

钝顶螺旋藻 C-藻蓝蛋白的稳定性和荧光特性

梁霄¹, 王成华^{1,2}, 卢鑫¹, 庞一扬¹, 江虹锐^{1,2}, 刘小玲^{1,2}

(1. 广西大学轻工与食品工程学院, 广西南宁 530004) (2. 广西水牛乳工程技术研究中心, 广西南宁 530000)

摘要: 本文探究了钝顶螺旋藻 C-藻蓝蛋白 (C-PC) 的光谱特性, 以及在温度、pH、光照 (强度、时间、光源)、蛋白质干扰剂等环境因素下其溶液稳定性及荧光特性的变化规律。实验结果表明, C-PC 色泽稳定性与荧光特性均受 pH、光照、温度及蛋白质干扰剂等因素影响。其中 pH 6~7、温度 4~30 °C, 避光条件下 C-PC 相对稳定, 溶液色素保留率与蓝度值 b* 变化范围小于 4.93%; C-PC 对光照敏感, 其中红、蓝波段光源对其影响最大 ($p < 0.05$); 在蛋白质干扰剂的存在下, 一定浓度的盐酸胍 ($\geq 2 \text{ mol/L}$)、乙醇 ($\geq 50\%$, V/V)、十二烷基硫酸钠 SDS ($\geq 0.05\%$, m/V) 均可使 C-PC 严重变性发生褪色, 并使其荧光峰淬灭。相关性分析显示, 温度、光照强度引起的 C-PC 色泽变化与其荧光特征峰值呈显著相关性 ($p < 0.05$), 但 pH 或蛋白质干扰剂引起的色泽变化与其荧光特征峰值无显著相关性 ($p > 0.05$), 表明 C-PC 荧光特性与其色泽稳定性变化不完全一致。研究结果为 C-PC 在天然色素、荧光试剂等应用领域或进一步的失稳机理研究提供参考。

关键词: C-藻蓝蛋白; 光谱特性; 稳定性; 荧光特征峰

文章编号: 1673-9078(2020)06-89-96

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.6.1233

Stability and Fluorescence Characteristics of C-phycoyanin in *Spirulina platensis*

LIANG Xiao¹, WANG Cheng-hua^{1,2}, LU Xin¹, PANG Yi-yang¹, JIANG Hong-rui^{1,2}, LIU Xiao-ling^{1,2}

(1. College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China)

(2. Guangxi Buffalo Milk Engineering and Technology Center, Nanning 530004, China)

Abstract: In this study, the spectral characteristics of C-phycoyanin (C-PC) from *Spirulina platensis* were studied, and the changes of its solution stability and fluorescence characteristics under the environmental factors such as temperature, pH, light (intensity, time, light source), protein denaturants. The results showed that the color stability and fluorescence characteristics of C-PC were affected by factors such as pH, light, temperature, and protein denaturants. Under the conditions of dark, pH 6~7, and temperature ranged 4~30 °C, the pigment retention rate and blue value b* of C-PC solution were less than 4.93%, which has good stability. C-PC was sensitive to light, of which the red and blue band light sources have the greatest influence ($p < 0.05$). In the solution of protein denaturants, certain concentrations of guanidine hydrochloride ($\geq 2 \text{ mol/L}$), ethanol ($\geq 50\%$, V/V), and sodium lauryl sulfate SDS ($\geq 0.05\%$, m/V) could make C-PC seriously unstable and discolored, and quenched its fluorescence peak. Correlation analysis showed that the color change of C-PC caused by temperature and light intensity was significantly correlated with the peak of its fluorescence characteristics ($p < 0.05$). However, the color change caused by pH or protein denaturants has no significant correlation with the peak of its fluorescence characteristics ($p > 0.05$), indicating that the fluorescence characteristics of C-PC were not completely consistent with the changes in its color stability. The results provided references for the application of C-PC in natural pigments, fluorescent reagents or further research on the mechanism of instability.

Key words: C-phycoyanin; spectroscopic properties; stability; fluorescence peak

引文格式:

梁霄,王成华,卢鑫,等.钝顶螺旋藻 C-藻蓝蛋白的稳定性和荧光特性[J].现代食品科技,2020,36(6):89-96

LIANG Xiao, WANG Cheng-hua, LU Xin, et al. Stability and fluorescence characteristics of C-phycoyanin in *Spirulina platensis* [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(6): 89-96

收稿日期: 2019-12-14

基金项目: 广西创新驱动发展专项 (桂科 AA17204075)

作者简介: 梁霄 (1994-), 女, 硕士, 研究方向: 藻类蛋白质营养与功能活性

通讯作者: 刘小玲 (1972-), 女, 教授, 研究方向: 蛋白质功能与活性肽

藻蓝蛋白是一种卟啉类色素蛋白,分为 C-藻蓝蛋白(来源于蓝藻)和 R-藻蓝蛋白(来源于红藻),它是藻类捕光色素复合体的重要组成部分,由开链四吡咯结构的发色团与脱辅基蛋白部分通过硫醚键共价结合^[1]。藻蓝蛋白的结构及空间构象使其具有特殊的光谱学性质及较高的荧光量子产率,它在紫外-可见光区域 280 nm、360 nm、620 nm 附近有特征吸收峰,且荧光激发波长为 610~620 nm,荧光发射峰在 620~640 nm 附近^[1-3]。藻蓝蛋白在水溶液中拥有透亮鲜艳的蔚蓝色外观,是我国 GB 2760-2014《食品添加剂使用卫生标准》中规定仅可使用的两种天然蓝色素^[4]之一。其具有众多的生理及药理活性如抗氧化、抗炎、抗肿瘤、维持机体稳态以及减毒增效等^[5-7],可作为保健食品成分。而高纯度藻蓝蛋白可用作光敏剂、荧光探针等生化试剂^[2]。藻蓝蛋白在螺旋藻中含量相对丰富,可占总蛋白质含量的 20%,它的氨基酸组成齐全,是螺旋藻中的主要功能活性成分^[5]。我国作为世界螺旋藻生产大国,在藻蓝蛋白的开发及应用领域具有优势。

