

# 葛仙米藻胆蛋白与色度降解动力学

程超<sup>1,2</sup>, 薛峰<sup>3</sup>, 李伟<sup>1</sup>, 汪兴平<sup>1,2,\*</sup>

(1.湖北民族学院生物资源保护与利用湖北省重点实验室, 湖北恩施 445000; 2.湖北民族学院生物科学与技术学院, 湖北恩施 445000; 3.西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西杨凌 712100)

**摘要:**以葛仙米藻胆蛋白为原料, 研究pH值、温度和光照对其色度和含量的影响, 建立葛仙米藻蓝蛋白及其色度的降解动力学, 结果发现pH 3色素溶液在可见光区几乎没有藻蓝蛋白特征吸收峰, 随pH值增加藻蓝蛋白特征吸收峰值逐渐增强, 至pH 6达最高, 之后逐渐下降; pH值增加藻蓝蛋白特征峰有轻微的蓝移效应。pH 4色素溶液Hunter-*b*最小, 其蓝色最深, 且每种pH值色素溶液的Hunter-*b*差异极显著。藻蓝蛋白在50 °C半衰期分别是60 °C和70 °C的8.09倍和11.05倍; 而色度在50 °C半衰期分别是60 °C和70 °C的29.17倍和72.74倍。

**关键词:**葛仙米; 藻蓝蛋白; 色度; 降解动力学

## Degradation Dynamics of Phycocyanin and Its Chroma from *Nostoc sphaeroides* Kützing

CHENG Chao<sup>1,2</sup>, XUE Feng<sup>3</sup>, LI Wei<sup>1</sup>, WANG Xing-ping<sup>1,2,\*</sup>

(1. Hubei Key Laboratory of Biological Resource Conservation and Utilization, Hubei University for Nationalities, Enshi 445000, China; 2. School of Biological Science and Technology, Hubei University for Nationalities, Enshi 445000, China; 3. College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

**Abstract:** In this article, using phycobiliprotein of *Nostoc sphaeroides* Kützing as raw material, the influence of pH, temperature and light on the chroma and concentration of phycobiliprotein were studied, and established the degradation kinetics of phycocyanin and its chroma of *Nostoc sphaeroides* Kützing. The results showed that aqueous phycocyanin at pH 3 exhibited almost no characteristic absorption peaks in the visible region, and characteristic absorption peaks appeared and the peak values gradually increased along with increasing pH, reaching the maximum at pH 6, followed by a gradual decrease. The characteristic absorption peaks of phycocyanin displayed a slight blue shift at higher pH levels. The Hunter-*b* value of phycocyanin was the lowest at pH 4, and its darkest color was blue. There was a significant difference in Hunter-*b* value at all pH levels tested. The half-life of phycocyanin at 50 °C was 8.09 and 11.05 times higher than those at 60 °C and 70 °C, respectively and the half-life of chroma at 50 °C was 29.17 and 72.74 times higher than those 60 °C and 70 °C respectively.

**Key words:** *Nostoc sphaeroides* Kützing; phycocyanin; chroma; degradation dynamics

中图分类号: TS201.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2014) 09-0016-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201409004

在构成藻胆蛋白的蛋白质中, 由于其所含色素不同产生的颜色也有差异, 如藻蓝蛋白主要呈现蓝色, 藻红蛋白主要呈现紫红色, 别藻蓝蛋白显示的是浅蓝色<sup>[1]</sup>。近年来人们对藻胆蛋白稳定性进行了一些研究, 如螺旋藻蛋白干粉在暗处和室内自然光下较稳定, 直射光下稍差。螺旋藻蛋白色素在10%乙醇溶液或50%甘油溶液中较稳定, Cu<sup>2+</sup>可破坏其稳定性, 乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)和柠檬酸可使其稳定性增强, 山梨酸可保护溶液色泽<sup>[2]</sup>。张以芳等<sup>[3]</sup>发现藻蓝蛋白在低于40 °C、pH 4.0~8.5较稳定, 45 °C以

