

论著

螺旋藻产品活性物质检测与免疫功能研究

王文博 孙建光 徐晶

(中国农业科学院农业资源与农业区划研究所/农业部作物营养与施肥重点实验室,北京 100081)

摘要:目的 检测国内市场 19 种有代表性螺旋藻产品的理化指标及活性物质含量,比较研究活性物质含量不同的 2 种螺旋藻产品的免疫功能,研究活性物质含量之间的相关性,确定评价活性物质含量的主要技术指标,为提高螺旋藻产品检测技术和制定相关产品质量标准提供科学依据。方法 总蛋白质含量测定采用凯氏定氮法,γ-亚麻酸、二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳六烯酸(DHA)采用气相色谱法,类胡萝卜素、藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白、藻红蛋白、叶绿素 a、叶绿素 b、β-胡萝卜素、螺旋藻多糖、超氧化物歧化酶(SOD)采用比色分析法,免疫性能检验采用小鼠动物实验,相关性分析采用 SPSS 13.0 统计分析软件。结果 受检样品营养物质及活性物质含量为:总蛋白质 47.0% ~ 67.3% ,类胡萝卜素 4.98 ~ 24.81 g/kg ,藻蓝蛋白 3.89% ~ 9.23% 、别藻蓝蛋白 2.03% ~ 5.47% 、藻红蛋白 0.63% ~ 1.51% ,γ-亚麻酸 694.3 ~ 1 860.0 mg/100 g、EPA 9.49 ~ 55.73 mg/100 g、DHA 0 ~ 19.81 mg/100 g ,叶绿素 a 705.37 ~ 1 235.67 mg/100 g、叶绿素 b 26.31 ~ 190.46 mg/100 g ,β-胡萝卜素 1.52 ~ 5.62 g/kg ,螺旋藻多糖 9.1% ~ 20.2% ,SOD 酶活性 629 ~ 3 086 U/g。类胡萝卜素与藻蓝蛋白、γ-亚麻酸、DHA、叶绿素 a、β-胡萝卜素以及 SOD 显著正相关,藻蓝蛋白与别藻蓝蛋白、藻红蛋白、γ-亚麻酸、叶绿素 a、β-胡萝卜素以及 SOD 显著正相关,螺旋藻多糖与总蛋白质、藻蓝蛋白和叶绿素显著负相关。活性物质含量较高的 8 号样品在抑菌效果、对小鼠腹腔巨噬细胞、血清溶菌酶活力、血清球蛋白含量的促进作用等方面显著强于活性物质含量较低的 13 号样品。结论 活性物质是螺旋藻产品免疫功能的基础,所检测国内市场有代表性的螺旋藻产品都含有活性物质,但含量差异较大,达到 2 ~ 5 倍。类胡萝卜素、藻蓝蛋白、螺旋藻多糖和 γ-亚麻酸 4 项技术指标能够比较完全地反映螺旋藻产品的活性物质含量。我国目前使用的 GB/T 16919—1997《食用螺旋藻粉》缺少活性物质技术指标,评判螺旋藻保健食品有困难,建议修订时添加活性物质技术指标。

关键词:螺旋藻;活性物质;相关性;免疫;标准

中图分类号:R247.1 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2011)01-0054-08

Bioactive compounds in spirulina products and their immunological functions

Wang Wenbo, Sun Jianguang, Xu Jing

(Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences / Key Laboratory of Crop Nutrition and Fertilization of Ministry of Agriculture, Beijing 100081, China)

Abstract: Objective To test the physical and chemical characteristics and the content of bioactive compounds of representative spirulina products in domestic markets. To compare the immune properties of two spirulina products with different amount of bioactive compounds. To test the correlations among bioactive compounds of spirulina products. To develop technical indicators for evaluating bioactive compounds. To provide scientific basis for improving detection technology and establishing quality standards. **Methods** Total protein content was determined by Kjeldahl method; γ-linolenic acid, eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) was determined with gas chromatography; carotenoids, phycocyanin, allophycocyanin, phycoerythrin, chlorophyll a, chlorophyll b, β-carotene, spirulina polysaccharides, and superoxide dismutase (SOD) was determined by colorimetric analysis; immune performance was tested in mice. Correlation analysis was conducted with SPSS 13.0 statistical analysis software. **Results** The content of nutrients and bioactive compounds were as follows: total protein 47.0% - 67.3%, carotenoid 4.98 - 24.81 g/kg, phycocyanin 3.89% - 9.23%, allophycocyanin 2.03% - 5.47%, phycoerythrin 0.63% - 1.51%, γ-linolenic acid 694.3 - 1 860.0 mg/100 g, EPA 9.49 - 55.73 mg/100 g, DHA 0 - 19.81 mg/100 g, chlorophyll a 705.37 - 1 235.67 mg/100 g, chlorophyll b 26.31 - 190.46 mg/100 g, β-carotene 1.52 - 5.62 g/kg, spirulina polysaccharide

收稿日期:2010-05-20

基金项目:国家科技资源平台项目 [2005DKA21201-14-1]

