

网络出版时间:2016-12-26 11:05

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2017.02.027

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20161226.1105.054.html

林蛙卵黑色素的提取工艺及其抗氧化活性

苏玉春,陈 光,郭会楠,肖红庆

(吉林农业大学 生命科学学院,吉林 长春 130118)

[摘 要] 【目的】研究盐酸水解法提取林蛙卵黑色素的最佳工艺,并分析林蛙卵黑色素的抗氧化活性。【方法】以林蛙卵为原料,通过单因素试验和正交试验,分析盐酸浓度、原料与盐酸料(g)液(mL)比、水解温度、水解时间对黑色素提取率的影响,确定林蛙卵黑色素盐酸水解法的最佳提取工艺;应用 DPPH 法、邻二氮菲法及邻苯三酚自氧化检测法,测定林蛙卵黑色素对 DPPH、羟基自由基和 O_2^- 的清除能力。【结果】酸水解法提取林蛙卵黑色素的最佳条件为:盐酸浓度 6 mol/L,料液比 1:30,水解温度 70 ℃,水解时间 2 h,在此条件下,林蛙黑色素提取率达 7.02%。黑色素对 DPPH 自由基具有显著的清除作用,清除 50% DPPH 自由基对应的黑色素质量浓度为 0.6 mg/mL;1.0 mg/mL 黑色素对羟基自由基的清除率达到 65%;黑色素对 O_2^- 的清除率不佳,最高达 28.3%。【结论】盐酸水解法对林蛙卵黑色素的提取效果较好,林蛙卵黑色素具有明显的抗氧化作用。

[关键词] 林蛙卵;黑色素;工艺条件;抗氧化活性

[中图分类号] R282.74

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2017)02-0196-07

Extraction and antioxidant activities of melanin from brown frog eggs

SU Yuchun, CHEN Guang, GUO Huinan, XIAO Hongqing

(College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China)

Abstract: 【Objective】 This study focused on the optimum extraction process of melanin from brown frog eggs by acid hydrolysis and its antioxidant activities. 【Method】 Using brown frog eggs as material, the effects of hydrochloric acid concentration, material to liquid ratio, hydrolysis temperature and hydrolysis duration were studied through single factor experiments and orthogonal test and the optimum hydrolysis process was determined. The scavenging activities on DPPH, hydroxyl free radical and O_2^- of extracted melanin were measured by DPPH method, phenanthroline-Fe (II) oxidation assay and pyrogallol oxidation method. 【Result】 The optimum hydrolysis parameters for melanin extraction from brown frog eggs were: hydrochloric acid concentration 6 mol/L, material (g) to liquid (mL) ratio 1:30, hydrolysis temperature 70 ℃, and hydrolysis duration 2 h. Melanin extraction yield of up to 7.02% was obtained by the method. Melanin had significant clearance ability on DPPH radicals and its concentration for half clearance rate was 0.6 mg/mL. The clearance ability on hydroxyl radical and O_2^- at concentration 1.0 mg/mL were 65% and 28.3%, respectively. 【Conclusion】 Hydrochloric acid hydrolysis was an efficient way to extract melanin from brown frog eggs, and the extracted melanin had significant antioxidant activities.

Key words: brown frog eggs; melanin; hydrolysis parameter; anti-oxidation activities

[收稿日期] 2015-10-16

[基金项目] 吉林省自然科学基金项目(201115189);吉林农业大学博士启动基金项目(2012225)

