

山杏核壳黑色素氨基酸修饰物的制备及性能分析

高莉¹, 刘琳琳¹, 王瑞琪¹, 樊靖宇¹, 赵英虎^{2*}, 赵邑³, 徐宏宇¹

(1. 中北大学 化学工程与技术学院, 山西 太原 030051; 2. 中北大学 环境与安全工程学院, 山西 太原 030051; 3. 山西省生物研究院有限公司, 山西 太原 030006)

摘要: 首先从废弃物山杏核壳中提取纯化得到黑色素, 然后对其进行了氨基酸修饰, 并对其制备条件进行了优化。接着对制得的氨基酸修饰山杏核壳黑色素的稳定性、水溶性和抗氧化性、抑菌性能及染色性能进行了评价。结果表明, L-精氨酸和 DL-精氨酸的修饰效果最好, 当黑色素与两种精氨酸最佳修饰质量比分别为 1 : 4.5 和 1 : 1.5 时, 氨基酸修饰的黑色素水溶性明显改善; 稳定性无较大变化; 经氨基酸修饰后的黑色素较好地保留了黑色素的生物活性。当黑色素溶液质量浓度为 0.20 g/L 时, 山杏核壳黑色素、L-精氨酸修饰黑色素、DL-精氨酸修饰黑色素及 V_C 对 ABTS 自由基的抑制率分别为 98.00%±3.46%、96.20%±2.16%、98.10%±1.97% 及 98.30%±2.12%。此外, L-精氨酸修饰黑色素的染色性能明显改善, 其最适染色条件为: 染色温度 70 °C, 质量浓度 0.08 g/L, 浴比 1 : 10 (g : mL), 染色次数 4 次。

关键词: 山杏核壳黑色素; 氨基酸修饰; 抗氧化作用; 抑菌作用; 染色; 生物工程

中图分类号: TQ28 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2022) 07-1393-09

Preparation and property of amino acid modified melanin derived from apricot kernel shells

GAO Li¹, LIU Linlin¹, WANG Ruiqi¹, FAN Jingyu¹, ZHAO Yinghu^{2*}, ZHAO Yi³, XU Hongyu¹

(1. School of Chemical Engineering and Technology, North University of China, Taiyuan 030051, Shanxi, China; 2. School of Environmental and Safety Engineering, North University of China, Taiyuan 030051, Shanxi, China; 3. Shanxi Biological Research Institute Co., Ltd., Taiyuan 030006, Shanxi, China)

Abstract: Melanin was extracted, purified from waste apricot kernel shells, and modified with different amino acids, of which preparation conditions were optimized. The compounds obtained were then evaluated from the aspects of stability, water solubility, antioxidant property, antimicrobial activity and dyeing performance. The results indicated that melanin modified by L-arginine and DL-arginine at a mass ratio of 1 : 4.5 and 1 : 1.5 (melanin to arginine) respectively exhibited significant improvement in water solubility while displayed similar performance in stability, antioxidant and bacteriostatic effects as the unmodified melanin. As the mass concentration of melanin solution was 0.20 g/L, the inhibition rates of apricot kernel shell melanin, L-arginine modified melanin, DL-arginine modified melanin and V_C against ABTS free radical were 98.00%±3.46%, 96.20%±2.16%, 98.10%±1.97% and 98.30%±2.12%, respectively. Moreover, dyeing performance of L-arginine modified melanin was greatly enhanced at conditions of dyeing temperature 70 °C, mass concentration 0.08 g/L, bath ratio 1 : 10 (g : mL), and dyeing times 4 times.

Key words: apricot kernel shell melanin; amino acid modification; antioxidation; bacteriostasis; dyeing; biological engineering

收稿日期: 2021-12-24; 定用日期: 2022-04-24; DOI: 10.13550/j.jxhg.20211317

基金项目: 山西省回国留学人员科研资助项目 (2020-118); 山西省重点研发计划项目 (201803D221013-4, 201903D221033); 医药生物技术山西省重点实验室开放课题基金资助 (KF202002); 2021 年山西省研究生创新项目 (2021Y599); 中北大学本科教育教学改革项目 (ZJ2020077)

作者简介: 高莉 (1980—), 女, 博士, 副教授, E-mail: gaoli@nuc.edu.cn. 联系人: 赵英虎 (1980—), 男, 博士, 讲师, E-mail: Zhaogao202005@163.com.

在化学工业中使用的黑色染料多为人工合成的, 其结构中含有具有一定毒性的偶氮基, 因此, 对皮肤无过敏性和致癌性的天然植物染料逐渐被研究者关注^[1-3]。当前, 食品中使用的黑色色素多为化学方法合成, 欧盟国家已实施了禁用化学合成黑色素的相关规定, 因此, 开发天然黑色素具有一定的现实意义^[4]。近年来, 利用黑色素制备染色剂和食品添加剂的研究已见报道^[5-7]。

黑色素是目前已知生物色素中使用最广泛的一类色素, 具有抗氧化、抗辐射、抑菌等生物学功能^[8-10], 但其一般不溶于水, 限制了其在食品、医药和化工等领域的应用, 因此, 提高黑色素的水溶性有重要意义。有研究利用氨基酸、多糖等分子结构修饰或通过羧甲基化修饰和硫酸酯化修饰来提高黑色素的水溶性^[11-13]。

YE 等^[14]研究发现, 经精氨酸等氨基酸修饰后的粒毛盘菌黑色素的水溶性明显改善, 其抗氧化活性明显提高。卢莹^[15]对辛格粒毛盘菌 YM296 黑色素进行了氨基酸(赖氨酸、组氨酸、精氨酸)修饰, 最终发现用组氨酸修饰的黑色素具有较高的水溶性, 推测可能是由于组氨酸与黑色素进行加成反应生成了组氨酸-黑色素。

山杏在中国广泛分布, 山杏核壳是杏仁加工过程中产生的下脚料, 除含木质素及黄酮类物质, 还含大量黑色素。李红姣等^[16]通过响应面实验确定了超声波辅助提取山杏种皮黑色素的工艺, 在此条件下黑色素得率为 4.14%。若将这一功能成分提取出来用于食品添加剂及染色剂等领域, 不仅节约资源, 还能创造巨大的经济价值^[17-18]。

本研究首先从山杏核壳中提取天然黑色素并利用具有不同亲水性与电荷的氨基酸(亲水带正电荷的 L-精氨酸、DL-精氨酸、L-组氨酸、L-赖氨酸; 亲水不带电荷的 L-天冬酰胺; 疏水的 L-甲硫氨酸)对其进行修饰, 以水溶性为指标选取具有最佳修饰效果的氨基酸并确定其最佳修饰质量比, 以期获得具有良好水溶性及稳定性的黑色素衍生物, 然后研究氨基酸修饰是否对其抑菌和抗氧化性等理化性质和生物活性产生影响, 最后探究了山杏核壳黑色素经 L-精氨酸修饰后的染色性能是否得到了改善, 为黑色素及其衍生物应用于食品、药品和化妆品等领域提供了理论基础。

1 实验部分

1.1 材料与试剂

山杏核壳, 山西省杏仁加工厂; NaOH、浓盐酸(质量分数为 36%)、H₂O₂(质量分数 30%), 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 无水乙醇, 分析