作者简介:王文博 女 硕士生 研究方向为免疫与保健

通信作者:孙建光 男 博士 副研究员 研究方向为农业微生物资源与利用 E-mail:jgsun@caas.ac.cn

9.1% - 20.2% , SOD 629 - 3 086 U/g. There is a significantly positive correlation of carotenoids with phycocyanin , γ -linolenic acid , DHA , chlorophyll a , β -carotene and SOD; a significantly positive correlation of phycocyanin with allophycocyanin , phycoerythrin , γ -linolenic acid , chlorophyll a , β -carotene and SOD; and a significantly negative correlation of spirulina polysaccharide with total protein , phycocyanin and chlorophyll a. The immune properties including antibacterial effect , peritoneal macrophages , serum lysozyme activity and serum globulin levels in the sample No. 8 with more bioactive compounds was significantly stronger than that in the sample No. 13 . **Conclusion** Bioactive compounds in spirulina products , which were the basis for immune function , were found in all representative Spirulina products inspected in domestic markets , and the difference of their contents was up to 2-5 times. Carotenoids , phycocyanin , spirulina polysaccharides and γ -linolenic acid are good technical indicators reflecting the bioactive properties of Spirulina products. The national standard GB / T 16919—1997 *Food grade spirulina powder* is difficult to evaluate the function of health food containing spirulina , because the current standard is lack of technical specifications for bioactive compounds. It is suggested to add technical specifications for bioactive compounds while amending the standard.

Key words: Spirulina; bioactive compounds; correlation; immunology; standard

螺旋藻富含类胡萝卜素、藻蓝蛋白、螺旋藻多糖、 γ -亚麻酸、二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳六烯酸(DHA)、超氧化物歧化酶(SOD)、维生素等多种生物活性物质,具有预防、保健、辅助治疗多种疾病和补充营养等功效,被世界卫生组织和联合国粮农组织誉为21世纪人类最优良的保健食品和药源食物^[1]。螺旋藻作为保健食品在我国已经生产应用了20多年,但长期以来,人们对国内市场螺旋藻产品的活性物质含量缺乏系统研究,难以科学评价产品质量。对于螺旋藻含有的营养成分和活性物质及其增强免疫、抗病毒、抗肿瘤功效,前人已有大量的研究和论述^[2-4],在世界很多地方螺旋藻已经被当作功能食品用于健康管理^[5],国内科学家对此也进行过大量研究^[6-8],但对于市场中的螺旋藻产品的活性物质检测,及其免疫性能评价至今鲜有报道。

本文从国内市场采集了19个螺旋藻产品,检测了它们的理化指标和活性物质含量,研究了活性物质含量之间的相关性,选取活性物质含量差异显著的2个代表性产品进行动物实验,比较研究了它们的免疫性能。这些研究结果将有助于提高人们对螺旋藻产品质量的认识,提升螺旋藻产品质量检测技术,促进我国螺旋藻产业发展。

1 材料与方法

1.1 样品

螺旋藻产品样品共计19种分别购自北京的药店、保健品商店和国内生产企业,代表了目前国内螺旋藻市场的主要产品和品牌。

1.2 实验动物

昆明种小鼠,体重18~22g,雌雄各半,由中国军事医学科学院实验动物中心提供,合格证号:(医动字)013023号,并经实验动物伦理审查委员会批准。

1.3 菌种

指示菌溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)由本实验室保藏。

1.4 试剂

γ -亚麻酸、EPA、DHA购自Sigma公司,硫酸、溴百里酚蓝、苯酚、氯仿、甲醇、邻苯三酚、丙酮、石油醚等购自北京化学试剂公司。

1.5 气相色谱工作条件

石英毛细管色谱柱(25 m × 0.32 mm × 0.25 μ m)柱温240 $^{\circ}$ C;检测器温度250 $^{\circ}$ C;载气流速30 ml/min;进样量2 μ l。

1.6 主要理化指标检测

总蛋白质、类胡萝卜素、水分、灰分、菌落总数分别依据GB/T 14771—1993《食品中蛋白质的测定方法》^[9],GB/T 12291—1990《水果、蔬菜汁类胡萝卜素全量的测定》^[10],GB/T 14769—1993《食品中水分的测定方法》^[11],GB/T 14770—1993《食品中灰分的测定方法》^[12],GB/T 4789.2—2008《食品卫生微生物学检验 菌落总数测定》^[13]测定。

1.7 活性物质检测

1.7.1 藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白、藻红蛋白

采用国家标准SNT 1113—2002《进出口螺旋藻粉中藻蓝蛋白、叶绿素含量的测定方法》^[14]测定。

1.7.2 螺旋藻多糖

采用苯酚硫酸法^[15]测定。

1.7.3 γ -亚麻酸、EPA、DHA

采用气相色谱法^[16,17]测定。

1.7.4 叶绿素a、叶绿素b、 β -胡萝卜素

采用分光光度法测定。准确称取螺旋藻试样0.0500g,加入20ml 80%丙酮石油醚溶液研磨至匀浆,50 $^{\circ}$ C水浴抽提24h,过滤,定容至50ml。测定波长450、645、663nm处的吸光度A,按照公式C₀

(mg/L) = 12.7A₆₆₃ - 2.69A₆₄₅, C_b (mg/L) = 22.9A₆₄₅ - 4.68A₆₆₃, C_t = C_a + C_b, 计算叶绿素 a、b 和总叶绿素含量。β-胡萝卜素含量由 A₄₅₀ 根据标准曲线求出。

1.7.5 SOD

采用邻苯三酚自养化法测定^[18,19]。酶活力单位定义为:在 1ml 反应液中,每分钟抑制邻苯三酚自氧化速率达到 50% 时的酶量。

1.8 免疫功能测试

1.8.1 抑菌试验

分别取螺旋藻样品 0.2 和 0.6 g, 加入 10 ml pH 7.2 磷酸缓冲液 (PBS), 震荡混匀, 超声波破碎 15 min, 置于 4 °C 冰箱 4 h 后取出 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min, 上清液用作抑菌实验^[20]。

