

喷雾冷冻干燥对葛仙米藻胆蛋白抗氧化特性的影响

程超^{1,2}, 朱玉婷², 田瑞², 汪兴平², 潘思轶^{1,*}

(1. 华中农业大学食品科学技术学院, 湖北 武汉 430070; 2. 湖北民族学院生物科学与技术学院, 湖北 恩施 445000)

摘要: 研究喷雾冷冻干燥对葛仙米藻胆蛋白抗氧化特性的影响, 并与冷冻干燥技术进行比较。主要测定 ABTS⁺·、铁还原抗氧化能力(FRAP)、对羟自由基(·OH)清除作用和 H₂O₂ 诱导的脂质过氧化的抑制作用, 结果发现, 喷雾冷冻干燥(SFD)对葛仙米藻胆蛋白的抗氧化特性有一定的影响, 在基于电子转移和氢原子转移的抗氧化测定方法中, SFD 与冷冻干燥(FD)制备的样品差异不明显, 但在基于活性氧自由基清除的测定方法中, SFD 显著优于 FD。表明 SFD 非常适合于高活性成分的干燥。

关键词: 喷雾冷冻干燥; 冷冻干燥; ABTS⁺·; FRAP; D-脱氧核糖; 脂质过氧化

Effect of Spray Freeze Drying on Antioxidant Activity of Phycocyanin from *Nostoc sphaeroides* Kützing

CHENG Chao^{1,2}, ZHU Yu-ting², TIAN Rui², WANG Xing-ping², PAN Si-yi^{1,*}

(1. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

2. Biological Scientific and Technical College, Hubei University for Nationalities, Enshi 445000, China)

Abstract: In this study, the effect of spray freeze drying on the antioxidant activity of phycobiliprotein from *Nostoc sphaeroides* Kützing was studied and compared with that of common freeze drying. The scavenging effect of phycobiliprotein on ABTS⁺· and hydroxyl radicals (·OH), H₂O₂-induced lipid peroxidation and ferric-ion reducing power (FRAP) were evaluated. The results indicated that spray freeze drying method had obvious effect on antioxidant activity of phycobiliprotein from *Nostoc sphaeroides* Kützing. The samples dried by two different methods showed no significant difference in the antioxidant activity determined based on electron transfer and hydrogen atom transfer. The free radical scavenging activity of the sample dried by spray freeze drying method was markedly higher than that of the sample dried by common freeze drying method. These data suggest that spray freeze drying is more suitable for drying active substances.

Key words: spray freeze drying; freeze drying; ABTS free radical; FRAP; D-deoxyribose; lipid peroxidation

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)13-0036-04

藻胆蛋白是存在于红藻、蓝绿藻和隐藻中的色素复合物, 目前国内外相继开展了藻胆蛋白(phycobiliprotein, PBP)抗氧化特性的研究, 如钝顶螺旋藻蛋白质提取物可抑制羟自由基(·OH)产生^[1]。大鼠肝微粒体脂肪过氧化可很好的被螺旋藻天然和还原藻蓝蛋白(phycocyanin, PC)抑制^[2]; Bermejo-Bescós 等^[3]也发现 PC 可抑制脂质过氧化; 水华束丝藻 PC 可明显抑制 H₂O₂、2,2'-偶氮二异丁脒氢氯化物(AAPH)诱导的氧化性溶血和脂肪过氧化^[4]。来源于 *Spirulina fusciformis* 的 PC 暴露在蓝光下, 可增强对 DPPH 自由基、·OH、次氯酸、氧化自由基吸收能力(oxygen radical absorbance capacity, ORAC)和