[作者简介] 苏玉春(1977—),女,吉林吉林人,副教授,博士,主要从事长白山天然产物开发与利用研究。

E-mail: suyuchun@126.com

[通信作者] 陈 光(1961—),女,吉林长春人,教授,博士生导师,主要从事长白山天然产物开发与利用研究。

中国林蛙(*Rana temporaria chensinensis* David),主产于我国东北地区,俗称田鸡、哈士蟆,属两栖纲无尾目蛙科林蛙属。其体内富含蛋白质、糖类以及多种维生素和激素等^[1],具有重要的保健功能^[2]。林蛙卵作为哈蟆油生产的副产品,具有较高的营养价值。陈大勇等^[3]报道林蛙卵多糖具有抗氧化活性。张肃等^[4]和金莉莉等^[5]研究指出,林蛙卵蛋白质具有抗疲劳、抗衰老活性。李铁纯等^[6]对林蛙卵脂肪酸进行了研究。而有关林蛙卵黑色素的报道较少。黑色素作为一种抗氧化剂和新式药物载体,其能够医治由于缺乏黑色素所引发的疾病。应超^[7]研究表明,黑色素具有抗氧化和防止衰老等功能。田军^[8]报道,黑色素能降低血管脆性,减少出血时间。徐磊等^[9]研究发现,短梗霉黑色素不仅能显著抑制体外培养的艾滋病病毒,还能减缓癌细胞的生长速度。吴晨霞等^[10]报道,木耳黑色素具有抗氧化活性。目前,有关黑色素的提取方法主要有盐酸水解法和酶解法等。张莲姬等^[11-12]研究了泥鳅鱼皮黑色素的酸法提取工艺和抗氧化作用。宋茹等^[13]报道了酶解法提取鱿鱼墨黑色素的工艺。本研究以中国林蛙卵为原料,研究盐酸水解法提取黑色素的工艺及其抗氧化活性,以期对林蛙卵黑色素的进一步开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

东北林蛙购自吉林省长春市三禾参业生物工程有限公司。将林蛙处死后冷冻干燥,取林蛙油后得到的林蛙卵经粉碎后过0.177 mm筛备用。

HH-S型恒温水浴锅,江苏省金坛市恒丰仪器厂;GL-21LM冷冻离心机,湖南星科仪器有限公司;T6新世纪紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 林蛙卵黑色素的盐酸水解法提取 参照游艳华等^[14]的方法,略做改动。具体步骤为:林蛙卵粉末(10.00 g)→乙醚浸提(2 h)→过滤→沉淀挥干乙醚→加入盐酸水解→离心(5 000 r/min, 15 min)→过滤→沉淀用蒸馏水洗至中性→碱溶(体积分数5% NaOH溶液 200 mL)→静置12 h→离心(5 000 r/min, 15 min)→滤液加盐酸沉淀(6 mol/L HCl调节pH值为1)→静置12 h→离心(5 000 r/min, 15 min)→干燥(60℃)→黑色素。

1.2.2 林蛙卵黑色素提取的单因素试验 以林蛙

卵黑色素提取率为指标,分别考察盐酸浓度、料液比、水解温度、水解时间4因素对黑色素提取率的影响,每因素设定6个梯度,进行单因素试验。

黑色素提取率=黑色素质量/林蛙卵质量×100%

(1)盐酸浓度对黑色素提取率的影响。准确称取林蛙卵粉末6份,每份10.00 g,加入100 mL乙醚浸泡2 h,过滤,沉淀挥干乙醚,加入料(g)液(mL)比为1:20,用浓度分别为3,4,5,6,7,8 mol/L的盐酸进行水解,水解温度60℃,水解时间3 h,其他步骤同1.2.1节。

(2)料液比对黑色素提取率的影响。准确称取林蛙卵粉末6份,每份10.00 g,加入100 mL乙醚浸泡2 h,过滤,沉淀挥干乙醚,按照料(g)液(mL)比为1:5,1:10,1:20,1:30,1:40,1:50,分别加入6 mol/L盐酸进行水解,水解温度60℃,水解时间3 h,其他步骤同1.2.1节。

(3)水解温度对黑色素提取率的影响。准确称取林蛙卵粉末6份,每份10.00 g,加入100 mL乙醚浸泡2 h,过滤,沉淀挥干乙醚,加入料(g)液(mL)比为1:20、6 mol/L盐酸进行水解,水解温度分别为40,50,60,70,80,90℃,水解时间3 h,其他步骤同1.2.1节。

(4)水解时间对黑色素提取率的影响。准确称取林蛙卵粉末6份,每份10.00 g,加入100 mL乙醚浸泡2 h,过滤,沉淀挥干乙醚,加入料(g)液(mL)比为1:20、6 mol/L盐酸进行水解,水解温度60℃,水解时间分别为1,2,3,4,5,6 h,其他步骤同1.2.1节。

1.2.3 林蛙卵黑色素提取的正交试验 在单因素试验基础上,进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,并以黑色素提取率为指标,确定最佳提取工艺条件。正交试验方案见表1。

1.3 林蛙卵黑色素清除自由基DPPH能力的测定

根据文献[15-17]的方法称取林蛙卵黑色素提取物,配成质量浓度为0.1,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,1.2 mg/mL的溶液,然后各取1 mL加入到4 mL DPPH溶液中,总体积为5 mL,摇匀,室温放置30 min,在517 nm波长处测定上清液的吸光度($A_{\text{样品}}$),同时在4 mL DPPH溶液中加入1 mL体积分数5%的NaOH溶液,记录吸光度值($A_{\text{空白}}$),由于维生素C的抗氧化性良好,因此以相同质量浓度的维生素C为阳性对照^[10]。