1.8.2 动物免疫试验

饲养小鼠, 适应性喂养 3 d 后随机分为 5 组, 即对照组和 1 号样品中剂量组 (500 mg/kg BW)、高剂量组 (1 500 mg/kg BW), 2 号样中剂量组 (500 mg/kg BW)、高剂量组 (1 500 mg/kg BW), 每组 8 只, 雌雄分笼喂养。实验组每日 1 次以规定剂量螺旋藻样品灌胃, 对照组同法给予生理盐水, 连续灌胃 21 d 后测定下列免疫学指标。

(1) 胸腺和脾脏指数^[21]。称量小鼠体重, 拔眼球采血, 处死, 取其脾和胸腺称重, 计算胸腺指数和脾脏指数。

(2) 腹腔巨噬细胞吞噬率和吞噬指数^[21]。

(3) 血清溶菌酶活力^[22]。小鼠末次给药 1 h 后, 拔眼球采血 500 μl 2 000r/min 离心 10 min 制得血清样品。分别培养溶壁微球菌和金黄色葡萄球菌, 制成菌悬液, 用于溶菌酶活力测定。

(4) 小鼠血清球蛋白含量^[23]。小鼠连续灌胃 21 d 后, 采血制得血清样品, 用考马斯亮蓝法测定血清总蛋白含量, 溴甲酚绿法测定血清白蛋白含量, 球蛋白含量 = 总蛋白含量 - 白蛋白含量。

1.9 统计分析

采用 SPSS 13.0 统计分析软件, 统计差异显著性按照 5% 和 1% 两个水平进行判定。

2 结果与分析

2.1 主要理化指标

目前, 国家颁布的与食用螺旋藻产品有关的标准只有 GB/T 16919—1997《食用螺旋藻粉》^[24]。本文检测了总蛋白质、类胡萝卜素、水分、灰分 4 项理化指标, 以及微生物学指标菌落总数。国内市场 19 种代表性螺旋藻产品的检测结果见表 1, 样品总蛋白质含量为 47.0% ~ 67.3%, 类胡萝卜素含量为

4.98 ~ 24.81 g/kg。对照国家标准, 在检测的 19 个产品中, 03 和 10 号产品未达到总蛋白质含量 ≥ 55% 的要求, 产品 05、10、13、18、19 灰分指标不符合标准, 产品 04、05、07、10、15 不符合菌落总数 ≤ 1 × 10⁴ CFU/g 的标准。以总蛋白质、类胡萝卜素、水分、灰分、菌落总数 5 项技术指标来衡量, 总计有 9 个产品 12 个单项技术指标未达到 GB/T 16919—1997 的技术要求。

表 1 国内市场部分螺旋藻产品主要理化指标检测结果

Table 1 Physical and chemical properties of spirulina products in domestic markets

产品编号	总蛋白质 (%)	类胡萝卜素 (g/kg)	水分 (%)	灰分 (%)	菌落总数 (10 ⁴ CFU/g)
01	67.2	15.55	2.6	5.9	0
02	60.9	7.33	2.2	6.9	0.04
03	53.8	7.89	3.7	6.4	0.02
04	62.0	9.70	2.5	6.5	2.50
05	59.0	6.54	4.9	9.0	1.10
06	66.1	11.48	2.8	6.4	0.20
07	59.7	4.98	2.2	6.8	1.30
08	62.2	24.81	1.3	5.9	0.25
09	61.0	16.41	2.3	6.4	0.70
10	47.0	13.38	2.3	7.8	1.20
11	67.3	11.68	3.5	6.0	0.01
12	65.0	10.96	3.3	6.3	0.02
13	63.4	6.36	1.3	9.1	0.80
14	62.1	14.55	2.8	6.4	0.02
15	62.3	8.91	2.7	6.0	5.60
16	65.6	18.71	2.7	6.1	0
17	63.1	18.97	1.8	6.9	0.03
18	60.7	9.80	2.2	8.2	0
19	58.1	10.12	2.0	8.0	0
国家标准	≥55	≥2	≤7	≤7	≤1

2.2 活性物质含量

样品活性物质含量的检测结果见表 2。受检样品藻蓝蛋白 3.89% ~ 9.23%, 别藻蓝蛋白 2.03% ~ 5.47%, 藻红蛋白 0.63% ~ 1.51%。不饱和脂肪酸之和在 703.79 ~ 1 892.50 mg/100 g 之间, 其中 γ-亚麻酸 694.3 ~ 1 860.0 mg/100 g, EPA 含量 9.49 ~ 55.73 mg/100 g, DHA 含量 0 ~ 19.81 mg/100 g。总叶绿素含量 784.62 ~ 1 291.95 mg/100 g, 其中叶绿素 a 含量 705.37 ~ 1 235.67 mg/100 g, 叶绿素 b 含量 26.31 ~ 190.46 mg/100 g。样品 β-胡萝卜素含量 1.52 ~ 5.62 g/kg, 螺旋藻多糖含量 9.1% ~ 20.2%, SOD 酶活性 629 ~ 3 086 U/g。所测国内市场有代表性的螺旋藻产品都含有活性物质, 但含量差异较大, 高含量样品与低含量样品差异达到 2 ~ 5 倍。