在水溶液中,藻蓝蛋白溶解性极好,但同时易受 pH、温度、光照等因素影响而褪色失活^[8-12],有研究表明,在 3×10^5 lux 光照、pH 5 条件下处理 24 h 后藻蓝蛋白损失率高达 80%,且高于 45 °C 易发生热变性,在生产加工及储存过程中易发生损失,虽显示了在众多因素下藻蓝蛋白的稳定性发生相应变化,但鲜有报道环境因素对藻蓝蛋白稳定性产生影响的同时对其荧光特性有何影响,因其荧光特性与发色基团结构变化紧密相关,而蛋白质链的失稳则直接影响其发色基团的构象及功能,故对两者进行综合探究更能全面反应在环境因素下藻蓝蛋白的相关性质变化,因此本研究以纯度为 2.59 的色素级钝顶螺旋藻 C-藻蓝蛋白为原料,在色素保留率评价基础上使用 CIELab 表色系统^[10]共同探究其稳定性变化,同时监测荧光特征指标,在 pH、温度、光照(强度、时间、光源)、蛋白质干扰剂等因素下,分析 C-藻蓝蛋白色泽稳定性与荧光特性的变化及其相关性,以期对 C-藻蓝蛋白的最佳应用条件提供更深入的研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

C-藻蓝蛋白,纯度 2.59(藻蓝蛋白纯度计算公式用 A_{620}/A_{280} 表示^[13],纯度大于 0.7 为食品级、大于 3.0 为药品级、大于 4.0 为分析等级),来源于钝顶螺旋藻 *Spirulina platensis* (*A. platensis*),北海生巴达生物科技有限公司。

尿素、盐酸胍、十二烷基硫酸钠、无水乙醇,过氧化氢,磷酸氢二钠、磷酸二氢钠,国产分析纯试剂。

专业灯光滤色纸(蓝、黄、靛青、红、绿),正白光球泡灯,晨申数码科技有限公司。

1.2 仪器与设备

紫外可见分光光度计(UV6100),上海美谱达;荧光分光光度计(F-7000/4600),Hitachi;分光测色计(CM-3600d),柯尼卡美能达;数字照度计(D4385-01),芯硅谷;pH计(STAR A111),美国赛默飞世尔;恒温振荡器(SHZ-82),常州国华电器。

1.3 分析方法

1.3.1 色泽指标的测定

采用 CIELab 表色系统进行颜色分析,使用分光测色计进行测定,L*表示溶液亮度,数值大小与颜色深浅成负相关,a*表示溶液红度值(+a*)与绿度值(-a*),b*表示黄度值(+b*)与蓝度值(-b*),其中 b*值越大,-b*表示 C-藻蓝蛋白溶液蓝度值越高。

1.3.2 色素保留率的测定

本研究以 C-藻蓝蛋白的色素保留率评价其稳定性^[12],监测样品溶液在可见光区最大吸光度值的变化。吸收光谱以每次试验样品溶剂作为对照进行双光路测定,光径为 1 cm。色素保留率按式(1)计算:

$$\text{色素保留率}/\% = \frac{A}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中: A_0 表示初始的最大吸光值, A 表示最终吸光值。

1.3.3 荧光特征峰的测定

参考张小玲^[14]等方法,取 C-藻蓝蛋白溶液适当稀释,置于 1 cm 光径下、在激发波长范围 400~700 nm,发射波长范围 500~700 nm 进行三维荧光扫描获得最大激发波长 EX 及最大发射波长 EM。实验中测定不同条件处理的 C-藻蓝蛋白荧光发射光谱均在最大激发波长 EX 条件下进行,记录荧光特征峰波长及峰值。

1.4 C-藻蓝蛋白稳定性试验

1.4.1 pH 对 C-藻蓝蛋白稳定性及光谱特性的影响

将 C-藻蓝蛋白溶解于 0.1 mol/L pH 被调节为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 的磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲溶液中,混匀于比色管中,室温静置 12 h,期间每隔 2 h 测定色素保留率,12 h 结束立即测定 L*a*b*色度值及荧光光谱,使用超纯水为溶剂作为对照组。

1.4.2 温度对 C-藻蓝蛋白稳定性及光谱特性的影响

将 C-藻蓝蛋白超纯水溶液置于 4 °C、30 °C、40 °C、50 °C、60 °C、70 °C、80 °C 水浴条件下处理 8 h, 每隔 1 h 测定色素保留率, 8 h 结束立即测定 L*、a*、b* 色度值及荧光光谱。

1.4.3 光照对 C-藻蓝蛋白稳定性及光谱特性的影响

使用超纯水溶解 C-藻蓝蛋白并分装于透明玻璃样品瓶中密封, 使用手持照度仪定点测定照度值, 于以下光照条件处理后测定色素保留率、荧光光谱。光照强度组: 照度为 0 lux (避光)、500 lux、1000 lux、1500 lux、3000 lux 条件下处理 24 h。光照时间组: 照度为白光 1500 lux 及 0 lux (避光) 条件下处理 24 h, 期间每隔 6 h 取样测定。光源组: 分别在照度为 1500 lux 靛青、蓝、绿、黄、红光波段条件下照射 24 h。

