

國立台東大學 生命科學研究所
Institute of Life Science National Taitung University

碩士論文

Master Thesis

指導教授：李炎 博士

由鞘絲藍菌 *Lyngbya* sp. 中分離純化藻藍素之
方法及其抗氧化活性探討

The Purification of Phycocyanin from *Lyngbya* sp. and
It's Oxidation Resistance Activity

研究生：張智翔

Student: Chih-Hsiang Chang

中華民國 98 年 6 月

June 2009

由鞘絲藍菌 *Lyngbya* sp. 中分離純化藻藍素之
方法及其抗氧化活性探討

**The Purification of Phycocyanin from *Lyngbya* sp. and
It's Oxidation Resistance Activity**

研究生：張智翔

Student：Chih-Hsiang Chang

指導教授：李炎 博士

Advisor：Yen Lee Ph.D.

國立台東大學
生命科學研究所
碩士學位論文

Submitted to Department of Institute of Life Science
National Taitung University
In Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master in
Life Science
June 2009
Taitung, Taiwan, Republic of China

中華民國 98 年 6 月

June 2009

國立台東大學

學位論文考試委員審定書

系所別：生命科學研究所

本班 張智翔 君

所提之論文 由鞘絲藍菌 *Lyngbya* sp. 分離純化藻藍素之
方法及其抗氧化活性探討

業經本委員會通過合於 ☒ 碩士學位論文 條件
☐ 博士學位論文

論文學位考試委員會：

黃德昌

(學位考試委員會主席)

李俊霖

李長

(指導教授)

論文學位考試日期：98年7月6日

國立台東大學

附註：1. 本表一式二份經學位考試委員會簽後，送交系所辦公室及註冊組或進修部存查。

2. 本表為日夜學制通用，請依個人學制分送教務處或進修部辦理。

博碩士論文授權書

本授權書所授權之論文為本人在 國立臺東大學 生命科學研究 系(所)

組 九十七 學年度第 二 學期取得 碩 士學位之論文。

論文名稱：由鞘絲藍菌 *Lyngbya* sp. 中分離純化藻藍素之方法及其抗氧化活性探討

本人具有著作財產權之論文全文資料，授權予下列單位：

同意	不同意	單 位
☒	☐	國家圖書館
☒	☐	本人畢業學校圖書館
☐	☒	與本人畢業學校圖書館簽訂合作協議之資料庫業者

得不限地域、時間與次數以微縮、光碟或其他各種數位化方式重製後散布發行或上載網站，藉由網路傳輸，提供讀者基於個人非營利性質之線上檢索、閱覽、下載或列印。

☐ 同意 ☒ 不同意 本人畢業學校圖書館基於學術傳播之目的，在上述範圍內得再授權第三人進行資料重製。

本論文為本人向經濟部智慧財產局申請專利(未申請者本條款請不予理會)的附件之一，申請文號為：_____，請將全文資料延後半年再公開。

公開時程

立即公開	一年後公開	二年後公開	三年後公開
			☒

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。上述同意與不同意之欄位若未勾選，本人同意視同授權。

指導教授姓名：李 忠 (親筆簽名)

研究生簽名：張 智 翔 (親筆正楷)

學 號：9600802 (務必填寫)

日 期：中華民國 98 年 7 月 6 日

1. 本授權書 (得自 <http://www.lib.nttu.edu.tw/theses/> 下載) 請以黑筆撰寫並影印裝訂於書名頁之次頁。

2. 依據 91 學年度第一學期一次教務會議決議：研究生畢業論文「至少需授權學校圖書館數位化，並至遲於三年後上載網路供各界使用及校內瀏覽。」

授權書版本: 2008/05/29

謝 誌

奔奔波波跌跌走過多少曲折不知幾個彎，過程當中，經歷了無數的風風雨雨，從一開始的懵懵懂懂，到論文順利完成的今天，由衷的感謝恩師李炎老師在這段期間耐心的指導實驗上許多應注意的細節，使我從中學習了許多以前未知的經驗，訓練了我獨立思考的能力，老師的認真也改變了我對實驗的態度，讓我了解到求學問不可囫圇吞棗，必須腳踏實地才能登峰造極，在此對老師致上最高的謝意。

也要感謝李俊霖老師在這段期間內給予我的指導與幫助，與老師亦師亦友的互動，使我能將遇到的困難或瓶頸與老師討論，老師的意見總是能啟發我新的想法，讓我順利解決實驗上的問題，非常感謝老師。

要感謝的人很多，但最要感謝的是我的哥哥也是我的學長張智超，若沒有他的幫忙，我的實驗不會這麼順利；另外本所的劉炯錫老師、彭仁君老師，黃祥恩老師，中央研究院生化所蔡明道所長等，諸位師長於在學期間的指導及鼓勵以及本所的助理張惠嵐小姐給予許多協助，同學、學長姊及學弟妹們的幫忙，一併在此致上深深的感謝。

最後，要感謝我最親愛的父母，辛苦的栽培與教養，困擾中給我支持，失意中給我鼓勵，你們的支持是我最大的動力，讓我能順利完成碩士學業，謝謝你們。

在此也祝大家事事順心，健康平安！

中文摘要

本研究主要在探討以快速簡單之萃取方式從鞘絲藍菌 *Lyngbya* sp. 中分離純化出藻藍素，並評估所萃取出之藻藍素抗氧化能力。利用物理方式先磨碎均質並離心，將上清液進行管柱層析分離或冷凍乾燥法可得濃度為 3.021 mg/ml；透過光譜分析所測得最強吸收波長為 620nm、SDS page 分子量鑑定可分離出 α -subunit 及 β -subunit 兩主要次單元，分子量分別為 17 kDa 及 18 kDa，對照標準品結果皆相同。

抗氧化能力分析上，首先建立細胞氧化模型，利用 H_2O_2 來誘導細胞產生氧化濃度測試的結果為 0.03% 最適當，高於 0.03% 則細胞所受氧化壓力過大，低於 0.03% 細胞無顯著影響，故最適濃度訂為 0.03%。藻藍素作用 H_2O_2 誘導氧化之細胞模型並與抗氧化劑維生素 C、維生素 E 以及 β -carotene 同時測試比較，結果發現，當濃度皆以 10 mM 進行測試時，以藻藍素有最佳的抗氧化能力，相較於同濃度之維生素 C 可抑制細胞承受氧化壓力之時間為其 6 倍，實驗結果也顯示，當細胞接受氧化壓力所攻擊時，在三小時內加入藻藍素仍具有相當的抗氧化能力，而同濃度的維生素 C 與維生素 E 則否； β -carotene 在 10mM 時對細胞而言濃度過高，會導致細胞產生皺縮現象，但在抗氧化測試方面，由結果顯示，先加入 β -carotene 在一小時內對氧化攻擊有明顯的抑制作用，但隨時間增長則對細胞會造成死亡，抗氧化效果亦不及同濃度的藻藍素來的佳。經過實驗的結果顯示，抗氧化劑加入的時間先後對細胞而言影響甚鉅，在細胞受到氧化攻擊之後的適當時間加入，才可達到抑制效果；但本實驗結果顯示 β -carotene 在細胞受氧化壓力前一小時加入，有明顯的效

果，由此可知抗氧化劑若先加入或超過了有效時間，則無法有效抑制氧化壓力，因種類而異。因此本實驗結果證明了由鞘絲藍菌中所萃取之藻藍素有優於其他抗氧化劑的能力，效果可達至少 5 倍以上，對於日後保健食品以及美妝保養品或抗氧化藥劑的研發上，有極佳的前瞻性。

關鍵字：鞘絲藍菌、藻藍素、抗氧化、抗氧化劑。



Abstract

This research used a fast and simple extraction method to purify the phycocyanin from *Lyngbya* sp., and tested the phycocyanin oxidation resistance ability. *Lyngbya* sp. cells were ground in distilled water and centrifuged, then the supernatant run through the column chromatography tube. The separated liquid had the concentration of 3.021 mg/ml. The liquid was then freeze dried. The liquid was analyzed by spectrophotometer. It showed the maximum absorption wave length was 620 nm. The SDS page result showed the protein had α - and β - two main subunits. Their molecular weights were 17 kDa and 18 kDa respectively, compared to Sigma standard.

For the oxidation resistance ability analyzation, cell oxidation model was firstly established. Different concentrations of H_2O_2 were used to treat the Vero cells. The most adequate concentration was found to be 0.03%. While 10mM of phycocyanin, vitamin C, vitamin E as well as β -carotene were used separately to treat the H_2O_2 stressed Vero cells, phycocyanin showed the best oxidation resistance ability. The experimental results also demonstrated, during 3 hours of Vero cells that treated by oxidization attack, then administrated the phycocyanin to the cells, phycocynin could help the cells to have suitable oxidation resistance ability. Nevertheless, the same concentration of neither vitamin C, vitamin E nor β -carotene could prevent the cells from shrinkage phenomenon. Experiment results also demonstrated that β -carotene added to Vero cells one hour before oxidization attack could have obviously inhibitory effect. It was estimated that the phycocya nin extracted from *Lyngbya* sp. suppressed other oxidation inhibitor ability about 5-fold.

It is reasonably to say, *Lyngbya* sp. has good ability for applications in the future in either health food or cosmic market.

Key word : *Lyngbya* SP. 、 phycocyanin 、 antioxidant



目 錄

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
目 錄.....	V
圖目錄.....	VIII
壹、緒論.....	1
一、前言.....	1
二、研究目標	3
貳、文獻整理.....	5
一、藍菌概述	5
二、藻藍素萃取方法回顧	13
三、測定抗氧化活性之方法原理	14
四、自由基的來源	19
五、氧自由基對生物體內所造成之危害	21
六、抗氧化劑之種類	23
七、藻藍素.....	27
八、藻藍素的生理功效	31
參、實驗流程.....	33
肆、材料與方法	34
一、實驗材料	34
二、實驗儀器	35
三、藍菌純化與培養方法	35
3.1 培養基配製：	35
3.2 藍菌培養	36

3.3 藍菌純化	37
3.4 藍菌保存	37
四、藻藍素分離前處理	38
4.1 冷凍乾燥法	38
4.2 膠體過濾層析法	39
五、藻藍素萃取條件方法開發	39
5.1 冷凍乾燥法	39
5.2 膠體過濾層析法	39
六、藻藍素特性分析	40
6.1 藻藍素定量分析	40
6.2 藻藍素定性分析	41
七、藻藍素對細胞抗氧化能力分析	42
7.1 細胞來源	42
7.2 細胞培養	42
7.3 過氧化氫誘導細胞氧化模型的建立	45
7.4 藻藍素對過氧化氫誘導細胞氧化之影響	45
7.5 維生素 C 對過氧化氫誘導細胞氧化之影響	46
7.6 維生素 E 對過氧化氫誘導細胞氧化之影響	46
7.7 β -carotene 對過氧化氫誘導細胞氧化之影響	47
7.8 藻藍素抗氧化能力分析	47
伍、結果與討論	49
一、藍菌培養	49
1.1 固態培養小量純化	49
1.2 液態小量培養	49

1.3 液態大量培養	49
1.4 藍菌純化	54
二、藻藍素萃取條件方法開發	54
2.1 冷凍乾燥法	54
2.2 膠體過濾層析法	59
三、藻藍素特性分析	59
3.1 藻藍素定量分析	59
3.2 分子量	61
3.3 吸收光譜	61
四、藻藍素細胞抗氧化能力分析	64
4.1 過氧化氫誘導細胞氧化模型建立	64
4.2 藻藍素對過氧化氫誘導細胞氧化之影響	68
4.3 維生素 C 對過氧化氫誘導細胞氧化之影響	68
4.4 維生素 E 對過氧化氫誘導細胞氧化之影響	73
4.5 β -carotene 對過氧化氫誘導細胞氧化之影響	76
4.6 藻藍素抗氧化能力分析	79
陸、結論.....	83
柒、參考文獻.....	85
附錄一、C-10 培養基配方	97
C-10 培養基 (藥品單位為每公升蒸餾水中所含公克數 :g/L).....	97
微量元素 (藥品單位為每公升蒸餾水中所含公克數 :g/L).....	97