清除率=($A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}$)/ $A_{\text{空白}}$ ×100%。

表 1 林蛙卵黑色素提取的 $L_9(3^4)$ 正交试验方案

Table 1 Factors and levels of $L_9(3^4)$ orthogonal design test for melanin extraction from brown frog eggs

水平 Level	因素 Factor			
	盐酸浓度/(mol·L ⁻¹) Hydrochloric acid concentration	原料与盐酸的料(g) 液(mL)比 Material-liquid ratio	水解温度/℃ Temperature	水解时间/h Time
	A	B	C	D
1	5	1 : 20	50	2
2	6	1 : 30	60	3
3	7	1 : 40	70	4

1.4 林蛙卵黑色素清除羟基自由基能力的测定

利用 Fenton 反应,采用邻二氮菲法^[18]测定林蛙卵黑色素对羟基自由基的清除能力。将黑色素提取物分别配制成质量浓度为 0.1,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,1.2 mg/mL 的溶液。将 pH 7.4 磷酸盐缓冲液 2.0 mL 和 0.75 mmol/L 邻二氮菲-无水乙醇溶液 1 mL 分别加入到试管中,振荡摇匀后,加入 1.0 mL 0.75 mmol/L FeSO₄ 立即混匀;然后将 1.0 mL 蒸馏水加入该试管中,再加入 1.0 mL 体积分数 0.01% H₂O₂,37℃水浴状态下保温 1 h,537 nm 下测定吸光度值(A_1),用 1.0 mL 蒸馏水和不同质量浓度的黑色素溶液分别替代上述 H₂O₂,测定吸光度值分别为 A_0 及 A_2 ,计算清除率。以相同质量浓度的维生素 C 为阳性对照^[10]。

清除率 = $(A_2 - A_1) / (A_0 - A_1) \times 100\%$ 。

1.5 林蛙卵黑色素清除 O₂⁻ 能力的测定

采用邻苯三酚自氧化检测法^[19]测定林蛙卵黑色素对 O₂⁻ 的清除能力。将黑色素提取物分别配制成质量浓度为 0.1,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,1.2 mg/mL 的溶液。取 4.5 mL pH 为 8.2 的 Tris-HCl 缓冲溶液于试管中,然后向试管中加入 3.2 mL 蒸

馏水,加入 1 mL 待测黑色素样品,充分振荡混匀,25℃水浴 20 min;取出后立即加入预先在 25℃水浴中加热的浓度为 20 mmol/L 的邻苯三酚 0.3 mL,空白管以 10 mmol/L 的 HCl 代替邻苯三酚溶液,迅速摇匀,在波长为 325 nm 处测定吸光度值,每隔 30 s 测定 1 次并记录相应数据,计算线性范围内吸光度值每分钟的变化量,并计算对 O₂⁻ 清除率。以相同质量浓度的维生素 C 为阳性对照^[10]。

清除率 = $(\Delta A_0 - \Delta A) / \Delta A_0 \times 100\%$ 。

式中: ΔA_0 为对照管吸光度值的变化率, ΔA 为样品管吸光度的变化率。

2 结果与分析

2.1 盐酸浓度对林蛙卵黑色素提取率的影响

从图 1 可以看出,随着盐酸浓度的增大,林蛙卵黑色素的提取率逐渐升高,当盐酸浓度为 6 mol/L 时提取率达到最高,继续提高 HCl 浓度,黑色素提取率则基本保持不变,考虑到黑色素中可能含有其他基团,酸度过高可能会影响其提取纯度,因此确定提取黑色素的盐酸最佳浓度为 6 mol/L。