上有变色现象, 荧光性减弱, 糖可提高藻蓝蛋白对热稳定性, 光照对藻蓝蛋白影响较小。当酒精体积分数低于40%, 温度低于30 °C, pH 4~10钝顶螺旋藻藻蓝蛋白可保持较好生物结构和活性<sup>[4]</sup>。陈新美等<sup>[5]</sup>发现螺旋藻藻蓝蛋白提取物在pH 4.0~8.5、40 °C以下和弱光环境中表现稳定。但毕海等<sup>[6]</sup>发现紫外辐照抑制了钝顶螺旋藻中藻蓝蛋白含量和纯度, 藻蓝素的结构也发生了明显改变。螺旋藻藻蓝蛋白在20 °C和30 °C时保持稳定, pH值为中性时藻蓝蛋白稳定性良好<sup>[7]</sup>。范刚等<sup>[8]</sup>发现葛仙米藻蓝蛋白在低于30 °C、乙醇体积分数小于10%、pH 6~8条件下比较

收稿日期: 2014-01-18

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目(31260365); 湖北省教育厅团队项目(T201312);

生物资源保护与利用湖北省重点实验室开放课题(PKLHB1322); 湖北民族学院博士启动基金项目(MY2012B011)

作者简介: 程超(1976—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为天然产物化学。E-mail: chengchaolw@126.com

\*通信作者: 汪兴平(1963—), 男, 教授, 博士, 研究方向为天然产物化学。E-mail: hbmywxp@163.com

稳定。以上研究主要集中在光照、乙醇、温度、pH值、添加剂对藻胆蛋白稳定性的影响, 这些因素对藻胆蛋白的色度影响还是未知, 而在红曲色素和叶绿素等方面已经有报道<sup>[9-10]</sup>。此外藻胆蛋白具有较强的抗氧化、抗癌和抗炎作用, 可以作为荧光探针进行医疗检测等, 但这些作用的发挥依赖于藻胆蛋白的稳定性, 因此本实验以葛仙米藻胆蛋白为原料, 研究pH值、温度和光照对其色度和与之关联的藻蓝蛋白的影响, 为探讨高效利用葛仙米藻胆蛋白提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

葛仙米 湖北省恩施市鹤峰县。

乙酸、磷酸氢二钾、乙酸钠、氢氧化钠、硫酸铵、山梨酸钾(分析纯) 国药集团化学试剂有限公司。

### 1.2 仪器与设备

CR-400色度计 Sensing公司; UV-1700 SPC型紫外-可见分光光度计 日本Shimadzu公司; 高速冷冻离心机、Φ660pH/Temp/Mv Meter Beckman公司; DF-101S集热式恒温加热磁力搅拌器 郑州长城科工贸有限公司; SH045恒定湿热试验箱 上海实验仪器总厂。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 葛仙米藻胆蛋白制备

称取脱脂葛仙米粉30 g, 复水后于-20 °C反复冻融3次, 后高速匀浆, 4 °C、pH 7.3的50 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH缓冲液浸提, 10 000 r/min离心15 min, 20%饱和硫酸铵去除杂蛋白后上清液接着用60%饱和硫酸铵沉淀, 透析过羟基磷灰石柱层析后冷冻干燥得产品<sup>[11]</sup>。

#### 1.3.2 葛仙米藻蓝蛋白含量测定

参考Román等<sup>[12]</sup>的方法略微进行了修改, 由于葛仙米藻胆蛋白中不含别藻蓝蛋白, 因此原公式中的别藻蓝蛋白的部分去掉。

$$\text{藻蓝蛋白含量}/(\text{mg/mL}) = \frac{A_{613 \text{ nm}}}{7.38} \quad (1)$$

式中:  $A_{613 \text{ nm}}$ 为藻蓝蛋白在613 nm波长处的吸光度。

#### 1.3.3 色度测定

配制5 mg/mL葛仙米藻胆蛋白色素溶液, 用色度仪测试样品的Hunter-L和Hunter-b值。Hunter L表示亮度, Hunter b值在色相环中表示黄色(-Hunter b值表示蓝色)<sup>[13]</sup>。