圖目錄

圖一.藍菌(<i>Cyanobacteria</i>)	2
圖二.鞘絲藍菌 (<i>Lyngbya</i> sp.).....	4
圖三.藍菌細胞圖(<i>Cyanobacterial cell structure</i>)	6
圖四.類囊體 (<i>Thylakoid</i>).....	7
圖五.位於類囊體上之藻膽體(<i>phycobilisome</i>)	9
圖六.藻膽體結構圖	10
圖七.藻膽體吸收光能產生能量路徑圖	11
圖八.不同色素之吸收光譜	29
圖九.藻藍素(<i>C-phycocyanin, C-PC</i>).....	30
圖十. <i>Lyngbya</i> sp.固態培養圖	50
圖十一.顯微鏡下 <i>Lyngbya</i> sp.	51
圖十二.小量液態培養之 <i>Lyngbya</i> sp.	52
圖十三.大量液態培養之 <i>Lyngbya</i> sp.	53
圖十四.萃取出之藻藍素粉末	56
圖十五.萃取出之藻藍素水溶液	57
圖十六.萃取出之藻藍素水溶液	58
圖十七.光譜強度之線性關係	60
圖十八. <i>Bovine serum albumin (BSA)</i> 蛋白質定量標準曲線	60
圖十九.10% 聚丙烯醯胺膠體電泳結果	62
圖二十.藻藍素吸收光譜	63

壹、緒論

一、前言

藍菌 (Cyanobacteria) (圖一)，在地球上出現約已 30 億年，是最早的光合放氧生物，對地球表面大氣原始的無氧環境轉變為有氧環境有重大作用，原始大氣層主要是由氮氣及二氧化碳所組成，環境不適合生物生長，地表溫度高，大氣中缺乏遮蔽紫外線之臭氧層，而生物經光合作用產生之氧氣受紫外線照射後會形成具有毒性的活性氧 (氧氣分子多一個電子 $O_2^- \cdot$)，而藍菌因其有強抗氧化作用可消除毒性氧而生存，並藉釋出光合作用產生之氧氣使地球漸形成臭氧層：氧氣分子可以吸收小於 240 μm 波長的太陽光中的紫外線，並分解形成氧原子。這些氧原子與氧分子相結合生成臭氧，生成的臭氧對太陽的紫外輻射有很強的吸收作用，有效地阻擋了對地表生物有傷害的紫外線，而使其他生物得以陸續生長。在分類上因不具有細胞核與粒腺體 (mitochondria)，高氏體 (Golgi body)，或葉綠體 (chloroplast) 等胞器，而被列為原核生物 (Beams and Kessel 1977)。

目前已發現的藍菌種類約 2000 多種，分佈廣泛，在淡水和海水中，潮濕和乾旱的土壤或岩石上、樹幹和樹葉上，溫泉中、冰雪上，甚至在鹽鹼池、岩石縫中都可以發現藍菌；有些還可穿入鈣質岩石或介殼中或土壤深層中。由於藍菌分佈廣，數量多，學界對其之研究也越來越多，已知的研究已有應用在食品方面，其菌體內所提取之化學物質亦有被發現對於抗細菌或病毒以及免疫調節等效果，對於生理醫學上的研究有極大前瞻性；農業方面的肥料使用，甚至工廠廢水處理，廚餘臭味的消除；另外生產含

放射性同位素的化合物，利用其生理代謝方式產生氫氣等，都是目前藍菌被廣泛應用的範疇。



圖一.藍菌(Cyanobacteria) (Nikon YS100 目鏡 20x；物鏡 40x)

二、研究目標

由於藍菌普遍富含藻藍素，而藻藍素又被研究發現具有許多生理上之功效，例如抗氧化、抗發炎作用；護肝以及抗腫瘤作用等(廖 2006)，而本實驗室由李炎教授分離純化出之藍菌 *Lyngbya* sp. (鞘絲藍菌)(圖二) 依生物學上之分類，歸類於原核生物界 (Monera)，藍菌門 (Cyanophyta)，藍菌綱 (Cyanophyceae)，顫藍菌目 (Oscillatoriales)，顫藍菌科 (Oscillatoriaceae)，鞘絲藍菌屬 (*Lyngbya*)，培養時間短，成本低且於培養液中生長快速，經篩選又為藍菌食品開發之優良菌屬(李 2005)，而從已知的 *Lyngbya* sp. 菌屬當中，發現許多抗細菌及病毒之化學物質，於生理醫學以及保健食品的開發上具有相當之價值(李 2005)，故本實驗決定以 *Lyngbya* sp. 為主要研究對象，研發從菌體中萃取分離純化出藻藍素，進行光譜吸收波長比對，分子量鑑定，並研究探討其細胞抗氧化能力。

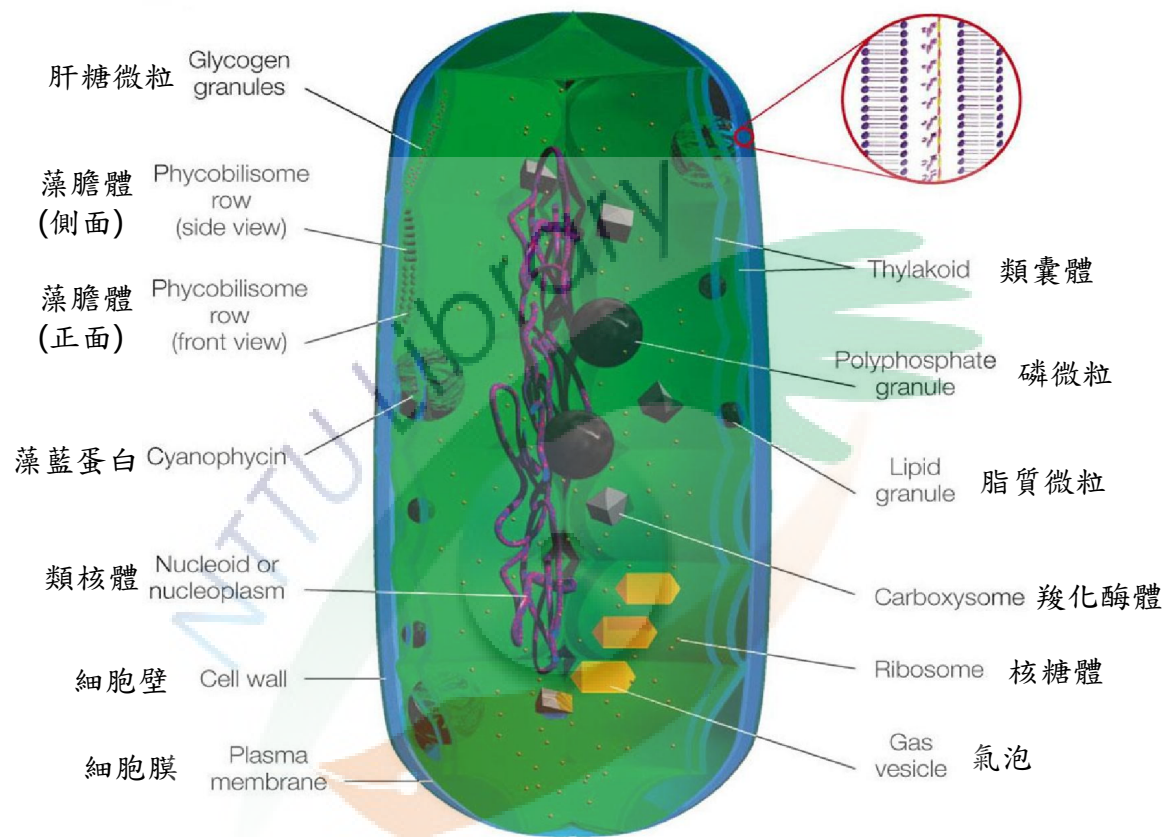


圖二. 鞘絲藍菌 (*Lyngbya* sp.) (Nikon YS100 目鏡 20x；物鏡 40x)

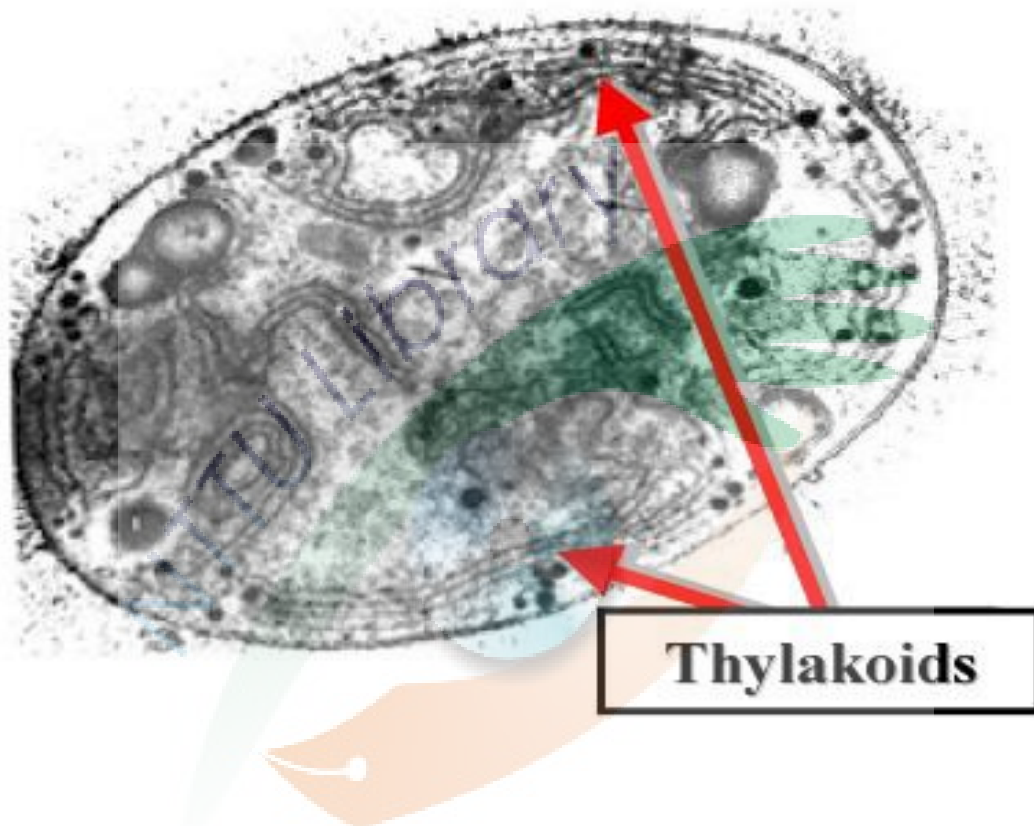
貳、文獻整理

一、藍菌概述

藍菌如前述在生物學上的分類屬於原核生物界。其細胞膜組成屬格蘭氏陰性(Gram-negative)，細胞膜附著細胞壁，細胞壁為脂多糖(lipopolysaccharide-LPS)與肽聚糖(peptidoglycan)組成之複合體，細胞膜內部則為細胞質(cytoplasm)(Ris and Singh 1961; Stolz 1991)。細胞大小由 1 μm 至 100 μm 不等，差異很大(Castenholz and Waterbury 1989)(圖三)。而其與細菌及古生菌之區別，可由 16S 與 5S rRNA 的排序鑑別出，另外，比較 23S rRNA 排序與延長因子(elongation factor) Tu 與 ATP 合成酶(ATPase)的 β 附屬單位(subunit)的蛋白質結構，可更明顯分別出與一般細菌之不同。類囊體(thylakoid)(圖四)是它們主要發生光合作用之處，是一存在於細胞內的膜狀結構(Stolz 1991)，類囊體會隨著不同環境如光照、溫度、細胞生長時間長短、缺磷、氫化物、形成厚垣孢子(akinete)或異形細胞(heterocyst)等情形下改變表現狀況，例如扭曲、緊靠、鬆散、甚至消失等(Stolz 1991; Grossman and others 1993)。極少數藍菌無類囊體，細胞膜是它們主要發生光合作用機制之處(Stolz 1991)。



