

长牡蛎可溶性黑色素的脱盐研究

何成¹, 于文超¹, 蔡忠强², 魏磊¹, 陈军¹, 李佳荣¹, 盖超伟¹, 姜秋云¹,
孙杰³, 王晓安³, 郭文⁴, 王晓通¹

(1. 鲁东大学 农学院, 山东 烟台 264025; 2. 中国水产科学研究院长岛增殖实验站, 山东 长岛 265800; 3. 鲁东大学 生命科学学院, 山东 烟台 264025; 4. 山东省海洋生物研究院, 山东 青岛 266104)

摘要: 该研究是继天然长牡蛎(*Crassostrea gigas*)黑色素的提取、可溶性长牡蛎(*Crassostrea gigas*)黑色素的制备之后, 对牡蛎黑色素提纯方面的进一步拓展和延伸。运用半透化学材料分离的方法, 选取纳滤透析膜为分离介质, 对可溶性长牡蛎黑色素的制取产物中多余的盐类无机物进行分离剔除, 进而得到纯度较高、品质优良的可溶性长牡蛎黑色素晶体, 通过称质量和盐度测量, 计算得出该方法对黑色素脱盐率达到 98%, 证明了该方法可以进行贝类黑色素的脱盐处理工作。

关键词: 长牡蛎(*Crassostrea gigas*); 黑色素纯化; 脱盐; 纳滤膜

中图分类号: P735 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2017)11-0097-05

DOI: 10.11759/hyxx20170731005

牡蛎(*Ostrea gigas*)作为世界上养殖量最大的贝类, 含丰富的蛋白和多糖类营养物质, 产量高, 已成为海洋贝类各方面研究的重要对象^[1]。近几年, 牡蛎全基因组测序完成^[2], 使得牡蛎研究方向更为广泛^[3]。贝类色素作为天然生物色素的良好研究材料, 一直以来都是科研实验室的重要研究对象, 尤其是近年来许多色素的生物功效得到证实使得贝类色素研究更被认可^[4-6]。本课题组人员从牡蛎贝壳色素入手, 选取的天然长牡蛎(*Crassostrea gigas*)黑色素为研究对象, 先后提取出了天然长牡蛎黑色素粗制品^[7], 并利用超声波破碎技术制得了可溶性的长牡蛎黑色素粉末及溶液^[8]。但由于技术限制以及黑色素本身的理化特性, 需要在进行超声破处理过程中加入氢氧化钠和盐酸, 因而过程中会产生杂质盐 NaCl, 该过程又是溶解性处理中不可避免的一部分, 而 NaCl 是普通方法难以去除的。

为了获得高纯度的可溶性长牡蛎黑色素, 利用差离子浓度扩散原理, 选用半通透的纳滤膜为分离材料, 对所得的可溶性黑色素溶液进行离子透析^[9], 再对处理后的黑色素进行干燥即可得到所需产品。该研究是对黑色素制取方法的进一步实验和探究。更纯净的长牡蛎黑色素具有更广泛的应用和研究价值, 该研究的产物可更方便地投入天然色素的功能研究中, 可减少由于杂质引起的干扰, 使得实验结果更为准确。

1 材料与方法

1.1 实验样品

可溶性长牡蛎黑色素溶液: 每组样品取 2 g 天然长牡蛎黑色素粗制品^[7], 溶解于 0.5 mol/L 的 100 mL 氢氧化钠溶液中。利用超声波破碎法对其进行处理, 然后调节 pH 至 7 并离心取上清得到的黑色素溶液, 进行 3 组平行试验。

1.2 实验仪器与试剂

实验试剂主要有碳酸氢钠、EDTA、溴化钾等。实验仪器包括电子数显式盐度计、TU-1810 紫外分光

收稿日期: 2017-07-31; 修回日期: 2017-08-31

基金项目: 山东省重点研发计划资助项目(2015GSF115013); 山东省现代农业产业技术体系贝类创新团队专项经费资助项目(SDAIT-14-03); 烟台市重点研发计划资助项目(2017ZH054); 山东省海洋与渔业科技创新计划资助项目(2017YY03); 山东省自然科学基金博士基金(ZR2017BC058); 山东省高等学校科技计划(J17KA129)