#### 1.3.4 葛仙米藻蓝蛋白在不同光照下的稳定性

采用乙酸-乙酸钠缓冲液配制pH 5.0的5 mg/mL葛仙米藻胆蛋白溶液, 在所有处理中加入0.2%山梨酸钾以防止溶液腐败。22 °C于黑暗、日光和蓝光照射3种条件下, 间隔1 d测定Hunter-b值和藻蓝蛋白含量变化。

#### 1.3.5 pH 5的葛仙米藻胆蛋白色素溶液的热稳定性

采用乙酸-乙酸钠缓冲液配制pH 5的5 mg/mL藻胆蛋白色素溶液, 将色素溶液分别在50、60、70 °C条件下恒温加热处理, 每隔一定时间取样, 为保证受热均匀水浴时注意不断摇匀, 样品在热处理之后用流水迅速冷却。冷却后测定溶液的Hunter-b值和藻蓝蛋白含量。

对葛仙米藻胆蛋白不同温度处理下的含量变化, 做动力学分析如下: 降解动力学方程的反应速率常数( $k$ )和半衰期( $t_{1/2}$ )可采用下面公式计算得出<sup>[14]</sup>。

$$\ln(\rho/\rho_0) = -k \times t; t_{1/2} = -\ln 0.5 \times k^{-1} \quad (2)$$

此公式可以用来表明藻蓝蛋白和色度对温度依赖性。活化能 $E_a$ 和频率常数 $K_0$ 可以从一级反应速率常数的对数( $\ln k$ )对绝对温度的倒数( $1/T$ )的作图中求出。

$$k = K_0 \exp(-E_a/RT); \ln k = -E_a/RT + \ln K_0 \quad (3)$$

式中:  $\rho_0$ 为初始质量浓度/(mg/mL);  $\rho$ 为在选择温度下加热 $t$ 段时间后的质量浓度/(mg/mL);  $k$ 为一级反应速率常数/ $\text{min}^{-1}$ ;  $K_0$ 为频率常数/ $\text{min}^{-1}$ ;  $t$ 为热处理时间/h;  $E_a$ 为活化能/(kJ/mol);  $R$ 为气体常数, 取8.314 J/(mol·K);  $T$ 为绝对温度/K。

### 1.4 数据分析

每组重复测定10次取平均值, 采用Origin 8.0软件作图, SPSS 16.0软件对数据结果进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同pH值缓冲液中葛仙米藻蓝蛋白吸收光谱

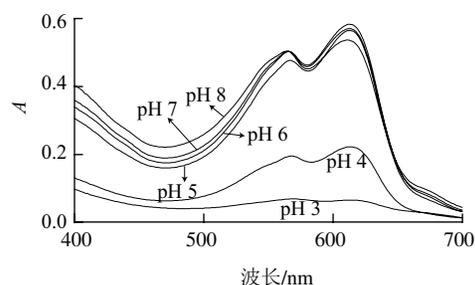


图1 不同pH值缓冲液中葛仙米藻蓝蛋白吸收光谱

Fig.1 Absorption spectra of phycocyanin from *Nostoc sphaeroides* Kültzing in different pH buffers

分别配制5 mg/mL的不同pH 3~8的葛仙米藻胆蛋白色素溶液, 在400~700 nm进行紫外扫描, 结果见图1。pH 3色素溶液几乎无色, 在可见光区几乎没有藻蓝蛋白特征吸收峰, 可能是因为在极端pH值条件下藻胆蛋白的聚合度发生改变, 影响其光吸收能力, 当pH值低于4或高于10时, 会导致别藻蓝蛋白三聚体发生解聚, 二级结构发生剧烈变化, 其光能吸收被破坏<sup>[15-16]</sup>, 本结果与此对应, 说明藻蓝蛋白也可能发生类似的结构变化。此外随pH值增加, 色素溶液特征吸收峰逐渐增强, 至pH 6藻蓝蛋白特征吸收