圖三.藍菌細胞圖(Cyanobacterial cell structure)(Hartwell T.Crim,1998)。

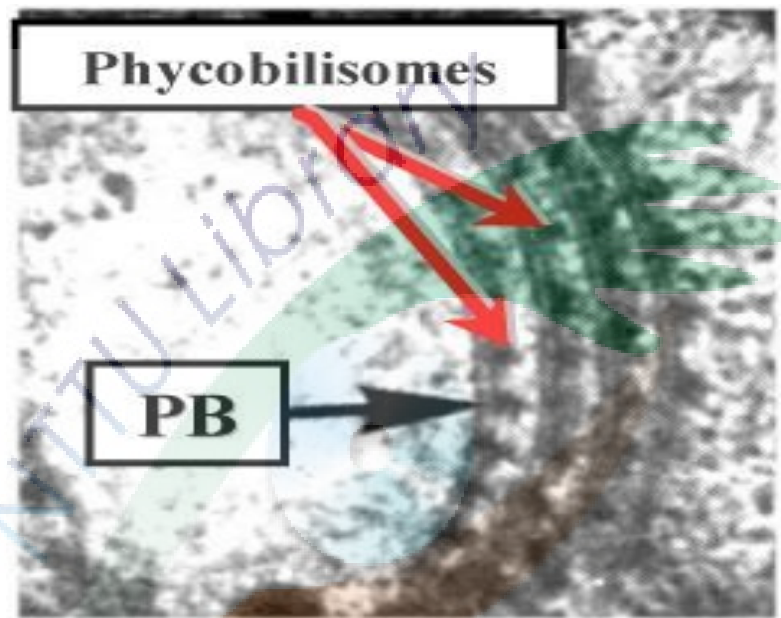


圖四.類囊體 (Thylakoid)。

(<http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/library/webb/BOT311/Cyanobacteria/Cyanobacteria.htm>)

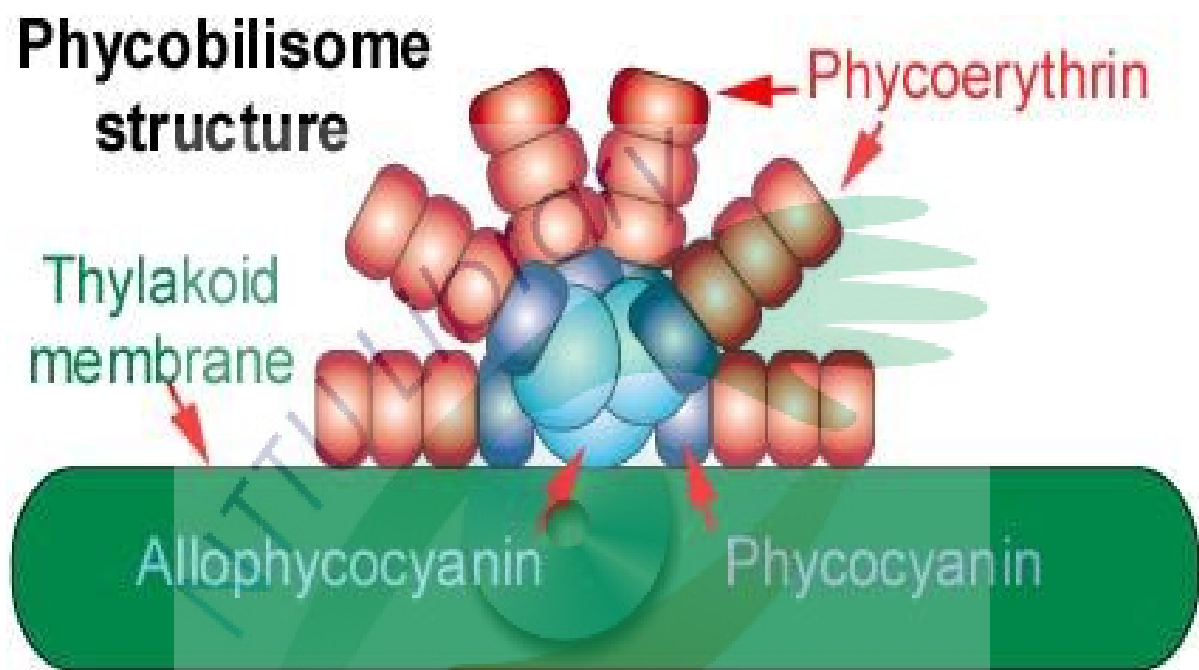
藍菌菌體中亦含有藻膽體 (phycobilisome)(圖五)，富含藻藍素 (phycocyanin, PC) 與異藻藍素 (allophycocyanin, APC)；又因菌種的不同，有的含有藻紅素 (phycoerythrin, PE) 有的則否(圖六)。藍菌均具藻膽體，藻膽體位於類囊體面向細胞質外的部分，當光子被藻膽體吸收，可利用所吸收的能，將水分解，形成 O_2 與 H^+ ，並透過電子傳遞系統，在類囊體膜兩側形成電化滲透壓(chemiosmotic or electrochemical potential)。所形成的能量，可使 $ADP + Pi \rightarrow ATP$ (圖七)(Bryce and Hill 1999)。

其中藻藍素已被廣泛研究，於生理活性上已被發現具有抗氧化、抗發炎以及能護肝且有細胞週期調節之作用(廖 2006)；在分離純化方面也有許多的研究探討(Brejc *et al.*, 1995；Minkova *et al.*, 2003；Pinero *et al.*, 2001)，而藻類機能性保健食品的開發，如綠藻、螺旋藍菌等皆被認為具有可預防生活習慣疾病的功效，且已逐漸受到人們所重視，被認為含有高營養、抗氧化、降低膽固醇的成分 (Bhat *et al.*, 2000；Herrero *et al.*, 2003；Mendes *et al.*, 2003)。而其中藻藍素具有之鎮痛、抗氧化抗發炎能力，因其結構與血紅素之降解產物膽紅素 (bilirubin) 極為相似，膽紅素 (bilirubin) 是人體中重要的抗氧化物，可抑制血漿蛋白質與芳香族胺基酸的氧化並可清除血清蛋白的氧自由基如超氧陰離子 ($O_2^{\cdot-}$)與過氧化自由基 (Farrera *et a.*, 1994; Romay *et al.*, 2003)。



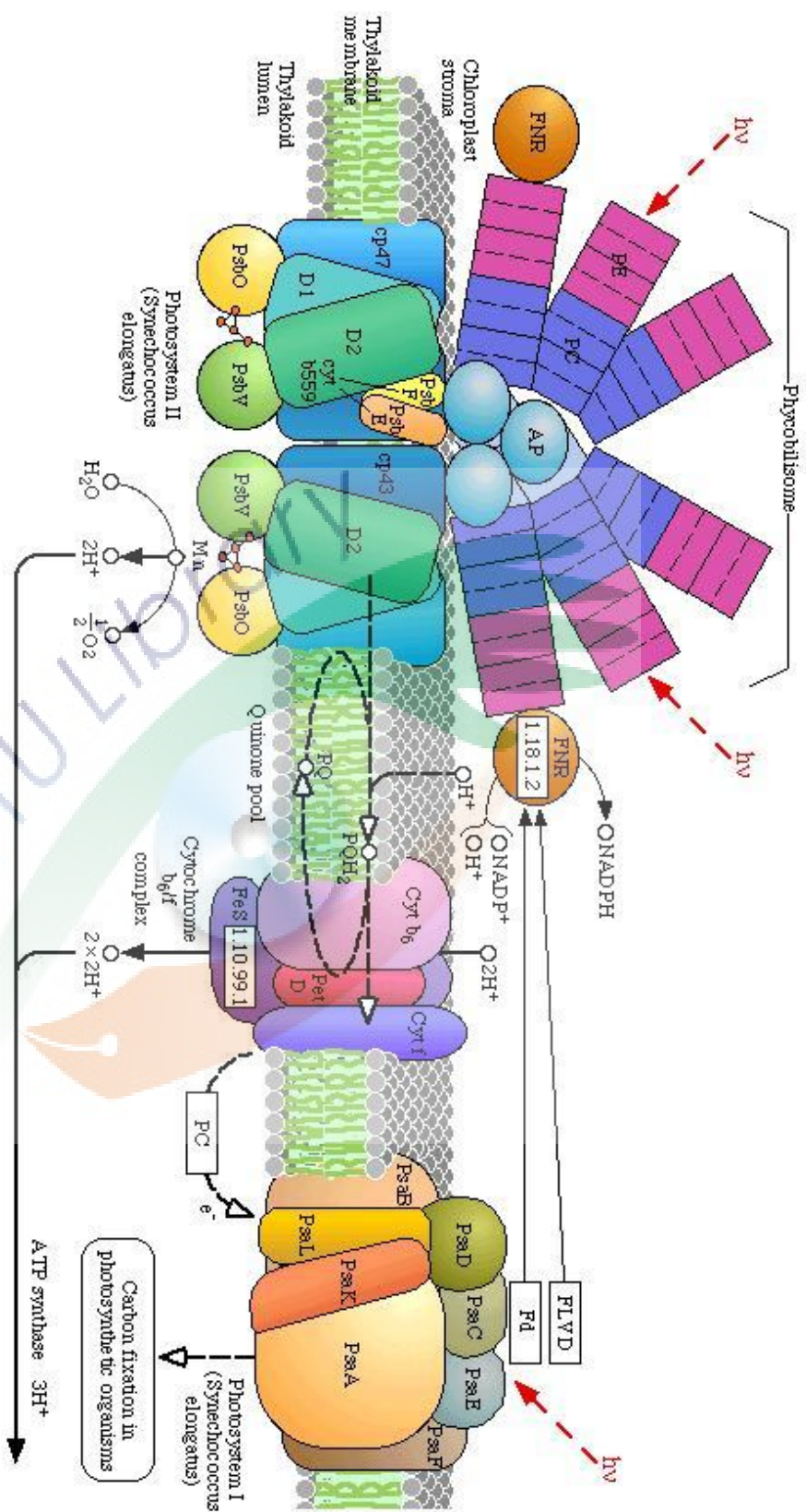
圖五.位於類囊體上之藻膽體(phycobilisome)。

(<http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/library/webb/BOT311/Cyanobacteria/Cyanobacteria.htm>)



圖六.藻膽體結構圖：藻藍素(phycocyanin, PC)；異藻藍素(allophycocyanin, APC)；藻紅素(phycoerythrin, PE)。

(<http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/library/webb/BOT311/Cyanobacteria/Cyanobacteria.htm>)



圖七. 藻膽體吸收光能產生能量路徑圖 (圖片說明於次頁)
(<http://www.chm.bris.ac.uk/motm/oec/images/phyco.gif>)

圖七中：

phycobilisome = 藻膽體，

$h\nu$ = 可見光光子

PE = phycoerythrin 藻紅素

PC = phycocyanin 藻藍素

AP = allophycocyanin 異藻藍素

thylakoid membrane = 類囊體膜

D_1 、 D_2 = PS II 的核心蛋白質體

CP_{43} 、 CP_{47} = 分子量分別為 43 與 47 kD 的葉綠素蛋白質複合體

PsbO，PsbV = PS II 中與氧結合有關的蛋白質

Cyt b_{559} 、Cyt b_6 、Cyt f = 細胞色素 b_{559} 、細胞色素 b_6 、細胞色素 f

PQ = Plastoquinone 質醌

FeS = 鐵硫氧化還原中心

方形 PC (Cyt c_{553}) = 細胞色素 c_{553} ，一種類囊體囊腔中電子傳遞蛋白質，

thylakoid lumen = 類囊體囊腔

stroma = 基質(亦即細胞質的部份)