[Foundation: Key Research and Development Program of Shandong Province China, No. 2015GSF115013; Modern Agricultural Industry Technology System of Shandong Province China, SDAIT-14-03; The Key R & D Program of Yantai City, China, No. 2017ZH054; The Innovation Plan for Marine/Fishery Science and Technology of Shandong Province, China, No. 2017YY03; Shandong Provincial Natural Science Foundation, China, No. ZR2017BC058; A Project of Shandong Province Higher Educational Science and Technology Program, No. J17KA129]

作者简介: 何成(1993-), 男, 山东淄博人, 硕士研究生, 主要从事海洋贝类学研究, 电话: 13280915138, E-mail: 1032399602@qq.com; 何成与于文超对本文具有同等贡献。王晓通, 通信作者, 教授, 电话 15589582318, E-mail: wangxiaotong999@163.com

光度计、傅里叶红外光谱仪、电热套、乙酸钠纤维素纳滤膜(相对分子量 MW=500)及配套止水夹等。

1.3 纳滤膜的预处理

将乙酸钠纤维素纳滤膜裁剪为 10 cm 长的小段,使之能够投入 1 000 mL 烧杯而不存在折叠。

将裁剪后的透析膜置于 1 000 mL 的 2%(W/V)碳酸氢钠和 1 mmol/L EDTA(pH 8.0)中煮沸 10 min; 用去离子水彻底清洗透析膜, 后在 1 mmol/L EDTA(pH 8.0)中将透析膜煮沸 10 min。

待冷却后取出透析膜浸泡于 1 000 mL 的去离子水中, 存放于 4℃ 环境待用。

1.4 离子置换透析

将可溶性长牡蛎黑色素溶液分装注入处理好的纳滤透析膜中(每份可装两只), 用止水夹严密封口并检漏, 后置于 1 000 mL 烧杯中, 加入去离子水 1 000 mL (如图 1), 并重复设置 3 个平行实验组以减小实验误差。



图 1 脱盐处理装置

Fig. 1 Appliance used for melanin desalination

第一阶段, 从透析第一天起, 每隔 24 h 使用盐度计测量一次烧杯中去离子水的盐度并记录数值, 直至盐度维持恒定为止。第二阶段, 将透析袋取出, 用去离子水冲洗干净后在新烧杯中换入新的去离子水, 重复以上测量和记录, 直至数值恒定为 0。

将透析膜中的黑色素溶液转移至小口径的烧杯中, 后放入电热鼓风干燥箱, 设置干燥条件为 70℃、48h, 干燥结束后, 将固体结晶剥离, 并用电子天平称质量记录, 并置于密闭离心管封存; 所得固体质量与原料质量的比值即为脱盐处理的产率。

1.5 脱盐后黑色素的鉴定

取少量处理后的黑色素用去离子水完全溶解, 利用紫外分光光度计在 190~500 nm 的范围内进行紫外光谱扫描, 结果用 Excel 作图。

取微量处理后的黑色素固体与 KBr 干粉混合, 研磨均匀后压片, 测定 500~4 000 cm^{-1} 的红外光谱, 结果用 Excel 作图。

2 结果

2.1 盐度数据统计

对脱盐处理期间的盐度测量数据进行统计, 整理如表 1、表 2。

表 1 3 组脱盐处理组第一阶段盐度测量数值统计

Tab. 1 The salinity change in the three desalination groups in the first stage

时间(d)	盐度($\times 10^{-3}\text{kg/L}$)		
	第一组	第二组	第三组
0	0	0	0
1	2.2	2.0	2.2
2	2.5	2.4	2.5
3	2.7	2.6	2.8
4	2.8	2.7	2.9
5	2.9	2.8	2.9
6	2.9	2.8	2.9
7	2.9	2.8	2.9

表 2 3 组脱盐处理组第二阶段盐度测量数值统计

Tab. 2 The salinity change in the three desalination groups in the second stage

时间(d)	盐度($\times 10^{-3}\text{kg/L}$)		
	第一组	第二组	第三组
0	0	0	0
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0