( $A_{613\text{nm}}$ ) 达最高值, 之后开始逐渐下降; 可能是pH值对藻蓝蛋白中与色素结合的蛋白构象的影响不同, 进而影响整体发色。此外pH值会影响葛仙米藻蓝蛋白特征吸收峰位置, pH值增加藻蓝蛋白特征峰有轻微的蓝移效应。

## 2.2 不同pH值葛仙米藻蓝蛋白溶液的色泽指数

### 2.2.1 葛仙米藻蓝蛋白溶液不同pH值下色素亮度指数和彩度指数

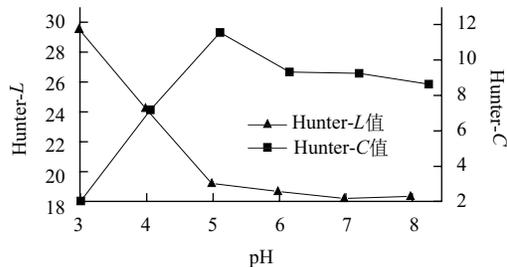


图2 葛仙米藻蓝蛋白溶液不同pH值下色素亮度指数和彩度指数  
Fig.2 Hunter-L and Hunter-C values of phycocyanin from *Nostoc sphaeroides* Kützing at different pH values

由图2可知, 不同pH值的葛仙米藻胆蛋白色素溶液的亮度值Hunter-L随pH值增加逐渐减弱, 即pH 3.0色素溶液亮度最高, 说明其中的有色物质少, 相反随pH值增加亮度减弱, 有色物质含量逐渐增加, 这与图1结果一致。而彩度值Hunter-C在pH 3.0最低, 至pH 5.0达到最高, 之后逐渐下降, 彩度值Hunter-C其实是指色素溶液颜色的饱和度, pH 5之后溶液的彩度下降是因为随pH值增加色素溶液中藻红蛋白所占比例上升(对应图1的紫外扫描图谱的 $A_{565\text{nm}}$ 的吸收峰), 这使得藻蓝蛋白的彩度下降。

### 2.2.2 葛仙米藻蓝蛋白溶液不同pH值条件下的Hunter-b

表1 不同pH值藻蓝蛋白色素溶液的Hunter-b差异性比较

Table 1 Comparison of Hunter-b values of phycocyanin from *Nostoc sphaeroides* Kützing at different pH values

pH	3	4	5	6	7	8
Hunter-b	$-6.920 \pm 0.010^{\text{ab}}$	$-11.027 \pm 0.013^{\text{cd}}$	$-8.788 \pm 0.020^{\text{bc}}$	$-8.537 \pm 0.022^{\text{ab}}$	$-7.577 \pm 0.021^{\text{bc}}$	$-1.803 \pm 0.004^{\text{ab}}$

注: 大写字母表示差异极显著 ( $P < 0.01$ ); 小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

由表1的Hunter-b可以看出, 随pH值增加, 葛仙米藻胆蛋白色素溶液Hunter-b逐渐增加, 但是在pH 4.0陡然下降, 而pH 8.0色素溶液的Hunter-b是最低的, Hunter-b负值越小, 说明这种色素溶液的蓝色越深; 因此pH4色素溶液蓝色最深, 后随pH值增加蓝色逐渐变浅。通过SPSS16.0软件分析每种pH值色素溶液的Hunter-b差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

## 2.3 光照对葛仙米藻蓝蛋白色素稳定性的影响

实验过程中发现pH 6.0和pH 7.0缓冲液配制的藻胆蛋白 (phycobiliprotein, PBP) 溶液, 光照2 d后易出现混浊, 从而影响吸光度测定, 因此本部分实验只进行了pH 5.0缓冲液光照降解实验, 具体结果见图3和图4。