FNR = ferredoxin/flavodoxin NADPH oxidoreductase 鐵氧化還原蛋白/煙

鹼鹼胺腺嘌呤二核苷酸磷酸，氧化還原酶

PsaA, PsaB, PsaD, PsaE, PsaL, PsaK = 在 PS I 中與葉綠素結合的蛋白質

Flvd = 一種黃素氧化還原蛋白

Fd = 鐵氧化還原蛋白

二、藻藍素萃取方法回顧

藻膽蛋白皆為水溶性，可輕易與其他脂溶性色素分離。有關藻藍素之研究已有很多，目前主要的純化方式仍是以硫酸銨沉澱後進行色層分離法為主，但所選擇之分離系統及純化條件各有不同，亦有以 rivanol (6,9-Diamino-2-ethoxyacridine-DL-lactate monohydrate) 進行前處理者 (Minkova *et al.*, 2003)；色層分離系統可選用膠體過濾法及離子交換法，或再以羥基磷酸鈣管柱 (hydroxylapatite) 將藻藍素及異藻藍素分離 (Pinero Estrada *et al.*, 2001)，也有使用了厭水交互作用色層分析法 hydrophobic interaction chromatography (HIC) (Badrish Soni *et al.*, 2007)，和離子交換色層分析法來萃取純化藻藍素 (Julio Abalde *et al.*, 1998)。

近幾年也有學者利用雙水相萃取法 aqueous two phase extraction (ATPE) 搭配離子交換層析法進行藻藍素的萃取，利用聚合物之間的不相溶性，即聚合物分子的空間阻礙作用，相互無法滲透，不能形成均勻一相，從而具有分離傾向，在一定條件下即可分為二相。一般認為只要兩聚合物水溶液的疏水程度有所差異，混合時就可發生相分離 (Ganapathi Patil *et al.*, 2008)。

除了傳統的蛋白質萃取與純化方式，Swanson 及 Glazer 利用反相高效能液相層析儀對藻膽蛋白直接進行純化及分析，可得到高純度的藻藍素 (Swanson and Glazer, 1990)；但此種方式的缺點是成本高，不適合應用於工業上的大量純化。

三、測定抗氧化活性之方法原理

抗氧化劑是能阻止或很大程度抑制易氧化物質氧化過程，能清除活性氧或者阻止活性氧生成的一類物質，在病理學和飲食中都起著不可或缺的作用。而一些人工合成的抗氧化劑有潛在的毒性，天然抗氧化劑越來越受到人們的重視。

抗氧化劑的抗氧化活性主要表現在抑制脂質氧化降解、清除自由基、抑制促氧化劑（如螯合過渡金屬）和還原能力等幾方面。現就較常用的一些方法進行簡單的介紹。

1. 還原力的測定

還原力的測定，實質上是檢驗物質是否為良好的電子供應者的過程。還原力強的物質供應的電子除可以還原氧化性物質外，也可與自由基反應，使自由基成為穩定的物質。

還原力測定源於 Oyaizu(1986) 之方法，以 $\text{Fe}_4(\text{Fe}(\text{CN})_6)$ 生成量作為指標。將 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 還原成 $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ，再利用 Fe^{2+} 形成 $\text{Fe}_4(\text{Fe}(\text{CN})_6)$ 。在 700 nm 吸光值反映 $\text{Fe}_4(\text{Fe}(\text{CN})_6)$ 的生成量，吸光值越大，樣品還原力值越強，表示抗氧化效果越佳。Wang 等從煙葉中提取多酚(polyphenols)，以維生素E作對照，用此法測定了還原力。結果顯示，還原力對於同一物質只是劑量回應，加大濃度對回應性質沒有影響 (Wang *et al.*, 2008)。

2. 抗油脂過氧化 (Lipid peroxide) 法

生物體內細胞膜的流動性和滲透性由其磷脂等成分決定，過多的自由基攻擊，油脂過氧化會導致細胞死亡。因此，抗氧化劑對脂類氧化的抑制作用也顯得非常重要。Rathee 等用老鼠肝臟粒線體作為受質，利用一種

植物芽體 (nagkesar) 提取物抗脂質過氧化能力為： α -tocopherol > 水-乙醇萃取物 > 甲醇萃取物 (Rathee *et al.*, 2006)。

3.金屬螯合

Fenton之氧化原理：Fenton 氧化原理於 1894 年由 Fenton 氏提出 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 氧化機制，直至 1934 年由 Haber 及 Weiss 氏證實 Fenton 可用來氧化有機化合物(Carberry and Yang, 1994)。Fenton 法乃是過氧化氫與亞鐵離子於酸性條件下反應，衍生具強氧化能力的氫氧自由基($\text{OH}\cdot$)氧化有機物，亞鐵離子被氧化成三價鐵離子，故 Fenton 程序同時兼具氫氧自由基氧化與鐵鹽混凝雙重功能(Lidia *et al.*, 2001)，其反應機制如下所示：



由方程式(1)顯示，亞鐵離子被過氧化氫氧化成三價鐵並生成氫氧自由基($\text{OH}\cdot$)，亞鐵離子亦會與氫氧自由基產生如(2)式之反應，綜合(1)~(2)式可得到如(3)式之反應，氫氧自由基氧化能力強於過氧化氫，與過氧化氫反應產生水及 $\text{HO}_2\cdot$ ，其反應如(4)式，(5)式為三價鐵與 $\text{HO}_2\cdot$ 反應還原為亞鐵離子，若過氧化氫劑量足夠，則反應可循環不斷進行。

在 Fenton 反應之前，金屬螯合降低過渡金屬酵素的濃度，還原性樣

品與 H_2O_2 競爭，因而在抗氧化性能測定中顯得非常重要。Lopes 等在研究中發現，單寧酸的抗氧化能力與亞鐵離子濃度成反比，相對於 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 其抗氧化能力歸因於鐵的螯合 (Lopes *et al.*, 1999)。

4. 自由基清除

自由基是含有未成對電子的原子、原子團或分子。活性氧如超氧陰離子、羥基自由基和過氧化氫由正常的生理過程和各種外在因素造成。它們一旦產生，就會引發油脂過氧化，與人體很多疾病相關。自由基損傷生物大分子，是造成衰老的主因。因此，自由基清除能力的測定對生物研究非常重要。

4.1 DPPH $\cdot$ (α,α -diphenyl- β -picrylhydrazyl) 和 ABTS $^{+}\cdot$ (2,2'-azino-bis-[3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid]) 清除

大部分自由基性質活潑，壽命非常短，但 DPPH $\cdot$ 和 ABTS $^{+}\cdot$ 例外，是兩種穩定的自由基。DPPH $\cdot$ 乙醇溶液呈深紫色，在 517 nm 處有一強吸收。若有單電子配對，則吸收消失，其褪色程度與接受的電子數成定量關係，因而可用分光光度法進行定量分析。Rathee 等用 DPPH 法測 nagkesar 的甲醇萃取物和水-乙醇萃取物的抗氧化性，結果顯示甲醇萃取物的清除能力 ($\text{IC}_{50} 8.33 \pm 0.391 \text{ g/ml}$) 優於水-乙醇萃取物的清除能力 (Rathee *et al.*, 2006)。

而 ABTS 能被各種氧化劑生成藍綠色的自由基陽離子，而抗氧化劑的存在又可使 ABTS $^{+}\cdot$ 還原，顏色褪去。特徵吸收峰下波長比對，清除能力用 TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity, trolox 當量抗氧化能力) 表示。Mathew 等用過硫酸鉀氧化羥自由基，測玉桂葉對 ABTS $^{+}\cdot$ 的

清除能力，得沒食子酸> 抗壞血酸> BHT> 玉桂葉(Mathew *et al.*, 2006)。

4.2 羥自由基($\text{OH}\cdot$)的清除

$\text{OH}\cdot$ 是體內最活潑的活性氧，也是已知的對生物分子破壞能力最強的自由基之一(Mathew and Abraham, 2006)。

4.2.1 去氧核糖法

利用 Fe^{3+} -EDTA-VitC- H_2O_2 體系產生 $\text{OH}\cdot$ ，然後去氧核糖受 $\text{OH}\cdot$ 攻擊裂解，產物在加熱、酸性條件下與硫代巴比妥酸(thiobarbituric Acid -TBA)回應生成一粉紅色化合物。因而樣品對去氧核糖裂解的抑制作用就很好的展現了其抗氧化性。

反應過程為：



Rathee 等用此法對 nagkesar 進行抗氧化研究發現，其甲醇萃取物和水-乙醇萃取物均對去氧核糖裂解的抑制作用很明顯，其中若不加引發劑抗壞血酸則幾乎沒什麼效果(Rathee *et al.*, 2006)。

4.2.2 $\text{Fe}(\text{phen})_3$ 法

此法是利用 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 透過 Fenton 反應產生 $\text{OH}\cdot$ ， $\text{Fe}^{2+}(\text{phen})_3$ (phen = 1,10-phenanthroline) 溶液被 $\text{OH}\cdot$ 氧化成 $\text{Fe}^{3+}(\text{phen})_3$ 。° $\text{Fe}^{2+}(\text{phen})_3$ (橙紅色) 的褪色程度可用來衡量 $\text{OH}\cdot$ 的清除量。金鳴等建立了此法，並用此法證明甘露醇、抗壞血酸和硫脲清除 $\text{OH}\cdot$ 作用呈良好量效關係(金 1996)。

4.3 超氧陰離子($O_2^{\cdot -}$)清除

4.3.1 NBT (nitroblue tetrazolium) 法

xanthine-xanthine oxidase 體系產 $O_2^{\cdot -}$ ，NBT 被 $O_2^{\cdot -}$ 還原成藍紫色 formazane。比色 formazane 即間接測定 $O_2^{\cdot -}$ 。Sakanaka 等用此法對幾種醋進行抗氧化性測定，它們都有 $O_2^{\cdot -}$ 清除能力，且柿子醋和米醋的清除能力比加工過的米醋和蘋果醋的要高(Sakanaka and Ishihar, 2008)。

4.3.2 APS(ammonium persulfate)/TEMED(tetramethylethylenediamine)法

此法是透過過硫酸銨/TEMED 體系產生氧自由基，然後可採用不同的方法測定。反應機轉為 $O_2^{\cdot -}$ 與羥胺溶液反應生成 $NO_2^{\cdot -}$ ， $NO_2^{\cdot -}$ 經對氨基苯磺酸和 α -naphthylamine 顯色在 530 nm 附近有特徵吸收峰，透過檢測 $NO_2^{\cdot -}$ 間接檢測 $O_2^{\cdot -}$ 。此法由蕭華山等建立，並驗證了抗壞血酸對 $O_2^{\cdot -}$ 的清除作用呈明顯量效關係(蕭 1999)。

4.3.3 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)測定法

MTT 在鹼性條件下自動氧化，不斷釋放出 $O_2^{\cdot -}$ ， $O_2^{\cdot -}$ 又可進一步促進自身氧化。在 MTT 自氧化 30~40s 後，中間物累積濃度與時間呈線性關係，一般線性時間可維持 4 min 左右，可求得自身氧化速率來顯示 $O_2^{\cdot -}$ 的清除能力(鐘 2004)。

四、自由基的型式

自由基與活性氧的來源廣泛，分為內在與外在兩大來源，內在生理效應產生自由基的途徑為 O_2 自粒線體電子傳遞鏈、細胞色素P-450 (cytochrome P-450) 的解毒反應、過氧化體 (peroxisome) 代謝反應等系統中，連續接受 4 個電子和 4 個氫原子還原成水。在此過程中經由電子轉移會依序產生 $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 和 $OH^{\cdot}$ (Imlay and Fridovich, 1991)；另 ROS (reactive oxygen species) 亦會經由許多生理作用產生，包括吞噬作用 (phagocytosis)、訊息傳遞 (signal transduction) 與細胞凋亡 (apoptosis) 等 (Moncada and Higgs, 1991)。外在環境來源則包括：空氣污染物、高氧環境、離子化輻射、化學藥劑如四氯化碳、農藥或防腐劑等均會產生自由基，引起中毒或慢性病。活性氧的種類包括：