铁还原抗氧化能力(ferric reducing antioxidant power, FRAP)的抑制^[5]。

葛仙米(*Nostoc sphaeroides* Kützing)是一种多细胞丝状蓝藻, 主要分布于湖北省鹤峰县走马坪, 范刚等^[6]报道葛仙米中藻胆蛋白含量为 7.38%; 汪兴平等^[7-8]发现葛仙米 PC、藻红蛋白(phycoerythrin, PE)对 H₂O₂、·OH、活性氧自由基(O₂⁻·)具有清除作用, 能明显降低丙二醛生成及血和肝中过氧化物含量。以往研究中藻胆蛋白的制备方式通常采用的是冷冻干燥(freeze drying, FD), 但是此法干燥所需时间很长, 有必要寻求更快速的样品制备方法。

收稿日期: 2011-11-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(30970284); 湖北民族学院团队项目(MY2008T004; MYT2007004)

作者简介: 程超(1976—), 女, 副教授, 博士研究生, 研究方向为食品化学。E-mail: chengchaolw@126.com

* 通信作者: 潘思轶(1964—), 男, 教授, 博士, 研究方向为农产品加工化学。E-mail: pansiyi@mail.hzau.edu.cn

喷雾冷冻干燥(spray freeze drying, SFD)是近几年发展起来的新型干燥技术,结合了喷雾干燥(spray drying, SD)和FD两项技术优点,特别适合于干燥高附加值的产品^[9]。根据抗氧化活性的主要表现,可将目前主要的抗氧化方法分为:以脂质氧化降解为基础的方法、以清除自由基为基础的方法、测定待测物的还原能力方法和其他方法^[10]。因此本实验以葛仙米为原料进行PBP的提取,采用喷雾冷冻干燥和冷冻干燥技术进行PBP产品制备,研究不同PBP产品对ABTS⁺·、FRAP、·OH和脂肪过氧化的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

葛仙米购于湖北省鹤峰县走马镇。

2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、水溶性VE(Trolox)、2,4,6-三吡啶吡嗪(TPTZ)、硫代巴比妥酸(TBA)、三氯乙酸(TCA)、乙二胺四乙酸二钠(EDTA)等均为分析纯。

1.2 仪器与设备

FA2104电子天平 上海天平仪器厂;UV1900PC紫外双光束可见分光光度计 上海亚研电子科技有限公司;CR21G高速冷冻离心机 日本日立公司;ALPHA1-4真空冷冻干燥机 德国M. CHRIS公司;YC-3000喷雾冷冻干燥设备 上海雅程仪器设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 冷冻干燥制备葛仙米PBP

准确称取30g脱脂干葛仙米粉用适量蒸馏水复溶,于-20℃反复冻融3次,用pH7.3磷酸氢二钾-氢氧化钠缓冲液在4℃条件下浸提,10000r/min离心15min,30%硫酸铵沉淀去除杂蛋白,离心上清液用60%硫酸铵沉淀,沉淀透析后过羟基磷灰石,收集过滤液后进行FD,用pH7.3、50mmol/L磷酸氢二钾-氢氧化钠缓冲液溶解得冷冻干燥藻胆蛋白(freeze drying phycobiliprotein, FDP)。

1.3.2 喷雾冷冻干燥制备葛仙米PBP

样品前处理同冷冻干燥样品,沉淀透析后过羟基磷灰石,收集过滤液后进行SFD,后用pH7.3、50mmol/L的磷酸氢二钾-氢氧化钠缓冲液溶解得喷雾冷冻干燥藻胆蛋白(spray freeze drying phycobiliprotein, SFDP)。

1.3.3 葛仙米PBP中PC和PE含量测定

将FDP和SFDP用pH7.3、50mmol/L的磷酸氢二钾-氢氧化钠缓冲液溶解(10mg/mL),于230~700nm波长范围内进行紫外扫描,按照式(1)、(2)计算其中PC和PE含量^[11]。

$$\text{PC含量}/(\text{mg/mL}) = \frac{\text{OD}_{610\text{nm}}}{7.38} \quad (1)$$

$$\text{PE含量}/(\text{mg/mL}) = \frac{\text{OD}_{565\text{nm}} - 2.8 \times \text{PC含量}}{12.7} \quad (2)$$

