

银耳菌糠黑色素的理化性质及抗氧化和抑菌活性

罗星¹, 李晓敏^{1,2}, 薛帆正¹, 蔡强¹, 朱雪峰³, 吴小平^{1,2}, 傅俊生^{1,2*}

1 福建农林大学生命科学学院, 福建 福州 350002

2 福建农林大学菌物研究中心, 福建 福州 350002

3 西藏自治区农牧科学院蔬菜研究所, 西藏 拉萨 850000

摘要: 银耳菌糠中存在一种银耳的伴生菌——炭团菌(俗称香灰菌), 其菌丝生长到一定阶段后会生成大量的黑色素, 具有广泛的应用价值。本研究从银耳菌糠中提取黑色素, 研究其理化性质、抗氧化活性及抑菌作用。通过紫外-可见光谱、傅里叶红外光谱对提取的黑色素进行鉴定, 表明银耳菌糠黑色素具有黑色素的典型特征。通过对银耳菌糠黑色素理化性质的研究, 表明银耳菌糠黑色素是一种趋于黑色并略带红色和黄色的粉末; 该黑色素易溶于碱性溶液; 具有较好的热稳定性和光稳定性, 其稳定性受氧化剂和还原剂的影响较小, 受 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 的影响较明显。通过总抗氧化能力(FRAP 法)、自由基清除能力检测银耳菌糠黑色素的抗氧化活性, 研究表明黑色素具有较高的抗氧化活性, 羟自由基、ABTS 自由基清除的 EC_{50} 值分别为 0.429 mg/mL 和 0.016 mg/mL。本研究还检测了黑色素对革兰氏阳性、革兰氏阴性细菌的抑菌能力, 结果表明该黑色素在浓度为 3.2 mg/mL 时对供试菌株的抑菌率超过 90%, 且对革兰氏阳性菌会较敏感。本研究为银耳菌糠的有效利用及其黑色素产品的开发提供了理论基础, 具有较高的经济价值。

关键词: 银耳菌糠; 黑色素; 稳定性; 自由基清除能力; 抑菌率; 最低抑菌浓度

[引用本文]

罗星, 李晓敏, 薛帆正, 蔡强, 朱雪峰, 吴小平, 傅俊生, 2023. 银耳菌糠黑色素的理化性质及抗氧化和抑菌活性. 菌物学报, 42(2): 539-552

Luo X, Li XM, Xue FZ, Cai Q, Zhu XF, Wu XP, Fu JS, 2023. Physicochemical properties and antioxidant and antibacterial activities of melanin from *Tremella fuciformis* bran. Mycosystema, 42(2): 539-552

资助项目: 特色食用菌种质资源创新研究与菌种繁育关键技术集成示范(XZ202001ZY0041N)

This work was supported by the Innovative Research on Specialty Edible Fungus Germplasm Resources and Integrated Demonstration of Key Technology for Breeding of Fungus Seeds (XZ202001ZY0041N).

*Corresponding author. E-mail: fuunsheng81@163.com

ORCID: LUO Xing (0000-0002-9772-3197)

Received: 2022-05-09; Accepted: 2022-06-02

Physicochemical properties and antioxidant and antibacterial activities of melanin from *Tremella fuciformis* bran

LUO Xing¹, LI Xiaomin^{1,2}, XUE Fanzheng¹, CAI Qiang¹, ZHU Xuefeng³, WU Xiaoping^{1,2}, FU Junsheng^{1,2*}

1 College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China

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

3 Vegetable Research Institute, Tibet Academy of Agriculture and Animal Husbandry Sciences, Lhasa 850000, Tibet, China

Abstract: *Hypoxylon* sp. intermixed with *Tremella fuciformis* bran can produce a lot of melanin when its hyphae grow at a certain stage, having wide application value. In this study, melanin was extracted from *T. fuciformis* bran to study its physicochemical properties, antioxidant activity and antibacterial activity. The extracted melanin was identified by UV-vis and FTIR spectra. *T. fuciformis* bran melanin was black-powdery with slightly reddish and yellow color, and easily soluble in alkaline solution. It has good thermal stability and photostability, and its stability is less affected by oxidant and reducing agent, but more significantly affected by Ca^{2+} and Cu^{2+} . The total antioxidant capacity (FRAP) and free radical scavenging capacity were used to evaluate antioxidant activity of the melanin. The results showed that the melanin had high antioxidant activity, and the EC_{50} value of hydroxyl radical and ABTS free radical scavenging was 0.429 mg/mL and 0.016 mg/mL, respectively. Bacteriostatic ability of the melanin to Gram-positive and Gram-negative bacteria was also detected. The results showed that the bacteriostatic rate of the melanin to the tested strains was more than 90% under melanin concentration of 3.2 mg/mL, and Gram-positive bacteria were more sensitive to the melanin. This study suggests that the effective utilization of *T. fuciformis* bran and the development of melanin products could bring in high economic value.

Keywords: *Tremella fuciformis* bran; melanin; stability; free radical scavenging capacity; bacteriostatic rate; minimum inhibitory concentration

黑色素是一种由羟基酚类或吲哚类物质氧化聚合而成的结构复杂多样的大分子物质(薛帆正等 2021), 具有较好的抗氧化、抗肿瘤、抗菌(刘鑫等 2019)和防辐射(刘芹等 2021)等功能, 可被广泛应用于保健品、食品和医学药品等领域(单良等 2008)。在国内外, 天然黑色素的研究已经成为一个研究热点(鲁明等 2020), 研究主要来源于动植物和真菌类的黑色素。其中真菌类是获取天然黑色素的一个重要来源, 相比于植物和动物, 其具有更短的生产周期和更高的产量(侯若琳等 2019a), 易于工厂化栽培, 并且具有一

定的安全保障(刘芹等 2021)。真菌中香灰菌的菌丝在生长过程中可产生大量的黑色素, 但近年来对香灰菌黑色素的研究却鲜见报道(师萱等 2016)。

在我国, 银耳作为一种价值极高的食药兼用型真菌(周州等 2021), 其资源丰富, 产量居于世界领先地位, 福建省古田县作为银耳的主要产区, 享有“中国食用菌之都”的称号(陈娟钦 2017)。随着银耳产量的增加, 大量银耳菌糠产出, 这种菌糠中含有一种炭团菌(俗称香灰菌) *Hypoxylon* sp., 是银耳的伴生菌, 当菌丝生长到

一定程度时,就会产生大量的黑色素,可通过一定的途径进行提取并将其加以应用。但由于人们对银耳菌糠的认识不足,大量银耳菌糠被当作废物废弃,造成了严重的资源浪费和环境污染。如果能将废弃的银耳菌糠循环再利用,不仅可以改善环境,还能将其变废为宝(黄嘉芳等 2020),带来一定的经济效益,但目前涉及银耳菌糠的研究较少。本研究从银耳菌糠中提取出黑色素,研究其光谱特征、理化性质、抗氧化活性以及抑菌活性,以期对银耳菌糠的有效利用及其黑色素产品的开发提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试样品

银耳菌糠,由福建古田县大野山银耳有限公司提供。

1.1.2 供试菌种

大肠杆菌 *Escherichia coli*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、肠炎沙门氏菌 *Salmonella enteritidis*、假单胞杆菌 *Pseudomonas adaceae*、志贺氏菌 *Shigella* sp., 为实验室保藏菌种。

1.1.3 试剂和仪器

甲醇、乙醇、乙酸乙酯、氯仿、二甲基亚砜、氢氧化钠、盐酸、30%过氧化氢、亚硫酸钠、七水合硫酸亚铁、水杨酸、无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司)。ABTS [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate)] (Sigma 公司)。

ST16R 型离心机(Thermo 公司); HH-4 型数显恒温水浴锅(上海博迅医疗生物仪器股份有限公司); UV-2450 型紫外-可见光分光光度计(Shimadzu 公司); PHBJ-260 型 pH 计(济南来宝医疗器械有限公司); DHG-9070A 电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司); CM-700D 色差计(柯尼卡美能达公司); CP-214 型电子天平(奥豪斯仪器有限公司); Varioskan Flash 型酶标仪(Thermo 公司)。