纯, 天津市光复科技发展有限公司; 1,1-二苯基-2-苦肼基(DPPH)、2,2'-氨基-二(3-乙基-苯并噻唑啉磺酸-6)铵盐(ABTS)、2,4,6-三吡啶基三嗪(TPTZ)、L-精氨酸、L-天冬酰胺、L-赖氨酸、L-甲硫氨酸(分析纯)、纤维素酶、糖化酶(生物试剂), 北京索莱宝科技有限公司; DL-精氨酸、L-组氨酸, 分析纯, 中国科学院上海生物化学研究所; 酵母粉、蛋白胨、氯化钠、琼脂条、三氯化铁、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、醋酸钠, 分析纯, 天津市大茂化学试剂厂; 邻二氮菲, 分析纯, 上海麦克林生化科技有限公司; 全棉纱布, 市售。

1.2 仪器与设备

400Y 高速粉碎机, 永康氏柏欧五金制品有限公司; SB-5200 DTDN 超声波清洗机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; TDL-5-A 高速离心机, 上海安亭科学仪器厂; PHS-3C 型酸度计, 杭州奥利龙有限公司; ReadMax 1900 光吸收全波长酶标仪, 上海闪谱生物科技有限公司; Perkin Elmer Spectrum Two 红外光谱分析仪, 天津市能谱科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 山杏核壳黑色素的提取与纯化

参考杨柳^[17]的实验方案, 采用碱溶酸沉法提取、纯化山杏核壳黑色素。具体步骤如下: 称取适量粉碎后的山杏核壳粉末, 过 20 目筛后按料液比 1 : 20 (g : mL) 溶于 2 mol/L 的 NaOH 溶液中, 静置提取 3 h 后离心除去固体; 之后, 使用循环水真空泵对液体抽滤, 将上清液用稀盐酸调 pH 至 2.2, 静置沉淀 2 h, 再离心, 除去上清液。向所得固体中加蒸馏水, 调其 pH 至 5.0 后, 加入一定量纤维素酶, 55 °C 水浴 1 h 后离心去除上清液, 再向所得固体中加蒸馏水, 调其 pH 至 4.5, 加入一定量糖化酶, 60 °C 水浴 1 h 后离心去除上清液。对两种酶处理后的固体按料液比为 1 : 30 (g : mL) 加入 2 mol/L 的 NaOH 溶液, 超声波辅助溶解 30 min, 酸沉(稀盐酸调 pH 至 2.2)后离心去除上清液, 60 °C 烘干后所得固体即为山杏核壳黑色素, 4 °C 保存。

1.3.2 氨基酸修饰山杏核壳黑色素的制备及优化

(1) 氨基酸修饰山杏核壳黑色素的制备

参考文献^[19]方法, 并稍作修改。分别取 0.05 g L-精氨酸、DL-精氨酸、L-组氨酸、L-天冬酰胺、L-赖氨酸、L-甲硫氨酸溶于 10 mL 蒸馏水制成质量浓度为 5 g/L 的水溶液, 再加入 0.01 g 山杏核壳黑色素, 超声 30 min, 离心去除未与氨基酸反应的山杏核壳黑色素, 测定上清液 500 nm 处的吸光度, 不添加氨基酸为空白对照, 通过比较各溶液的吸光度判断选取的具有不同亲水性与电荷的氨基酸对山杏核壳黑色素的修饰效果, 选取修饰效果最好的两种氨基酸修

饰山杏核壳黑色素,于40℃干燥处理后即为后续研究对象。

(2) 氨基酸的最佳修饰质量比优化

以氨基酸修饰山杏核壳黑色素水溶液在500 nm处的吸光度为指标,探究黑色素与氨基酸的最适质量比(分别为1:0.5、1:1.5、1:2.5、1:3.5、1:4.5、1:5.5)^[18]。以此条件制备得到的两种氨基酸修饰山杏核壳黑色素用于后续结构表征和性能测定。

1.4 结构表征与性能测定

1.4.1 结构表征

将山杏核壳黑色素溶于0.1 mol/L NaOH溶液中配成质量浓度为0.2 g/L的溶液,以0.1 mol/L NaOH溶液为参照。将两种氨基酸修饰山杏核壳黑色素溶于蒸馏水配成质量浓度为0.2 g/L的溶液,以蒸馏水为参照。在波长200~800 nm内进行全波段扫描后分析其UV-Vis吸收光谱^[20]。分别将山杏核壳黑色素及两种氨基酸修饰山杏核壳黑色素与适量溴化钾混匀压片,在波数4000~400 cm⁻¹内测定其红外光谱^[21]。

1.4.2 水溶性测定

分别取0.01 g样品溶于1 mL蒸馏水,摇匀后静置,观察溶解情况和溶液颜色^[22]。

1.4.3 稳定性测定

参考陈博文等^[23]的实验方法,稍作修改。以样品溶液[将0.25 mg山杏核壳黑色素溶于5 mL浓度为0.1 mol/L的NaOH溶液中;将0.25 mg氨基酸修饰山杏核壳黑色素溶于5 mL水中]在500 nm处的吸光度为指标,考虑到山杏核壳黑色素作为染色剂及食品添加剂的潜在应用场景,结合食品中允许的其他食品添加剂的添加量,分别研究温度(20、40、60、80、100℃)、pH(1.0、3.0、5.0、7.0、10.5分别代表强酸性、弱酸性、中性、碱性环境)、金属离子(浓度分别为0、0.05、0.25、0.50、0.75、1.00 mmol/L的Na⁺、Cu²⁺、Fe²⁺与Fe³⁺)、食品添加剂(质量浓度分别为0、0.10、0.25、0.50、1.00 g/L的蔗糖和柠檬酸)对样品稳定性的影响。

1.4.4 抗氧化活性测定

通过测定山杏核壳黑色素及其氨基酸修饰物(同浓度V_C溶液为阳性对照)对DPPH·、·OH和ABTS⁺的清除作用及对铁离子的还原能力来研究其抗氧化活性。

分别取0.02 mL不同质量浓度(0.1、0.4、0.8、1.2、1.6、1.8、2.0 g/L)样品溶液与0.18 mL DPPH无水乙醇溶液混匀,室温遮光放置30 min,无水乙醇调零,517 nm处测溶液吸光度。对照组用无水乙醇代替DPPH·溶液,空白组用蒸馏水代替样品溶液^[24]。按式(1)计算DPPH·清除率。

$$\text{DPPH}\cdot\text{清除率}/\%=[1-(A-A_g)/A_1]\times 100 \quad (1)$$

式中:A_g为对照组吸光度;A为实验组吸光度;A₁为空白组吸光度。

向反应管中依次加入1 mL邻二氮菲溶液、2 mL磷酸盐缓冲液(pH=7.4)、0.5 mL H₂O、5 mmol/L新配制的FeSO₄溶液1 mL、质量分数0.1%的H₂O₂ 1 mL,37℃水浴60 min,536 nm处测其吸光度(A_测)。对照组用1 mL H₂O代替H₂O₂溶液,实验组用5 mL样品溶液(质量浓度分别为0.2、0.4、0.8、1.2、1.6、1.8、2.0 g/L)代替H₂O,按式(2)计算·OH清除率。

$$\cdot\text{OH}\text{清除率}/\%=(A_{\text{样}}-A_{\text{测}})/(A_{\text{未}}-A_{\text{测}})\times 100 \quad (2)$$