由以上数据可知, 透析处理到第 5 天左右即可趋于稳定, 在处理第二阶段既可达到盐度析出浓度为 0 的恒定状态。为了更直观地显示脱盐的效率趋势, 将表 1 中的数据用 Excel 制作脱盐效率趋势图, 如图 2。

2.2 脱盐后的黑色素固体

经过纳滤膜脱盐处理后的黑色素干燥后, 得到纯黑色有光泽的长牡蛎黑色素固体, 如图 3, 从外观特征来看, 脱盐后, 黑色素纯度比较高, 干燥称质量后, 黑色素结晶平均产量为 0.2041g。

2.3 脱盐后的黑色素鉴定结果

脱盐后黑色素的紫外光谱如图 4, 图中脱盐后的

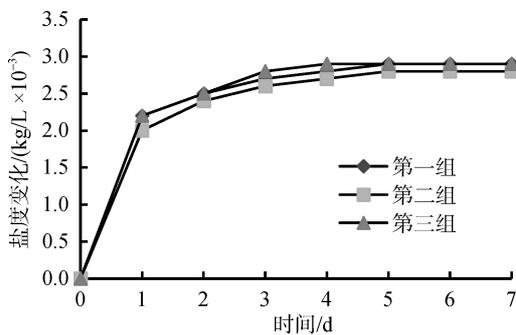


图 2 脱盐效率趋势

Fig. 2 The trend of desalination efficiency

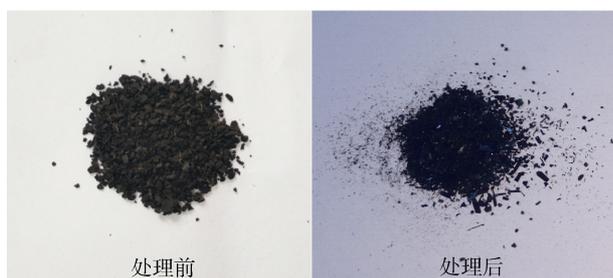


图 3 黑色素粗制品与脱盐处理后的对比

Fig. 3 The comparison between crude melanin and desalinated melanin

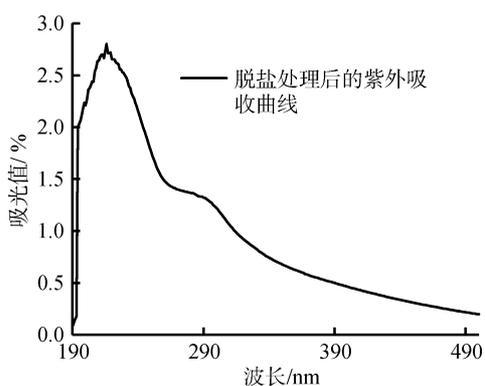


图 4 脱盐处理后黑色素的紫外光谱

Fig. 4 UV absorption spectra: The melanin of desalinated treatment

黑色素在 210 nm~220nm 之间存在最大吸收峰, 且从最大吸收波长至 500nm 吸光值逐渐降低。该趋势与脱盐处理前黑色素紫外光谱趋势一致。

在图 5 显示的红外光谱中, 在 1630 cm^{-1} 和 3400 cm^{-1} 波段仍然存在两处的吸收峰, 与脱盐处理前的趋势和峰值大致相同。

3 讨论

3.1 脱盐后黑色素的理化性质分析

黑色素可分为真黑色素和褐黑色素, 从紫外和红外

的扫描结果来看, 脱盐处理后的黑色素与之前未处理的黑色素趋势一致^[8], 可证明脱盐后的黑色素仍然存在处理前真黑色素的有效官能基团^[10-12], 脱盐处理并未将黑色素脱除而是只脱去了溶解盐。与长牡蛎黑色素粗制品相比, 透析脱盐后的黑色素是深黑色、具有光泽的固体结晶, 区别于未脱盐处理的掺有白色固体杂质的产物。