1.2 银耳菌糠黑色素的提取和纯化

参照刘鑫等(2019)的方法,并作适当修改。将干燥的银耳菌糠粉碎,过 80 目标准筛后精确称取银耳菌糠 60.00 g,以 1:30 的料液比加入 NaOH 溶液,进行超声水浴抽提,5 000 r/min 离心 10 min 并收集上清液,用 HCl 将上清液 pH 调节至 1.5,80 °C 水浴加热 10 h。黑色素提取液经 5 000 r/min 离心 12 min,将沉淀洗涤多次后得黑色素粗品。

银耳菌糠黑色素的纯化:参照侯若琳等(2019b)的方法,并作适当修改。银耳菌糠黑色素粗品依次用 95%乙醇、氯仿、乙酸乙酯和 75%乙醇洗涤 3 次,5 000 r/min 离心 3 min,用蒸馏水洗涤沉淀直至溶液无色,6 000 r/min 离心 3 min,去除残留的溶剂,将沉淀用 1 mol/L NaOH 溶液溶解,再用 HCl 调节溶液 pH 至 1.5,使黑色素重新沉淀,5 000 r/min 离心 12 min,收集沉淀,将沉淀干燥。

1.3 银耳菌糠黑色素的光谱特征分析

1.3.1 紫外可见光谱扫描

称取少量纯化银耳菌糠黑色素溶于 0.1 mol/L NaOH 溶液中,并用超声波辅助其溶解,在 200–550 nm 的波长范围内进行紫外可见光谱扫描(师萱等 2016)。

1.3.2 傅里叶红外光谱扫描

采用溴化钾压片法,按 1:100 的比例加入纯化银耳菌糠黑色素和溴化钾,研磨成细粉进行压片,在 400–4 000 cm^{-1} 范围内进行傅里叶红外光谱扫描。

1.4 银耳菌糠黑色素理化性质分析

1.4.1 银耳菌糠黑色素的颜色检测

以仙草黑色素作为对照,通过色差计测定银耳菌糠黑色素粉末和仙草黑色素的颜色指标,采用 L^* 、 a^* 及 b^* 表示色差值(邹宇等 2013)。

1.4.2 银耳菌糠黑色素的溶解性

将 0.01 g 纯化黑色素分别加入 2 mL 水、酸性溶液、碱性溶液和常见的有机溶剂(甲醇、乙

醚、乙酸乙酯、氯仿和二甲基亚砷)中,经充分振荡后观察黑色素的溶解情况(Hou *et al.* 2019)。

1.4.3 银耳菌糠黑色素的热稳定性

将浓度为 50 mg/L 的银耳菌糠黑色素溶液放入水浴锅中进行加热。水浴锅温度设置 4 个梯度: 25、50、75 和 100 °C,每隔 1 h 进行取样,在 318 nm 处测定吸光值(邹宇等 2013),并计算 3 h 后的色素保存率,保存率>80%为实验条件对银耳菌糠黑色素影响不显著(李琦 2011),色素保存率按式(1)计算:

$$\text{色素保存率} = \frac{\text{最初溶液的吸光度}}{\text{试验后溶液的吸光度}} \times 100\% \quad (1)$$

1.4.4 银耳菌糠黑色素的光稳定性

将浓度为 50 mg/L 的银耳菌糠黑色素溶液分别置于暗处、自然光和白炽灯光(375、750、1 500 和 3 000 lx)下照射 4 d,每隔 1 d 进行取样,在 318 nm 处测定吸光值(邹宇等 2013),并计算 4 d 后的色素保存率。

1.4.5 银耳菌糠黑色素氧化剂的稳定性

分别配制质量浓度为 0、10、100 和 1 000 mg/L 的 H₂O₂ 溶液,各取 0.5 mL H₂O₂ 溶液分别与 4.5 mL 的 50 mg/L 黑色素溶液混合,使黑色素溶液中的 H₂O₂ 质量浓度分别为 0、1、10 和 100 mg/L,充分混匀后每隔 1 h 进行取样,在 318 nm 处测定吸光值(李红姣等 2016),并计算 2 h 后的色素保存率。

1.4.6 银耳菌糠黑色素还原剂的稳定性

分别配置质量浓度为 0、10、100、1 000 和 10 000 mg/L 的 Na₂SO₃ 溶液,各取 0.5 mL Na₂SO₃ 溶液分别与 4.5 mL 的 50 mg/L 黑色素溶液混合,使黑色素溶液中的 Na₂SO₃ 质量浓度分别为 0、1、10、100 和 1 000 mg/L,充分混匀后每隔 1 h 进行取样,在 318 nm 处测定吸光值(李红姣等 2016),并计算 2 h 后的色素保存率。

1.4.7 银耳菌糠黑色素的金属离子稳定性

将含有不同金属离子的盐溶液(Na⁺、Ca²⁺、Cu²⁺、Fe³⁺和 K⁺)加入浓度为 50 mg/L 的银耳菌糠黑色素溶液中,使其中含有 0.01 mol/L 的金属

离子,每隔 1 h 取样,在 318 nm 处测定吸光值(Hou *et al.* 2019),并计算 3 h 后的色素保存率。

1.5 银耳菌糠黑色素的抗氧化活性分析

1.5.1 总抗氧化能力的测定

参照吴青等(2006)的方法,并作适当修改。具体方法如下: FeSO₄·7H₂O 标准曲线的绘制: 0.3 mol/L 醋酸钠缓冲液(pH 3.6), 10 mmol/L TPTZ 溶液,系列浓度为 25、100、150、200、500 和 1 000 μmol/L 的 FeSO₄·7H₂O 溶液,按 10:1:1 配置混合溶液。吸取 170 μL 的混合溶液加入 96 孔板中,升温至 37 °C,于 593 nm 处测定吸光值。以 FeSO₄·7H₂O 溶液的浓度为横坐标,以吸光值为纵坐标绘制标准曲线。

银耳菌糠黑色素溶液总抗氧化能力的测定: 0.3 mol/L 醋酸钠缓冲液(pH 3.6), 10 mmol/L TPTZ 溶液, 20 mmol/L FeCl₃·6H₂O 溶液,按 10:1:1 配置混合溶液。吸取 150 μL 的混合溶液加入 96 孔板中,37 °C 下反应 10 min,于 593 nm 处测定吸光值($A_{\text{反应前}}$),再往孔中加入 20 μL 不同质量浓度的银耳菌糠黑色素溶液,37 °C 下反应 10 min,于 593 nm 处测定吸光值($A_{\text{反应后}}$),以 Vc 为阳性对照,方法同上。通过差值($A_{\text{反应后}} - A_{\text{反应前}}$)在 FeSO₄·7H₂O 标准曲线求得与不同质量浓度的银耳菌糠黑色素及 Vc 相当的 FeSO₄·7H₂O 浓度,将其定义为 FRAP 值(张敏 2015)。