式中:A_未为不含样品与H₂O₂溶液的吸光度;A_测为不含样品含H₂O₂溶液的吸光度;A_样为含样品和H₂O₂溶液的吸光度。

参考文献[25]实验方法,并稍作修改。分别加入样品溶液0.02 mL(质量浓度分别为0.005、0.025、0.05、0.10、0.15、0.20 g/L)、ABTS应用液(7 mmol/L ABTS与2.45 mol/L过硫酸钾溶液混合避光反应12~16 h得ABTS工作液,使用前用无水乙醇将ABTS工作液稀释为OD_{734 nm}=0.7±0.02的ABTS应用液)0.18 mL,室温避光旋涡振荡6 min,无水乙醇为对照组,734 nm处测吸光度,按式(3)计算ABTS⁺清除率。

$$\text{ABTS}^+\text{清除率}/\%=[(A_3-A_1+A_2)/A_3]\times 100 \quad (3)$$

式中:A₁为添加样品后溶液的吸光度;A₂为对照组用无水乙醇代替ABTS应用液的吸光度;A₃为ABTS应用液起始的吸光度。

参考文献[26]方法并稍作修改。将0.3 mol/L的醋酸钠缓冲液(pH=3.6)、10 mmol/L的TPTZ、20 mmol/L的三氯化铁溶液按体积比10:1:1配制FRAP工作液。取0.2 mL(质量浓度分别为0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40 g/L)样品溶液(同质量浓度V_C溶液为阳性对照)、6 mL FRAP工作液与0.6 mL H₂O混合后,于37℃水浴10 min,在593 nm处测其吸光度。以质量浓度为0.01~0.06 mg/L的FeSO₄标准溶液代替样品绘制标准曲线。根据所测溶液的吸光度和标准曲线回归方程计算得到对应的FeSO₄质量浓度(g/L),即为铁离子还原/抗氧化值(FRAP值)。

1.4.5 抑菌性能测定

通过观察黑色素、L-精氨酸-黑色素与DL-精氨酸-黑色素(后续样品名中黑色素均为山杏核壳黑色素)对大肠杆菌生物膜形成的抑制作用来评价其抑菌性能^[27]。在24孔板中放入10 mm×10 mm的玻璃片,每孔分别加入900 μL大肠杆菌菌液(1×10⁸ cfu/mL)及100 μL(质量浓度为1.28 g/L)黑色素、L-精氨酸-黑色素、DL-精氨酸-黑色素溶液,

再加入 1 mL 液体培养基 (酵母粉 0.5 g, 蛋白胨 1.0 g, 氯化钠 1.0 g, 蒸馏水定容至 100 mL, 高温高压灭菌 20 min), 空白对照为 1 mL 菌液, 37 °C 培养 24 h。玻璃片取出放于载玻片上, 无水乙醇溶解 1 min, 蒸馏水冲洗。番红染色 1 min, 蒸馏水冲洗去除多余染色液, 干燥后显微镜下观察。

1.4.6 染色性能测定

在前期实验基础上, 选择 L-精氨酸修饰黑色素进行染色性能的测定。参考丁芸等^[28]的方法, 使用手机软件实时取色器测试染后全棉纱布 *L* (亮度)、*a* (从红色至绿色的范围)、*b* (从蓝色至黄色的范围) 等色度指标, 固定染液 pH 为 7, 探究染色温度 (30、50、70 °C)、L-精氨酸修饰黑色素的质量浓度 (0.02、0.04、0.08 g/L)、浴比 [即全棉纱布质量 (g) 与染液体积 (mL) 之比, 分别为 1 : 10、1 : 20、1 : 30]、染色次数 (2、3、4 次) 对 L-精氨酸修饰黑色素染色性能的影响, 从而确定最佳染色条件。

1.4.7 数据处理与分析

所有数据经 SPSS 25 统计软件处理后用平均值±标准差表示, *t* 检验分析显著性差异。结果图中不同小写字母表示组内有显著差异 ($p < 0.05$); 不同大写字母表示组间有显著差异 ($p < 0.05$)。

2 结果与讨论

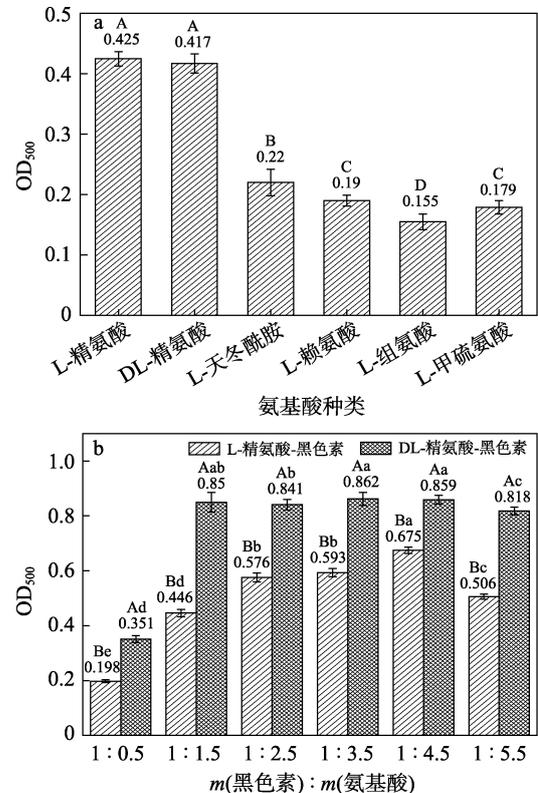
2.1 山杏核壳黑色素氨基酸修饰物的制备条件优化

不同种类氨基酸修饰山杏核壳黑色素溶液的吸光度如图 1a 所示。由图 1a 可知, 经 L-精氨酸、DL-精氨酸修饰后黑色素溶液的吸光度相近且较大, 由此可知, L-精氨酸、DL-精氨酸的修饰效果较好, 这与汪燕^[1]的研究结果一致, 原因可能是精氨酸和山杏核壳黑色素进行加成反应生成了精氨酸-黑色素, 还可能与几种氨基酸的亲水性强弱有关, 精氨酸在中性条件下为带正电荷的极性氨基酸^[29], 因此, 后续选择 L-精氨酸及 DL-精氨酸修饰黑色素并探究精氨酸与山杏核壳黑色素最佳质量比。

不同质量比 L-精氨酸和 DL-精氨酸修饰黑色素溶液的吸光度如图 1b 所示。黑色素与 L-精氨酸质量比在 1 : 0.5~1 : 4.5 时, 溶液吸光度随 L-精氨酸质量的增大而增大; 当黑色素与 L-精氨酸质量比为 1 : 5.5 时溶液吸光度降低。当黑色素与 L-精氨酸质量比为 1 : 4.5 时, 溶液的吸光度达到最大值, 溶液水溶性最佳。因此, 选择黑色素与 L-精氨酸质量比为 1 : 4.5。

由图 1b 还可看出, 黑色素与 DL-精氨酸质量比在 1 : 0.5~1 : 1.5 时, 溶液吸光度随 DL-精氨酸质量的增大而增大; 黑色素与 DL-精氨酸质量比在 1 :