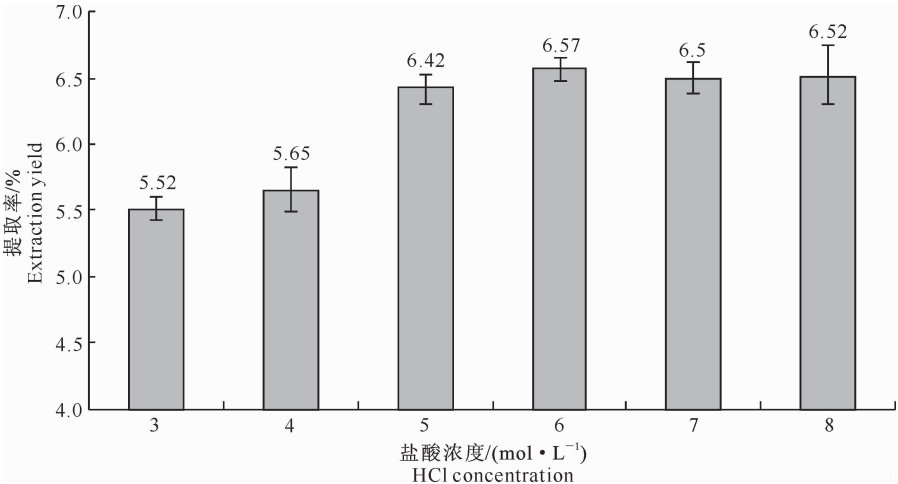


图 1 盐酸浓度对林蛙卵黑色素提取率的影响

Fig. 1 Effect of hydrochloric acid concentration on t extraction yield of melanin from brown frog eggs

2.2 料液比对林蛙卵黑色素提取率的影响

从图 2 可以看出,随着料液比的增加,林蛙卵黑色素的提取率逐渐增加。当料液比为 1 : 30 时,黑

色素提取率则趋于平缓,这是因为料液比较低时,黑色素溶解量少;料液比较高时,呈现饱和状态,溶解量趋于平衡。因此确定最佳料液比为 1 : 30。

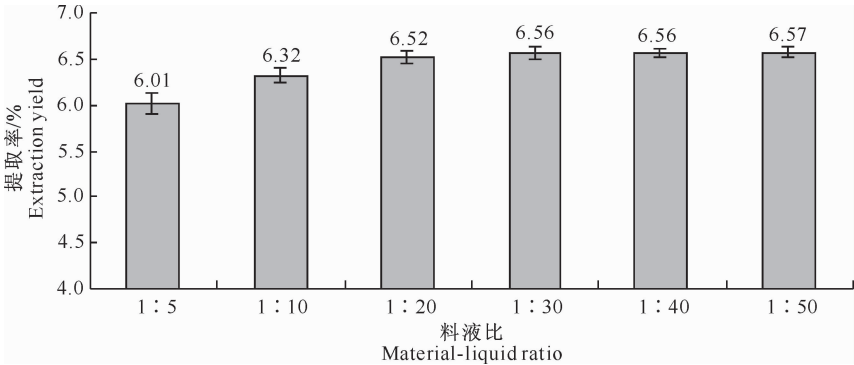


图 2 料液比对林蛙卵黑色素提取率的影响

Fig. 2 Effect of material-liquid ratio on extraction yield of melanin from brown frog eggs