表2 国内市场部分螺旋藻产品生理活性物质含量检测结果

Table 1 Active ingredient test results of spirulina products in domestic market

产品 编号	色素蛋白					不饱和脂肪酸					叶绿素			胡萝卜素	藻多糖	生物酶
	藻蓝蛋白 (%)	别藻蓝蛋 白 (%)	藻红蛋白 (%)	藻胆蛋白 (%)	γ -亚麻酸 (mg/100 g)	二十碳五 烯酸 (mg/100 g)	二十二碳 六烯酸 (mg/100 g)	不饱和脂肪 酸之和 (mg/100 g)	叶绿素 a (mg/100 g)	叶绿素 b (mg/100 g)	总叶绿素 (mg/100 g)	β -胡萝卜 素 (g/kg)	螺旋藻多糖 (%)	超氧化物 歧化酶 (U/g)		
01	7.70	4.04	1.01	12.75	1763.6	42.04	19.19	1824.83	1043.04	78.08	1121.12	4.59	12.5	2514		
02	6.46	4.78	1.22	12.46	958.0	19.40	0	977.40	915.76	154.98	1070.74	2.16	10.7	1429		
03	5.57	4.35	1.09	11.01	1048.9	12.90	0	1061.80	826.76	78.80	905.56	2.29	20.2	800		
04	6.86	3.94	1.08	11.88	694.3	9.49	0	703.79	1063.88	110.46	1174.34	2.76	10.7	743		
05	5.87	3.63	0.98	10.48	1412.4	28.51	4.89	1445.80	857.62	103.00	960.62	1.91	18.4	743		
06	8.76	5.01	1.49	15.26	1394.5	28.07	3.50	1426.07	939.62	65.21	1004.83	3.50	14.9	2286		
07	5.91	3.29	0.99	10.19	1317.5	24.90	6.30	1348.70	705.37	79.25	784.62	1.52	13.0	1771		
08	7.50	4.77	1.28	13.55	1787.3	55.73	19.81	1862.84	1026.75	190.46	1217.21	4.34	16.6	2457		
09	6.45	3.55	0.84	10.84	1780.7	19.60	1.40	1801.70	1162.47	72.59	1235.06	4.89	12.7	1429		
10	3.89	2.70	0.68	7.27	1139.8	44.50	15.40	1199.70	873.79	83.00	956.79	3.81	19.9	2286		
11	8.55	4.28	0.85	13.68	1860.0	32.50	0	1892.50	1062.28	72.19	1134.47	3.49	9.8	2514		
12	7.91	3.68	0.86	12.45	1554.7	16.22	7.60	1578.50	927.62	62.70	990.32	3.19	11.5	2000		
13	4.12	2.03	0.75	6.90	1409.8	33.78	0	1443.50	796.36	103.04	899.40	1.92	10.0	629		
14	7.50	4.10	0.88	12.48	1675.3	38.90	9.00	1723.20	1046.00	95.23	1141.23	4.19	10.5	743		
15	5.50	2.47	0.63	8.60	1126.4	19.40	1.50	1147.30	834.20	92.39	926.59	2.76	17.0	2514		
16	8.97	5.18	1.43	15.58	1452.8	20.68	0	1473.40	1144.77	59.77	1204.54	5.45	10.4	3086		
17	9.23	5.47	1.51	16.21	1852.8	24.40	3.80	1881.00	1235.67	56.28	1291.95	5.62	9.1	2343		
18	8.06	5.26	1.43	14.75	1703.4	45.78	7.10	1756.20	1166.21	26.31	1192.52	3.05	12.4	1943		
19	7.75	4.69	1.31	13.75	1560.7	43.90	6.90	1611.50	1096.20	66.61	1162.81	2.97	13.3	2229		

表3 螺旋藻产品生理活性物质含量相关性分析
Table 3 Correlations among bioactive ingredients of spirulina products