1.5~1 : 5.5 时, 溶液的吸光度较平稳。考虑到节约 DL-精氨酸用量, 选择黑色素与 DL-精氨酸最佳质量比为 1 : 1.5。分别以最佳质量比制备的两种氨基酸修饰山杏核壳黑色素用于后续性能测试实验。



注: 不同小写字母表示组内有显著差异 ($p < 0.05$); 不同大写字母表示组间有显著差异 ($p < 0.05$), 下同。

a—不同氨基酸的影响; b—黑色素与 L-精氨酸、DL-精氨酸的不同质量比的影响

图 1 氨基酸修饰山杏核壳黑色素最佳条件的确定
Fig. 1 Determination of optimal conditions for amino acid modification of apricot kernel shell melanin

2.2 UV-Vis 分析

山杏核壳黑色素及两种氨基酸修饰黑色素的 UV-Vis 谱图如图 2 所示。

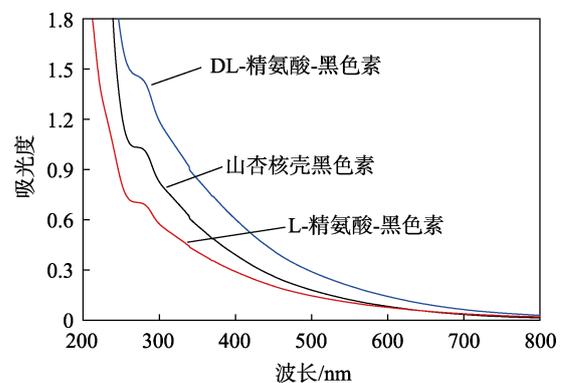


图 2 氨基酸修饰山杏核壳黑色素的 UV-Vis 谱图
Fig. 2 UV-Vis spectra of melanin in apricot kernel shell modified by amino acids

由图2可见,山杏核壳黑色素随波长的增加,吸光度逐渐下降,这是由于山杏核壳黑色素分子中存在较多的复杂共轭结构。在270~280 nm内均有一较弱肩峰,这与山杏核壳黑色素的紫外特征峰一致^[30]。虽然经两种氨基酸修饰后的UV-Vis谱图与山杏核壳黑色素的吸光度发生了改变,但随着波长的增加,吸光度均呈下降趋势,无明显吸收峰峰形的变化,因此,山杏核壳黑色素经氨基酸修饰后未改变其紫外光谱特征。

2.3 红外光谱分析

山杏核壳黑色素及两种氨基酸修饰黑色素的红外谱图如图3所示。

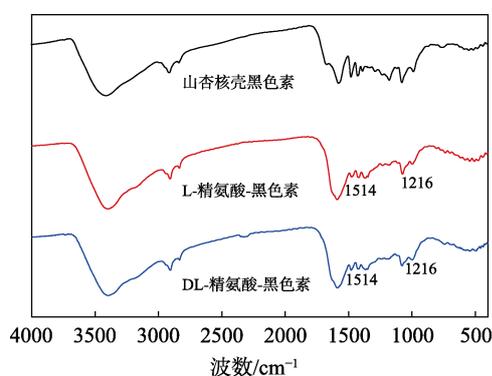


图3 山杏核壳黑色素及其氨基酸修饰物的FTIR谱图
Fig. 3 FTIR spectra of apricot kernel shell melanin and its amino acid modifiers

图3中,山杏核壳黑色素在3396 cm^{-1} 处吸收峰宽且强,说明山杏核壳黑色素的结构中含有羟基($-\text{OH}$)和氨基($-\text{NH}_2$),同时该区域也属于 $\text{C}=\text{O}$ 的伸缩振动吸收峰^[31];2832 cm^{-1} 处小而尖的峰,说明有脂肪族 $\text{C}-\text{H}$,可能为 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ 结构^[32];1411 cm^{-1} 处有很强的吸收峰,属于苯环上 $\text{C}=\text{C}$ 键的伸缩振动吸收峰^[33];1652 cm^{-1} 处强吸收峰说明有羧基($-\text{COOH}$)结构的存在,与3400 cm^{-1} 处的强吸收峰共同指示羧酸根的存在^[34];860~650 cm^{-1} 范围吸收带较弱,表明芳环被取代,形成共轭体系,芳氢相对减少^[35]。综上所述,山杏核壳黑色素含有羟基、羧基、氨基、烷基和苯环等官能团,而且苯环上的多数氢被取代。两种氨基酸修饰后的山杏核壳黑色素的红外谱图相似,但与山杏核壳黑色素有所区别。氨基酸修饰后的黑色素在1514 cm^{-1} 处有两种氨基酸胍基的 $\text{C}=\text{N}$ 伸缩振动吸收峰,在1216 cm^{-1} 处有两种氨基酸上 $-(\text{CH}_2)_3-$ 的 $\text{C}-\text{H}$ 弯曲振动吸收峰,这说明两种氨基酸都成功修饰了山杏核壳黑色素,形成了氨基酸-黑色素分子^[25]。

2.4 水溶性分析

山杏核壳黑色素及两种氨基酸修饰黑色素的水溶性测试结果见表1。山杏核壳黑色素不溶于蒸馏

水,与其他典型的黑色素非常相似,经L-精氨酸或DL-精氨酸修饰后的黑色素易溶于蒸馏水,溶液呈黑色且无黑色素固体颗粒。说明山杏核壳黑色素经L-精氨酸或DL-精氨酸修饰后水溶性提高,这可能是因为这两种氨基酸结构中有较多的亲水基团^[29]。

表1 山杏核壳黑色素及其氨基酸修饰物水溶性
Table 1 Water solubility of apricot kernel shell melanin and its amino acid modifiers