1. 超氧陰離子自由基 (superoxide anion radical)

以 $O_2^{\cdot-}$ 表示，為體內最先產生的自由基，可再轉變為 H_2O_2 、 $OH^{\cdot}$ 等，是由體內吞噬細胞 (phagocyte) 及粒線體中的電子傳遞鏈產生。當吞噬細胞遇到外來物質時，即產生 $O_2^{\cdot-}$ ，以抵抗外來的入侵者；而粒線體為人體製造能量的場所，經過電子傳遞鏈產生 ATP 以供身體所需，但是電子傳遞鏈產能的步驟會產生 $O_2^{\cdot-}$ ，若產生過多，將對人體細胞造成傷害，引發疾病 (丁 1996；增山 1997)。

2. 過氧化氫 (hydrogen peroxide, H_2O_2)

由 $O_2^{\cdot-}$ 轉變而來，或吞噬細胞的吞噬作用及其他氧化還原循環中產生。 H_2O_2 本身雖比其他的自由基穩定，但對細胞的傷害較大，主要是因

為 H_2O_2 可以通過細胞膜，和體內運轉中的鐵或銅發生費敦反應 (Fenton reaction)，因而產生 $\text{OH}\cdot$ (丁 1996；增山 1997)。

3. 氫氧自由基 (hydroxyl radical)

以 $\text{OH}\cdot$ 表示，由前述的自由基轉變而來，或過多 X-ray 及日光的照射均會在體內產生。 $\text{OH}\cdot$ 是破壞力最強的自由基，造成體內脂質過氧化。一個 $\text{OH}\cdot$ 與不飽和脂肪酸產生過氧化反應，因連鎖反應而造成上百個不飽和脂肪酸的氧化，使體內的細胞膜遭到破壞。 $\text{OH}\cdot$ 與體內醣類、胺基酸、磷脂質、核醣體、有機酸等任何物質反應，造成細胞死亡或突變，使得組織不能發揮應有的功用，而產生疾病 (丁 1996；增山 1997；Halliwell and Cuttidge, 1986)。

4. 單線態氧 (singlet oxygen)

以 $^1\text{O}_2$ 表示，是由一般的三線態氧經紫外線的照射，使得電子軌域的電子由基態 (ground state) 轉變到激發態 (excited state)，而單線態氧比三線態氧每莫耳高出 22 Kcal 的能量，故單線態氧的活性非常高，比一般氧氣的反應力更強，也較不穩定 (丁 1996；增山 1997)。

5. 過氧化脂質 (lipid hydroperoxide)

脂質和脂蛋白的不飽和脂肪酸對自由基引起的氧化特別敏感，因不飽和脂肪酸具有特殊之化學結構，烯丙基的 (allylic) 雙鍵以 CH_2 基分開，導致 CH_2 基上的氫易受自由基的攻擊而生成碳中心自由基，再與基態氧分子結合形成過氧化自由基與脂質過氧化物。不飽和脂質氧化成帶有不成對電子的脂質，而一連串連鎖反應，造成更多的脂質被破壞 (增山 1997；

Giese 1996)。另有研究顯示，脂質過氧化物和活性氧在許多癌症及促進老化的發展上相當重要，脂質氧化的二級產物，如丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 是相當具有活性的，易與生物體的蛋白質、胺基酸、DNA 反應，和老化、致突變性 (mutagenesis) 和致癌性 (carcinogenesis) 等皆有關連 (Tamura *et al.*, 1991; Wang and Liehr, 1995; Hamilton *et al.*, 1997)。

五、氧自由基對生物體內所造成之危害

人體內以活性氧之自由基最為重要，活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 形成有許多來源，如：黃嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase); (Kukreja and Hess, 1992)、活化之吞噬細胞 (Weiss 1989)、粒線體 (mitochondria) (Luft 1994)、溶酵素體 (peroxisome) (Kasai *et al.*, 1989)、內質網或微粒體之電子傳遞系統的 cytochrome P450 oxidase 及 reductase (Bachur *et al.*, 1979)、epinephrine 與 dopamine 之自身氧化作用 (autooxidation) 相伴引起氧化還原循環作用 (redox cycling) 均會產生活性氧 (Ames *et al.*, 1993; Dix and Aikens 1993)。一般經呼吸進入體內的氧氣約有 1-3% 的活性氧，包括過氧化脂質 (LOO·) 與活性氧。環境中的自由基主要來自離子輻射、空氣污染、紫外線照射、抽菸、生理與心理的壓力及暴露於化學物質等 (Schechter 1996)。生物體中具有許多防禦系統來控制過氧化作用，但若吸收或體內的活性氧與自由基過多時，體內的抗氧化系統無法維持在一個平衡狀態。超氧自由基在酸的環境下，易質子化形成過氧化氫活性氧 (H_2O_2) 或在含有大量一氧化氮 ($NO\cdot$)，

在環境中易與 $\text{NO} \cdot$ 形成peroxynitrite(ONOO^-)，此物氫基化裂解會放出 $\text{HO} \cdot$ ，造成周圍生物分子損傷 (Halliwell and Gutteridge, 1990)。因有不成對電子的存在，賦予自由基極不穩定的特性而具有強化學反應性，易與細胞產生一連串的化學反應，造成脂質氧化性傷害 (Halliwell and Gutteridge, 1990)、蛋白質氧化性傷害 (Stadtman 1992)、核酸氧化性傷害 (Janssen *et al.*, 1993)、醣類氧化性傷害 (Woff and Dean, 1987)。

此外，隨著年齡的增長，抗氧化防禦系統亦會降低，導致體內抗氧化還原失調，引起許多病變。增山(1997)指出，促使脂質過氧化的自由基以及經由脂質過氧化產生的自由基，不僅會攻擊細胞膜、細胞組成物而且危害細胞核內的細胞物質，最後導致細胞死亡及致癌性，此與許多疾病的發展有重要的相關性。目前已知和自由基有關的疾病包括心臟循環系統以及發生在肺臟、腎臟、紅血球、消化系統、腦、眼球、皮膚、癌症所產生的疾病。最近亦發現人體的老化與體內自由基過多有關。體內活性氧或自由基的增加或抗氧化防禦能力的降低將導致氧化壓力 (oxidative stress)。氧化壓力可以說是疾病的第二性狀，也是疾病所導致的一個結果。氧化壓力與組織傷害互為因果關係，白血球在慢性發炎的部位產生過量的 $\text{O}_2^- \cdot$ 、 H_2O_2 及其他自由基會導致組織劇烈的傷害，此時若抗氧化系統無法提供適當的保護，將促使疾病的惡化。然而自由基在許多人類疾病上扮演的重要角色，適量的自由基在人體內有生理作用，若不正常過量的自由基或活性氧卻可直接或間接造成人類疾病，許多證據顯示自由基與人體病變有密切的關係，但自由基在人體的生理角色卻是非常重要的 (Sundaresan *et al.*, 1995)。

而陽明大學最新研究成果表示，以證實位在第四號染色體上的Cisd2基因可以控制哺乳類動物壽命並有效調控細胞老化，由於不論低等或高等

生物同樣皆具有 Cisd2 基因。研究顯示，剔除 Cisd2 基因的小黑鼠，在四到八週(約人類十五至二十五歲)後，不僅體型比同胎兄弟瘦小，還長出白毛、不停顫抖、喘不過氣；晚期眼睛凸出白濁、骨質疏鬆、駝背、皮膚鬆弛。研究的小黑鼠當中有 40% 在七個月死亡，比野生鼠平均能活兩年的生命週期，明顯短命許多。Cisd2 是影響粒線體結構完整的關鍵，粒線體是細胞製造能量的工廠，對肌肉和神經細胞尤其重要。一旦缺少 Cisd2 時，粒線體破損、功能失調，老化徵狀接踵而來，而使用抗氧化劑活化 Cisd2 的小黑鼠，代謝功能好，雄鼠還能在十二個月後罕見地讓雌鼠受孕，證實了抗氧化劑可調控生物體內的 Cisd2 基因，抑制氧化，並進一步達到防止老化，延長壽命的功效(Chen *et al.*, 2009)。

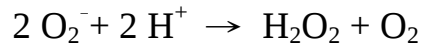
六、抗氧化劑之種類

可分為酵素型抗氧化劑與非酵素型抗氧化劑。

1. 酵素型抗氧化劑

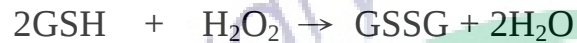
(1) 超氧歧化酵素 (superoxide dismutase, SOD) 於體內中以兩種型式存在，以銅/鋅為輔因子 (Cu, Zn/SOD) 存於細胞質中；或以錳為輔因子 (Mn/SOD) 存於粒腺體間質 (Kurechi *et al.*, 1980)。其反應為歧化反應 (dismutation reaction)，主要在清除超氧陰離子 ($O_2^{\cdot-}$)，產生的 H_2O_2 會被觸酶及麩胱甘肽過氧化酶代謝成 H_2O 。反應式如下：

SOD



(2) 麩胱甘肽過氧化酶 (glutathione peroxidase, GSHPx)

GPx 的反應中心為硒 (Se)，在體內負責清除 H_2O_2 ，藉催化還原態 glutathione (GSH) 將 H_2O_2 或 ROOH 還原成 H_2O 或 ROH，其反應式為 (Bondorden and Pariza, 1994)：



或

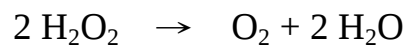


可降低細胞內氧化壓力的形成 (Halliwell 1994)，亦可避免紅血球受到 H_2O_2 的攻擊，抑制血紅素的鐵離子釋放。

(3) 觸酶(Catalase, CAT)

觸酶為存在於細胞膜內過氧化小體 (peroxisome) 中的含鐵酵素 (Meir *et al.*, 1995)，在細胞內會催化 H_2O_2 分解成 H_2O 及 O_2 ，其反應式(Bondorden and Pariza, 1994)：

Catalase



2. 非酵素型抗氧化劑

此類型的抗氧化劑，主要有天然抗氧化劑、人工抗氧化劑及其他。
其分類如下：

(1) 天然抗氧化劑

生物體中含有多種清除活性氧或自由基的抗氧化物質，包括維生素 E、維生素 C、類胡蘿蔔素、微量元素、類黃酮素、藻藍素及其他一些酚類物質，可當作還原劑、金屬螯合劑或活性氧清除劑而終止自由基引起的油脂過氧化反應。

A、維生素 E

維生素 E 化學名為：tocophero1，是一種脂溶性的抗氧化物，可以有效地抑制脂質過氧化作用，一般認為 d 型最具抗氧化性，抗氧化作用是發生在細胞膜或脂肪組織，主要是利用苯環上的羥基，使羥基的氫原子易被自由基奪走而成為 a-tocophero1 radical，此複合物穩定性高攻擊其他分子機率大幅降低(Sridevi *et al.*, 2007)。

B、維生素 C

維生素 C 是一種水溶性抗氧化劑又稱抗壞血酸。因抗壞血酸容易氧化，所以如有其它易氧化的化合物共同存在，抗壞血酸會先行貢獻自身之氫原子給對方而被氧化，因而保護其他化合物，其天然型式可當做還原劑或氧去除劑。抗壞血酸在人體內生化氧化過程中扮演輔助還原劑，會與亞硝酸鹽反應，避免亞硝酸鹽與體內蛋白質反應產生致癌性之亞硝胺化合物。流行病學的研究亦顯示多食用維生素 C 具有防癌效果 (Kitts 1997)。

C、類胡蘿蔔素

類胡蘿蔔素 (carotenoid) 是一種脂溶性、含 40 個碳之植物色素，可分為兩群：含 C 和 H 之胡蘿蔔素及含氧之胡蘿蔔素 (葉黃素) 做為抗氧化劑，類胡蘿蔔素可終止自由基的連鎖反應，它可與苯氧自由基作用終止自由基的連鎖反應，並與苯氧自由基作用而形成較安定的類胡蘿蔔素自由基，以防止蛋白質和 DNA 等之氧化變異(Toni *et al.*, 2008)。