活性物质	总蛋白	类胡萝卜素	藻蓝蛋白	藻红蛋白	藻胆蛋白	γ-亚麻酸	二十碳五烯酸	二十二碳六烯酸	不饱和脂肪酸	叶绿素 a	叶绿素 b	总叶绿素	β-胡萝卜素	螺旋藻多糖	超氧化物歧化酶	
总蛋白	1	0.212	0.656 ^b	0.276	0.233	0.509 ^a	0.419	-0.112	-0.157	0.400	0.326	-0.057	0.325	0.267	-0.677 ^b	0.258
类胡萝卜素	0.212	1	0.487 ^a	0.428	0.317	0.475 ^a	0.553 ^a	0.376	0.483 ^a	0.560 ^a	0.650 ^b	0.174	0.722 ^b	0.895 ^b	-0.107	0.516 ^a
藻蓝蛋白	0.656 ^b	0.487 ^a	1	0.831 ^b	0.697 ^b	0.963 ^b	0.529 ^a	0.044	0.007	0.516 ^a	0.722 ^b	-0.302	0.673 ^b	0.573 ^a	-0.517 ^a	0.498 ^a
藻红蛋白	0.276	0.428	0.831 ^b	1	0.904 ^b	0.948 ^b	0.306	0.094	0.011	0.302	0.665 ^b	-0.135	0.657 ^b	0.440	-0.262	0.330
藻胆蛋白	0.233	0.317	0.697 ^b	0.904 ^b	1	0.845 ^b	0.176	0.098	-0.024	0.175	0.516 ^a	-0.127	0.505 ^a	0.304	-0.219	0.292
γ-亚麻酸	0.509 ^a	0.475 ^a	0.963 ^b	0.948 ^b	0.845 ^b	1	0.441	0.071	0.006	0.431	0.720 ^b	-0.240	0.688 ^b	0.528 ^a	-0.422	0.443
二十二碳六烯酸	0.419	0.553 ^a	0.529 ^a	0.306	0.176	0.441	1	0.536 ^a	0.365	0.999 ^b	0.528 ^a	-0.261	0.483 ^a	0.568 ^a	-0.306	0.385
不饱和脂肪酸	-0.112	0.376	0.044	0.098	0.176	0.441	0.536 ^a	1	0.750 ^b	0.573 ^b	0.171	0.143	0.194	0.194	0.133	0.288
叶绿素 a	-0.157	0.483 ^a	0.007	0.011	-0.024	0.006	0.365	0.750 ^b	1	0.401	0.046	0.232	0.108	0.285	0.296	0.314
叶绿素 b	0.400	0.560 ^a	0.516 ^a	0.302	0.175	0.431	0.999 ^b	0.573 ^a	0.401	1	0.521 ^a	-0.244	0.479 ^a	0.565 ^a	-0.287	0.391
总叶绿素	0.326	0.650 ^b	0.722 ^b	0.665 ^b	0.516 ^a	0.720 ^b	0.528 ^b	0.171	0.046	0.521 ^a	1	-0.282	0.969 ^b	0.773 ^b	-0.484 ^a	0.335
β-胡萝卜素	-0.057	0.174	-0.302	-0.135	-0.127	-0.240	-0.261	0.143	0.232	-0.244	-0.282	1	-0.034	-0.186	0.169	-0.222
螺旋藻多糖	0.325	0.722 ^b	0.673 ^b	0.657 ^b	0.505 ^a	0.688 ^b	0.483 ^a	0.215	0.108	0.479 ^a	0.969 ^b	-0.034	1	0.756 ^b	-0.460 ^a	0.291
超氧化物歧化酶	0.267	0.895 ^b	0.573 ^b	0.440	0.304	0.528 ^b	0.568 ^a	0.194	0.285	0.565 ^a	0.773 ^b	-0.186	0.756 ^b	1	-0.267	0.544 ^a
	-0.677 ^b	-0.107	-0.517 ^a	-0.262	-0.219	-0.422	-0.306	0.133	0.296	-0.287	-0.484 ^a	0.169	-0.460 ^a	-0.267	1	-0.048
	0.258	0.516 ^a	0.498 ^a	0.330	0.292	0.443	0.385	0.288	0.314	0.391	0.335	-0.222	0.291	0.544 ^a	-0.048	1

注:表中数据为相关系数,^a表示相关性显著($r < 0.05$),^b表示相关性极显著($r < 0.01$)。

表4 活性物质含量不同的两种螺旋藻产品的免疫功能比较

Table 4 Comparison of the immunological ability of 2 spirulina products with different amount of bioactive ingredients

产品编号	抑菌实验		对免疫器官影响				对巨噬细胞吞噬影响		血清溶菌酶活力		血清球蛋白(g/L)
	实验处理	抑制金黄色葡萄球菌	抑制大肠杆菌	胸腺指数 (mg/g)	脾脏指数 (mg/g)	吞噬率 (%)	吞噬指数 (个/细胞)	溶壁微球菌 (10^7 /ml)	金黄色葡萄球菌 (10^7 /ml)		
08	对照(0)	-	-	3.92 ^a	3.36 ^a	22.75 ^a	0.96 ^a	578.25 ^a	757.83 ^a	19.04 ^a	
	低浓度(2%)	+	+	4.00 ^a	3.56 ^a	75.75 ^d	1.77 ^c	419.38 ^c	652.38 ^c	27.58 ^c	
	高浓度(6%)	-	-	3.96 ^a	3.64 ^a	62.63 ^c	1.70 ^c	496.25 ^b	686.78 ^{bc}	24.15 ^{bc}	
13	低浓度(2%)	+	-	3.85 ^a	3.49 ^a	36.25 ^b	1.16 ^b	532.92 ^{ab}	719.79 ^{ab}	21.36 ^b	
	高浓度(6%)	-	-	3.89 ^a	3.52 ^a	44.50 ^b	1.12 ^b	530.33 ^{ab}	730.00 ^{ab}	22.25 ^b	

注:抑菌实验:-表示无抑菌圈;+表示抑菌圈在0~25 mm之间;+表示抑菌圈大于25 mm。动物免疫试验:数据后面同肩的不同字母表示与对照组相比差异显著($P < 0.05$)。

2.3 营养成分及活性物质间的相关性

表3详细分析了各活性物质间的相关性。统计结果显示,螺旋藻产品的蛋白质含量与藻蓝蛋白含量呈极显著正相关,与藻胆蛋白呈显著正相关,但与螺旋藻多糖含量呈极显著负相关;螺旋藻产品的类胡萝卜素含量与 β -胡萝卜素、总叶绿素和叶绿素a含量呈极显著正相关,与不饱和脂肪酸、 γ -亚麻酸、藻胆蛋白、藻蓝蛋白、DHA,以及SOD都具有显著的正相关性;藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白和藻红蛋白3种色素蛋白之间存在高度的正相关,它们与叶绿素a含量正相关; γ -亚麻酸、EPA和DHA之间存在正相关,它们与类胡萝卜素含量正相关;螺旋藻多糖与其它活性成分多为负相关,但只是与蛋白质和叶绿素呈显著负相关;SOD与藻蓝蛋白和胡萝卜素呈显著正相关。类胡萝卜素、藻蓝蛋白、螺旋藻多糖和 γ -亚麻酸4项技术指标能够比较完全地反映螺旋藻产品的活性物质含量。