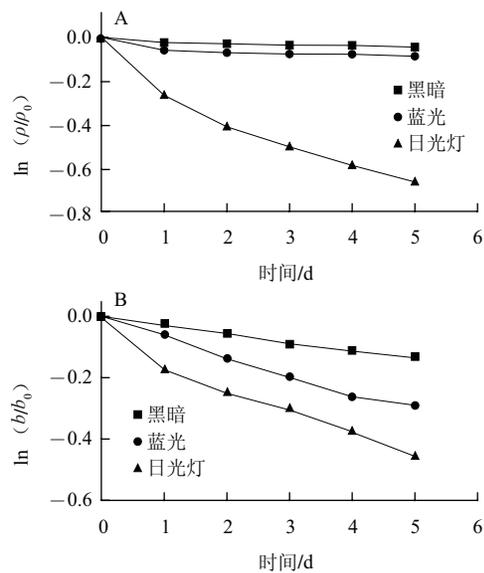


图3 藻胆蛋白溶液光处理时的藻蓝蛋白 (A) 及其色泽的降解 (B)  
Fig.3 Degradation of phycocyanin (A) from *Nostoc sphaeroides* Kützing and its color (B) under different light conditions

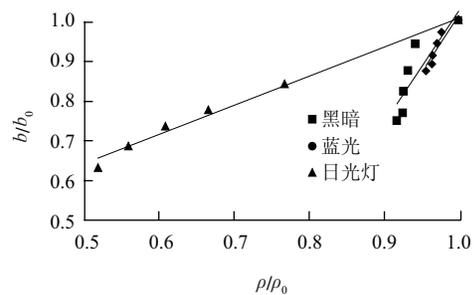


图4 光处理过程中藻蓝蛋白与色泽降解的关系图  
Fig.4 Linear relationships between the degradation of phycocyanin from *Nostoc sphaeroides* Kützing and its color under different light conditions

由图3、4可知, 不同光照对pH5.0的葛仙米藻胆蛋白色素溶液的藻蓝蛋白的含量影响不同, 日光灯照射最易导致藻蓝蛋白降解, 蓝光对其有一定的保护作用, 但相比较黑暗条件而言, 仍有部分降解; 图4表明藻蓝蛋白及其色泽的光降解符合线性关系。He等<sup>[17]</sup>曾报道在光照条件下藻蓝蛋白具有产生自由基的作用, 而暗处具有清除自由基的作用, 所以光照导致藻蓝蛋白色度下降可能是产生的自由基的作用。Madhyastha等<sup>[18]</sup>发现暴露在蓝光下的C-藻蓝蛋白具有清除能力, 所以蓝光对藻蓝蛋白及其色度具有一定的保护作用。

## 2.4 温度对葛仙米藻胆蛋白色素稳定性的影响

由图5、6可知, 选择光照处理组对应的pH 5.0缓冲液的进行温度稳定性的实验, 结果发现葛仙米藻蓝蛋白色素溶液在高温处理时会有明显的褪色现象, 并且温度越高褪色越明显, 分别测定不同温度处理下藻蓝蛋白的保留率和Hunter-b值的变化。

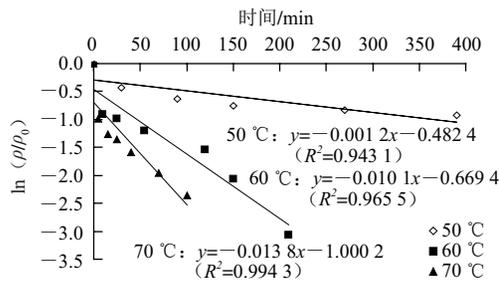


图5 葛仙米藻蓝蛋白在热处理过程中的降解

Fig.5 Degradation of phycocyanin from *Nostoc sphaeroides* Kützing during thermal treatment