1.5.2 羟自由基清除能力的测定

参照李倩茹等(2020)的方法,并作适当的修改。在 96 孔板中依次加入 30 μL FeSO₄ 溶液(9 mmol/L)、H₂O₂ 溶液(8.8 mmol/L)和水杨酸-乙醇溶液(9 mmol/L),再加入相同体积的不同质量浓度的银耳菌糠黑色素溶液,最后加入 105 μL 蒸馏水。将 96 孔板放入 37 °C 的烘箱中反应 30 min,用酶标仪在 510 nm 处测定吸光值(A_x),用等体积的蒸馏水代替 H₂O₂ 溶液,测定吸光度(A_{x0})。用等体积的蒸馏水代替黑色素溶液,测定吸光度(A_0),并以相同质量浓度的 Vc 作阳性对照试验。羟自由基清除率按式(2)计算:

$$\text{羟自由基清除率} = [A_0 - (A_x - A_{x0})] / A_0 \times 100\% \quad (2)$$

1.5.3 ABTS 自由基清除能力的测定

参照刘芹等(2021)的方法,并作适当修改。将 ABTS 溶液(7.4 mmol/L)与过硫酸钾溶液(2.45 mmol/L)混合,避光孵育 12–16 h,制得 ABTS 母液。用去离子水稀释 ABTS 母液,使其在 734 nm 处吸光度值为 0.70 ± 0.02 。依次向 96 孔板中加入 100 μL 的 ABTS 溶液,再加入相同体积的不同质量浓度的银耳菌糠黑色素溶液,在 734 nm 处测定吸光度(A_x)。用等体积的去离子水代替 ABTS 溶液,测定吸光度(A_{x0})。用等体积的去离子水代替黑色素溶液,测定吸光度(A_0),并以相同质量浓度的 Vc 作阳性对照试验。ABTS 自由基清除率按式(3)计算:

$$\text{ABTS 自由基清除率} = [A_0 - (A_x - A_{x0})] / A_0 \times 100\% \quad (3)$$

1.6 银耳菌糠黑色素的抑菌活性分析

1.6.1 供试菌株的活化

将大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、肠炎沙门氏菌、假单胞杆菌和志贺氏菌接种于 LB 固体培养基中活化 24 h,挑取生长较好的菌落接种于 LB 液体培养基中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后得到菌悬液,将其稀释一定倍数使其最终浓度为 5×10^5 CFU/mL (Cockerill *et al.* 2012)。

1.6.2 抑菌率及最低抑菌浓度(MIC)的测定

参照范明君(2021)的方法,并作适当修改。

将银耳菌糠黑色素母液用 LB 液体培养基稀释至浓度为 3.2、1.6、0.8、0.4、0.2、0.1、0.05 和 0.025 mg/mL。在 96 孔板中依次加入不同质量浓度的黑色素溶液 100 μL ,再加入 10 μL 的不同供试菌株菌悬液到对应孔中。以各供试菌 110 μL 作为阳性对照,以及各质量浓度的银耳菌糠黑色素溶液作为阴性对照。将孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养 24 h,在 600 nm 处测定吸光值,计算各浓度的银耳菌糠黑色素溶液的抑菌率,将浓度为 2 mg/mL 的银耳菌糠黑色素与氨苄西林的抑菌效果进行比较,抑菌率按式(4)计算,当抑菌率 $> 90\%$ 时,可将该浓度认定为 MIC 值(苏梦茹等 2020)。

$$\text{抑菌率}(\%) = [1 - (\text{样品吸光值} - \text{阴性对照}) / \text{阳性对照}] \times 100\% \quad (4)$$

2 结果与分析

2.1 银耳菌糠黑色素的光谱特征

2.1.1 紫外-可见光谱特征

银耳菌糠黑色素的紫外可见吸收光谱见图 1,银耳菌糠黑色素在 318 nm 处有最大特征吸收峰,在可见光区域吸收不明显,随着波长的增加黑色素的吸光度呈现下降的趋势(项锦敏等 2021),在波长 260 nm 和 280 nm 处没有明显的吸收峰(图 1A),说明其核酸、蛋白质以及脂质

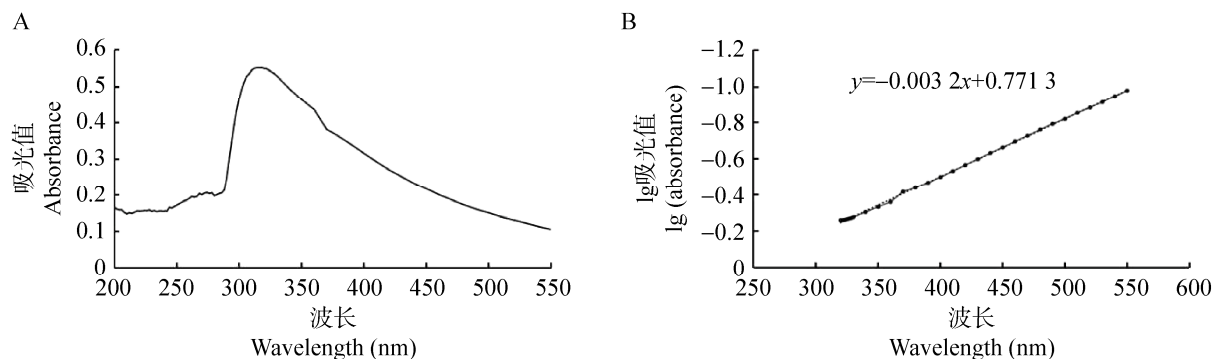


图 1 银耳菌糠黑色素的紫外-可见吸收光谱 A: 银耳菌糠黑色素的紫外吸收图谱. B: 吸光度的对数对波长作的图

Fig. 1 UV-visible radiation absorption spectrum of *Tremella fuciformis* bran melanin. A: UV absorption spectrum. B: A plot of optical density against wavelength.

等杂质的含量较少(王昭玉等 2021)。这一现象与师萱等(2016)已报道的银耳菌糠黑色素的紫外可见光谱基本一致。此外,黑色素溶液的光密度对数值与波长的线性曲线斜率可以用来鉴定黑色素,该曲线斜率在-0.264 6和-0.546 6之间(Manivasagan *et al.* 2013),而银耳菌糠黑色素吸光值的对数值会对波长产生斜率为-0.003 2的线性曲线(图1B),表明银耳菌糠黑色素具有黑色素的典型特征。

2.1.2 红外光谱特征

银耳菌糠黑色素的红外光谱图见图2,银耳菌糠黑色素在 $3\,374\text{ cm}^{-1}$ 处有较宽较强的共轭吸收峰,表明银耳菌糠黑色素中存在氨基(-NH)和羟基(-OH)结构,吸收峰是二者之间的氢键伸缩振动产生的。在 $2\,933\text{ cm}^{-1}$ 处存在较弱的吸收峰,对应脂肪族C-H伸缩振动。在 $1\,645\text{ cm}^{-1}$ 处有较强的吸收峰,表明黑色素分子中含有羧基(-COO)结构,与 $3\,370\text{ cm}^{-1}$ 左右的较强吸收峰共同指示-COOH结构的存在。 $1\,515\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰是由N-H变角振动而产生。在 $1\,456\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰是芳环的弯曲和骨架振动产生。在 $829\text{--}622\text{ cm}^{-1}$ 的范围内吸收带较弱,是由于芳环被取代,并形成共轭体系,芳氢含量随之相对减少。根据红外光谱表征分析结果,可初步推断银耳菌糠黑色素是一种典型的黑色素。

2.2 银耳菌糠黑色素的理化性质

2.2.1 颜色指标

以纯化的仙草黑色素为对照,与银耳菌糠黑色素的色指标进行对比。色差计测定中 L^* 表示亮度, a^* 表示红/绿, b^* 表示黄/蓝。银耳菌糠黑色素(图3B)的 L^* 、 a^* 、 b^* 值分别为 46.30 ± 0.28 、 2.59 ± 0.19 、 5.20 ± 0.29 ,相较于仙草黑色素(图3A), ΔL^* 、 Δa^* 、 Δb^* 值分别为 0.87 ± 0.66 、 1.83 ± 0.45 、 1.13 ± 0.84 。银耳菌糠黑色素和仙草黑色素颜色指标相差不大,两者的 L^* 值均较大, a^* 和 b^* 值均较小,数值表明银耳菌糠黑色素和

仙草黑色素的色都是趋于黑色且略带黄色和红色。这是由于黑色素包含了如碳水化合物、蛋白质、金属离子等物质,这些物质使黑色素表现出略微的红色和黄色(邹宇等 2013)。

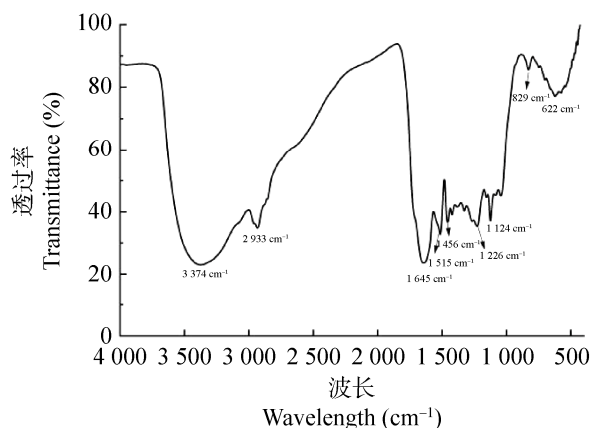


图2 银耳菌糠黑色素的红外光谱图

Fig. 2 Infrared spectrogram of melanin from *Tremella fuciformis* bran.