山杏核壳黑色素	L-精氨酸-黑色素	DL-精氨酸-黑色素
水溶性	-	++
图片		

注:“-”表示难溶;“+”表示较易溶;“++”表示易溶。

2.5 稳定性分析

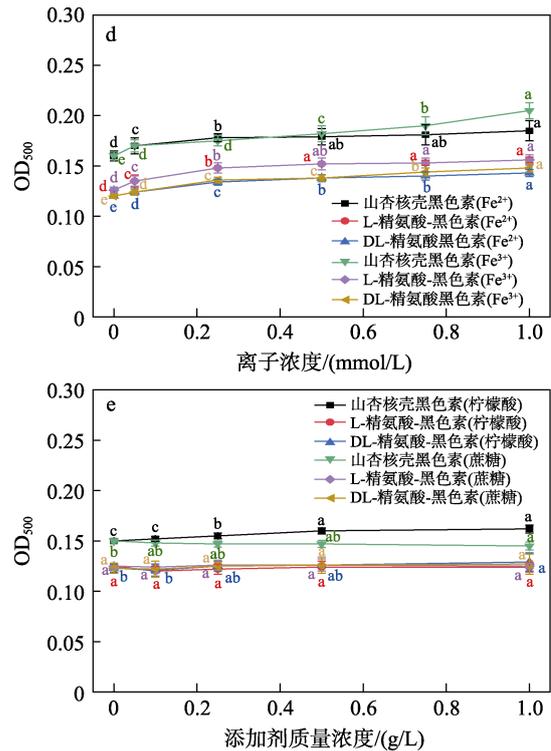
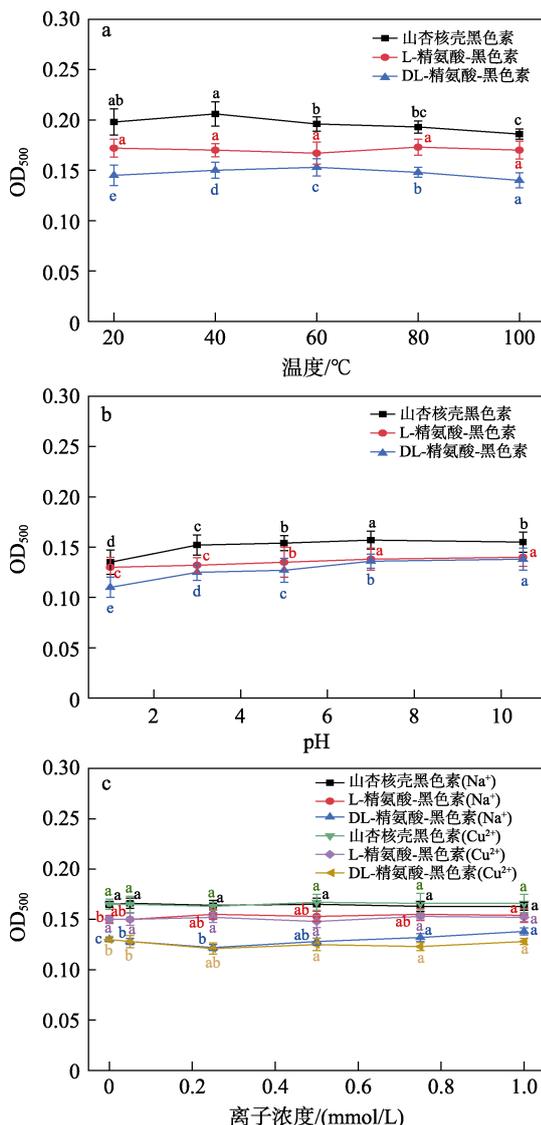
山杏核壳黑色素及两种氨基酸修饰黑色素的热稳定性测试结果如图4a所示。温度为20~80 $^{\circ}\text{C}$ 时,山杏核壳黑色素及L-精氨酸或DL-精氨酸修饰后的山杏核壳黑色素的吸光度几乎没有变化,说明温度较低时对三者几乎没有影响;温度大于80 $^{\circ}\text{C}$ 后,三者吸光度降低较为明显,且L-精氨酸和DL-精氨酸修饰后的黑色素吸光度变化较大。说明温度较高时对山杏核壳黑色素及其氨基酸修饰物的稳定性有影响,且温度过高对氨基酸的影响较大,导致氨基酸修饰后的黑色素在高温下的吸光度变化更大。总体来看,在一定温度范围内,山杏核壳黑色素和两种氨基酸-黑色素有较好的耐热性。

pH对山杏核壳黑色素及两种氨基酸修饰黑色素稳定性的影响如图4b所示。三者**在强酸性环境(pH 1)下吸光度较低,但在弱酸性(pH 3~5)、中性(pH 7)及碱性(pH 10.5)环境中的吸光度较高且相近,说明山杏核壳黑色素及其氨基酸修饰物在强酸性环境中的稳定性略差,但弱酸性、中性及碱性环境对其稳定性无影响,这与李红姣等^[16]所测山杏种皮黑色素在酸碱性环境中的性质相似。这可能是因为黑色素在强酸性溶液中产生了较少沉淀,而导致其吸光度较低。当在食品工业中添加山杏核壳黑色素及其氨基酸修饰物时要尽量避免应用于强酸性环境。**

不同浓度的金属离子对山杏核壳黑色素及两种氨基酸修饰黑色素稳定性的影响如图4c、d所示。Na⁺浓度在0~0.2 mmol/L内变化时对三者的稳定性均无较大影响,Cu²⁺、Fe²⁺与Fe³⁺浓度在0~0.2 mmol/L内变化时,山杏核壳黑色素溶液的吸光度均增大,表明Cu²⁺、Fe²⁺与Fe³⁺对三者均有增色作用,这与

李红姣等^[16]所测金属离子对山杏种皮的影响一致。且溶液中加入 Cu^{2+} 与 Fe^{2+} 后的增色程度相近, 这可能是由于山杏核壳黑色素及其氨基酸修饰物对 Cu^{2+} 与 Fe^{2+} 的结合能力相近; 当溶液中加入 Fe^{3+} 后, 三者的吸光度均有了较大提高, 这可能是由于三者对 Fe^{3+} 的结合能力较强, 且结合 Fe^{3+} 后, 山杏核壳黑色素的增色程度大于其氨基酸修饰物, 这可能是由于山杏核壳黑色素经氨基酸修饰后使其铁结合位点减少而导致铁结合能力降低。由此可知, Na^+ 对山杏核壳黑色素及其氨基酸修饰物的稳定性均无较大影响; Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 对其稳定性有影响。因此, 当添加山杏核壳黑色素或其氨基酸修饰物时可考虑利用 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 的助色作用来提高其染色性能; 当应用于食品工业时, 应尽量避免用这些金属容器保存或添加乙二胺四乙酸 (EDTA) 等金属螯合剂以避免金属离子对其稳定性的影响。

不同质量浓度的蔗糖与柠檬酸对山杏核壳黑色素及两种氨基酸修饰黑色素的稳定性测试结果如图 4e 所示。



a—温度; b—pH; c— Na^+ 、 Cu^{2+} ; d— Fe^{2+} 、 Fe^{3+} ; e—柠檬酸、蔗糖

图 4 不同因素对山杏核壳黑色素及其氨基酸修饰物稳定性的影响

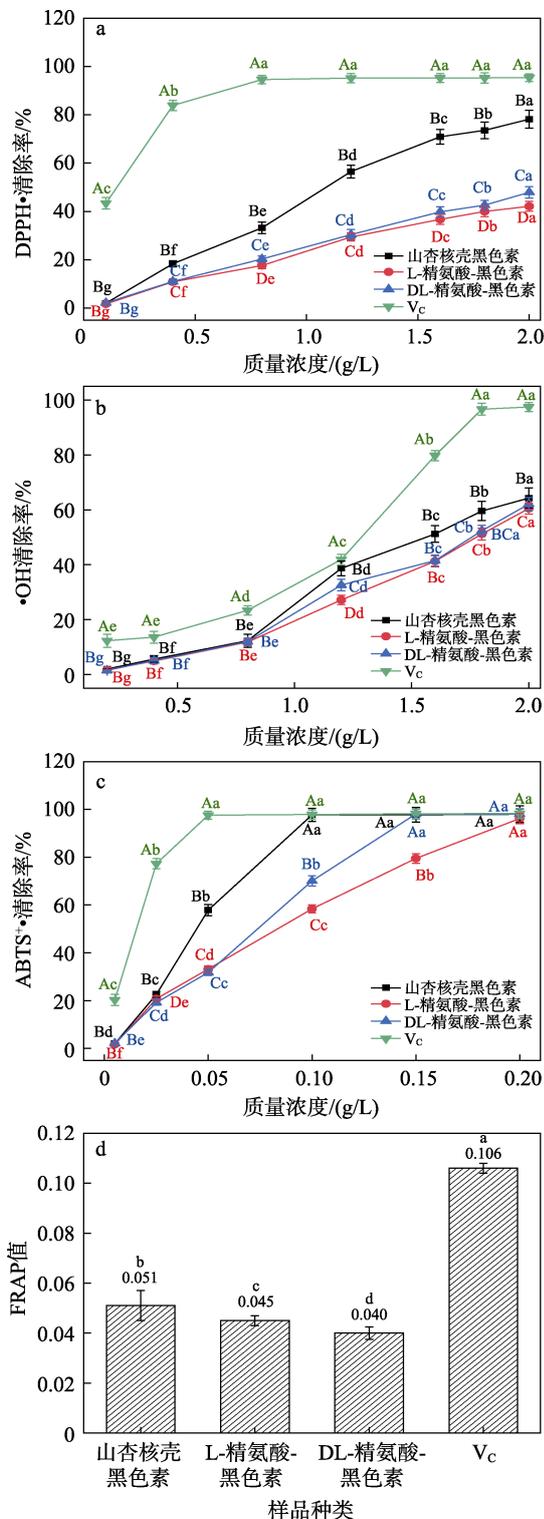
Fig. 4 Effects of different factors on the stability of apricot kernel shell melanin and its amino acid modifiers