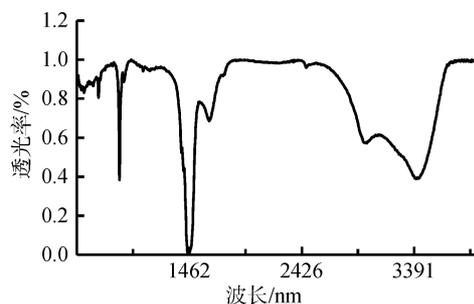


图 5 脱盐处理后黑色素的红外光谱

Fig. 5 IR spectra: The melanin of desalinated treatment

3.2 脱盐量分析

长牡蛎黑色素粗品是不可溶的, 为了得到可溶性的黑色素, 作者酸碱粗提配合超声破碎法制取了可溶性长牡蛎黑色素, 但该过程中引入了 NaOH 和 HCl, 根据方程式 $\text{NaOH} + \text{HCl} = \text{NaCl} + \text{H}_2\text{O}$, 相当于引入了 NaCl, 所以需要进行脱盐处理, 才能保证黑色素的纯度。

已知用盐酸滴定超声后的溶液 pH 调整为 7 时, 原溶液里的氢氧化钠是完全反应的, 配置浑浊液时原体系加入了 2 g 氢氧化钠即 0.05 mol, 按照化学方程式质量守恒定律可得反应所得氯化钠盐 2.925 g。进而可以计算得出黑色素脱盐率, 由表 1、表 2 可知, 第一阶段脱盐至平衡盐度为 2.9×10^{-3} 、 2.8×10^{-3} 、 $2.9 \times 10^{-3}\text{ kg/L}$ 即各组分含盐量分别为 2.9、2.8、2.9 g 计算与理论所得钠盐 2.925 g 可得平均脱盐率为 $(2.9 + 2.8 + 2.9) \div 2.925 = 98.0\%$; 而第二阶段盐度数据均为 0, 即表明第二阶段几乎未脱出盐份, 也就表明, 原黑色素溶液中钠盐已达到最大脱除量。从图 2 来看, 该方法脱盐速率并不平均, 而是随时间增长逐渐递减, 且理论上速率无限接近零, 脱盐量无限接近 2.925 g。该曲线趋势大致符合反正切函数方程^[13-14], 可总结脱盐率方程式为:

$$F = \frac{117}{20\pi} \arctan t \quad (t > 0)$$

3.3 脱盐效率分析

由表 1、表 2 中的数据可知,脱盐透析期间的脱盐速率并不是恒定不变的,而是先快后慢,在处理到一定时间后达到某临界值而钠盐几乎不再脱出。从表 1 数据可知,处理到第 5 天,盐度计所能测得的数值已不再变化。可以推测,在此之后,并不是钠盐不再脱出,而是数值过小,效率过低,使得盐度计无法捕获到数值。因此,在脱盐处理实验过程中,在实验的前 5 天速率较高,之后的速率可以忽略不计。因而从总的处理效率来说,脱盐速率平均每天 19.6%,也就相当于平均每天脱出 NaCl 盐 0.57 g 左右。

4 结论

本研究成功完成了黑色素溶液的脱盐处理,并获得了纯度更高、质量更优的黑色素结晶,该脱盐方法的研究是天然长牡蛎黑色素提取工艺的进一步拓展,在贝类黑色素的生理功能研究和高值化利用方面具备潜在的应用价值。

参考文献:

[1] Deepalakshmi K, Mirunalini S. *Pleurotus ostreatus*: an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties[J]. *Journal of Biochemical Technology*, 2014, 5(2): 718-726.

[2] Zhang G, Fang X, Guo X, et al. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation[J]. *Nature*, 2012, 490(7418): 49-54.

[3] Hao S, Hou X, Wei L, et al. Correction: extraction and identification of the pigment in the adductor muscle scar of Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Plos One*, 2016, 11(2): e0148704.

[4] Rao A V, Rao L G. Carotenoids and human health (Review)[J]. *Pharmacological Research*, 2007, 55(3): 207-216.

[5] Maiani G, Castón M J, Catasta G, et al. Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2009, 53(S2): 194-218.

[6] 霍培, 季静, 王罡, 等. 植物类胡萝卜素生物合成及功能[J]. *中国生物工程杂志*, 2011, 31(11): 107-113.

[7] 于文超, 何成, 武长路, 等. 长牡蛎(*Crassostrea gi-*

gas) 贝壳与外套膜中黑色素的提取和鉴定[J]. *海洋与湖沼*, 2015, 46(4): 909-914.