1.3.4 对H₂O₂诱导的肝脏脂质过氧化的影响

取小鼠的肝组织,用冷的生理盐水洗净后冰浴下匀浆,制成体积分数为1%悬浮液。取此悬浮液1mL、不同质量浓度样品0.1mL、6mmol/L FeSO₄ 0.1mL、60mmol/L H₂O₂ 0.1mL,对照组加0.1mL水或pH7.3磷酸氢二钾-氢氧化钠缓冲液,37℃温育1h后,加入15% TCA 1mL,终止反应,以3000r/min离心10min,取上清液,加0.67% TBA 1mL后,沸水浴15min,流水冷却,测定532nm波长处的吸光度,按照式(3)计算样品对脂质过氧化的抑制率^[12]。

$$\text{抑制率}/\% = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{对照}}} \times 100 \quad (3)$$

1.3.5 对H₂O₂诱导的红细胞溶血的影响

小鼠眼眶取血,肝素抗凝,2000r/min离心分离得红细胞,冷生理盐水洗涤3次,直至上层澄清无红色,制成0.5%悬浮液。取红细胞悬液4mL,加入0.5mL不同质量浓度的样品,以溶解样品的溶剂为对照组,最后加0.4mL 260mmol/L H₂O₂溶液启动反应,37℃温育1h后,2500r/min离心10min,于波长415nm处测定吸光度,按照式(4)计算样品对H₂O₂诱导的红细胞溶血的抑制率^[12]。

$$\text{抑制率}/\% = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{对照}}} \times 100 \quad (4)$$

1.3.6 FRAP法测定抗氧化特性

参照杨继涛^[13]的方法。60μL样品提取液顺序加入1mL蒸馏水和1.8mL TPTZ溶液,混匀后37℃反应10min,在593nm比色,同时以Trolox为标准品进行实验,以Trolox浓度为横坐标, A_{593nm}为纵坐标绘制标准曲线,得到Trolox标准曲线方程为: y = 0.044 + 0.001x, R² = 0.996。根据样品的A_{593nm}带入Trolox回归方程,最终结果以μmol/L Trolox等量抗氧化能力(Trolox equal antioxidant capacity, TEAC)表示。

1.3.7 ABTS⁺·法测定抗氧化特性

用2.45mmol/L的过硫酸钾配制7mmol/L的ABTS贮备液,室温、避光条件下静置12~16h,将ABTS贮备液用10mmol/L pH7.4磷酸缓冲液稀释制备ABTS测试液,使其在734nm的吸光度为0.7 ± 0.02,取4mL ATBS测试液,加入60μL样品溶液,振摇30s,反应6min后,测定734nm波长处的吸光度^[14],按照式(5)计算样品对ABTS⁺·的抑制率。

$$\text{抑制率}/\% = (1 - \frac{A_{\text{样品}}}{0.7}) \times 100 \quad (5)$$

1.3.8 D-脱氧核糖体系对·OH的清除作用

在干净磨口试管中依次加入0.4mL 50mmol/L pH7.5的KH₂PO₄-KOH缓冲液,一定质量浓度样品,0.1mL 1.04mmol/L的EDTA溶液,0.1mL 10mmol/L的H₂O₂,0.1mL 60mmol/L的D-脱氧核糖(对照不加),0.1mL 2mmol/L的VC,以及0.1mL 1mmol/L FeCl₃,各试管终体积为1mL,37℃保温1h后取出,加入1mL 20%三氯乙酸终止反应,再加入1mL 1.0% TBA,将每个试管中溶液混合均匀,于沸水浴上煮沸15min,立即冷却。(若有混浊)加入3mL正丁醇萃取,取上清液在波长532nm处比色。按式(6)计算·OH清除率^[15]。

$$\cdot\text{OH清除率}/\% = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100 \quad (6)$$