D、葉綠素

葉綠素 (chlorophyll) 是植物體各器官含有之綠色色素，可吸收太陽能而進行光合作用，有四種型式：chlorophyll a, chlorophyll b, phenophytin a 及 phenophytin b。在黑暗條件下，其在甲基亞麻油酸中之抗氧化性大小依序為 chlorophyll a > chlorophyll b > phenophytin a > phenophytin b，且 chlorophyll a 之抗氧化性比 BHT(Butyl hydroxytoluene) 之效果還好(王 2002)；其抗氧化作用可能是藉由提供氫原子來清除過氧化自由基而抑制脂質氧化。

E、藻藍素 (C-phyococyanin, C-PC)

藻藍素是一種藻膽色素蛋白質 (phycobiliprotein)，為藍菌中主要成分。此一蛋白質色素已被證實具有抗癌、自由基清除、抗氧化及抗發炎的特性(廖 2006)，並於後詳述。

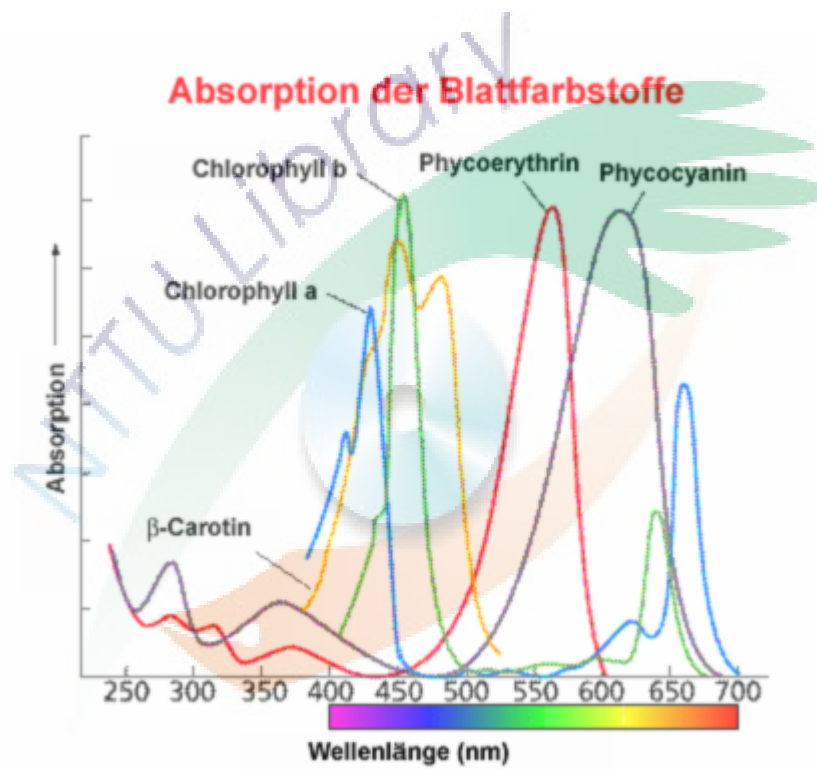
七、藻藍素

藻藍素 (C-phycocyanin, C-PC) 為藍菌中的主要成分之一，屬於光合作用色素 (photosynthetic pigment)，是一種可溶於水且具有螢光的藻膽色素蛋白質 (phycobiliprotein)。最大吸收波長 (absorbance maximum) 約為 615 ~ 620 nm (MacColl and Guard-Frair 1987; Bryant 1982)，最大螢光散射波長 (fluorescence emission maximum) 約為 637 ~ 650 nm (MacColl and Guard-Frair, 1987; Oi *et al.*, 1982) (圖八)。許多藍菌都含有 C-PC 的成分。

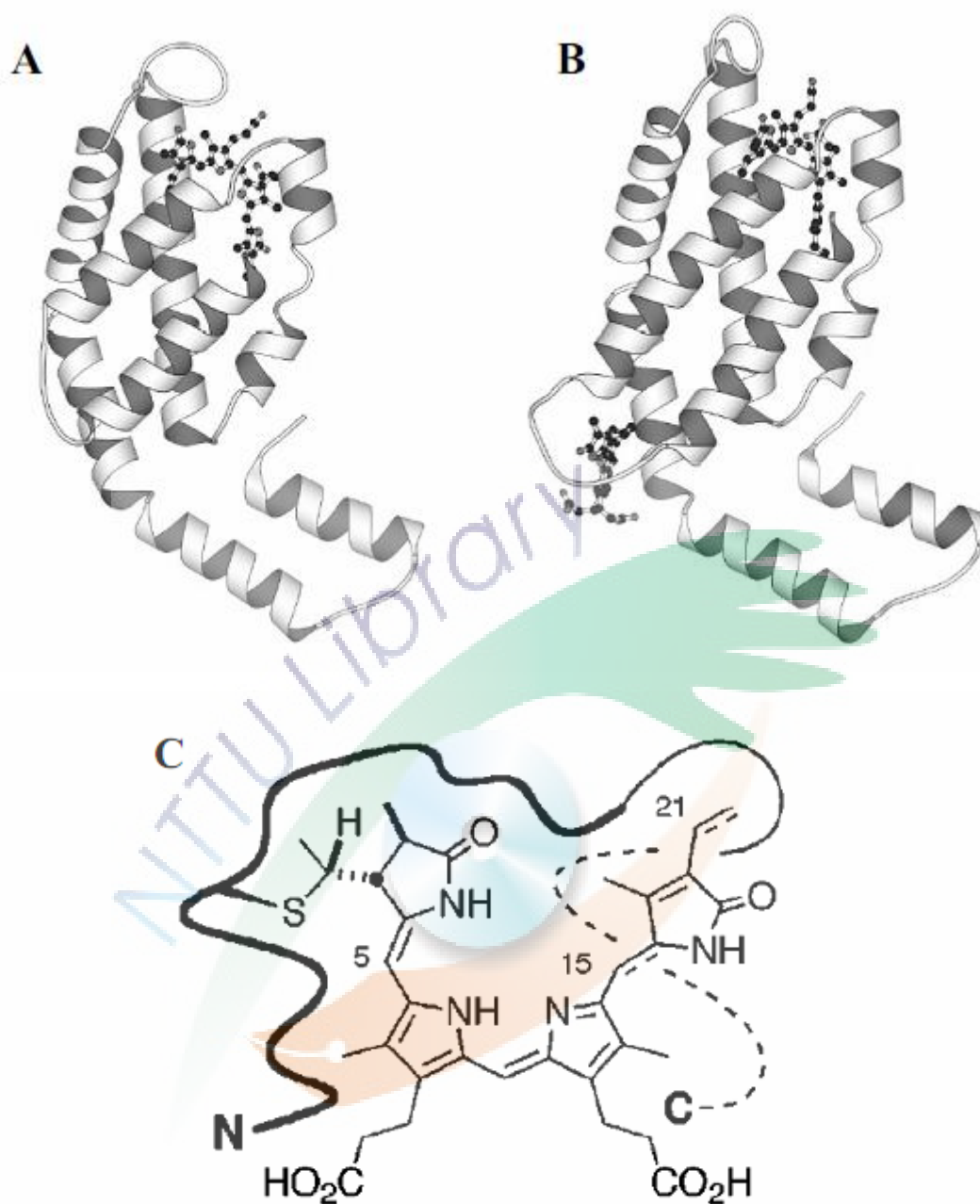
C-PC 單元體 ($\alpha\beta$ -monomer) 結構與葉綠素、血紅素類似，主要由兩個次單元 (subunit) 構成： α 次單元，約 15,900 ~ 18,500 daltons； β 次單元，約 18,300 ~ 20,000 daltons。一般 C-PC 單體會以 ($\alpha\beta$)₃-trimer 或 ($\alpha\beta$)₆-hexamer 的型式存在。每一個 C-PC 單元體中都含有三個發色基團 (chromophore)，一個位於 α 次單元 (α -84 position)，兩個位於 β 次單元 (β -84 和 β -155 positions) (Stec *et al.*, 1999)。此發色基團在藍菌中稱之為膽素 (bilin)，而位於 C-PC 單元體中的又稱之為 phycocyanobilin。其主要結構為 open chain linear tetrapyrrole，並利用 thioether bond 以共價鍵結的方式與各個 C-PC 次單元之輔基蛋白 (apoprotein) 上的半胱氨酸 (cysteine residue) 相連結 (Jacobi *et al.*, 2000; Padyana *et al.*, 2001) (圖九)，且其結構中並未螯合金屬元素 (Duerring *et al.*, 1991)。一般而言，C-PC 除了單獨存在於藍菌細胞內，也會和其他的藻膽色素蛋白質結合形成胞器 (organelle)，稱之為藻膽體 (phycobilisome) (Gantt and Conti 1965, 1966a, b; Gantt *et al.*, 1976)。藻膽體由兩個主要區域 (domain) 組成：一個核心區域 (core domain) 和多個桿

狀區域(rods domain)。核心區域含有異藻藍素 (allophycocyanin)，並且依附在類囊膜上；桿狀區域含有藻藍素和藻紅素 (phycoerythrin)，位於類囊膜的外側，而藻藍素則介於藻紅素及異藻藍素之間(圖六)。各區域內的藻膽色素蛋白質及各區域之間以多功能性聚胜肽 (polypeptide)，稱之為 linker，組織起來形成核心及桿狀區域並將兩個區域相互連接 (Tandeau de Marsac and Cohen-Bazire, 1977)。除此之外，linker 亦可將藻膽體固定依附在類囊膜上。





圖八.不同色素之吸收光譜。(source: www.egbeck.de)



圖九.藻藍素(C-phycocyanin, C-PC) (A) α -subunit 以及 (B) β -subunit
(C) 藻藍素發色團 Structure of open chain linear tetrapyrrole of
phycocyanobilin in C-phycocyanin. (Jacobi *et al.*, *J Org Chem.* 2000; 65:
8478-8489;Padyana *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 282: 893-898).

在藍菌中 C-PC 主要的功能是幫助葉綠素吸收來自外界的光能。藍菌一般都生長在水中，所以行光合作用需要的光線會被環境中的水所阻隔而改變波長並且影響了葉綠素吸收光能的效力。因此藍菌細胞就衍生出一套補救的機制，也就是利用藻膽色素蛋白來補強光能的吸收。以鞘絲藍菌為例，藻藍素（C-phycocyanin）位於細胞內類囊膜（thylakoid membrane）的外側幫助葉綠素a（chlorophyll a）吸收來自外界或上游光合色素傳遞下來的的光能，接著在將光能轉移到類囊膜內側的葉綠素。最後，葉綠素便藉由電子傳遞鏈的機轉將光能轉換成化學能以進行光合作用。

八、藻藍素的生理功效

由於 C-PC 屬於天然色素，使用在日常生活中已有多年的歷史。在日本、泰國及中國大陸就有將 C-PC 使用在食品（如：口香糖、乳製品、果凍等）及化妝品（如：口紅、眼線膏）中當作著色劑的例子（Sarada *et al.*, 1999）。另外，C-PC 也有發展為螢光探針（phycofluor probes）應用在免疫診斷（immunodiagnosics）上的例子（Kronik *et al.*, 1983）。除此日常生活與技術上的應用，亦有文獻及研究報告指出 C-PC 具有許多醫療上的功效(廖 2006)。

目前已知藻藍素具有抗氧化能力（Romay and Gonzalez, 2000），能清除活性氧自由基（Romay *et al.*, 1998a; Romay *et al.*, 2001），亦能抑制四氯化碳和 Fe^{2+} -ascorbic acid 所引起的粒腺體脂質過氧化（Bhat and Madyastha, 2000）。對 carrageenan 誘導之老鼠足蹠浮腫和花生四烯酸誘導老鼠耳朵發炎反應下，藻藍素具有抗發炎的效果（Romay *et al.*, 1998b;