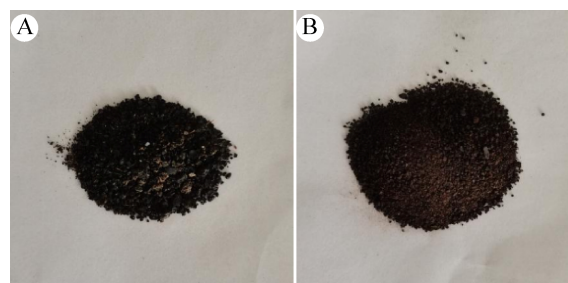


图3 纯化的黑色素粉末 A: 凉粉草(俗称仙草)黑色素(对照). B: 银耳菌糠黑色素

Fig. 3 Purified melanin powder. A: *Mesona chinensis* melanin (contrast). B: *Tremella fuciformis* bran melanin.

2.2.2 溶解性

银耳菌糠黑色素在蒸馏水和甲醇、乙醚、乙酸乙酯、氯仿、二甲基亚砷等常见有机溶剂以及酸性溶液(1 mol/L HCl溶液)中的溶解度较低,而在强碱溶液(1 mol/L NaOH溶液)中的溶解度较高(表1,图4A),银耳菌糠黑色素的溶解性特征与毛木耳(刘鑫等 2019)和粗毛纤孔菌(Hou *et al.* 2019)等的研究非常相似。

表 1 银耳菌糠黑色素的溶解性
Table 1 Solubility of *Tremella fuciformis* bran melanin

类型 Type	溶剂 Solvent	溶解性 Solubility
水 Water	①蒸馏水 Distilled water	—
有机溶剂 Organic solvent	②甲醇 Methyl alcohol	—
	③乙醚 Diethyl ether	—
	④乙酸乙酯 Ethyl acetate	—
	⑤氯仿 Chloroform	—
	⑥二甲基亚砷 Dimethyl sulfoxide	+
酸 Acid	⑦1 mol/L 盐酸 1 mol/L hydrochloric acid	—
碱 Alkali	⑧1 mol/L 氢氧化钠 1 mol/L sodium hydroxide	++

—表示不溶；+表示微溶；++表示溶解
— Means insoluble; + Means slightly soluble; ++ Means dissolved.

2.2.3 热稳定性

温度对银耳菌糠黑色素稳定性的影响见图 4B 和表 2。温度使银耳菌糠黑色素稳定性在数值上产生了显著差异($P<0.05$), 且当温度达到 100 ℃时, 其吸光值变化幅度较大(图 4B)。随着时间延长, 银耳菌糠黑色素的保存率仍在 90.0% 以上, 其保存率变化不显著(表 2), 这表明银耳菌糠黑色素在应用上热稳定性较强, 足以忽略数值上的差异。

2.2.4 光稳定性

银耳菌糠黑色素在不同光照条件(黑暗、自然光照射、白炽灯照射)处理 4 d 后, 其吸光值在数值上发生了明显的变化, 且在自然光和白炽灯 3 000 lx 照射下, 其吸光值的变化幅度较大(图 4C)。这是因为黑色素经过照射, 其能量被消耗, 单体内部发生了质子转移, 导致黑色素的结构发生改变。但这并不能说明其光稳定性差, 而是黑色素在吸收了紫外辐射后, 将光能转化成了热量, 使其成为一种优良的光保护剂(范心乐等 2019)。在黑暗条件处理 4 d 后, 其色素损失率仅为 1.84%; 经过自然光和白炽灯照射 4 d 后, 银耳菌糠黑色素的保存率均在 80.0% 以上, 其保存率未发生明显变化(表 3)。表明银耳菌糠黑色素在应用上的光稳定性较好, 足以忽略数值上的差异。

2.2.5 氧化稳定性

黑色素是一类含有多种官能团的聚合物,

在较宽的 pH 值范围内既可以作为电子供体, 又可以作为电子受体, 因此具有氧化还原特性(李红姣等 2016)。在氧化剂作用下银耳菌糠黑色素稳定性在数值上产生了显著差异($P<0.05$), 且当氧化剂浓度等于 100 mg/L 时, 吸光度变化幅度增大(图 4D)。在氧化剂作用 2 h 后, 黑色素的保存率均在 90% 以上, 其保存率变化不显著(表 4), 表明在氧化剂的作用下银耳菌糠黑色素在应用上的稳定性较高, 足以忽略数值上的差异。

2.2.6 还原稳定性

在还原剂作用后的 1–2 h, 不同质量浓度的还原剂使银耳菌糠黑色素稳定性产生了显著差异($P<0.05$), 但时间对其影响并不显著(图 4E)。在还原剂作用 2 h 后, 黑色素的保存率均在 95% 以上, 其保存率变化不显著(表 5), 表明银耳菌糠黑色素在应用上的还原稳定性较高, 足以忽略数值上的差异。

2.2.7 金属离子稳定性

银耳菌糠黑色素对不同的金属离子显示出不同的稳定性。金属离子对银耳菌糠黑色素的影响见图 4F 和表 6。 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 对银耳菌糠黑色素有减色作用, 对黑色素稳定性的影响显著($P<0.05$), Fe^{3+} 、 Na^{+} 和 K^{+} 在数值上对黑色素稳定性产生了显著影响($P<0.05$) (图 4F)。经过 3 h 的反应, Ca^{2+} 和 Cu^{2+} 使银耳菌糠黑色素的保存率