可以看出, 当蔗糖与柠檬酸质量浓度在 0~0.2 g/L 内变化时, 山杏核壳黑色素及 L-精氨酸-黑色素、DL-精氨酸-黑色素溶液的吸光度均无较大变化。由此说明, 蔗糖和柠檬酸对山杏核壳黑色素及其氨基酸修饰物的稳定性均无较大影响。在食品工业中, 蔗糖和柠檬酸通常用作食品添加剂。因此, 当添加山杏核壳黑色素或其氨基酸修饰物时可添加蔗糖和柠檬酸。

2.6 抗氧化活性分析

不同质量浓度 V_C 、山杏核壳黑色素及两种氨基酸修饰黑色素的抗氧化活性如图 5 所示。4 种样品对几种自由基的清除率均呈浓度依赖性, 清除自由基顺序为 V_C >山杏核壳黑色素>DL-精氨酸-黑色素>L-精氨酸-黑色素。当黑色素溶液质量浓度为 0.20 g/L 时, 山杏核壳黑色素、L-精氨酸-黑色素、DL-精氨酸-黑色素及 V_C 对 ABTS 自由基的抑制率分别为 $98.00\% \pm 3.46\%$ 、 $96.20\% \pm 2.16\%$ 、 $98.10\% \pm 1.97\%$ 及 $98.30\% \pm 2.12\%$ 。黑色素具有较强的清除自由基能力, 这可能是因为其具有氧化性 (邻醌) 和还原性 (邻对苯二酚) 基团, 在电子转移过程中失去或俘获电子以清除自由基; 另外, 由于官能团之间可能会产生协同作用, 从而使黑色素整体的抗氧化活性更强^[36-37]。经 DL-精氨酸及 L-精氨酸修饰后的两种黑

色素衍生物的抗氧化性几乎没有区别, 且都较黑色素有所降低, 这可能是因为氨基酸和黑色素作用时, 对二苯酚/苯醌结构转换而失去电子, 降低了其清除自由基的活性^[38]。



a—对 DPPH•的清除作用; b—对•OH 的清除作用; c—对 ABTS•+ 的清除作用; d—FRAP 值
图 5 VC、山杏核壳黑色素及其氨基酸修饰物的抗氧化作用

Fig. 5 Antioxidant activities of VC, apricot kernel shell melanin and its amino acid modifiers

2.7 抑菌性能分析

山杏核壳黑色素及两种氨基酸修饰黑色素的抑菌活性如图 6 所示。当黑色素质量浓度为 1.28 g/L 时, 山杏核壳黑色素对大肠杆菌生物膜的抑制作用较明显, 基本可完全抑制大肠杆菌生物膜形成; 同质量浓度的 L-精氨酸-黑色素与 DL-精氨酸-黑色素对大肠杆菌生物膜的抑制作用也均较明显, 且 L-精氨酸-黑色素的抑制作用强于 DL-精氨酸-黑色素。由此可知, 山杏核壳黑色素经 L-精氨酸与 DL-精氨酸修饰后对大肠杆菌生物膜仍有较强抑菌作用, 无明显变化。研究表明, 杀灭大于 48 h 的生物膜抗生素剂量需 5000 倍以上, 人体无法承受如此大剂量的抗生素^[39]。山杏核壳黑色素及其 L-精氨酸与 DL-精氨酸修饰物使大肠杆菌不能形成成熟的生物膜, 进而杀死细菌, 以期在使用低剂量的抗生素条件下达到治疗的目的^[40-41]。

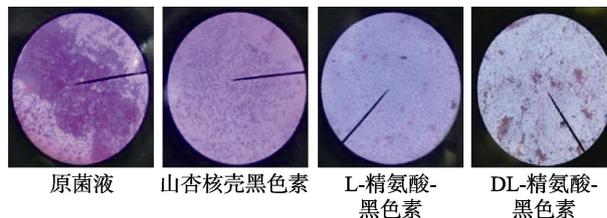


图 6 山杏核壳黑色素及其氨基酸修饰物对大肠杆菌生物膜的抑制效果

Fig. 6 Inhibitory effect of apricot kernel shell melanin and its amino acid modifiers on *E. coli* biofilm

2.8 染色性能分析

山杏核壳黑色素及 L-精氨酸修饰黑色素的染色结果如表 2~5 所示。

表 2 温度对染色效果的影响

Table 2 Effect of temperature of sample on dyeing effect

	山杏核壳黑色素			L-精氨酸-黑色素		
	30 °C	50 °C	70 °C	30 °C	50 °C	70 °C
染色 实图						
色 值	<i>L</i> 62.931	59.437	58.577	19.910	18.610	17.760
	<i>a</i> -1.746	1.362	0.970	0.540	-1.130	-1.410
	<i>b</i> 20.443	22.909	22.827	-2.700	-3.310	-2.700

注: 其他染色条件为样品质量浓度 0.04 g/L, 浴比 1 : 20, 染色次数 3 次。

L 为亮度, 该值越大, 样品越亮, *L* 越小说明染色效果越好; *a* 为红绿色偏向程度, 正值越大, 越偏向红色, 负值越大, 越偏向绿色; *b* 为黄蓝色偏向程度, 正值越大, 越偏向黄色, 负值越大, 越偏向蓝色。由表 2~5 可看到, L-精氨酸-黑色素处理组的 *L* 值均明显低于同处理条件下山杏核壳黑色素处理组, 说明黑色素经 L-精氨酸修饰后的染色效果明

显改善。L-精氨酸-黑色素处理组与同处理条件下山杏核壳黑色素处理组 a 值的变化范围均较小, 说明全棉纱布的红绿色变化程度不大。山杏核壳黑色素处理组 b 值整体均明显高于同处理条件下的 L-精氨酸-黑色素组 b 值, 且多为正值, 说明其整体偏向于黄色。