式中:A₀为空白对照液吸光度;A₁为加入样品溶液后的吸光度;A₂为样品本底吸光度。

1.4 数据分析

实验均重复3次,各个参数的显著性分析均采用SPSS16.0进行AVONA分析。

2 结果与分析

2.1 不同干燥方式对葛仙米PBP含量测定结果的影响

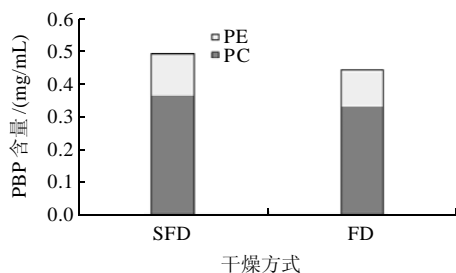


图1 干燥方式对葛仙米PBP含量的影响

Fig.1 Effect of different drying methods on results of determination of phycobiliprotein content in *Nostoc sphaeroides* Kütting

由图1可知,SFD对PE、PC的保留量要高于FD,通过计算发现SFDP和FDP的PC/PE含量比值分别为2.793和2.865,二者无显著差异($P > 0.05$)。

2.2 对ABTS⁺·的抑制作用及在FRAP中的还原作用
FRAP和ABTS⁺·是基于电子转移的抗氧化测定方法,此法评价的是抗氧化剂维持氧化还原状态的能力,两部分的实验结果具体见图2。统计分析发现,SFDP对铁离子的还原能力极显著高于FDP($P < 0.01$)。

通过回归方程计算,SFDP和FDP对ABTS⁺·的IC₅₀分别为0.1941mg/mL和0.1813mg/mL,将其IC₅₀进行

统计分析发现二者对ABTS⁺·的清除效果差异不显著($P > 0.05$)。

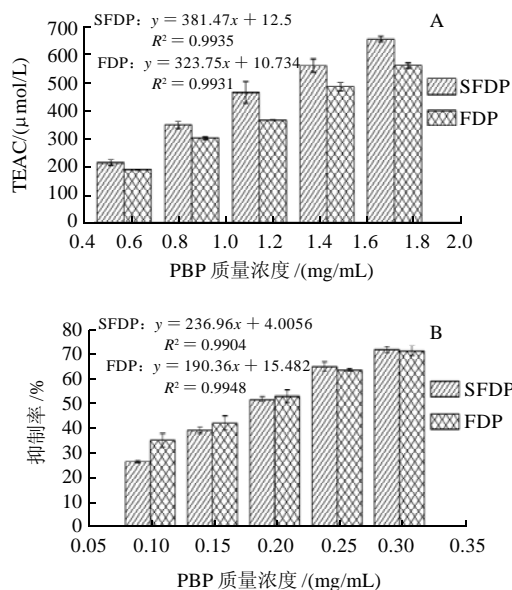


图2 葛仙米PBP在FRAP中的还原作用(A)和对ABTS⁺·的抑制率(B)

Fig.2 ABTS free radical scavenging effect (B) and FRAP (A) of phycobiliprotein from *Nostoc sphaeroides* Kütting

2.3 D-脱氧核糖体系对·OH的清除能力

抗氧化剂对·OH的清除是基于对活性氧的清除能力,利用D-脱氧核糖体系建立·OH反应体系,结果见图3。

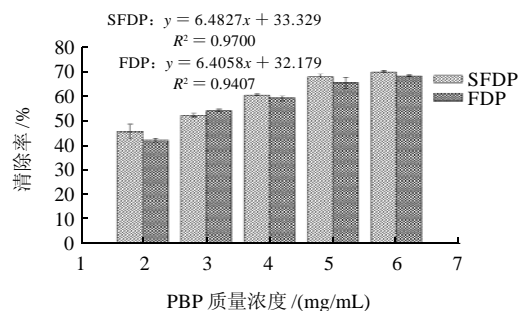


图3 葛仙米PBP对·OH的抑制作用

Fig.3 Inhibitory rate of phycobiliprotein from *Nostoc sphaeroides* Kütting on hydroxyl free radicals