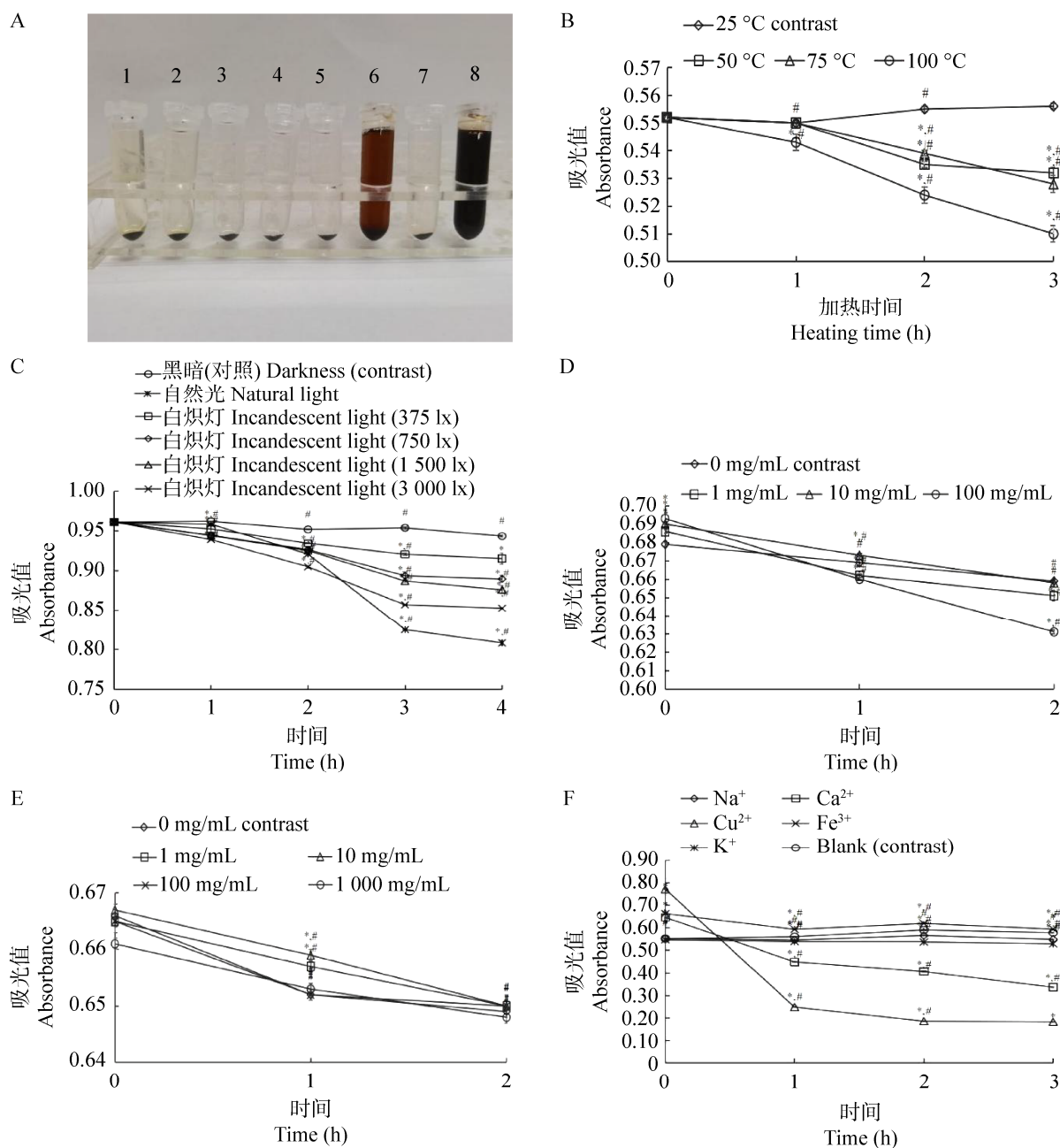


图 4 银耳菌糠黑色素的溶解及稳定性特征 A: 银耳菌糠黑色素的溶解情况(1-8 与表 1 中①-⑧——对应). B: 温度对银耳菌糠黑色素稳定性的影响. C: 光照对银耳菌糠黑色素稳定性的影响. D: 氧化剂对银耳菌糠黑色素稳定性的影响. E: 还原剂对银耳菌糠黑色素稳定性的影响. F: 金属离子对银耳菌糠黑色素稳定性的影响. 相同时间不同实验组与对照组进行比较, * $P < 0.05$; 组内与前一项时间进行比较, # $P < 0.05$

Fig. 4 Dissolution and stability of melanin in *Tremella fuciformis* bran. A: Dissolution of melanin in *T. fuciformis* bran (1-8 corresponds to ①-⑧ in Table 1). B: Effect of temperature on the stability of melanin in *T. fuciformis* bran. C: Effect of light on the stability of melanin in *T. fuciformis* bran. D: Effect of oxidant on the stability of melanin in *T. fuciformis* bran. E: Effect of reducing agent on the stability of melanin in *T. fuciformis* bran. F: Effect of metal ions on the stability of melanin in *T. fuciformis* bran. Comparison between different experimental groups and control group at the same time, * $P < 0.05$; Compared with the previous time within the group, # $P < 0.05$.

发生了显著变化，对黑色素稳定性影响显著；Fe³⁺、Na⁺和 K⁺对银耳菌糠黑色素保存率无明显影响(表 6)，在应用上对黑色素稳定性影响不显著，足以忽略数值上的差异。产生此现象可能是因为黑色素遇到 Ca²⁺、Cu²⁺会形成沉淀，使色素分子结构中多个邻位酚羟基结构作为多基配体与这几种金属离子发生了络合反应(单良等 2008)。

表 2 不同温度下 3 h 后银耳菌糠黑色素的保存率

Table 2 Preserving rate of melanin in *Tremella fuciformis* bran after 3 h preservation under different temperature

温度 Temperature (°C)	25	50	75	100
保存率 Preserving rate (%)	100.00±0.10	96.37±0.28	95.77±0.46	92.45±0.54

表 3 不同光照条件下 4 d 后银耳菌糠黑色素的保存率

Table 3 Preserving rate of melanin in *Tremella fuciformis* bran after 4 d preservation under different light condition

光照条件 Light condition	黑暗 Darkness	自然光 Natural light	白炽灯(375 lx) Incandescent light (375 lx)	白炽灯(750 lx) Incandescent light (750 lx)	白炽灯(1 500 lx) Incandescent light (1 500 lx)	白炽灯(3 000 lx) Incandescent light (3 000 lx)
保存率 Preserving rate (%)	98.16±0.12	84.08±0.28	95.21±0.72	92.54±0.48	91.12±0.51	88.69±0.06

表 4 不同 H₂O₂ 浓度下 2 h 后银耳菌糠黑色素的保存率

Table 4 Preserving rate of melanin in *Tremella fuciformis* bran after 2 h preservation under different concentration of H₂O₂

浓度 Concentration (mg/L)	0	1	10	100
保存率 Preserving rate (%)	97.01±0.15	94.94±0.39	95.41±0.22	91.05±0.17

表 5 不同 Na₂SO₃ 浓度下 2 h 后银耳菌糠黑色素的保存率

Table 5 Preserving rate of melanin in *Tremella fuciformis* bran after 2 h preservation under concentration of Na₂SO₃

浓度 Concentration (mg/L)	0	1	10	100	1 000
保存率 Preserving rate (%)	97.45±0.31	97.70±0.15	97.50±0.30	97.70±0.26	98.13±0.09

表 6 不同金属离子存在条件下 3 h 后银耳菌糠黑色素的保存率

Table 6 Preserving rate of melanin in *Tremella fuciformis* bran after 3 h preservation under the presence of different metal ion

金属离子类型 Metal ion type	Na ⁺	Ca ²⁺	Cu ²⁺	Fe ³⁺	K ⁺	空白 Blank
保存率 Preserving rate (%)	99.22±0.18	51.91±0.32	25.21±0.14	89.65±0.30	96.59±0.11	100±0.10

2.3 银耳菌糠黑色素的抗氧化活性

2.3.1 总抗氧化能力

FRAP 法可用于银耳菌糠黑色素总抗氧化能力的测定。在酸性条件下,样品中的还原性物质可将 Fe^{3+} -TPTZ 还原成 Fe^{2+} -TPTZ,呈蓝色,且在 593 nm 处具有最大光吸收。当 Fe^{3+} -TPTZ 过量时,可以通过检测蓝色物质的生成量来反映样品的还原能力(赵文恩和李茜倩 2011)。还原力大表示该物质给电子能力大,因此认为与抗氧化活力紧密相关。结果与相应浓度的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 标准溶液(图 5A)比较,得出 FRAP 值。银耳菌糠黑色素还原力随样品浓度的增加而增加(图 5B),这表明银耳菌糠黑色素是良好的电子供应者,能提供电子并将自由基转变为稳定的产物而终止自由基链式反应,但总抗氧化能力弱于 Vc (张敏 2015)。

2.3.2 清除自由基能力

银耳菌糠黑色素具有较强的自由基清除能力。银耳菌糠黑色素和 Vc 对羟自由基的清除作用都随着浓度的增加而增加(图 6),并且具有一定的剂量关系。这是因为酚羟基具有很强的提供质子的能力,羟基越多,提供的氢离子越多,能与更多的活性自由基结合,而且羟基上氧原子的 $p-\pi$ 共轭效应强烈的斥电子效应使生成的自由基更稳定(叶明等 2009a)。在 0.125–2.0 mg/mL 浓度范围内,银耳菌糠黑色素与 Vc 的羟自由基清除能力存在极显著差异($P < 0.01$),当银耳菌糠黑色素溶液浓度大于 1.0 mg/mL 时,其对羟自由基的清除能力高于 Vc,且羟自由基清除的 EC_{50} 值为 0.429 mg/mL,表明银耳菌糠黑色素对羟自由基的清除能力较强。