表 3 样品质量浓度对染色效果的影响
Table 3 Effect of mass concentration on dyeing effect

	山杏核壳黑色素			L-精氨酸-黑色素		
	0.02 g/L	0.04 g/L	0.08 g/L	0.02 g/L	0.04 g/L	0.08 g/L
染色 实图						
L	65.504	59.704	58.960	21.220	16.310	15.740
a	-2.037	-0.740	0.958	-2.650	0.040	0.990
b	19.616	20.414	22.797	-1.420	-2.570	-0.900

注: 其他染色条件为染色温度 70 °C, 浴比 1 : 20, 染色次数 3 次。

表 4 浴比 (g : mL) 对染色效果的影响
Table 4 Effect of bath ratio (g : mL) on dyeing effect

	山杏核壳黑色素			L-精氨酸-黑色素		
	1 : 10	1 : 20	1 : 30	1 : 10	1 : 20	1 : 30
染色 实图						
L	53.585	56.671	56.672	17.710	17.940	18.270
a	3.329	2.861	1.862	-1.600	-1.150	-0.470
b	19.906	14.46	13.054	1.630	1.620	1.780

注: 其他染色条件为染色温度 70 °C, 样品质量浓度 0.08 g/L, 染色次数 3 次。

表 5 染色次数对染色效果的影响
Table 5 Effect of dyeing times on dyeing effect

	山杏核壳黑色素			L-精氨酸-黑色素		
	2 次	3 次	4 次	2 次	3 次	4 次
染色 实图						
L	71.728	64.701	54.586	18.870	18.710	13.770
a	-2.203	-1.945	3.494	-0.460	-1.120	-2.070
b	15.255	16.244	22.825	1.290	0.330	0.040

注: 其他染色条件为染色温度 70 °C, 样品质量浓度 0.08 g/L, 浴比 1 : 10。

由表 2 可明显看到, 随着染色温度的升高, L-精氨酸-黑色素处理组全棉纱布的明亮度 L 呈下降趋势。这可能是因为温度升高, L-精氨酸-黑色素分子的热运动加剧, 在水中的溶解度增大, 且全棉纱布纤维大分子链运动也会加剧, 使全棉纱布上的纤维扩散更容易, 上染速率更快^[26]。 a 值逐渐降低, 但变化范围较小, 说明染色的全棉纱布略微向绿色偏

移; b 值大小略有变化后趋于平衡, 说明全棉纱布的黄蓝色变化不大。因此, 确定最适染色温度为 70 °C。

由表 3 可见, 随着 L-精氨酸-黑色素质量浓度的增加, 全棉纱布的明亮度 L 降低, 这是因为提取染料用量增加到一定值后, 逐渐接近上染饱和, 染色趋向于平衡; a 逐渐增大, 但变化范围较小, 说明染色的全棉纱布略微向绿色偏移; b 减小至一定值后稍有增加, 说明全棉纱布的黄蓝色变化不大。因此, 质量浓度选择为 0.08 g/L。

由表 4 可见, 随着浴液比例的升高, L-精氨酸-黑色素处理组全棉纱布的明亮度 L 增加, 这可能是因为 L-精氨酸-黑色素的占比逐渐降低, 染色效果下降; a 缓慢增大, 但均为负值, 说明全棉纱布仍偏绿色, 但绿色偏移情况逐渐减弱; b 缓慢增大, 但变化范围较小, 说明全棉纱布的黄蓝色变化不大。因此, 确定最适浴比为 1 : 10。

由表 5 可见, 随着染色次数逐渐增多, L-精氨酸-黑色素处理组全棉纱布的明亮度 L 降低, 随着染色次数的增加, 固着在全棉纱布上的 L-精氨酸-黑色素染料达到平衡, 染色也趋于稳定^[42]; a 逐渐降低, 但均为负值, 说明全棉纱布向绿色偏移; b 逐渐降低, 但均为正值, 说明全棉纱布仍偏黄色, 但黄色偏移情况逐渐减弱。因此, 确定最适染色次数为 4 次。

3 结论

(1) 采用 6 种氨基酸分别对山杏核壳黑色素进行修饰, 发现其水溶性均有不同程度的增加。其中, L-精氨酸与 DL-精氨酸对黑色素的修饰效果最好, 黑色素与两种氨基酸最佳质量比分别为 1 : 4.5 与 1 : 1.5。

(2) 稳定性实验结果表明, 温度对山杏核壳黑色素、L-精氨酸修饰山杏核壳黑色素与 DL-精氨酸修饰山杏核壳黑色素的稳定性无较大影响; 三者**在强酸性环境中的稳定性略差, 但弱酸性、中性及碱性环境对其稳定性无影响**; Na^+ 对三者稳定性无较大影响, Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 与 Fe^{3+} 对其有增色作用; 蔗糖、柠檬酸两种食品添加剂对三者稳定性无较大影响; 抗氧化及抑菌实验结果表明, 经氨基酸修饰后的黑色素较好地保留了黑色素的生物活性; 山杏核壳黑色素经 L-精氨酸修饰后的染色性能得到了明显改善, 其染色全棉纱布的最适条件为: 染色温度 70 °C、L-精氨酸修饰山杏核壳黑色素的质量浓度 0.08 g/L、浴比 1 : 10、染色次数 4 次。

(3) 本研究制备的黑色素衍生物具有良好的水溶性, 为山杏核壳黑色素作为天然染色剂和食品添加剂在食品和化妆品行业中的应用提供了重要依据。

参考文献:

- [1] WANG X X (王雪雪). Development of dung beetle melanin hair dye[D]. Mianyang: Southwest University of Science and Technology, (西南科技大学), 2018.
- [2] FANG Y M (方玉梅), ZHANG P (张萍), WANG Y H (王毅红), *et al.* Study on biological activity of melanin from leaves of sweetgum in Guizhou[J]. Food Research and Development (食品研究与开发), 2015, 36(14): 36-40.
- [3] LI W (李玮). Study on the correlation between jinggangmycin and melanin produced by *Streptomyces bibulus* 5008[D]. Hangzhou: Zhejiang University (浙江大学), 2015.
- [4] JU J J (巨俊俊). Study on active components and mechanism of sesame melanin black hair[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University (郑州大学), 2020.
- [5] LI H J, LI J X, ZHAO Z. Characterization of melanin extracted from apricot (*Armeniaca sibirica*) and its effect on hydrazine-induced rat hepatic injury[J]. Scienceasia, 2016, 42(6): 382-391.
- [6] LIU C (刘超). Study on preparation technology of hair dye gardenia black[D]. Changsha: Hunan University of Chinese Medicine (湖南中医药大学), 2019.
- [7] WANG Y (汪洋), DONG W F (东为富). Structure, properties and application of melanin in nano-composite materials[J]. Materials China (中国材料进展), 2019, 38(5): 470-477.
- [8] SHANKAR S, WANG L F, RHIM J W. Effect of melanin nanoparticles on the mechanical, water vapor barrier, and antioxidant properties of gelatin-based films for food packaging application[J]. Food Packaging and Shelf Life, 2019, 21: 100363.
- [9] ROY S, RHIM J W. Carrageenan-based antimicrobial bionanocomposite films incorporated with ZnO nanoparticles stabilized by melanin[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 90(5): 500-507.
- [10] NAGGAR E A, EWASY S M. Bioproduction, characterization, anticancer and antioxidant activities of extracellular melanin pigment produced by newly isolated microbial cell factories *Streptomyces glaucescens* NEAE-H[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 42129.
- [11] WANG Y (汪燕). Study on structure, amino acid modification and biological activity of YM-346 melanin from *Trichoderma granuloides*[D]. Hefei: Hefei University of Technology (合肥工业大学), 2012.
- [12] YE Z, LU Y, ZONG S, *et al.* Structure, molecular modification and anti-tumor activity of melanin from *Lachnum singerianum*[J]. Process Biochemistry, 2019, 76: 203-212.
- [13] XIE W, PAKDEL E, LIANG Y, *et al.* Natural eumelanin and its derivatives as multifunctional materials for bioinspired applications: A review[J]. Biomacromolecules, 2019, 20(12): 4312-4331.
- [14] YE M, WANG Y, GUO G Y, *et al.* Physicochemical characteristics and antioxidant activity of arginine-modified melanin from *Lachnum* YM-346[J]. Food Chemistry, 2012, 135(4): 2490-2497.
- [15] LU Y (卢莹). Structure characterization, amino acids modification and bioactivities of melanin from *Lachnum singerianum*[D]. Hefei: Hefei University of Technology (合肥工业大学), 2014.
- [16] LI H J (李红姣), LI J X (李巨秀), ZHAO Z (赵忠). Optimization and stability of enzymatic assisted extraction of melanin from seed coat of apricot[J]. Food Science (食品科学), 2016, 37(10): 69-75.
- [17] YANG L (杨柳). Preparation and properties of melanin nanoparticles in apricot kernel shell[D]. Taiyuan: North University of China (中北大学), 2019.
- [18] FRANCISCO S. Melanin and melanin-related polymers as materials with biomedical and biotechnological applications-cuttlefish ink and mussel foot proteins as inspired biomolecules[J]. Scientific Reports, 2017, 18: 1561.
- [19] LI J (李俊). Preparation and properties of ganoderma lucidum melanin derivatives[D]. Taiyuan: Shanxi Agricultural University (山西农业大学), 2019.
- [20] WANG L F, RHIM J W. Isolation and characterization of melanin from black garlic and sepia ink[J]. LWT, 2019, 99: 17-23.
- [21] VARGA M, BERKESI O, DARULA Z, *et al.* Structural characterization of allomelanin from black oat[J]. Phytochemistry, 2016, 130: 313-320.
- [22] HAN Z B (韩宗博), QI K J (戚克进), ZHAN Y L (展亚莉), *et al.* Different food additives enhance the thermal stability of the two water-soluble natural pigments[J]. Food Industry (食品工业), 2021, 42(4): 277-280.
- [23] CHEN B W (陈博文), ZHANG X L (张小林), SUN X R (孙晓瑞), *et al.* Isolation, identification, stability and antioxidant activity of melanin in *Pleurotus cylindrical*[J]. Acta Edulis Fungi (食用菌学报), 2017, 24(3): 57-62.
- [24] LIU R (刘瑞), YU Z L (于章龙), SUN Y L (孙元琳), *et al.* Study on extraction and antioxidant activity of antioxidant components from black wheat bud[J]. Food Industry (食品工业), 2021, 42(7): 134-138.
- [25] YU Z L (于章龙), LIU R (刘瑞), SONG Y (宋昱), *et al.* Extraction of antioxidant active components from black wheat bran and evaluation of antioxidant capacity[J]. Science and Technology of Cereals (粮油食品科技), 2021, (7): 71-76.
- [26] XIN C, MA J H, TAN C J, *et al.* Preparation of melanin from *Catharsius molossus* L. and preliminary study on its chemical structure[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2015, 119 (4): 446-454.
- [27] XU C, LI J, YANG L, *et al.* Antibacterial activity and a membrane damage mechanism of *Lachnum* YM30 melanin against *Vibrio parahaemolyticus* and *Staphylococcus aureus*[J]. Food Control, 2017, 73(1): 1445-1451.
- [28] DING Y (丁芸), LIU Y M (刘玉梅). Study on dyeing properties of ethanol extract of green walnut husk on cotton fabric[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2016, 33(11): 1278-1286.
- [29] ZHANG L (张麟), SUN Y (孙彦), GUO X C (郭小翠). The invention discloses a method and application for self-assembly of auxiliary virus-like particles by introducing positive and negative charge: CN106636016B[P]. 2017-02-24.
- [30] PRALEA I E, MOLDOVAN R C, PETRACHE A M, *et al.* From extraction to advanced analytical methods: The challenges of melanin analysis[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(16): 3943.
- [31] XU C (徐灿). Bioactivity and mechanism of melanin and its derivatives[D]. Hefei: Hefei University of Technology (合肥工业大学), 2017.
- [32] CHO S, PARK W, KIM D H. Silica-coated metal chelating-melanin nanoparticles as a dual-modal contrast enhancement imaging and therapeutic agent[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2017, 9(1): 101-111.
- [33] LONGO D L, STEFANIA R, CALLARI C, *et al.* Water soluble melanin derivatives for dynamic contrast enhanced photoacoustic imaging of tumor vasculature and response to antiangiogenic therapy[J]. Advanced Healthcare Materials, 2017, 6(1): 1-6.
- [34] DISCHIA M, NAPOLITANO A, PEZZELLA A, *et al.* Melanin biopolymers: Tailoring chemical complexity for materials design[J]. Angewandte Chemie, 2020, 59(28): 11196-11205.
- [35] BATAL A I, SAYYAD G S, GHAMERY A, *et al.* Response surface methodology optimization of melanin production by *Streptomyces cyaneus* and synthesis of copper oxide nanoparticles using gamma radiation[J]. Journal of Cluster Science, 2017, 28(3): 1083-1112.
- [36] ROY S, RHIM J W. New insight into melanin for food packaging and biotechnology applications[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2021, (1): 1-27.
- [37] LIU Y L, AI K L, JI X Y, *et al.* Comprehensive insights into the multi-antioxidative mechanisms of melanin nanoparticles and their application to protect brain from injury in ischemic stroke[J]. J Am Chem Soc, 2016, 139(2): 856-862.
- [38] USHAKOVA N A, DONTSOV A E, MARSOVA M V, *et al.* Antioxidant properties of an extract of hermetia illucens larvae[J]. Biology Bulletin, 2021, 48(2): 118-121.
- [39] XU Y A (徐炎安). Preliminary study on the effect of synthetic antimicrobial peptides against *Escherichia coli*. biofilm[D]. Chongqing: Chongqing Medical University (重庆医科大学), 2009.
- [40] KIRAN G S, JACKSON S A, PRIYADHARSINI S, *et al.* Synthesis of Nm-PHB (nanomelanin-polyhydroxy butyrate) nanocomposite film and its protective effect against biofilm-forming multi drug resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 9167.
- [41] LAXMI M, KURIAN N K, SMITHA S, *et al.* Melanin and bacteriocin from marine bacteria inhibit biofilms of foodborne pathogens[J]. Indian Journal of Biotechnology, 2016, 15(3): 392-399.
- [42] THIERRY D M, LLINE S, KAREN H, *et al.* Halochromic properties of sulfonphthaleine dyes in a textile environment: The influence of substituents[J]. Dyes and Pigments, 2016, 124: 249-257.