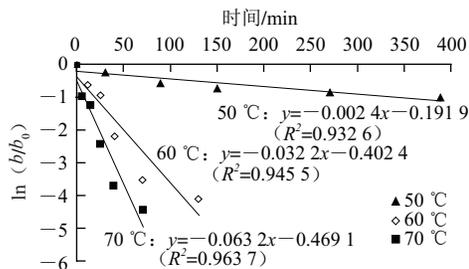


图6 葛仙米藻胆蛋白色泽在热处理过程中的降解

Fig.6 Color degradation of phycocyanin from *Nostoc sphaeroides* Kützing during thermal treatment

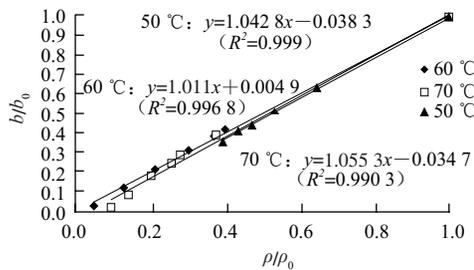


图7 热处理过程中藻蓝蛋白与色泽降解的关系图

Fig.7 Linear relationships between the degradation of phycocyanin from *Nostoc sphaeroides* Kützing and its color during thermal treatment

表2 葛仙米藻胆蛋白溶液热处理过程中藻蓝蛋白和色泽的热降解参数  
Table 2 Thermal degradation parameters of phycocyanin from *Nostoc sphaeroides* Kützing and its color during thermal treatment

温度/°C	藻蓝蛋白 (pH 5.0)		色泽	
	$t_{1/2}/h$	$E_d/(kJ/mol)$	$t_{1/2}/h$	$E_d/(kJ/mol)$
50	9.242		4.837	
60	1.141	108.958	0.166	194.079
70	0.837		0.067	

图5、6表明pH 5.0时藻蓝蛋白热降解符合一级反应动力学，且 $R^2$ 均大于0.90。图7为热处理过程中藻蓝蛋白的降解与色泽降解有线性相关性。热处理过程中藻蓝蛋白和色泽热降解参数如表2所示，在所选择温度下，随温度升高，体系中藻蓝蛋白和色泽降解变快，半衰期变短。藻蓝蛋白在50 °C半衰期分别是60 °C和70 °C的8.09倍和11.05倍；而色泽在50 °C半衰期分别是60 °C和70 °C的29.17倍和72.74倍。

### 3 讨论

溶液pH值改变会在很大程度上影响葛仙米藻胆蛋白的色泽，夏安东等<sup>[19]</sup>发现在低pH值(3.9、4.7和7.0)别藻蓝蛋白聚合度下降，而三聚体状态的发色团分子更趋于卷曲和折叠状态。同时苏海楠<sup>[20]</sup>发现藻蓝蛋白在酸性溶液中，藻蓝蛋白高聚态会发生解离，解离程度受溶液pH值及离子强度影响。本实验结果可以看出pH 3的色素溶液在可见光区几乎没有藻蓝蛋白特征吸收峰，随pH值增加这两种蛋白的特征吸收峰逐渐增强，至pH 6溶液藻蓝蛋白的特征吸收达到最高值，之后开始逐渐下降。不同pH值色素溶液的Hunter-*b*差异极显著，pH 4.0的色素溶液的蓝色较深，这也说明pH值会影响到与藻胆蛋白白色基结合的蛋白构象，构象直接影响藻蓝蛋白对光的吸收<sup>[16]</sup>，进而影响到藻胆蛋白整体发色。

光照会导致藻蓝蛋白及其色泽的降解，暗处最稳定，蓝光对其有一定的保护作用，日光灯照射最易导致藻蓝蛋白降解。葛仙米藻蓝蛋白色素溶液在高温处理时会有明显的褪色现象，并且温度越高褪色越明显，半衰期越短。因此为了保证充分的发挥藻蓝蛋白功能，提取和处理藻蓝蛋白时最好采用黑暗、低于50 °C的条件。