ABTS 是用于测定单一化合物以及其他复杂混合物抗氧化活性最常用的有机自由基之一(刘芹等 2021)。在 0.125–1.0 mg/mL 浓度范围内,银耳菌糠黑色素与 Vc 的 ABTS 自由基清除能力存在极显著差异($P < 0.01$);当浓度为 2.0 mg/mL 时,

银耳菌糠黑色素与 Vc 的羟自由基清除能力无显著差异($P > 0.05$);其 ABTS 自由基的清除能力与 Vc 相近,且 ABTS 自由基清除的 EC_{50} 值为 0.016 mg/mL (图 6),表明银耳菌糠黑色素具有较强的 ABTS 自由基清除能力。

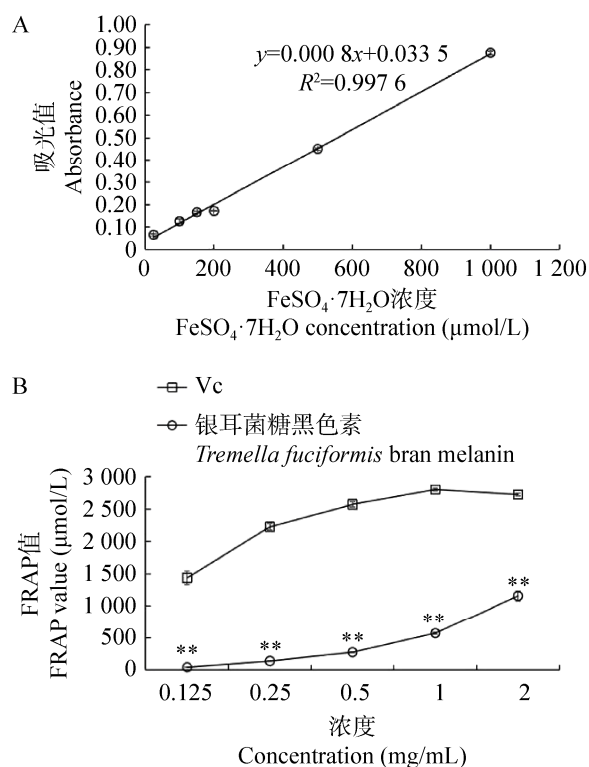


图 5 总抗氧化能力的测定 A: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 绘制的 FRAP 标准曲线. B: 银耳菌糠黑色素和 Vc 的还原能力. 与 Vc 相比较, ** $P < 0.01$

Fig. 5 Determination of total antioxidant capacity of the melanin. A: A representative calibration curve for determination of mean FRAP values using $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ standards. B: Reducibility of *Tremella fuciformis* bran melanin and Vc. Compare that to Vc, ** $P < 0.01$.

2.4 银耳菌糠黑色素的抑菌作用

银耳菌糠黑色素对细菌有较强的抑制作用,随着黑色素溶液浓度的增大,其对细菌的抑制作用愈强(图 7)。当抑菌率大于 90%时,可认定 MIC 值可靠(苏梦茹等 2020)。因此,银耳菌糠黑色素对大肠杆菌、肠炎沙门氏菌和志贺氏

菌的 MIC 为 3.2 mg/mL；对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 1.6 mg/mL；而当银耳菌糠黑色素溶液的浓度达到 3.2 mg/mL 时，仍未达到对假单胞杆菌的 MIC 值。2.0 mg/mL 的银耳菌糠黑色素有一定的抑菌效果，但其抑菌效果弱于氨苄西林($P<0.01$ ，表 7)。其中，银耳菌糠黑色素对金黄色葡萄球菌的抑制效果最佳，且金黄色葡萄球菌为革兰氏阳性菌，剩余的 4 种细菌均为革兰氏阴性菌，综合来看，银耳菌糠黑色素对革兰氏阳性菌较敏感(杨柳等 2016)。

3 讨论

近年来合成黑色素由于存在安全隐患，其发展逐渐受到了限制，天然黑色素的开发和应用已经变成了必然的趋势(叶明等 2009b)。银耳菌糠作为天然黑色素的来源之一，却多被当作废弃物直接丢弃或焚烧，造成了资源浪费以及环境污染等诸多问题(张莹等 2020)。倘若能从大量废弃的银耳菌糠中提取出黑色素，便能在很大程度上降低成本。因此，相较于其他天然黑色素来源，银耳菌糠在成本上占有极大优势。但目前天然黑色素的研究主要集中于提取优化等工艺问题，对黑色素的理化性质及其生物活性的研究较少。为了发掘银耳菌糠黑色素的开发潜能，本文对银耳菌糠黑色素的光谱特征、理化性质、抗氧化活性及其抑菌作用进行了研究。

表 7 2.0 mg/mL 的氨苄西林和银耳菌糠黑色素的抑菌效果

组别	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	假单胞杆菌	肠炎沙门氏菌	志贺氏菌
Group	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas adaceae</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Shigella</i> sp.
抑菌率(氨苄西林)	99.13±0.11	99.76±0.28	98.27±0.36	99.82±0.33	99.42±0.14
Antibacterial rate (ampicillin) (%)					
抑菌率(银耳菌糠黑色素)	97.77±0.21**	46.59±0.24**	20.61±0.54**	55.02±0.37**	35.13±0.18**
Antibacterial rate (<i>Tremella fuciformis</i> bran melanin) (%)					

与氨苄西林相比较，** $P<0.01$ 。
Compare that with ampicillin, ** $P<0.01$.

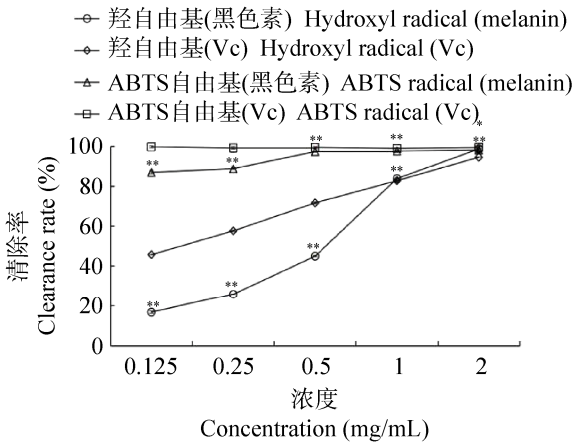


图 6 银耳菌糠黑色素清除自由基能力与 Vc 相比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$

Fig. 6 Ability of *Tremella fuciformis* bran melanin scavenging free radical. Compare with Vc, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

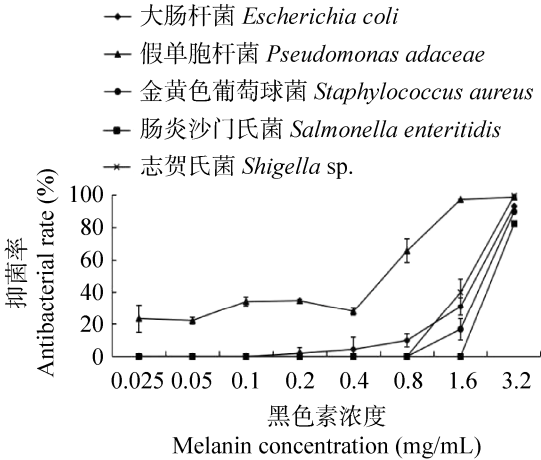


图 7 银耳菌糠黑色素的抑菌作用

Fig. 7 Antibacterial effects of *Tremella fuciformis* bran melanin.