根据图3中的回归方程可计算出SFDP和FDP的IC₅₀分别为2.572mg/mL和2.782mg/mL,对其IC₅₀进行方差分析,发现二者差异显著($P < 0.05$),说明就D-脱氧核糖体系而言,SFDP的清除效果优于FDP。

2.4 对H₂O₂诱导的肝脏脂质过氧化的影响

脂质过氧化的常用检测方法有过氧化值法、硫氰酸铁法、共轭二烯法和TBARS反应法等。在这些方法中,TBARS反应法是生物样品中最常使用的,其抗氧化机理是基于氢原子转移,是抗氧化剂所扮演的生物最相关的反应,结果见图4。

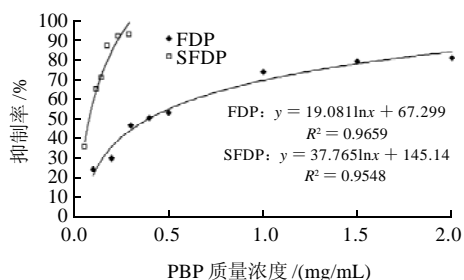


图4 葛仙米PBP对H₂O₂诱导的脂质过氧化的抑制率

Fig.4 Inhibitory rate of phycobiliprotein from *Nostoc sphaeroides* Kitting on lipid peroxidation

由图4可知,两种干燥方式的PBP对脂质过氧化的抑制效果均呈现对数相关,其中SFDP对脂质过氧化的抑制率明显优于FDP,其IC₅₀分别为0.0805mg/mL和0.4039mg/mL,对其IC₅₀进行方差分析,发现二者对H₂O₂诱导的脂质过氧化具有极显著差异($P < 0.01$)。

2.5 对H₂O₂诱导的红细胞溶血的抑制作用

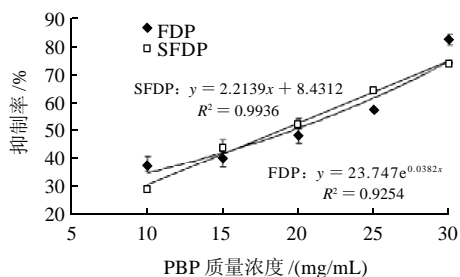


图5 葛仙米PBP对H₂O₂诱导的红细胞溶血的抑制率

Fig.5 Inhibitory rate of phycobiliprotein from *Nostoc sphaeroides* Kitting on red blood cell (RBC) hemolysis induced by H₂O₂

由图5可知, SFDP对H₂O₂诱导的红细胞溶血的抑制作用略优于FDP,通过回归方程可计算出SFDP和FDP的IC₅₀为18.776mg/mL和19.491mg/mL,方差分析发现二者对H₂O₂诱导的红细胞溶血差异不显著($P > 0.05$)。

3 结论与讨论

3.1 由于没有统一的抗氧化作用评价的标准方法,所以在对抗氧化作用研究时,本实验选取了3种不同作用机制的抗氧化测定方法来共同说明葛仙米PBP的抗氧化能力,就本研究所选用的几种测定方法结果具有一定的一致性。

3.2 根据实验结果发现,基于电子转移和活性氧的抗氧化测定方法中, SFDP和FDP的抗氧化效果相当,但SFDP在FRAP体系中对Fe³⁺的还原能力强于FDP。可是基于氢原子转移和活性氧的抗氧化测定方法中, SFDP的效果显著优于FDP。