1.4.4 蛋白质干扰剂对 C-藻蓝蛋白稳定性及光谱特性的影响

将 C-藻蓝蛋白溶液于五种蛋白质干扰剂、三个浓度梯度、室温条件处理 24 h 后测定色素保留率及荧光光谱。配制方法为, 先将 C-藻蓝蛋白溶于少量超纯水, 再与一定浓度的干扰剂溶液混合, 使得终浓度设置如下: 十二烷基硫酸钠 SDS (S 组) 浓度梯度 1~3 (1%、5%、10%, *m/V*); 乙醇 (E 组) 浓度梯度 1~3 (50%、70%、90%, *V/V*); 过氧化氢 (H 组) 浓度梯度 1~3 (1%、5%、10%, *V/V*); 尿素 (U 组) 浓度梯度 1~3 (0.5、1、2 mol/L); 盐酸胍 (G 组) 浓度梯度 1~3 (0.5、1、2 mol/L)。

1.5 数据处理

各实验重复三次, 使用 Origin 9.1 进行图表的绘制, 使用 SPSS 20.0 进行 Pearson 相关性分析及单因素方差显著性分析, $p < 0.05$ 表示具有显著性。

2 结果与讨论

2.1 pH 对 C-藻蓝蛋白稳定性及荧光特性的影响

2.1.1 pH 对 C-藻蓝蛋白稳定性的影响

C-藻蓝蛋白在紫外-可见区 250~700 nm 内共有三个特征吸收峰, 如图 1a 所示, 分别为 278 nm、360 nm、618 nm, C-藻蓝蛋白中的发色团共轭体系使其在可见光区 618 nm 附近具有特征吸收峰, 从而表现出鲜亮的蔚蓝色, 当受到外界因素影响时, 通过测定特征吸收峰值的变化计算色素保留率可以反映其发色团结构的破坏程度及其色素保留程度^[12], 可作为 C-藻蓝蛋白

稳定性评价指标。当环境 pH 改变时, 蛋白质的解离程度和带电性改变, 从而会影响稳定性^[8], 由图 1b 可知, 12 h 内 C-藻蓝蛋白溶液在 pH 4~7 范围色素保留率仅下降 2.57%, 较为稳定, 而 pH 3、pH 9、10 条件下, 下降 20% 以上, 不利于其稳定储存, 且在偏碱性条件下色素保留率的损失较大, 与刘杨等^[15]结果相似。在处理 12 h 后, C-藻蓝蛋白 pH 6 条件比 pH 7 稳定性更高, 且在 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7) 中比超纯水对照组 (pH 7) 更高, 表明相同条件下 C-藻蓝蛋白在磷酸盐缓冲液中储存稳定性更好, 且 pH 6 时其色素保留率达到最高, 显示出最佳稳定状态, 与 Chaiklahan、程超等^[8,16]的实验结果相似。

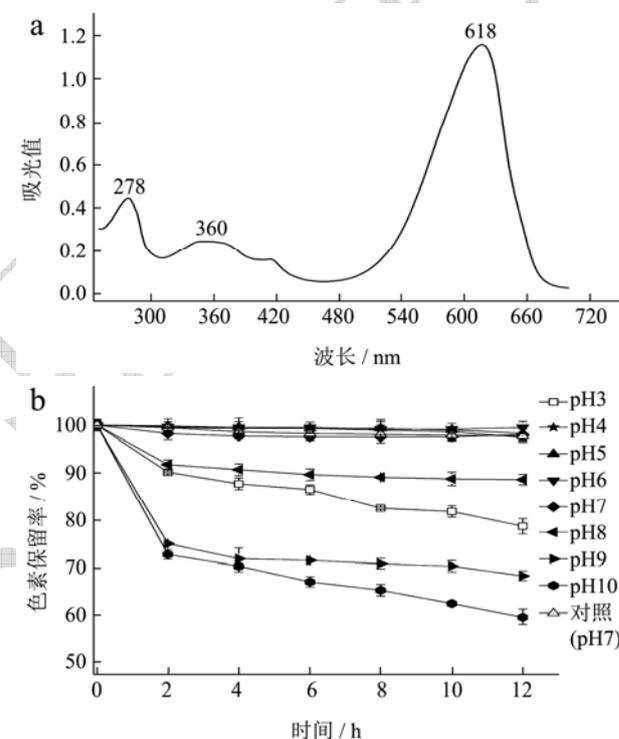


图 1 C-藻蓝蛋白样品吸收光谱扫描 a 及不同 pH 对其稳定性的影响 b

Fig.1 The UV-visible absorption spectrum of C-phycoerythrin(a) and effect of different pH on the stability of C-phycoerythrin(b)

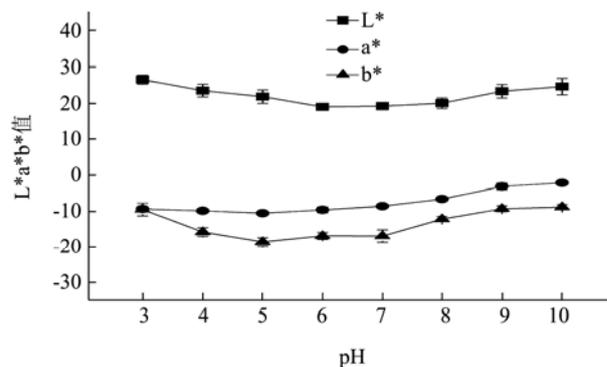


图 2 不同 pH 对 C-藻蓝蛋白 L*a*b* 值 (b) 的影响
Fig.2 L*a*b* value of C-phycoerythrin at different pH