2.3 水解温度对林蛙卵黑色素提取率的影响

从图 3 可以看出,随着温度的升高,林蛙卵黑色素的提取率逐渐增大。当温度为 60 ℃时,黑色素提

取率达到最大;温度继续升高,黑色素提取率下降,可能是因为此时黑色素结构不稳定所致。因此确定最佳的水解温度为 60 ℃。

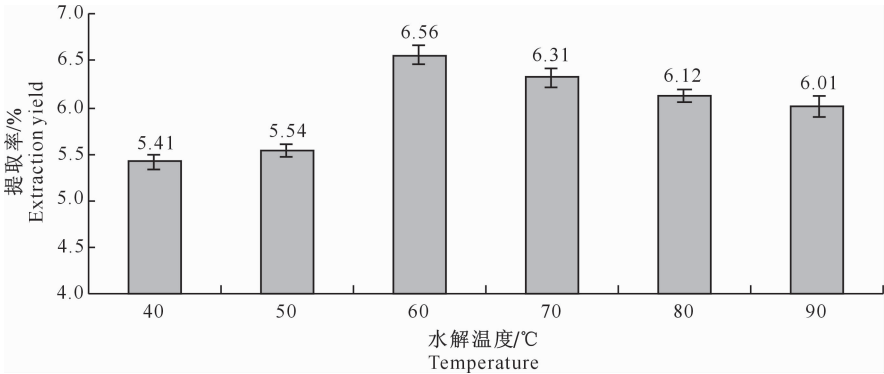


图 3 水解温度对林蛙卵黑色素提取率的影响

Fig. 3 Effect of temperature on extraction yield of melanin from brown frog eggs

2.4 水解时间对林蛙卵黑色素提取率的影响

由图 4 可以看出,随着水解时间增大,黑色素提取率逐渐升高,于水解 3 h 达最高值,水解时间超过

3 h 时,提取率缓慢下降,这可能是由于水解时间过长导致黑色素分解所致。因此确定最佳的水解时间为 3 h。

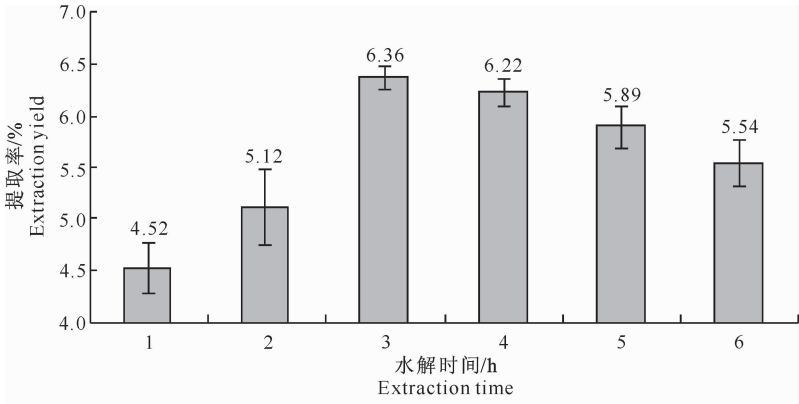


图 4 水解时间对林蛙卵黑色素提取率的影响

Fig. 4 Effect of time on extraction rate of melanin from brown frog eggs

2.5 林蛙卵黑色素提取的正交试验结果

从表 2 可以看出,林蛙卵黑色素的最佳提取工艺为 A₂B₂C₃D₁,即盐酸浓度 6 mol/L,料液比

1 : 30,水解温度 70 ℃,水解时间 2 h,在此条件下林蛙卵黑色素的提取率为 7.02%。

表 2 林蛙卵黑色素提取的正交试验结果

Table 2 Orthogonal test results of melanin extraction from brown frog eggs

试验号 Test No.	盐酸浓度 Hydrochloric acid concentration A	原料与盐酸的 料(g)液(mL)比 Material-liquid ratio B	水解时温度 Temperature C	水解时间 Time D	提取率/% Extraction yield
1	1	1	1	1	6.38
2	1	2	2	2	6.28
3	1	3	3	3	6.39
4	2	1	2	3	6.27
5	2	2	3	1	7.02
6	2	3	1	2	6.41
7	3	1	3	2	6.54
8	3	2	1	3	6.09
9	3	3	2	1	6.43
K ₁	6.350	6.397	6.293	6.610	
K ₂	6.567	6.463	6.327	6.410	
K ₃	6.353	6.410	6.650	6.250	
R	0.217	0.066	0.357	0.360	

2.6 林蛙卵黑色素清除自由基 DPPH 的能力

由图 5 可知,林蛙卵黑色素对 DPPH 自由基的清除能力随其质量浓度的升高而增大;黑色素对 DPPH 自由基的半数清除率的质量浓度为 0.6 mg/mL,表明林蛙卵黑色素对 DPPH 自由基有很好

的清除作用,与对照维生素 C 相比,清除效果稍差。

2.7 林蛙卵黑色素清除羟基自由基的能力

林蛙卵黑色素对羟基自由基的清除能力见图 6。

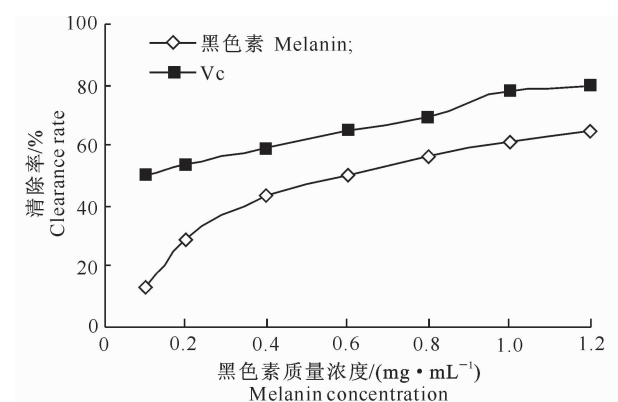


图 5 林蛙卵黑色素对 DPPH 自由基的清除能力
Fig. 5 Effect of brown frog eggs melanin concentration on scavenging ability of DPPH