2.4 免疫功能比较研究

选取活性物质含量差异极显著的两个螺旋藻产品,即活性物质含量相对较高的8号和较低的13号样品作为代表,研究比较螺旋藻产品的免疫功能,结果见4。

抑菌实验表明,6%螺旋藻提取液不显示抑菌作用,但2%螺旋藻提取液具有明显的抑菌作用,而且活性物质含量较高的8号样品的抑菌效果显著强于活性物质含量较低的13号样品,对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌都有抑菌作用,对金黄色葡萄球菌的抑菌圈大于25mm。

动物免疫试验结果显示,饲喂螺旋藻对小鼠免疫器官影响不显著,从表4可以看出,饲喂8号样品的小鼠,其胸腺和脾脏指数均高于饲喂13号样品的实验组,也高于对照组,但统计分析表明差异无显著性。饲喂螺旋藻对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬作用的影响效果显著,饲喂螺旋藻实验组小鼠巨噬细胞吞噬率和吞噬指数均显著高于对照组,同时,活性物质含量较高的8号样品实验组显著高于13号样品实验组。以溶壁微球菌和金黄色葡萄球菌为指示菌进行的血清溶菌酶活力实验表明,饲喂螺旋藻小鼠的血清溶菌酶活力显著高于对照组,且8号样品实验组的显著高于13号样品实验组的。血清球蛋白检测也说明,饲喂螺旋藻使小鼠血清球蛋白显著增加,活性物质含量较高的8号样品显著优于活性物质含量较低的13号样品。

3 讨论

活性物质是螺旋藻成为保健食品和药源食物

的基础。大量研究证明,藻蓝蛋白和螺旋藻多糖都具有增强人体免疫力^[25,26]、抑制肿瘤细胞^[27]的功能,SOD能够清除氧自由基,类胡萝卜素等有抗氧化、抗衰老、抗疲劳等作用,不饱和脂肪酸能够降低胆固醇、防治高脂血症^[28,29]。螺旋藻中的活性铁、维生素和叶绿素是合成血红蛋白的原料和辅酶,具有抗贫血及促骨髓造血作用^[30]。本文以8号样品和13号样品为代表进行的比较试验也清楚地说明了活性物质含量对于螺旋藻产品免疫性能的重要性,活性物质含量较高的8号样品不仅抑菌效果显著强于活性物质含量较低的13号样品,而且对小鼠腹腔巨噬细胞、血清溶菌酶活力、血清球蛋白含量的促进作用,也都显著高于13号样品。

从19个螺旋藻产品活性物质含量的检测结果来看,所有产品都含有色素蛋白、多聚不饱和脂肪酸、类胡萝卜素、叶绿素、螺旋藻多糖、SOD等活性物质,但含量差异很大,高含量样品与低含量样品的差异达到2~5倍,有的样品检测不到DHA。单从样品蛋白质和类胡萝卜素含量这两项理化指标来看,样品之间的差别并不大,但仔细分析每个样品活性物质含量,就会发现作为保健食品,受检的19个螺旋藻产品实际上质量差别很大。最为典型的例子就是8号样品和13号样品,单从蛋白质含量来看,两者差异不显著,甚至8号样品62.2%的蛋白质含量还要略低于13号样品63.4%的蛋白质含量,但8号样品所有活性物质含量检测结果全部高于13号样品,且差异具有极显著性。这样的例子还有很多。所以要判断螺旋藻保健食品的质量,不仅要检测其蛋白质和类胡萝卜素等理化指标,更重要的是要检测其活性物质含量,这样才能判断其保健功能。

螺旋藻产品营养及活性物质含量之间的相关性分析表明,样品总蛋白质含量与藻蓝蛋白呈极显著正相关性,与螺旋藻多糖呈极显著负相关性,与其他活性物质含量不具相关性。所以,单凭样品蛋白质含量这一项指标不足以评判螺旋藻保健食品的产品质量。类胡萝卜素含量与藻蓝蛋白、 γ -亚麻酸、DHA、叶绿素a、 β -胡萝卜素、以及SOD都具有显著的正相关性,可以说是一个能够综合反映螺旋藻产品活性物质含量的比较好的技术指标,但相似系数在0.475~0.895之间,单靠这一项指标还不足以反映全部活性物质。国外文献报道螺旋藻干粉的类胡萝卜素含量为6.5 g/kg^[31],本文检测的19个螺旋藻产品类胡萝卜素含量在4.98~24.81 g/kg之间,这个数据偏高。GB/T 16919—1997《食用螺旋藻粉》规定的类胡萝卜素含量技术指标为 ≥ 2 g/kg,