对 C-藻蓝蛋白 CIELab 表色系统进行分析, 由图 2 可知, 随 pH 的变小或增大, -b*向+b*方向移动, 表明由蓝色向灰色-黄色过渡, 样品关键色泽蓝度值降低, 而 pH 越低样品绿值 a*越大, 表明 pH 3 样品溶液接近蓝绿色, 这与 Falkeborg 等^[10]观察到的现象一致, 且 L*值的增大表示样品颜色变浅褪色程度增大, 由此可知 pH 的过高或过低均对样品色泽有破坏作用, 在 pH 5~7 范围内样品色泽保持稳定。

2.1.2 pH 对 C-藻蓝蛋白荧光特性的影响

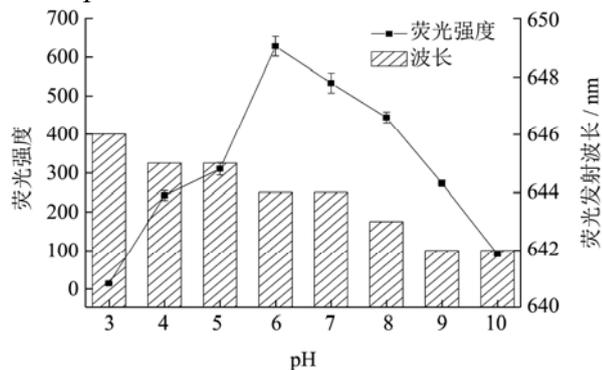


图 3 pH 对 C-藻蓝蛋白特征荧光峰波长及强度的影响

Fig.3 Effect of pH on the fluorescence peak wavelength and intensity of C-phycoerythrin

通过三维荧光光谱扫描确定本研究中 C-藻蓝蛋白最大激发波长为 620 nm, 荧光最大发射峰为 644 nm, 通过分析荧光强度及发射峰波长的变化探究其与色泽稳定性间的关系。样品处理 12 h 后, 由荧光数据分析 (图 3) 可知, 随 pH 变小, 荧光发射峰 644 nm 处发生红移现象, 而随 pH 的增大发生蓝移。样品在 pH 3、pH 10 条件下荧光强度降至初始的 4.45%及 13.31%, 推测极端 pH 条件可严重破坏其发色团共轭体系, 但在相应条件下其色素保留率为 57.44%、78.63%, 可知当其荧光发生严重淬灭时, 依旧可保持一定的颜色特征。在 pH 6 条件, C-藻蓝蛋白荧光强度达到最大, 显示出最佳稳定状态, 这与其色素保留率分析结果一致。

2.2 温度对 C-藻蓝蛋白稳定性及荧光特性的影响

2.2.1 温度对 C-藻蓝蛋白稳定性的影响

图 4 中, 8 h 内 C-藻蓝蛋白溶液在 4~30 °C 内能保持较好稳定性, 色素保留率仅降低 5% 以内, 随温度的进一步升高, 当升至 60~70 °C 时, 急剧下降, 8 h 后 70 °C、80 °C 处理的样品色素保留率下降到只有 19.42%、9.37%, 与张少斌等^[17,18]的研究结果相比较,

钝顶螺旋藻 C-藻蓝蛋白在 70 °C 以上时稳定性急剧下降, 因此在生产加工过程中, 应保持 C-藻蓝蛋白的环境温度尽量不超过 60 °C。

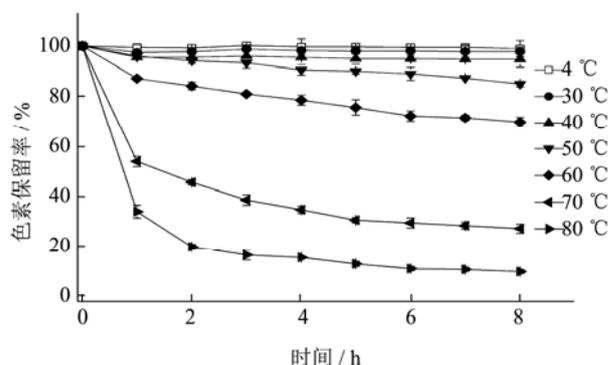


图 4 温度对 C-藻蓝蛋白稳定性的影响

Fig.4 Effect of different temperature on the stability of C-phycoerythrin

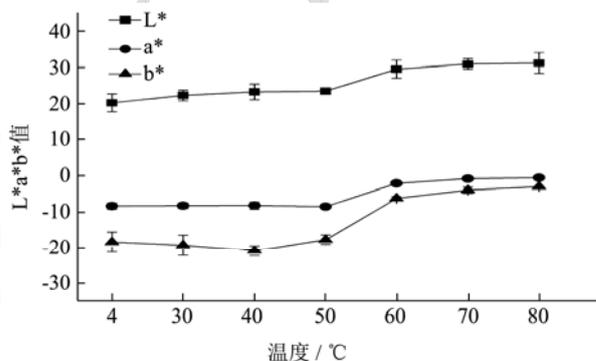


图 5 温度对 C-藻蓝蛋白 L*a*b* 值的影响

Fig.5 L*a*b* value of C-phycoerythrin at different temperatures

由图 5, 当温度大于 40 °C, 随温度的升高, 亮度 L* 增大, 绿度 a*、蓝度 b* 趋近于零, 表明样品褪色程度增大, 最终接近透明液体。在分析中发现 50~70 °C 范围内, C-藻蓝蛋白色素保留率、L*、a*、b* 值及荧光强度变化均呈急剧变化趋势, 推测其变性温度在此范围内。同时, 由于微生物生长繁殖最适温度范围为 20~40 °C, 因此在 C-藻蓝蛋白的加工储存中降低温度以达到抑制微生物繁殖、减缓生化降解^[19] 有利于其色泽、荧光特性的稳定及保持, 长期储存溶液时应选择 4 °C 低温环境。