图 6 表明,随着黑色素质量浓度的增加,其对羟基自由基的清除能力也逐渐升高。当黑色素质量浓度增加到 0.8 mg/mL 时,清除率达到 50%;黑色素质量浓度达到 1.0 mg/mL 时,其清除率为 65%,接近于抗坏血酸(Vc)的清除率,此时对羟自由基的清除效果最好。

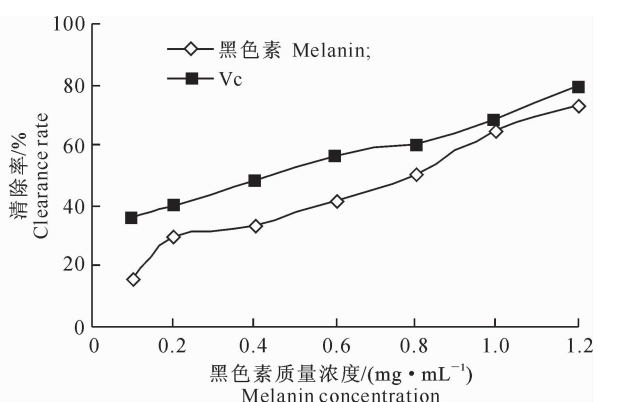


图 6 林蛙卵黑色素对羟基自由基的清除能力
Fig. 6 Effect of brown frog eggs melanin concentration on scavenging ability of hydroxyl radicals

2.8 林蛙卵黑色素清除 O₂⁻ 的能力

图 7 表明,林蛙卵黑色素对 O₂⁻ 有一定的清除能力,随着黑色素质量浓度的增加,其对 O₂⁻ 的清除率逐渐上升。但与对照维生素 C 相比,清除效果较差,质量浓度为 1.0 mg/mL 时,清除率仅为 28.3%。

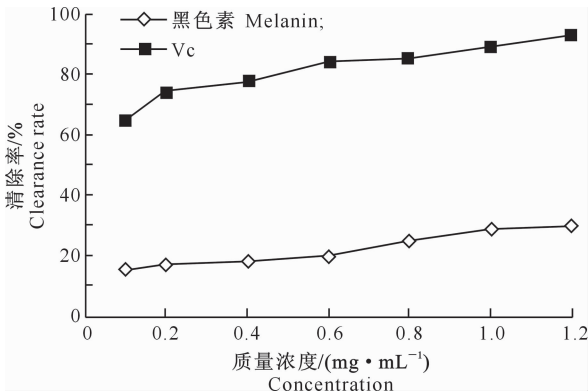


图 7 林蛙卵黑色素对 O₂⁻ 的清除能力

Fig. 7 Effect of brown frog eggs melanin concentration on clearance ability of superoxide radicals

3 讨论与结论

目前,黑色素的提取方法主要有盐酸水解法和酶解法^[20-21],其中盐酸水解法工艺简单,操作方便,可操作性强,因此本研究用此法提取林蛙卵中的黑色素。在试验过程中发现,沉淀环节中适当延长时 间,有利于黑色素的提取与精制,从而提高提取效率。在本研究所得最佳工艺下提取林蛙卵黑色素的提取率(7.02%)比张连姬等^[11](2.23%)及游艳华等^[14](3.36%)的提取率高,原因是林蛙卵黑色素在卵中存在相对集中,提取容易。在抗氧化试验中发现,林蛙卵黑色素具有较好的抗氧化活性,但与其他黑色素^[12,14-15]相比,其抗氧化能力略低。本研究确定的林蛙卵黑色素提取的最优条件为:盐酸浓度 6 mol/L,料(g)液(mL)比 1:30,水解温度 70℃,水解时间 2 h,在此条件下,黑色素提取率为 7.02%。

[参考文献]

[1] 中国药用动物志. 中国药用动物志: 第一册 [M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1982: 174-176.
China Medicinal Fauna Compileto Cooperate. China medicinal fauna: first book [M]. Tianjin: Tianjin Science and Technology Press, 1982: 174-176.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010 版 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
State Pharmacopoeia Committee. Phmacopoeia of the Peoples Republic of China: 2010 [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2010.

[3] 陈大勇, 杨 靖, 李 硕, 等. 林蛙卵多糖的提取工艺及其抗氧化作用研究 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2013, 41(12): 149-154.
Chen D Y, Yang J, Li S, et al. Optimization of polysaccharides extraction from brown frog egg and the antioxidant activity of

extracted polysaccharides [J]. Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed), 2013, 41(12): 149-154.