Romay *et al.*, 2001)，其透過的可能作用機轉為清除氧自由基，抑制 cyclooxygenase-2 (COX-2) 的表現 (Reddy *et al.*, 2000)，並進一步抑制 Prostaglandin E2 (PGE2)及Leukotriene B4 (LTB4)的生成(Romay *et al.*, 2000) 和降低 myeloperoxidase (MPO) 的活性等。藻藍素也會抑制經由 Lipopolysaccharide (LPS) 感染的小鼠血清中發炎性 tumour necrosis factor- α (TNF- α) 的含量 (Romay *et al.*, 2001)。



參、實驗流程



肆、材料與方法

一、實驗材料

試藥

品名	廠商
Bradford reagent、Protein marker	Bio-Rad Laboratories
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma
Disodium hydrogen phosphate(Na_2HPO_4)	Shimakyu
Dulbecco's modified eagle medium(DMEM)	GIBCO
Methanol	Shimakyu
Fetal bovine serum(FBS)	GIBCO
Hydrogen peroxide(H_2O_2)	誠意興
Ampicillin + Streptomycin (AS)	GIBCO
Potassium dihydrogenphosphate (KH_2PO_4)	Shimakyu
Phycocyanin	Sigma
Sodium carbonate anhydrous(Na_2CO_3)	Shimakyu
Sodium Dihydrogenphosphate(NaH_2PO_4)	Shimakyu
Sodium dodecyl sulfate(SDS)	Sigma
Sodium bicarbonate(NaHCO_3)	Sigma
Sodium pyruvate	Sigma
Trypsin	Biowest
Trypsin-EDTA	Biowest
Coomassie blue R250	Merck

二、實驗儀器

分光光度計 (UV-160A, Shimadzu, Tokyo, Japan; Shimadzu)

恆溫振盪培養箱 (S300R, Firstek)

高速離心機 (Himac CR 21, Hitachi, Tokyo, Japan; Hitachi)

蛋白質電泳槽 (Bio-Rad Laboratories)

直立式顯微鏡 (Nikon YS100)

倒置式顯微鏡 (Nikon eclipse TS100)

細胞培養箱 (Nuair US autoflow CO₂ water-Jacketed incubator)

光合作用培養箱 (Firstek Model-TG5)

冷凍乾燥機 (Kingmech FD3-12P)

三、藍菌純化與培養方法(李 2005)

3.1 培養基配製：

培養基方面，採用淡水藍菌培養基培養，此種培養基材料取得容易，製作時不麻煩且較為廉價，保存時間久，對一般藍菌生長效果良好等，故選之使用。

3.1.1 淡水藍菌培養基：

本實驗使用之培養基為 C-10 培養基 (附錄一)，將之配置好後，以每 L 中加入 1 ml 之比例加入微量元素 (附錄一)，再進行高溫高壓消毒，可於 4 °C 保存 3 個月；微量元素配置完成後，以 10 % NaOH 調整 pH 至 8.2，並定量分裝，高溫高壓滅菌後，可於 -20 °C 保存一年以上。

3.2 藍菌培養

3.2.1 實驗室培養：

實驗室中以固態以及小量液態培養為主，固態培養可用於純化藍菌，而液態培養可用於將純化後的藍菌大量增殖。

3.2.1.1 固態培養基培養法：

培養藍菌時將 C-10 培養基加入 1.5 % 的 agar，配製好後，以 autoclave 進行高溫高壓滅菌， 121°C 、15min，待其滅菌完成後，冷卻倒入培養皿中，配製好的培養基作為純化藍菌使用。

接種菌原，取菌種 100 μl ，用平面培養基以 L 型玻棒沾酒精後過火消毒，待冷卻後將菌種均勻塗布於培養基上，接種完成後將培養基倒放置入光合作用培養箱，光源採用日光燈，因日光燈的光波波長多在藍菌的各種色素吸收範圍內。

3.2.1.2 液態培養基培養法（小量培養）：

將固態培養基生長一定數量之鞘絲藍菌，取些許樣本於顯微鏡下觀察是否為預期菌種以及純度，若菌種純度夠且為預期的鞘絲藍菌，即可於無菌操作台中以圓形接種環將固態培養基上的鞘絲藍菌刮下並接種菌原至內含已配置好且滅菌消毒之液態 C-10 培養基之三角錐形瓶中（500 ml 錐形瓶盛 150 ~ 250 ml；1000 ml 錐形瓶盛 300 ~ 500 ml，即培養液約錐形瓶標式容量之 30 % ~ 50 %），接種完瓶口塞以棉花以便通氣，再放置到光合作用培養箱（培養箱需具有震盪裝置，震盪之轉速約為 100 rpm / min）。光線強度，以一般日光燈照明，光線強度為 500-2000 lux。於室溫下震盪培養，使其生長約一至二個月，待其生長數量足夠，即可進行下一步實驗。

3.2.1.3 大量培養：

若將純菌分離出之後，可先增量，再移至大型培養槽中培養大量，小型增量之方式：

膠桶打氧式：準備 20 L 透明塑膠方桶，於內倒入培養液，再加入已純化出之藍菌（最終濃度為 2g[紗布過濾濕重]/L 以上），並以小馬達打空氣（使水流動並使空氣中 CO_2 進入水中），並以 300 lux 燈光照之長期培養。若欲其快速生長可使用 1500 lux 燈光。

3.3 藍菌純化

取欲純化之藍菌菌種，以前述之 L 型玻棒於固態平面培養基塗勻，待其菌群生長之後，以燒紅消毒之無菌接種環，取出小量於培養液中稀釋，再塗於平面固態培養基，如此反覆數次，可得到較純之藍菌菌群。

3.4 藍菌保存

藍菌的保存，可將液態培養基培養之菌體，先離心濃縮，再加入總體積 10 % 的抗凍劑 DMSO (dimethyl sulfoxide) 或 15 % 的甘油 (glycerol)，裝入冷凍保存細胞用的冷凍小管中 (plastic ampule)，再保存於液態氮中 (-196°C)；另外亦可保存於 -70°C ，但需注意，無論保存在 -70°C 或 -196°C ，均得逐漸降溫，先將冷凍小管置於 4°C 、1 小時，再置 -20°C 、1 小時，再置入 -70°C 或 -196°C 長期保存，或用自動逐步降溫冷凍儀降溫後凍存。而前述之斜面固態培養法，待菌群生長好後，以蠟將蓋口封緊，置光合作用培養箱，並將照度減低為正常培養的 1/2，約能保存 3 個月以上。

四、藻藍素分離前處理

藻藍素分離的前處理步驟有許多方式，首先必須打破藍菌細胞，再進行藻藍素的萃取，打破藍菌細胞有幾種主要方式：以高壓破碎裝置(French Press)將細胞打破(Tandeau and Cohen, 1977)；以十二烷基二甲基氧化胺(Lauryl Dimethyl Amine Oxide)處理(Barbara *et al.*, 1985)；日本學者也有人以超音波震碎的方式萃取(Takao *et al.*, 2003)；在Jayant的實驗中，則是先以高溫250°C將菌體乾燥並以磷酸緩衝液萃取(Jayant 2005)；而近幾年較為常見的方式是先以溫差反覆凍融造成細胞破裂，再以硫酸銨分餾、Sephadex G-150 進行大小排除層析法以及DEAE (diethylaminoethyl)纖維素進行離子交換層析法(Badrish *et al.*, 2006)；另外也有以溫度影響以及生物質量與溶劑比值(biomass-solvent ratio)，以不同條件來處理(Silveira *et al.*, 2007)；而在Priya的實驗中，以研鉢研磨的方式利用玻璃均質器均質後，再加入聚丙烯處理(Priya and Christopher, 2007)。

而本實驗則是選擇先以研鉢將藍菌磨碎後，離心取得深藍色的上清液，先進行冷凍乾燥，再以藻藍素不溶於甲醇之特性，進行後續純化的步驟。

4.1 冷凍乾燥法

取大量培養後的藍菌，以抽氣過濾法去除培養液並抽乾，將過濾抽乾後的藍菌秤乾重，再將乾燥後的藍菌置入研鉢，加入少量蒸餾水磨碎，將磨碎後的藍菌，倒入離心管中，離心(10000 rpm, 30 min)，離心之後取上清液置入新的離心管中，再冷凍乾燥濃縮成粉末。

4.2 膠體過濾層析法

取大量培養後的藍菌，連同培養液倒入離心管中離心（5000 rpm，10 min），倒掉上清液，取離心後的藍菌置入研鉢中加入適量蒸餾水磨碎，將磨碎後的藍菌，倒入離心管中，離心（10000 rpm，30 min），離心之後取長 30cm 內徑 1.5cm 內含 Silica gel (Merck silica gel 60) 之管柱並將上清液注入層析管柱。

五、藻藍素萃取條件方法開發

5.1 冷凍乾燥法

取前處理過後得到的乾燥藍菌粉末，加入甲醇萃取，震盪混勻，倒出萃取液留下沉澱物，再加入甲醇反復震盪萃取數次，最後離心（5000 rpm，10 min），倒出上清液，得到藍色沉澱物，再加入適量蒸餾水即可將之溶解，溶解之深藍色液體即為藻藍素水溶液。

5.2 膠體過濾層析法

取一 2.5 x 30 cm 的層析管柱，內填充矽膠（Merck silica gel 60），約管柱的 2/3 高，將管柱裝置好，以滴管沿管壁緩緩加入前處理好的藍菌上清液，待其與矽膠作用約 10 分鐘之後，利用中壓層析儀分離，分離條件移動相使用分析級的甲醇，流速設定為 10 ml/min，將藻紅素、藻膽蛋白等物質透過甲醇分離出，藻藍素則留於矽膠層中，待沖提結束後，以刮勺將矽膠取出，置入三角錐型瓶中，加入適量蒸餾水與矽膠混勻，並以

超音波震盪機震盪分離，藻藍素即可與矽膠分離溶於蒸餾水中，反覆加入蒸餾水混勻震盪，收集藻藍素溶液，收集後的藻藍素溶液以濾紙過濾除去矽膠殘渣，再將過濾後的藻藍素溶液，進行冷凍乾燥，即可得到藻藍素粉末。

六、藻藍素特性分析

6.1 藻藍素定量分析

6.1.1 蛋白質定量 (Bradford 1976)

蛋白質標準品檢量線製作：

以 Bradford 方法，以胎牛血清白蛋白 (bovine serum albumin; BSA) 為蛋白質標準品，精確稱量 50 mg，用二次水 1 mL 溶解後，稀釋成一系列濃度 (500 µg/mL、400 µg/mL、300 µg/mL、200 µg/mL、100 µg/mL)，取 20 µL 的蛋白質樣品與 1 mL 的 Bradford 染劑(稀釋 5 倍)，混勻 5 分鐘後，放入分光光度計 590 nm 測定其吸光值平均值，依並 OD value (Y) 對蛋白濃度 µg/mL (X)，求出趨勢線方程式 $y = 0.359x + 0.0751$ $R^2 = 0.9992$ 。

樣品蛋白質定量：

取 20 µL 的蛋白質樣品與 1 mL 的 Bradford 染劑 (稀釋 5 倍)，混勻 5 分鐘後，放入分光光度計 590 nm 測定其吸光值平均值，利用檢量線公式則可求得實際蛋白質樣品濃度。

6.1.2 吸收光譜分析

將藻藍素標準品以磷酸緩衝液稀釋成終濃度 100, 200, 500, 700, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 之溶液，並將藻藍素樣品稀釋 5 倍後，測定標準品及樣品在 620 nm 處之吸光值，作出標準曲線後即可求出樣品中之藻藍素濃度。

6.2 藻藍素定性分析

6.2.1 分子量鑑定

本實驗採用 SDS 聚丙烯胺膠體電泳 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) 之方法分析。利用 bio-rad SDS-PAGE 標準品進行分子量估算，膠片採用 Bio-rad Ready gels 4-20% Tris-HCl。