2.2.2 温度对 C-藻蓝蛋白荧光特性的影响

当温度超过 C-藻蓝蛋白相对稳定范围 30~40 °C 后, 随温度的升高, 蛋白质的热变性作用对其空间结构的破坏可能进一步影响发色团构象, 导致了荧光强度的下降 (图 6), 60 °C 附近特征峰荧光强度急剧下降, 80 °C 时已降至初始值的 4.35%, 证明高温条件对其荧光有较强淬灭作用。当温度升至 60 °C 以上, 其荧光峰发生蓝移。

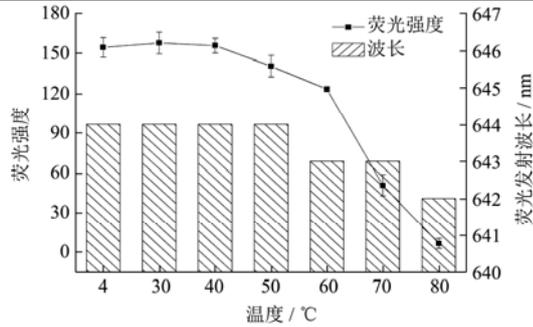


图6 温度对C-藻蓝蛋白特征荧光峰波长及强度的影响

Fig.6 Effect of temperature on the fluorescence peak wavelength and intensity of C-phycoerythrin

2.3 光照对 C-藻蓝蛋白稳定性及荧光特性的影响

影响

2.3.1 光照对 C-藻蓝蛋白稳定性的影响

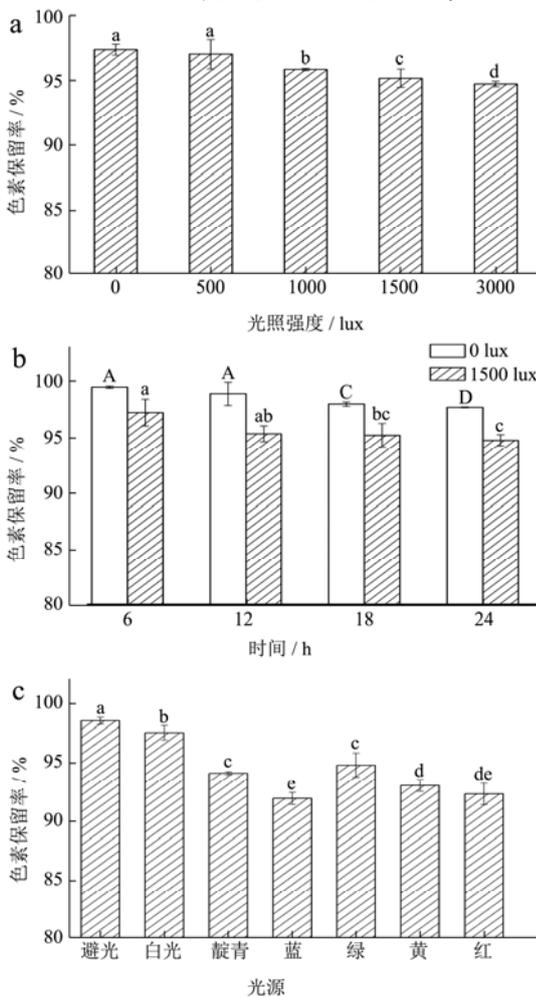


图7 光照(强度、时间、光源)对C-藻蓝蛋白稳定性的影响

Fig.7 Effect of light (intensity, time, light sources) on the stability of C-phycoerythrin

注: 不同大写字母之间差异显著 ($p < 0.05$); 不同小写字母之间差异显著 ($p < 0.05$).

由图7, 在不同强度白光照射24 h后C-藻蓝蛋白色素保留率变化有显著差异 ($p < 0.05$), 选取差异显著组1500 lux 照度条件进行光照时间试验, 可知随光照强度及时间的增大色素保留率均呈显著下降趋势, 表明光照可使C-藻蓝蛋白稳定性减弱。但在避光条件下, 其色素保留率依旧下降, 表明C-藻蓝蛋白即使不受光照因素影响, 仅在室温下随储存时间的增长其稳定性依然会发生持续下降。为探究不同波段光源照射对C-藻蓝蛋白的影响, 在1500 lux 光照强度下、不同光源靛青、蓝、绿、黄、红条件下处理24 h后测定其色素保留率, 结果如图7所示, 红光、蓝光对其影响最大 ($p < 0.05$)。

2.3.2 光照对 C-藻蓝蛋白荧光特性的影响

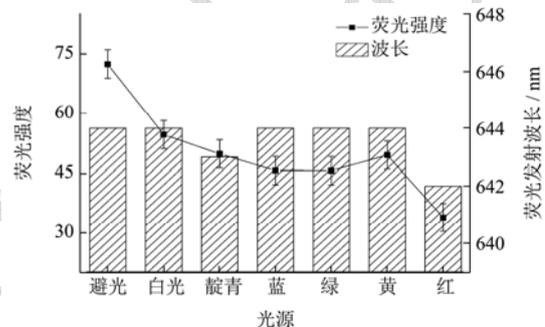


图8 不同光源照射对C-藻蓝蛋白特征荧光峰波长及强度的影响

Fig.8 Effect of different light sources on the fluorescence peak and intensity of C-Phycocyanin