[4] 张 肃, 胡春晓, 金莉莉, 等. 东北林蛙卵蛋白抗疲劳活性研究 [J]. 特产研究, 2010, 22(1): 7-9.
Zhang S, Hu C X, Jin L L, et al. Study on the anti-fatigue function of the egg protein of chinese frog rana dybowskii [J]. Special Wild Economics Animal and Plant Research, 2010, 22(1): 7-9.

[5] 金莉莉, 刘德文, 范文今, 等. 中国林蛙卵、卵油及输卵管对红细胞 SOD 活性的影响 [J]. 中国公共卫生, 2002, 18(5): 607.
Jin L L, Liu D W, Fan W J, et al. Effect of brown frog egg, egg oil and oviduct on SOD activity of red blood cell [J]. China Public Health, 2002, 18(5): 607.

[6] 李铁纯, 侯冬岩, 刁全平, 等. 两种方法提取林蛙肝脂肪酸的气质联用分析 [J]. 食品科学, 2012, 33(18): 195-196.
Li T C, Hou D Y, Diao Q P, et al. Analysis of fatty acids in *Rana chensinensis* eggs by two different extraction methods combined with GC-MS [J]. Food Science, 2012, 33(18): 195-196.

[7] 应 超. 黑色食品中黑色素的研究现状 [J]. 科学教育, 2010, 16(1): 95-96.
Ying C. Research status on melanin of black food [J]. Science Education, 2010, 16(1): 95-96.

[8] 田 军. 黑色食品市场前景广阔 [J]. 中国农业信息, 2007(3): 39.
Tian J. Black food has a prospective marketing [J]. Chinese Agricultural Information, 2007(3): 39.

[9] 徐 磊, 王长海. 短梗霉黑色素的提取及其理化性质的研究 [J]. 食品科学, 2006, 27(8): 122-125.
Xu L, Wang C H. Extraction and physico-chemical characteristics of the melanin produced by *Aureobasidium pullulans* [J]. Food Science, 2006, 27(8): 122-125.

[10] 吴晨霞, 陈 萍, 金 晖, 等. 木耳黑色素的提取及其抗氧化研究 [J]. 食用菌, 2013(4): 73-75.
Wu C X, Chen P, Jin H, et al. Study on extraction and antioxidant of melanin from *Auriezaria aurieuza* [J]. Edible Fungi, 2013(4): 73-75.

[11] 张莲姬, 崔泰花. 泥鳅鱼皮黑色素提取工艺的研究 [J]. 江苏农业科学, 2009(5): 263-265.
Zhang L J, Cui T H. Study on the melanin extraction from loach skin [J]. Jiangsu Agricultural Science, 2009(5): 263-265.

[12] 张莲姬. 泥鳅鱼黑色素抗氧化作用 [J]. 食品研究与开发, 2010, 31(8): 11-14.
Zhang L J. Study on antioxidant activity of the loach melanin [J]. Food Research and Development, 2010, 31(8): 11-14.

[13] 宋 茹, 李厚宝, 邓尚贵. 鱿鱼墨黑色素酶解法提取工艺优化及其紫外、红外光谱特征分析 [J]. 食品科学, 2011, 32(18): 63-67.
Song R, Li H B, Deng S G. Optimization of enzymatic preparation of natural melanin from squid ink and its spectral characterization [J]. Food Science, 2011, 32(18): 63-67.

[14] 游艳华, 许 军, 严 明. 乌骨鸡黑色素的提取实验 [J]. 中国

兽医学杂志,2007,36(1):10-11.

You Y H,Xu J,Yan M. Study on extraction of melanin from *Taihe* Silkies [J]. Journal of China Veterinary,2007,36(1):10-11.

[15] 蔡华珍,陈守江,张 丽,等. 乌骨鸡黑色素的酶法提取及其抗氧化作用的初步研究 [J]. 食品与发酵工业,2006,26(1):99-102.

Cai H Z,Chen S J,Zhang L,et al. A primary study on separating of melanin by enzymic hydrolysis of protein and on antioxidantization of the melanin in *Taihe* Silkies [J]. Food and Fermentation Industries,2006,26(1):99-102.

[16] Li X C,Lin J,Gao Y X,et al. Antioxidant activity and mechanism of *Rhizoma cimicifugae* [J]. Chemistry Central Journal,2012;6(1):140.