3.3 SFDP的抗氧化效果优于FDP,这可能与其中PC和PE的含量有关,这也说明SFDP技术对生物活性的保留率要高于FDP,原因可能有4种: 1)SFD的喷雾冷凝

温度为-50℃,利用喷头使样品瞬时形成细小冰晶,实验时FD预冻时采用的温度为-18℃,其冻结速度要远远慢于SFD; 2)SFD采用空气自然加热升华,而FD利用的是隔热板的加热升华,相比较而言空气自然加热升华使样品的稳定性进一步提高了; 3)由于SFDP在FD前将样品喷成了雪花状,增大了干燥面积,相同体积的SFDP的时间大大缩短; 4)制备的葛仙米PBP为粗样品,除了含PBP外还有其他糖类等物质,这些不同的成分在不同干燥方式中保存方式可能不同,同时在实验中发现, SFDP可以很好的溶解在KH₂PO₄-NaOH缓冲液中,但是完全不溶于水,而FDP在KH₂PO₄-NaOH缓冲液和水中的复溶效果都很好,其原因可能与此有关,具体变化尚在研究。

参考文献:

- [1] PALOMA B, ENRIQUE P, ÁNGELMA V. Iron-chelating ability and antioxidant properties of phycocyanin isolated from a protean extract of *Spirulina platensis*[J]. Food Chemistry, 2008, 110(2): 436-445.
- [2] BHAT V B, MADYASTHA K M. C-Phycocyanin: a potent peroxy radical scavenger *in vivo* and *in vitro*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000, 275(1): 20-25.
- [3] BERMEJO-BESCÓS P, PIÑERO-ESTRADA E, VILLAR del FRESNO Á M. Neuroprotection by *Spirulina platensis* protean extract and phycocyanin against iron-induced toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells [J]. Toxicology in Vitro, 2008, 22(6): 1496-1502.
- [4] BENEDETTI S, BENVENUTI F, PAGLIARANI S, et al. Antioxidant properties of a novel phycocyanin extract from the blue-green alga *Aphanizomenon flosaquae*[J]. Life Sciences, 2004, 75(19): 2353-2362.
- [5] MADHYASTHA H K, SIVASHANKARI S, VATSALA T M. C-phycocyanin from *Spirulina fusciformis* exposed to blue light demonstrates higher efficacy of *in vitro* antioxidant activity[J]. Biochemical Engineering Journal, 2009, 43(2): 221-224.
- [6] 范刚, 陈德文, 潘思轶, 等. 葛仙米藻蛋白提取工艺及藻蛋白稳定性研究[J]. 食品科学, 2005, 26(9): 215-218.
- [7] 汪兴平, 谢笔均, 潘思轶, 等. 葛仙米藻红蛋白体外抗活性氧自由基作用的研究[J]. 食品科学, 2005, 26(8): 404-407.
- [8] 汪兴平, 谢笔均, 潘思轶, 等. 葛仙米藻蓝蛋白抗氧化作用研究[J]. 食品科学, 2007, 28(12): 458-461.
- [9] 黄立新, 郑文辉, 王成章, 等. 喷雾冷冻干燥在植物提取和医药中的应用[J]. 林产化学与工业, 2007, 27(增刊 1): 143-146.
- [10] 杜国荣. 猕猴桃、柿和苹果果实的抗氧化能力及其抗氧化活性成分的分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2009.
- [11] ROMÁN R B, ALVÁREZ-PEZ J M, ACIÉN FERNÁNDEZ F G, et al. Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*[J]. Journal of Biotechnology, 2002, 93(1): 73-85.
- [12] FU Hongfei, XIE Bijun, MA Shaojun, et al. Evaluation of antioxidant activities of principal carotenoids available in water spinach (*Ipomoea aquatica*)[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2011, 24(2): 288-297.
- [13] 杨继涛. 柿(*Diospyros kaki* L.)果实抗氧化能力的分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2009.
- [14] 林恋竹, 赵谋明. 反应时间对 DPPH·法、ABTS·法评价抗氧化性结果的影响[J]. 食品科学, 2010, 31(5): 63-67.
- [15] 张俐勤, 戚向阳. 罗汉果皂甙提取物的分离、纯化及对体外自由基的清除作用[J]. 食品与发酵工业, 2006, 27(3): 16-18.