由图8分析可知, C-藻蓝蛋白特征峰荧光强度的变化趋势与图8中也较为相似, 红光光源条件下样品荧光强度减弱程度最大, 蓝、绿光源条件下次之, 由于红光波段为620~740 nm, 蓝光波段在400~480 nm, 结合图1中C-藻蓝蛋白可见光区吸收光谱(400~700 nm), 其在可见区内的最大吸收峰为618 nm附近, 以及在相应区域吸收更多的光能及热能, 故对色素保留率、荧光强度等影响较大。相比于pH或高温处理等因素, 24 h内光照因素对C-藻蓝蛋白各指标的影响均相对较小。

2.4 蛋白质干扰剂对 C-藻蓝蛋白稳定性及荧光特性的影响

影响

2.4.1 蛋白质干扰剂对 C-藻蓝蛋白稳定性的影响

由于C-藻蓝蛋白由脱辅基蛋白部分与发色基团共同构成, 因此探究蛋白质变性过程对样品色泽及发色基团荧光特性的影响。本试验在十二烷基硫酸钠SDS、乙醇、过氧化氢、尿素、盐酸胍五种变性处理

下展开,不同蛋白质干扰剂作用原理不同,从而可导致C-藻蓝蛋白不同程度的变性和结构的破坏。尿素、盐酸胍与蛋白质形成氢键的能力比水强,在高浓度时破坏蛋白质分子内部的氢键使其发生不同程度的变性,如图9,C-藻蓝蛋白经五种干扰剂处理24h后,样品色素保留率均显著下降,1mol/L盐酸胍、2mol/L尿素使其色素保留率下降至50%以下。乙醇为强亲水性试剂,破坏蛋白质与水间氢键,50%(V/V)乙醇可使其色素保留率降至50%以下,与张厚森^[18]实验结果相似。过氧化氢作为强氧化剂可使氨基酸残基氧化、断裂氢键,从而破坏蛋白质的二级结构,SDS是常见的阴离子表面活性剂也是蛋白质强变性剂,破坏蛋白质分子间非共价键并与蛋白质结合形成蛋白质-SDS复合物,10%(V/V)过氧化氢、1%(m/V)SDS使C-藻蓝蛋白色素保留率降至50%以下。其中SDS对样品的破坏程度最大,10%(m/V)SDS可降至4.02%。

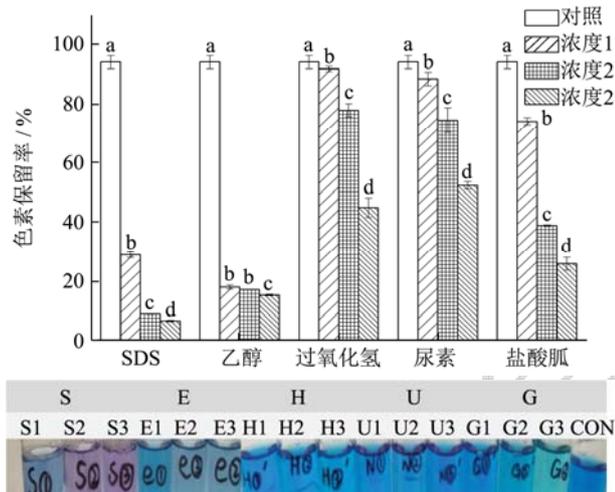


图9 蛋白质干扰剂对C-藻蓝蛋白稳定性的影响
Fig.9 Effect of protein denaturants on the stability of C-phycoerythrin

注:同一组内不同浓度之间,不同小写字母表示差异显著($p < 0.05$)。

在图9中观察样品颜色,与对照组溶液(CON)相比,不同条件处理24h后C-藻蓝蛋白溶液均发生了不同程度的褪色现象,其中E-乙醇组、S-SDS组、G-盐酸胍组蓝色褪色现象较为明显,且S组发生了转色现象,SDS浓度由1%向10%增大时,颜色由蓝色转变为紫色。

2.4.2 蛋白质干扰剂对C-藻蓝蛋白荧光特性的影响

分析样品荧光强度的变化(图10),随不同干扰剂浓度的增大,C-藻蓝蛋白荧光强度随之减弱,当SDS 1%、乙醇50%条件时,特征荧光峰已完全猝灭,此时荧光强度为0,当盐酸胍浓度为2mol/L时,荧光强度

降至6.41%,而当尿素为2mol/L时,C-藻蓝蛋白只发生部分变性,荧光强度仅降至86.41%。

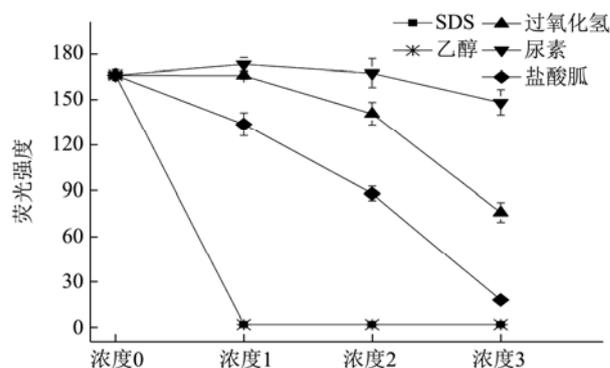


图10 不同蛋白质干扰剂对C-藻蓝蛋白荧光强度的影响
Fig.10 Effect of different protein denaturants on the fluorescence peak intensity of C-Phycocyanin