[17] Qiao D L,Ke C L,Hu B. Antioxidant activities of polydactharrides from *Hyriopsis cumingii* [J]. Carbohydrate Polymers,2009,78(1):199-204.

[18] 范冠宇,谢 虹,吴志刚. 水溶性几丁聚糖对羟自由基的清除作用 [J]. 中国公共卫生,2006,22(6):676-677.

Fan G Y,Xie H,Wu Z G. Scavenging effect of water-soluble chitosan on hydroxyl radical [J]. China Public Health,2006,22(6):676-677.

[19] 许申鸿,杭 瑚,李运平. 超氧化物歧化酶邻苯三酚测活法的研究及改进 [J]. 化学通报,2001,19(8):516-519.

Xu S H,Hang H,Li Y P. Study and improvement of markland SOD activity assay [J]. Chemistry Bulletin,2001,19(8):516-519.

[20] 张建萍,蔡 峻,邓音乐,等. 野生 *Bc* 菌株产黑色素的研究 [J]. 微生物学通报,2006,33(1):42-45.

Zhang J P,Cai J,Deng Y L,et al. Characterization of melanin produced by a wild-type strain of *Bacillus cereus* [J]. Microbiology China,2006,33(1):42-45.

[21] 並木雅彦,河合良三,青木良行,等. 黑色素的制造方法、由该方法制造的黑色素、含有该黑色素的功能性薄膜及其制造方法:101233196A [P]. 2008-07-30.

Kawai Ryozou,Aoki Ryuki,Takakuwa Kouhei,et al. Method for producing melanin,melanin produced by the method,comprising a functional film of the melanin and its manufacturing method:101233196A [P]. 2008-07-30.

[27] 于保霞. 食品中亚硝酸盐含量的测定 [J]. 河北化工,2010,33(3):62-63.

Yu B X. The determination of the nitrite content of several foods [J]. Hebei Chemical,2010,33(3):62-63.

[28] 赵 静,王 娜,冯叙桥,等. 蔬菜中硝酸盐和亚硝酸盐检测方法的研究进展 [J]. 食品科学,2014,35(8):42-49.

Zhao J,Wang N,Feng X Q,et al. Advances in detection methods for nitrate and nitrite in vegetables [J]. Food Science,2014,35(8):42-49.

[29] 谢文仙,韩雅莉. 焦性没食子酸清除亚硝酸盐和阻断亚硝胺作用探究 [J]. 食品科技,2015,40(2):318-323.

Xie W X,Han Y L. Effect of pyrogalllic acid cleaning nitrite and blocking nitrosamines [J]. Food Science and Technology,2015,40(2):318-323.

[30] 刘可心,兰永强,杨 娜,等. 木蝴蝶总黄酮的提取及体外清除亚硝酸盐及阻断亚硝胺合成的研究 [J]. 西北药学杂志,2015,30(6):669-674.

Liu K X,Lan Y Q,Yang N,et al. Extraction of total flavonoids from *Oroxylum indicum* (L.) Vent and the *in vitro* study on its abilities of scavenging nitrite and the synthetic blocking effect of nitrosamine [J]. Pharmaceutical Journal of Northwest,2015,30(6):669-674.

[31] 胡 利,贾冬英,姚 开,等. 桑叶黄酮对亚硝酸盐的体外清除作用研究 [J]. 中国调味品,2015,40(3):1-5.

Hu L,Jia D Y,Yao K,et al. Research on nitrite scavenging activity of mulberry leaf flavonoids *in vitro* [J]. China Condi-ment,2015,40(3):1-5.

[32] 冯丽丹,艾对元,张银彩,等. 蕨菜粗多糖对亚硝酸盐清除作用的研究 [J]. 中国果菜,2014,34(4):59-61.

Feng L D,Ai D Y,Zhang Y C,et al. Study on nitrite scavenging of bracken polysaccharide [J]. Chinese Fruit,2014,34(4):59-61.

[33] 范培红,娄红祥. 葡萄籽多酚的分离鉴定及其对细胞 DNA 氧化损伤的防护作用 [J]. 药学报,2004,39(11):869-875.

Fan P H,Lou H X. Isolation and structure identification of grape seed polyphenols and its effects on oxidative damage to cellular DNA [J]. Acta Pharmaceutica Sinica,2004,39(11):869-875.

(上接第 195 页)