### 参考文献:

- JIANG Tao, ZHANG Jiping, CHANG Wenrui, et al. Crystal structure of *R*-phycocyanin and possible energy transfer pathways in the phycobilisome[J]. *Biophysical Journal*, 2001, 18(2): 1171-1179.
- 何航, 杨新潮, 刘盈, 等. 螺旋藻蛋白色素的稳定性研究[J]. *广州化学*, 1995(2): 23-29.
- 张以芳, 刘旭川, 李琦华. 螺旋藻藻蓝蛋白提取及稳定性试验[J]. *云南大学学报: 自然科学版*, 1999(3): 66-68.
- 刘鲁宁, 黄芳, 黄业立. 螺旋藻酒中藻蓝蛋白稳定性影响因素的研究[J]. *酿酒*, 2004(3): 43-45.
- 陈新美, 王晓华. 螺旋藻藻蓝蛋白的稳定性及抗癌活性研究[J]. *氨基酸和生物资源*, 2006(1): 59-62.
- 毕海, 张光明, 王伟. 紫外辐射对钝顶螺旋藻藻蓝蛋白的影响研究[J]. *农业环境科学学报*, 2007(3): 1033-1039.
- 刘杨, 王雪青, 庞广昌, 等. 钝顶螺旋藻藻蓝蛋白的富集分离及其稳定性研究[J]. *食品科学*, 2008, 29(7): 39-42.
- 范刚, 陈德文, 潘思轶, 等. 葛仙米藻胆蛋白提取工艺及藻蓝蛋白稳定性研究[J]. *食品科学*, 2005, 26(9): 215-219.
- 张晓伟, 王昌禄, 陈勉华, 等. 理化因子对红曲色素色价的影响及橘霉素的光降解性[J]. *食品科学*, 2013, 34(15): 17-21.
- 花丹, 张晖, 钱海峰, 等. 绿豆色素的降解和颜色损失的研究[J]. *食品科技*, 2014, 39(1): 263-267.
- 程超, 薛峰, 汪兴平, 等. 反复冻融增强葛仙米藻胆蛋白抗氧化特性研究[J]. *食品科学*, 2011, 32(23): 121-124.
- BERMEJO-ROMÁN R B, ALVÁREZ-PEZ J M, ACIÉN FEMÁNDEZ F G, et al. Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2002, 93(1): 73-85.
- 周玮婧, 李书艺, 孙智达, 等. 不同品种荔枝皮花色苷提取物粒径与色泽对其抗氧化活性的影响[J]. *食品科学*, 2010, 31(9): 1-5.
- 董楠, 王强, 雷丹丹, 等. 胭脂萝卜红色素热处理及贮藏过程中降解动力学[J]. *食品科学*, 2013, 34(5): 67-71.
- 邵思蜜, 苏海楠, 张熙颖, 等. The active conformation of Allophycocyanin from *Spirulina platensis* studied with spectroscopic analysis[J]. *光谱学与光谱分析*, 2010(6): 1643-1646.
- 郑锡光, 汪河洲, 余振新, 等. 藻胆素的构象变化及其对光吸收的影响[J]. *生物化学与生物物理进展*, 1996, 23(5): 433-436.
- HE Jinan, HU Yizhen, JIANG Lijin. Photodynamic action of phycobiliproteins: *in situ* generation of reactive oxygen species[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1997, 1320(2): 165-174.
- MADHYSTHA 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.
- 夏安东, 朱晋昌, 蒋丽金, 等. 别藻蓝蛋白藻蓝胆色素发色团分子构象研究[J]. *生物化学与生物物理研究进展*, 1993, 20(2): 112-115.
- 苏海楠. 藻蓝与红藻中藻胆蛋白的活性构象研究[D]. 济南: 山东大学, 2010.