单看这一指标,所有产品都达标,但从保健食品的角度来看,这些达标产品的质量差别很大。藻蓝蛋白与总蛋白、类胡萝卜素、别藻蓝蛋白、藻红蛋白、 γ -亚麻酸、叶绿素 a、 β -胡萝卜素、以及 SOD 都具有显著的正相关性,也是一个能够综合反映螺旋藻产品活性物质含量的指标,但它与螺旋藻多糖含量存在显著的负相关性,所以在使用这一指标时应结合螺旋藻多糖的检测结果来综合评价螺旋藻类保健食品的产品质量。螺旋藻多糖与其它活性物质含量多为负相关,但只是与总蛋白质、藻蓝蛋白和叶绿素呈显著负相关。 γ -亚麻酸与类胡萝卜素、藻蓝蛋白、EPA、叶绿素 a 和 β -胡萝卜素之间存在显著正相关。所以,采用类胡萝卜素、藻蓝蛋白、螺旋藻多糖和 γ -亚麻酸 4 项指标就能够比较全面地反映螺旋藻类保健食品的活性物质含量,从而综合评价螺旋

藻类保健食品的产品质量。

目前,我国食用螺旋藻执行的标准仍然是 1997 年制定的国家标准 GB/T 16919—1997《食用螺旋藻粉》,标准的主要技术指标包括感官要求、理化指标、重金属限量和微生物学要求,主要技术指标见表 5。可以看出,除了一些有害物限制性指标外,标准涉及螺旋藻营养物质的技术指标只有总蛋白质和类胡萝卜素 2 项,以此来评判一般意义上的食品是可行的,但作为保健食品的螺旋藻产品,其价值更多地体现在它的保健作用,也就是螺旋藻所含的生理活性物质。从本文的研究结果来看,活性物质是螺旋藻产品免疫功能的基础,由于该标准缺少活性物质技术指标,评判保健食品意义上的螺旋藻产品有困难,建议有关部门修订该标准时考虑活性物质技术指标。

表 5 GB/T 16919—1997《食用螺旋藻粉》技术指标

Table 5 National standard GB/T 16919—1997 Food grade spirulina powder technical specifications

项目	指标	项目	指标
感官要求		重金属限量 (mg/kg)	
色泽	蓝绿色或深蓝绿色	铅	≤2.0
滋味和气味	略带海藻鲜味,无异味	砷	≤0.5
外观	均匀粉末	镉	≤0.2
杂质	显微镜镜检无异物	汞	≤0.05
理化指标		微生物学要求	
细度 (μm)	≤180	菌落总数 (个/g)	≤1 × 10 ⁴
水分 (%)	≤7	大肠菌群 (个/100 g)	≤90
蛋白质 (%)	≥55	霉菌 (个/g)	≤25
类胡萝卜素 (g/kg)	≥2.0	致病菌 (沙门菌、金黄色葡萄球菌、志贺菌)	不得检出
灰分 (%)	≤7		

参考文献

[1] 王文博,高俊莲,孙建光,等. 螺旋藻的营养保健价值及其在预防医学中的应用[J]. 中国食物与营养, 2009, 14(1): 48-51.

[2] SINGH S, KATE B N, BANERJEE U C. Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: an overview [J]. Crit Rev Biotechnol, 2005, 25(3): 73-95.

[3] KHAN Z, BHADOURIA P, BISEN P S. Nutritional and therapeutic potential of Spirulina [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2005, 6(5): 373-379.

[4] AKAO Y, EBIHARA T, MASUDA H, et al. Enhancement of antitumor natural killer cell activation by orally administered Spirulina extract in mice [J]. Cancer Sci, 2009, 100(8): 1494-1501.

[5] KULSHRESHTHA A, ZACHARIA A J, JAROULIYA U, et al. Spirulina in health care management [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2008, 9(5): 400-405.

[6] 张成武. 钝顶螺旋藻多糖和藻蓝蛋白对小鼠急性放射病的防护作用[J]. 营养学报, 1996, 18(3): 327-331.

[7] 王俏先,孟正木,亢寿海. 钝顶螺旋藻的抗癌作用及对免疫功能的影响[J]. 癌症, 1996, 15(6): 423-425.

[8] 李冰,张学成,高美华. 钝顶螺旋藻藻蓝蛋白和多糖的抗肿瘤免疫活性研究[J]. 中国海洋大学学报, 2004, 34(3): 396-402.

[9] 全国食品工业标准化技术委员会. GB/T 14771—1993 食品中蛋白质的测定方法[S]. 北京:中国标准出版社, 1993.

[10] 中华人民共和国农业部. GB/T 12291—1990 水果、蔬菜汁类胡萝卜素全量的测定[S]. 北京:中国标准出版社, 1990.

[11] 全国食品工业标准化技术委员会. GB/T 14769—1993 食品中水分的测定方法[S]. 北京:中国标准出版社, 1993.

[12] 全国食品工业标准化技术委员会. GB/T 14770—1993 食品中灰分的测定方法[S]. 北京:中国标准出版社, 1993.

[13] 中华人民共和国卫生部. GB/T 4789. 2—2008 食品卫生微生物学检验 菌落总数测定[S]. 北京:中国标准出版社, 2008.

[14] 国家认证认可监督管理委员会. SN/T 1113—2002 进出口螺旋藻粉中藻蓝蛋白、叶绿素含量的测定方法[S]. 北京:中国标准出版社, 2002.

[15] 朱英,罗永明,严喜鸾,等. 螺旋藻多糖含量测定[J]. 时珍国医国药, 1999, 10(2): 88.