Yu Wenchao, He Cheng, Wu Changlu, et al. Extraction and identification of melanin in shell and mantle of pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, 46(4): 909-914.

[8] 何成, 于文超, 蔡忠强, 等. 酸碱粗提配合超声破碎法制取可溶性长牡蛎(*Crassostrea gigas*)黑色素的研究[J]. *海洋与湖沼*, 2017, 48(3): 634-639.

He Cheng, Yu Wenchao, Cai Zhongqiang, et al. The preparation of soluble Pacific oyster melanin using the ph-shift processing and ultrasonic-assisted procedure[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2017, 48(3): 634-639.

[9] 张赛男, 李林福, 陈毅勇. 超滤、纳滤膜技术分离浓缩玫瑰茄花青素研究[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(23): 143-147.

Zhang Sainan, Li Linfu, Chen Yiyong. Research of separation and concentration of roselle anthocyanins by ultrafiltration-nanofiltration membrane[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2015, 36(23): 143-147.

[10] 李文, 邓卫东, 毛华明, 等. 乌骨绵羊黑色素的研究进展[J]. *家畜生态学报*, 2007, 28(3): 1-5.

Li Wen, Deng Weidong, Mao Huaming, et al. Advance on melanin in the black bone sheep[J]. *Acta Ecologiae Animalis Domastici*, 2007, 28(3): 1-5.

[11] 李华, 邱祥聘, 龙继蓉, 等. 乌骨鸡黑色素的研究进展[J]. *畜牧与兽医*, 2002, 34(8): 33-35.

Li Hua, Qiu Xiangpin, Long Jirong, et al. Research advances on melatonin in silkies[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2002, 34(8): 33-35.

[12] 郭欣, 陈士国, 薛长湖, 等. 超声降解法制备可溶性鱿鱼墨黑色素及其抗氧化性[J]. *水产学报*, 2013, 37(7): 1113-1120.

Guo Xin, Chen Shiguo, Xue Changhu, et al. Ultra-sound-assisted degradation for preparing soluble melanin from squid ink and its anti-oxidant activity[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(7): 1113-1120.

[13] Rajan S, Wang S, Inkol R, et al. Efficient approximations for the arctangent function[M]. New York: John Wiley & Sons, Inc, 2007: 265-276.

[14] 蔺涛. 反正切函数回归模型方法及其应用[C]//中国现场统计研究会第十二届学术年会论文集. 烟台: 中国现场统计研究会学术年会, 2005.

Lin Tao. Inverse tangent function regression model method and its application[C]// Proceedings of the 12th annual academic annual conference of China statistical research institute. Yantai: Academic Annual Conference Held By Chinese Association Of Applied Statistics, 2005.

Desalination study of soluble melanin of the Pacific oyster

HE Cheng¹, YU Wen-chao¹, CAI Zhong-qiang², WEI Lei¹, CHEN Jun¹,
LI Jia-rong¹, GAI Chao-wei¹, JIANG Qiu-yun¹, SUN Jie³, WANG Xiao-an³,
GUO Wen⁴, WANG Xiao-tong¹

(1. School of Agriculture, Ludong University, Yantai 264025, China; 2. Changdao Enhancement and Experiment Station, Chinese Academy of Fishery Sciences, Changdao 265800, China; 3. School of Life Sciences, Ludong University, Yantai 264025, China; 4. Marine Biology Institute of Shandong Province, Qingdao 266104, China)

Received: Jul. 31, 2017

Key words: Pacific oyster (*Crassostrea gigas*); melanin purification; desalination; nanofiltration membrane

Abstract: This study is the further development and extension of the technology of melanin purification after the extraction of natural and soluble Pacific oyster melanin. The method of permeable membrane separation was applied using a nanofiltration membrane as the medium for separating the redundant salts from the crude melanin of the oyster. Then, the soluble melanin crystal of the Pacific oyster was obtained with a higher purity and quality. We observed that the desalination rate of melanin calculated using weight and salinity reached up to 98%. Therefore, this method can be used for desalination of mollusk melanin.

(本文编辑: 谭雪静)