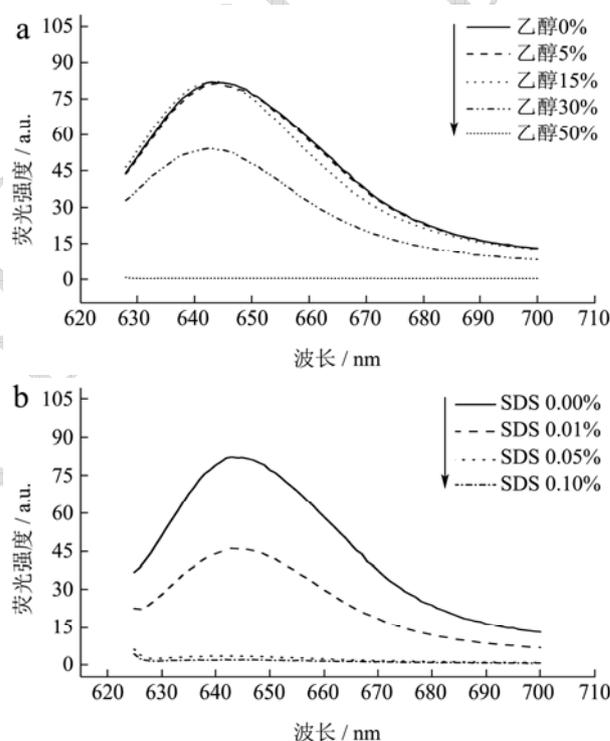


图11 低浓度乙醇(a)及SDS(b)对C-藻蓝蛋白荧光强度的影响

Fig.11 Effects of ethanol (a) and SDS (b) at low concentration on the fluorescence intensity of C-phycoerythrin

由于在图10中,SDS 1%(m/V)、乙醇50%(V/V)条件下,特征荧光峰就已完全猝灭,为更深入探究故降低浓度进行复测,如图11,可知当乙醇浓度达到30%~50%(V/V)区间C-藻蓝蛋白荧光峰发生完全猝灭,表明经乙醇处理后脱辅基蛋白发生完全变性、发色基团结构破坏导致C-藻蓝蛋白完全丧失光传递能力。当SDS处理浓度达到0.05%(m/V)C-藻蓝蛋白荧光峰也显示完全猝灭,表明其完全变性范围在0.01%~0.05%(m/V)范围内,这与周站平^[20]等对别藻

蓝蛋白在 SDS 条件下处理的研究结果为 0~0.028% (m/V) 时完全变性相近, 具有参考价值。

2.5 不同因素下 C-藻蓝蛋白色泽稳定性与荧光特性间的相关性分析

由表 1 可看出, 温度、光照(强度、时间)因素下, C-藻蓝蛋白的色泽稳定性, 即其色素保留率、蓝度值 b^* 与荧光强度间均呈显著相关性 ($p < 0.05$), 表明在该环境下, 当色泽发生变化时, C-藻蓝蛋白特征荧光也发生相应变化, 可使应用者更好的从感官色泽角度判断 C-藻蓝蛋白荧光性质改变。但在 pH 及蛋白

质干扰剂(表 2)因素下, 其色泽稳定性与荧光强度间显示无显著相关性($p > 0.05$)。在之前的实验结果中, C-藻蓝蛋白在 pH 3 条件下荧光峰严重淬灭(4.45%), 但其色泽依旧有所保持, 色素保留率为 78.92%, b^* 值为 9.12。故无法通过色泽变化判断荧光峰值的损失程度。而在不同的蛋白质干扰剂环境下, C-藻蓝蛋白受到不同程度的变性作用, 脱辅基蛋白部分二级结构及更高级的空间结构改变都会影响到发色基团构象, 从而影响到发色基团共轭体系所具备的天然荧光性质, 其中的作用规律更为复杂, 因此在干扰剂因素环境中, 仅通过色泽无法判断其荧光性质的变化。

表 1 不同因素下 C-藻蓝蛋白色泽稳定性与荧光特性间相关性分析

Table 1 Correlation analysis between color stability and fluorescence property of C-phycoyanin under different factors

	荧光强度			
	pH	温度	光照(强度)	光照(时间)
色素保留率 (A/A_0)	0.683	0.999**	0.885*	0.882*
b^*	0.648	0.899**	0.937**	0.971**

注: **表示在 0.01 水平上显著相关; *表示在 0.05 水平上显著相关。表 2 同。

表 2 不同蛋白质干扰剂环境下 C-藻蓝蛋白色泽稳定性与荧光特性间相关性分析

Table 2 Correlation analysis between color stability and fluorescence property of C-phycoyanin in different denaturant solutions

	荧光强度				
	SDS	乙醇	过氧化氢	尿素	盐酸胍
色素保留率 (A/A_0)	0.896	0.655	0.989**	0.859	0.955*
b^*	0.873	0.724	0.955*	0.531	0.928*

3 结论

3.1 pH、高温、光照及蛋白质干扰剂等因素作用下, C-藻蓝蛋白的色素保留率、蓝度值 b^* 、荧光特征峰均发生显著变化, 温度 (≥ 70 °C); 盐酸胍 (≥ 1 mol/L)、乙醇 ($\geq 50\%$, V/V) 以及 SDS ($\geq 1\%$, m/V) 等条件下, C-藻蓝蛋白色素保留率、荧光强度均下降超过 50%, 上述条件可严重破坏 C-藻蓝蛋白色泽稳定性及荧光特性。而在 pH 6~7、温度 4~30 °C、黑暗条件下其色素保留率、蓝度值 b^* 损失率均小于 4.93%, 荧光特征峰值变化范围小于 15.12%, 能保持相对稳定范围。

3.2 仅在温度和光照因素下, C-藻蓝蛋白的色泽稳定性与荧光峰值间均呈显著相关性 ($p < 0.05$), 而在其他条件下无法通过色泽判断其荧光性质的变化。本实验从多因素多角度探究了 C-藻蓝蛋白的稳定性, 还可进一步从空间结构角度探究其荧光特性及其稳定性变化机制。