基于师萱等(2016)对银耳菌糠黑色素提取优化的研究,本研究从银耳废菌糠中提取出黑色素,通过对紫外可见光谱图的分析,得出银耳菌糠黑色素在 318 nm 处存在特征吸收峰,吸光值的对数对波长作图斜率为 -0.0032 ,结合红外光谱初步推测出银耳菌糠黑色素是一种非常典型的黑色素。通过理化试验表明银耳菌糠黑色素符合典型的黑色素特征,其不溶于水、酸性溶液和大部分有机溶液,但在碱性溶液中溶解性较好;该黑色素具有较好的热稳定性,在 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热 3 h 后其保存率仍达到 92.45%,而黑木耳黑色素在 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热 3 h 后保存率为 90.57% (邹宇 2011),表明银耳菌糠黑色素的热稳定性略优于黑木耳黑色素;该黑色素具有较强的光稳定性,在自然光和白炽灯光(375、750、1 500 和 3 000 lx)照射 4 d 后黑色素的保存率均在 80%以上,而黑木耳黑色素保存率低于 80% (邹宇 2011),表明银耳菌糠黑色素的光稳定性优于黑木耳黑色素;该黑色素在氧化剂和还原剂的作用下其稳定性依然很强,保存率均在 90%以上,而黑木耳黑色素在氧化剂作用下褪色,但在还原剂中较稳定且保存率接近 100% (张敏 2015),表明银耳菌糠黑色素的氧化稳定性优于黑木耳黑色素;该黑色素对大多数金属离子(除 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 外)表现出稳定性,而黑木耳黑色素稳定性易受 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 影响, Ca^{2+} 对其影响不显著(张敏 2015),表明不同黑色素受金属离子的影响存在差异。通过抗氧化实验表明银耳菌糠黑色素具有较强的抗氧化活性,羟自由基、ABTS 自由基清除的 EC_{50} 值分别为 0.429 mg/mL 和 0.016 mg/mL ,而黑木耳黑色素为 1.0 mg/mL 时,其自由基清除率仍未达到 EC_{50} 值(侯若琳等 2019b),表明银耳菌糠黑色素清除自由基的能力优于黑木耳。此外,银耳菌糠黑色素还具有较好的抑菌作用,当黑色素溶液浓度达到 3.2 mg/mL 时,该黑色素对大部分供试细菌的抑菌率超过了 90%且达到了 MIC。相比

于其他革兰氏阴性菌,其对金黄色葡萄球菌抑制效果最佳。银耳具有抗氧化、抗肿瘤和抗炎症等功能(Wu *et al.* 2019),本研究发现银耳菌糠黑色素同样具有抗氧化和抑菌活性。通过实验表明该黑色素在食品、化妆品和医疗用品行业具有良好的应用前景,本研究为银耳菌糠黑色素相关产品的开发奠定了理论基础,有效地解决了银耳菌糠的废弃问题,发掘了银耳菌糠的应用潜质,具有较高的经济价值和现实意义。

[REFERENCES]

- Chen JQ, 2017. The influencing factors research of Gutian County's *Tremella fuciformis* industry development in the view of the dietary therapy. Master Thesis, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou. 1-73 (in Chinese)
- Cockerill FR, Wikler MA, Alder J, Dudley MN, Eliopoulos GM, Ferraro MJ, Hardy DJ, Hecht DW, Hindler JA, Patel JB, Powell M, Swenson JM, Thomson RB, Traczewski MM, Turnidge JD, Weinstein MP, Zimmer BL, 2012. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. Clinical and Laboratory Standards Institute, 32(2): 1-68
- Fan MJ, 2021. Research on antioxidant function and antibacterial activity of extract from wheat bran liquid-state fermented by *Ganoderma lucidum* and its active components. Master Thesis, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot. 1-74 (in Chinese)
- Fan XL, Yao FJ, Wang W, Fang M, Wang P, 2019. Study on extraction process and physicochemical properties of melanin from *Auricularia cornea*. Journal of Molecular Science, 35(6): 484-491 (in Chinese)
- Hou RL, Liu X, Xiang KK, Chen LT, Wu XP, Lia WX, Zheng MF, Fu JS, 2019. Characterization of the physicochemical properties and extraction optimization of natural melanin from *Inonotus hispidus* mushroom. Food Chemistry, 277: 533-542
- Hou RL, Wang DT, Liu X, Mai MX, Wu XP, Lin WX, Zheng MF, Fu JS, 2019a. Analysis of innovation trend of fungal melanin based on international patent data. Microbiology China, 46(6): 1470-1484 (in Chinese)
- Hou RL, Yuan Y, Xiang KK, Wu XP, Lin WX, Zheng MF, Fu JS, 2019b. Cellulase and ultrasonic wave synergistic extraction technology of melanin from *Auricularia heimuer* and analysis of antioxidant activity of the melanin product. Mycosystema, 38(3): 414-427 (in

- Chinese)
- Huang JF, Su JX, Wu BH, Huang PY, Zhang X, Zheng LL, 2020. Adsorption properties of *Tremella* mushroom bran for methylene blue. *Guangdong Chemical Industry*, 47(5): 30-31 (in Chinese)
- Li HJ, Li JX, Zhao Z, 2016. Optimization of enzyme-assisted extraction of melanin from testae of wild apricots and evaluation of its stability. *Food Science*, 37(10): 69-75 (in Chinese)
- Li Q, 2011. Study on extraction, purification and characterization of melanin from *Auricularia auricula*. Master Thesis, Huazhong Agricultural University, Wuhan. 1-81 (in Chinese)
- Li QR, Xia S, Huang T, Wu T, Shi GL, Ye YM, Luo LB, Li SM, 2020. Determination the hydroxyl radical scavenging ability of *Hippophae fructus* by microplate reader. *Food Science and Technology*, 45(9): 287-294 (in Chinese)
- Liu Q, Hu SJ, Cui X, Song ZB, Kong WL, Kang YC, 2021. The extraction optimization and physicochemical properties of natural melanin from *Pleurotus ostreatus*. *Edible Fungi of China*, 40(12): 57-65 (in Chinese)
- Liu X, Yuan Y, Hou RL, Chen LT, Wu XP, Zheng MF, Fu JS, 2019. Optimization of extraction conditions of melanin from *Auricularia polytricha* and its antioxidant activities *in vitro*. *Natural Product Research and Development*, 31(10): 1688-1696, 1752 (in Chinese)
- Lu M, Fu X, Yu M, 2020. Research progress of natural melanin extraction and its biological function. *China Food Additives*, 31(1): 165-171 (in Chinese)
- Manivasagan P, Venkatesan J, Senthilkumar K, Sivakumar K, Kim SK, 2013. Isolation and characterization of biologically active melanin from *Actinoalloteichus* sp. MA-32. *International Journal of Biological Macromolecules*, 58: 263-274
- Shan L, Xu LP, Jin QZ, Liu YF, Wang XG, 2008. Stability and free radical scavenging activities of black sesame melanin. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 36(26): 11527-11531, 11541 (in Chinese)
- Shi X, Yan Y, Liang XM, Tan HJ, Yang Y, Zhong G, Shi WJ, 2016. Study on extraction process and antioxidant activity of melanin from *Tremella fuciformis* residue. *Food & Machinery*, 32(12): 161-165, 174 (in Chinese)
- Su MR, Ma PP, Li XX, Liu C, Li Y, Yao Q, Guo KK, 2020. Determination of minimum inhibitory concentration of nine antibacterial drugs to *Escherichia coli*. *Progress in Veterinary Medicine*, 41(3): 52-56 (in Chinese)
- Wang ZY, Chang MC, Xu LJ, Meng JL, Zuo NK, Pan X, 2021. Structural characterization, physicochemical properties of melanin from fruiting body, hyphae and spores of *Ganoderma lucidum*. *Biotechnology Bulletin*, 37(11): 81-91 (in Chinese)
- Wu F, Zhou LW, Yang ZL, Bau T, Li TH, Dai YC, 2019. Resource diversity of Chinese macrofungi: edible, medicinal and poisonous species. *Fungal Diversity*, 98: 1-76
- Wu Q, Huang J, Luo LX, Yi LY, Long SD, 2006. Studies on the antioxidant activity of extracts of 15 Chinese medicinal herbs. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 6(1): 284-289 (in Chinese)
- Xiang JM, Zhao QY, Yuan H, Peng ZH, Song W, 2021. Physicochemical properties and antioxidant activities of melanin from Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*). *Natural Product Research and Development*, 33(3): 453-461 (in Chinese)
- Xue FZ, Huang HC, Wu FQ, Li XM, Wu XP, Fu JS, 2021. Research status and industrial application of fungal melanin. *Biotechnology Bulletin*, 37(11): 32-41 (in Chinese)
- Yang L, Liu CJ, Li YH, Chen YF, Wang L, Zhang Y, 2016. Research on antibacterial effect and stability of coumarin of *Angelicae dahuricae*. *China Condiment*, 41(5): 41-44 (in Chinese)
- Ye M, Xu QP, Chen X, Liang YH, Sun HJ, 2009a. Fermentation and antioxidant activities of melanin produced by *Lachnum* YM-223. *Food Science*, 30(17): 185-189 (in Chinese)
- Ye M, Zhu L, Tan W, Liu GQ, Yuan HB, Lin YR, Zhuang WY, 2009b. Properties and structure of the melanin from *Lachnum brasiliense*. *Mycosystema*, 28(3): 393-398 (in Chinese)
- Zhang M, 2015. Production and antioxidant activity of melanin by submerged fermentation of *Auricularia auricula*. Master Thesis, Wenzhou University, Wenzhou. 1-68 (in Chinese)
- Zhang Y, Tian L, Xu MH, Wang B, Song B, Li Y, 2020. Research progress in comprehensive utilization of spent mushroom substrates. *Microbiology China*, 47(11): 3658-3670 (in Chinese)
- Zhao WE, Li QQ, 2011. Determination of total antioxidant capacity of red pigments from Chinese jujube peel by the ferric reducing/ antioxidant power assay. *Journal of Zhengzhou University (Engineering Science)*, 32(3): 28-30, 35 (in Chinese)
- Zhou Z, Luo S, Song Y, Ou YL, Xu XY, 2021. Development and technology of a kind of solid beverage prepared with *Tremella fuciformis*. *Edible Fungi of China*, 40(11): 76-81 (in Chinese)
- Zou Y, 2011. Fermentative production of melanin by *Auricularia auricula* and its functional properties. PhD