- [16] 邓青, 张晓梅. 气相色谱/质谱联用分析测定螺旋藻脂肪酸组成[J]. 云南民族学院学报: 自然科学版, 2003, 12 (1): 37-38.
- [17] 可成友, 吴晓芳. 不饱和脂肪酸的气相色谱法同时测定[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15 (5): 528-530.
- [18] 李永利, 张炎. 邻苯三酚自氧化法测定 SOD 活性[J]. 中国卫生检验杂志, 2000, 10(6): 673.
- [19] 张宏, 谭竹钧. 四种邻苯三酚自氧化法测定超氧化物歧化酶活性方法的比较[J]. 内蒙古大学学报: 自然科学版, 2002, 33 (6): 677-681.
- [20] 杨红文, 艾玲, 雒秋江. 大蒜等 12 种中草药的体外抑菌实验[J]. 时珍国医国药, 2009, 20 (9): 2209-2210.
- [21] 吴新正, 何迎春, 刘红萍, 等. 红景天复方对小鼠免疫、耐缺氧和抗疲劳能力的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2008, 28 (1): 29-31.
- [22] 国果, 吴建伟, 付萍, 等. 家蝇幼虫分泌物抗菌肽对小鼠血清溶菌酶含量的影响[J]. 贵阳医学院学报, 2007, 32 (6): 586-588.
- [23] 韩广金, 杨桂芹, 邹兴淮. 不同鹿胎及胎盘制剂对老年雄性大鼠免疫功能影响的研究[J]. 畜牧与兽医, 2006, 38(1): 8-10.
- [24] 中华人民共和国科学技术委员会. GB/T 16919—1997 食用螺旋藻粉[S]. 北京: 中国标准出版社, 1997.
- [25] ERIKSEN N T. Production of phycocyanin-a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine[J]. Microbiol Biotechnol, 2008, 80: 1-14.
- [26] MORTEN L, WALSTED A, LARSEN R, et al. Enhancement of human adaptive immune responses by administration of a high-molecular-weight polysaccharide extract from the cyanobacterium *Arthrospira platensis* [J]. J Med Food, 2008, 11(2): 313-322.
- [27] SCHWARTZ J, SHKLAR G, REID S, et al. Prevention of experimental oral cancer by extracts of *Spirulina-Dunaliella* algae [J]. Nutr Cancer, 1988, 11: 127-134.
- [28] JUAREZ M A, MASCHER D, TORRES P V, et al. Effects of dietary *Spirulina* on vascular reactivity [J]. J Med Food, 2009, 12(1): 15-20.
- [29] PARK H J, LEE Y J, RYE H K, et al. A randomized double-blind, placebo-controlled study to establish the effects of spirulina in elderly Koreans [J]. Ann Nutr Metab, 2008, 52 (4): 322-328.
- [30] JOHNSON P, SHUTERT E. Availability of iron to rats from spirulina, a blue-green alga [J]. Nutr Res, 1986, 6: 86.
- [31] MIKI W, YAMAGUCHI K, KONOSU S. Carotenoid composition of *Spirulina maxima* [J]. Bull Jap Soci Scienti Fisher, 1986, 52 (7): 1225-1227.

论著

MALDI-TOF-MS 鉴定 2008 年辽宁省食源性疾病监测系统检出的沙门菌的初步研究

吕佳¹, 卢行安², 刘淑艳², 蒋丹², 宋惠君², 侯君³, 胡英⁴

(1. 大连工业大学生物工程学院, 辽宁 大连 116034; 2. 辽宁出入境检验检疫局, 辽宁 大连 116015; 3. 大连市疾病预防控制中心, 辽宁 大连 116021; 4. 辽宁省疾病预防控制中心, 辽宁 沈阳 110005)

摘要:目的 应用 MALDI-TOF-MS 技术对 2008 年辽宁省食源性疾病监测检出的 24 株沙门菌和 2 株沙门菌标准菌株进行鉴定, 并对其中 4 种血清型的 16 株沙门菌进行种水平的鉴定。通过 MALDI-TOF-MS 的相关性分析, 研究 MALDI-TOF-MS 与血清分型结果的相关性及 MALDI-TOF-MS 对实验的沙门菌的分型能力。方法 考察并确定既适合菌株生长又适宜 MALDI-TOF-MS 分析的沙门菌培养基后, 应用 MALDI-TOF-MS 的相关软件对沙门菌进行数据采集和图谱比对, 所得鉴定结果与血清分型结果进行比较。对属于 4 个种的 4 株沙门菌的蛋白峰信息进行比较分析。通过生化鉴定及 MALDI-TOF-MS 的聚类分析及主成分分析讨论 4 株肠炎沙门菌同源关系。结果 MALDI-TOF-MS 技术分别在属和种的水平上准确鉴定了沙门菌株, 并且在种的鉴定水平上与血清分型结果具有极大相关性。MALDI-TOF-MS 区分了属于 4 个种的 4 株沙门菌的蛋白峰之间的微小差异。而且, 对相同血清型的 4 株肠炎沙门菌的聚类分析及主成分分析显示出其同源程度的差异。结论 MALDI-TOF-MS 技术在属水平上鉴定沙门菌具有很高的准确性, 在种水平上的鉴定也有着很好的应用前景。MALDI-TOF-MS 技术可能为沙门菌分型溯源提供一种新的手段。

关键词:沙门菌; MALDI-TOF-MS; 血清型; 质谱图; 鉴定

中图分类号: R378.22 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2011)01-0061-09

收稿日期: 2010-07-05

作者简介: 吕佳 女 硕士生 研究方向为食源性致病菌检测与鉴定 E-mail: chaneljia095@hotmail.com

通信作者: 卢行安 男 研究员 研究方向为食源性致病菌检测与鉴定 E-mail: luxa@lnciq.gov.cn