参考文献

[1] 张发宇, 余金卫, 张浏, 等. 巢湖蓝藻藻蓝蛋白纯化过程中紫

外-可见吸收光谱特征分析[J]. 光谱学与光谱分析, 2017, 37(3): 806-810

ZHANG Fa-yu, YU Jin-wei, ZHANG Liu, et al. UV-Vis spectrum characteristics of phycocyanin purification in water from chao lake [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2017, 37(3): 806-810

[2] Hou Y, Yan M, Wang Q, et al. C-phycoyanin from *Spirulina maxima* as a green fluorescent probe for the highly selective detection of mercury (II) in seafood [J]. Food Analytical Methods, 2017, 10(6): 1931-1939

[3] Roda-Serrat M C, Christensen K V, El-Houri R B, et al. Fast cleavage of phycocyanobilin from phycocyanin for use in food colouring [J]. Food Chemistry, 2018, 240: 655-661

[4] 徐春明, 李婷, 王英英, 等. 食用蓝色素及其使用现状研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2014, 1: 208-214

XU Chun-ming, LI Ting, WANG Ying-ying, et al. Research progress of edible blue pigments and its application status [J]. China Food Additives, 2014, 1: 208-214

[5] Fernández-Rojas B, Hernández-Juárez J, Pedraza-Chaverri J. Nutraceutical properties of phycocyanin [J]. Journal of

- Functional Foods, 2014, 11: 375-392
- [6] 郝帅,秦玉,王成涛.功能食品藻蓝蛋白的生理活性研究进展[J].食品与生物技术学报,2017,36(12):1233-1240
HAO Shuai, QIN Yu, WANG Cheng-tao. Research progress of the physiological activity of functional food phycocyanin [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2017, 36(12): 1233-1240
- [7] Hao S, Yan Y, Li S, et al. The *in vitro* anti-tumor activity of phycocyanin against non-small cell lung cancer cells [J]. Marine Drugs, 2018, 16(6): 178
- [8] Chaiklahan R, Chirasuwan N, Bunnag B. Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: Influence of temperature, pH and preservatives [J]. Process Biochemistry, 2012, 47(4): 659-664
- [9] 欧瑜,叶瑞玲.钝顶螺旋藻藻蓝蛋白稳定性研究[J].食品研究与开发,2013,34(4):11-14
OU Yu, YE Rui-ling. Study on the stability of phycocyanin from *Spirulina platensis*[J]. Food Research and Development, 2013, 34(4): 11-14
- [10] Falkeborg M F, Roda-Serrat M C, Burnæs K L, et al. Stabilising phycocyanin by anionic micelles [J]. Food Chemistry, 2018, 239: 771-780
- [11] Munawaroh H S H, Darajatun K, Gumilar G G, et al. Characterization of phycocyanin from *Spirulina fusiformis* and its thermal stability [J]. Journal of Physics: Conference Series, 2018, 1013: 12205
- [12] Jespersen L, Str Mdahl L D, Olsen K, et al. Heat and light stability of three natural blue colorants for use in confectionery and beverages [J]. European Food Research and Technology, 2005, 220(3-4): 261-266
- [13] Herrera A, Boussiba S, Napoleone V. Recovery of c-phycocyanin from the cyanobacterium *Spirulina maxima* [J]. Journal of Applied Phycology, 1989, 1(4): 325-331.
- [14] 张小玲,殷高方,赵南京,等.不同生境条件下藻蓝蛋白活体荧光光谱特性研究[J].光谱学与光谱分析,2017,37(4):1145-1151
ZHANG Xiao-ling, YIN Gao-fang, ZHAO Nan-jing, et al. Research on fluorescence spectral characteristics of phycocyanin under different habitat conditions [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2017, 37(4): 1145-1151
- [15] 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,2008,7:39-42
LIU Yang, WANG Xue-qing, PANG Guang-chang, et al. Enrichment separation and stability of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* [J]. Food Science, 2008, 7: 39-42
- [16] 程超,薛峰,李伟,等.葛仙米藻胆蛋白与色度降解动力学[J].食品科学,2014,35(9):16-19
CHENG Chao, XUE Feng, LI Wei, et al. Degradation dynamics of phycocyanin and its chroma from *Nostoc sphaeroides* kutzing [J]. Food Science, 2014, 35(9): 16-19
- [17] 张少斌,王瑾,马楠,等.天然食用色素藻蓝蛋白的稳定性研究[J].食品科技,2007,6:169-171
ZHANG Shao-bin, WANG Jin, MA Di, et al. Studies on the stability of phycocyanin used as natural food pigments [J]. Food Science and Technology, 2007, 6:169-171
- [18] 张厚森,马海乐.钝顶螺旋藻藻蓝蛋白的稳定性试验研究[J].食品研究与开发,2005,26(3):74-76
ZHANG Hou-sen, MA Hai-le. Stability of phycocyanin in *Spirulina platensis* [J]. Food Research and Development, 2005, 26(3): 74-76
- [19] Kaale L D, Eikevik T M, Rustad T, et al. Superchilling of food: A review [J]. Journal of Food Engineering, 2011, 107(2): 141-146
- [20] 周站平,刘鲁宁,陈秀兰,等.光照,变性剂和 pH 对钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)藻蓝蛋白(APC)抗氧化活性的影响[J].海洋与湖沼,2005,36(2):179-185
ZHOU Zhan-ping, LIU Lu-ning, CHEN Xiu-lan, et al. Effects of light, denaturants and pH on antioxidant activity of allophycocyanin in blue green alga *Spirulina platensis* [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2005, 36(2): 179-185