- Dissertation, Nanjing Agricultural University, Nanjing. 1-155 (in Chinese)
- Zou Y, Yin DM, Hu WZ, Jiang AL, Chen C, Gu ZX, 2013. Physicochemical properties and antioxidant activities of *Auricularia auricula* melanin. Science and Technology of Food Industry, 34(5): 118-120, 125 (in Chinese)
- [附中文参考文献]
- 陈娟钦, 2017. 食疗视角下古田县银耳产业发展的影响因素研究. 福建农林大学硕士论文, 福州. 1-73
- 范明君, 2021. 灵芝液态发酵麸皮提取物的抗氧化、抑菌作用及其活性成分研究. 内蒙古农业大学硕士论文, 呼和浩特. 1-74
- 范心乐, 姚方杰, 王薇, 方明, 王鹏, 2019. 毛木耳黑色素的提取工艺及理化性质研究. 分子科学学报, 35(6): 484-491
- 侯若琳, 王丹亭, 刘鑫, 麦梦贤, 吴小平, 林文雄, 郑明锋, 傅俊生, 2019a. 基于国际专利数据的真菌黑色素创新发展趋势分析. 微生物学通报, 46(6): 1470-1484
- 侯若琳, 袁源, 项凯凯, 吴小平, 林文雄, 郑明锋, 傅俊生, 2019b. 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. 菌物学报, 38(3): 414-427
- 黄嘉芳, 苏佳欣, 吴冰虹, 黄培颖, 张璇, 郑林禄, 2020. 银耳菌糠对亚甲基蓝的吸附特性研究. 广东化工, 47(5): 30-31
- 李红姣, 李巨秀, 赵忠, 2016. 酶法辅助提取山杏种皮黑色素工艺优化及其稳定性. 食品科学, 37(10): 69-75
- 李琦, 2011. 黑木耳黑色素的提取、纯化及其活性研究. 华中农业大学硕士论文, 武汉. 1-81
- 李倩茹, 夏珊, 黄婷, 吴婷, 石桂莲, 叶译蔓, 罗林碧, 李生茂, 2020. 建立酶标仪法检测沙棘的羟自由基清除活性. 食品科技, 45(9): 287-294
- 刘芹, 胡素娟, 崔筱, 宋志波, 孔维丽, 康源春, 2021. 平菇天然黑色素的提取优化及理化性质表征. 中国食用菌, 40(12): 57-65
- 刘鑫, 袁源, 侯若琳, 陈良韬, 吴小平, 郑明锋, 傅俊生, 2019. 毛木耳黑色素提取条件优化及体外抗氧化活性研究. 天然产物研究与开发, 31(10): 1688-1696, 1752
- 鲁明, 付欣, 于淼, 2020. 天然黑色素提取与生物功能研究进展. 中国食品添加剂, 31(1): 165-171
- 单良, 徐利萍, 金青哲, 刘元法, 王兴国, 2008. 黑芝麻黑色素的稳定性及自由基清除活性. 安徽农业科学, 36(26): 11527-11531, 11541
- 师萱, 阎语, 梁旭明, 谭红军, 杨勇, 钟耕, 石文娟, 2016. 银耳菌糠黑色素微波辅助提取工艺优化及其抗氧化活性. 食品与机械, 32(12): 161-165, 174
- 苏梦茹, 马培培, 李鑫鑫, 刘沉, 李妍, 姚倩, 郭抗抗, 2020. 9 种抗菌药物对大肠埃希菌最小抑菌浓度的测定. 动物医学进展, 41(3): 52-56
- 王昭玉, 常明昌, 徐丽婧, 孟俊龙, 左宁柯, 潘旭, 2021. 灵芝子实体、菌丝体和孢子黑色素的表征与理化性质研究. 生物技术通报, 37(11): 81-91
- 吴青, 黄娟, 罗兰欣, 易路遥, 龙树娣, 2006. 15 种中草药提取物抗氧化活性的研究. 中国食品学报, 6(1): 284-289
- 项锦敏, 赵琼瑜, 远航, 彭振辉, 宋伟, 2021. 乌鳖黑色素理化性质及其抗氧化活性研究. 天然产物研究与开发, 33(3): 453-461
- 薛帆正, 黄海辰, 吴福泉, 李晓敏, 吴小平, 傅俊生, 2021. 真菌黑色素研究现状与产业应用. 生物技术通报, 37(11): 32-41
- 杨柳, 刘长姣, 李玉邯, 陈宇飞, 王磊, 张一, 2016. 白芷香豆素的抑菌及稳定性研究. 中国调味品, 41(5): 41-44
- 叶明, 许庆平, 陈晓, 梁一华, 孙汉巨, 2009a. *Lachnum* YM-223 产黑色素发酵及其黑色素抗氧化活性研究. 食品科学, 30(17): 185-189
- 叶明, 朱立, 谭炜, 刘国庆, 袁怀波, 林英任, 庄文颖, 2009b. 巴西粒毛盘菌黑色素理化性质与结构. 菌物学报, 28(3): 393-398
- 张敏, 2015. 木耳黑色素的发酵制备及其抗氧化活性. 温州大学硕士论文, 温州. 1-68
- 张莹, 田龙, 徐敏慧, 王蓓, 宋冰, 李玉, 2020. 食用菌菌糠综合利用研究进展. 微生物学通报, 47(11): 3658-3670
- 赵文恩, 李茜倩, 2011. FRAP 法测定大枣枣皮红色素的总抗氧化能力. 郑州大学学报(工学版), 32(3): 28-30, 35
- 周州, 罗舒, 宋怡, 欧亚龙, 许晓燕, 2021. 一种银耳固体饮料的开发及工艺优化. 中国食用菌, 40(11): 76-81
- 邹宇, 2011. 发酵法制备黑木耳色素及其功能特性研究. 南京农业大学博士论文, 南京. 1-155
- 邹宇, 尹冬梅, 胡文忠, 姜爱丽, 陈晨, 顾振新, 2013. 黑木耳天然黑色素理化性质及其抗氧化活性的研究. 食品工业科技, 34(5): 118-120, 125