6.2.1.1 電泳

將藻藍素標準品 (C-phycocyanin, Sigma P-2172) 及藻藍素樣品約 10 μl 和 10 μl 之 sample buffer 均勻混和後，置於沸水中五分鐘，再注入膠體中。電泳分析所使用的緩衝溶液為 SDS-PAGE running buffer。以 80 V 設定使樣品移動至堆積凝膠及分離凝膠之界面後，同樣以 120 V 使樣品移動至分離凝膠末端時，即可取下分離凝膠進行染色。

6.2.1.2 染色及退染

將分離凝膠取下後，放入塑膠盒中。先倒入適量 SDS-PAGE 染劑 (Coomassie blue)，於震盪器上搖晃 30 分鐘進行染色，之後將染劑倒掉，再以適量退染液 (destain solution)，進行退染，將其置於震

盪器上搖動至藍色背景退去後將分離凝膠保存。

6.2.2 光譜特性分析

將藻藍素標準品與樣品以磷酸緩衝液稀釋至濃度為 100 µg/ml，測定其在波長 250-700 nm 之吸收，並與標準品之最大吸收波長比對。

七、藻藍素對細胞抗氧化能力分析

本實驗利用 Vero cell：非洲綠猴腎臟上皮正常細胞 (African green monkey kidney) 來探討藻藍素對細胞抗氧化能力的影響，Vero cell 生長快速且易於培養，為藥理實驗上常用之細胞株，故選其使用。

7.1 細胞來源

本實驗室所採用之細胞株購自食品工業發展研究所，BCRC 60013 (BCRC Number：60013)。

7.2 細胞培養

7.2.1 製備培養基

Vero 細胞培養基為 MEM (Minimum Essential Medium)，不含 L-glutamine、sodium pyruvate，購自 Sigma 公司。將 MEM (10g) 溶於 900 ml 的蒸餾水，攪拌均勻後加入 1.5g Na_2HCO_3 以及 1g sodium pyruvate 混勻，然後用 1N HCl 滴定至 pH 7.3~7.4，在無菌操作台內用 0.22 µm 過濾膜無菌過濾，平均分裝到 2 個 500 ml 血清瓶，每

500 ml 培養基再加入 200 mM L-glutamine 2.5 ml，取 5 ml 於細胞培養箱做空白測試，24小時若無污染再將 Fetal bovine serum 加入 MEM 中佔總體積的 10%，存於4℃，要使用之前再加入抗生素 Ampicillin 50 µg/ml 以及 streptomycin 30 µg/ml。

7.2.2 冷凍細胞活化

冷凍細胞之活化原則為37°C快速解凍，以避免冰晶對細胞造成傷害。細胞活化後，約需數日，或繼代一至二代，其細胞生長或特性表現才會恢復正常。

將新鮮培養基置於 37°C 水槽中預熱，以 70% ethanol 擦拭外部，移入無菌操作台內。自液態氮容器中取出冷凍管，立即放入 37°C 水槽中快速解凍，輕搖冷凍管使其在1~2分鐘內全部融化，以70% ethanol 擦拭保存管外部，移入無菌操作台內。於無菌操作台內取適量培養基加入細胞培養皿中，緩慢加入已解凍之細胞懸浮液，一般稀釋比例為 1:10~1:15，與培養基混合均勻後，放入培養箱培養。可另取樣少許解凍細胞懸浮液作存活測試。解凍後是否立即去除冷凍保護劑 Dimethyl sulfoxide (DMSO)，依細胞種類而異。本實驗之細胞株，不需要立即去除冷凍保護劑，待第二天確定細胞生長或貼附良好後再去除即可。惟極少數因對 DMSO 敏感或會造成細胞分化之細胞，需立即去除 DMSO，若要立即去除，則將解凍之細胞懸浮液加入含有 5~10ml 培養基之離心管內，離心 1000 rpm、5 分鐘後，移去上清液，加入新鮮培養基，混合均勻，放入培養瓶內，置於適當之培養箱培養。若不需立即去除冷凍保存劑，則在解凍培養隔日後更換培養基即可。

7.2.3 細胞繼代培養

細胞生長至高密度時，即須收集細胞，分殖至新的培養皿中，其稀釋比例 1:2 或 1:6。收集細胞方法係用 trypsin-EDTA 及離心處理。Trypsin-EDTA 為收集吸附型細胞常用之方法。Trypsin 為胰蛋白酶，其作用為分解細胞與盤底之附著蛋白，EDTA 其作用為去除 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等離子，trypsin 與 EDTA 二者共同作用，可使附著之細胞自盤壁脫落。Trypsin-EDTA 作用時間勿太久，否則可能對細胞造成傷害或死亡。敲拍培養瓶不可太過猛烈，避免對細胞造成傷害或造成培養瓶裂痕而污染。每一種細胞在繼代培養時，都須先測試 trypsin 對細胞的影響，假如可以只用 trypsin 就可使附著之細胞自盤壁脫落，就不需要用 Trypsin-EDTA，避免對細胞傷害過大。

首先吸除舊培養液，用 PBS 洗滌細胞一至二次，再加入 trypsin-EDTA 2~3 ml，移至細胞培養箱，待數分鐘後細胞自盤底脫落後，加入適量含血清之新鮮培養基，以終止 trypsin 作用，因血清中含有 trypsin inhibitor，可以終止 trypsin 作用，離心後去除上清液，移至新的培養盤中，依正常條件繼續培養之。

7.2.4 細胞計數方法

計算細胞數目用紅血球計數盤，血球計數盤有二個 chamber，每個 chamber 中細刻 9 個 1 mm^2 之大正方形，其中位於 4 個角落之正方形再細刻 16 個小格，深度均為 0.1 mm。當 chamber 上方蓋上蓋玻片後，每個大正方形之體積為 $1 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm} = 1.0 \times 10^{-4} \text{ ml}$ 。使用時，計數每個大正方形內之細胞數目，乘以稀釋倍數，再乘以 10^4 ，即為每 ml 中之細胞數目。利用染劑 (例如 trypan blue) 會滲入死細

胞中而呈色，而活細胞因細胞膜完整，染劑無法滲入而不會呈色。取 20 μl 細胞懸浮液與 20 μl trypan blue 等體積混合均勻。取少許混合液 (約10 μl) 自紅血球計數盤 chamber 上方凹槽加入，蓋上蓋玻片，於 100 倍倒立顯微鏡下觀察，活細胞不染色，死細胞則為藍色。計數五個大方格之細胞總數，再除 5，乘以稀釋倍數，最後乘以 10^4 ，即為每毫升中細胞懸浮液之細胞數。

細胞存活率的算法公式如下：

$$\text{細胞存活率}\% = \frac{\text{活細胞數}}{(\text{活細胞數} + \text{死細胞數})} \times 100\%$$

7.3 過氧化氫誘導細胞氧化模型的建立

將繼代二次以後的細胞，吸除培養皿中原細胞培養液，用 PBS 洗滌細胞一至二次，再加入 trypsin-EDTA 2 ~ 3 ml，移至細胞培養箱，待數分鐘後細胞自盤底脫落後，移至 24 well 培養盤中培養，每 well 中細胞數為 1×10^5 以上，培養至隔日後，移除原培養液，加入含不同濃度的 H_2O_2 之 MEM 培養液， H_2O_2 濃度設定分別以 9%、7%、5%、3%、1%、0.5%、0.1%、0.08%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.025、0.0125%、0.00625%，於 37°C ，5% CO_2 條件下培養，培養12小時，每種濃度培養細胞進行4重複，觀察細胞在不同濃度之 H_2O_2 作用下的形態變化，測試細胞氧化誘導之 H_2O_2 最適濃度(可使細胞產生氧化壓力之最低濃度)。

7.4 藻藍素對過氧化氫誘導細胞氧化之影響

找到最適誘導細胞氧化條件後，參考(Liu *et al.*, 2008)分兩部份進行藻

藍素之抗氧化力測試實驗：首先準備兩盤 24 well 生長良好之 vero cell，每個 well 之細胞數為 1×10^5 以上，生長一天後將其中一盤細胞先以 H_2O_2 誘導為氧化態，濃度為氧化誘導最適濃度，培養後加入藻藍素 250 μl ，濃度為 10 mM，時間間隔為 4h、3h、2h、1h、30min，置入 $37^\circ C$ ，5% CO_2 條件下培養，培養 12 小時，各種濃度條件均4重複，觀察細胞形態變化；另一盤則先加入藻藍素共同培養，培養後加入 H_2O_2 ，時間間隔為 4h、3h、2h、1h、30min，濃度為氧化誘導最適濃度，置入 $37^\circ C$ ，5% CO_2 條件下培養，培養 12 小時，各種濃度條件均4重複，觀察細胞形態變化(Liu *et al.*, 2008)。

7.5 維生素 C 對過氧化氫誘導細胞氧化之影響

參考(Liu *et al.*, 2008)實驗分兩部份進行：首先準備兩盤 24 well 生長良好之 vero cell，每個 well 之細胞數為 1×10^5 以上，生長一天後將其中一盤細胞先以 H_2O_2 誘導為氧化態，濃度為氧化誘導最適濃度，培養後加入維生素C 250 μl ，濃度為 10 mM，時間間隔為 4h、3h、2h、1h、30min，置入 $37^\circ C$ ，5% CO_2 條件下培養，培養 12 小時，各種濃度條件均4重複，觀察細胞形態變化；另一盤則先加入維生素C 10 mM 共同培養，培養後加入 H_2O_2 ，時間間隔為 4h、3h、2h、1h、30min，置入 $37^\circ C$ ，5% CO_2 條件下培養，培養 12 小時，各種濃度條件均4重複，觀察細胞形態變化(Liu *et al.*, 2008)。

7.6 維生素 E 對過氧化氫誘導細胞氧化之影響

參考(Liu *et al.*, 2008)實驗分兩部份進行：首先準備兩盤 24 well 生長良好之 vero cell，每個 well 之細胞數為 1×10^5 以上，生長一天後將其

中一盤細胞先以 H_2O_2 誘導為氧化態，濃度為氧化誘導最適濃度，培養後加入維生素E 250 μl ，濃度為 10 mM，時間間隔為 4h、3h、2h、1h、30min，置入37°C，5% CO_2 條件下培養，培養 12 小時，各種濃度條件均 4 重複，觀察細胞形態變化；另一盤則先加入維生素E 10 mM 共同培養，培養後加入 H_2O_2 ，時間間隔為 4h、3h、2h、1h、30min，濃度為氧化誘導最適濃度，置入37°C，5% CO_2 條件下培養，培養 12 小時，各種濃度條件均 4 重複，觀察細胞形態變化(Liu *et al.*, 2008)。

7.7 β -carotene 對過氧化氫誘導細胞氧化之影響

參考(Liu *et al.*, 2008)實驗分兩部份進行：首先準備兩盤 24 well 生長良好之 vero cell，每個 well 之細胞數為 1×10^5 以上，生長一天後將其中一盤細胞先以 H_2O_2 誘導為氧化態，濃度為氧化誘導最適濃度，培養後加入 β -carotene，濃度為 10 mM，時間間隔為 4h、3h、2h、1h、30min，置入37°C，5% CO_2 條件下培養，培養 12 小時，各種濃度條件均 4 重複，觀察細胞形態變化；另一盤則先加入 β -carotene 10 mM 共同培養，培養後加入 H_2O_2 ，時間間隔為 4h、3h、2h、1h、30min，濃度為氧化誘導最適濃度，置入37°C，5% CO_2 條件下培養，培養 12 小時，各種濃度條件均 4 重複，觀察細胞形態變化(Liu *et al.*, 2008)。

7.8 藻藍素抗氧化能力分析

將藻藍素、維生素C、維生素E、 β -carotene 處理過的細胞，置於倒置式顯微鏡觀察細胞形態變化，加入抗氧化劑與過氧化氫後過 4 小時拍照，觀察抗氧化劑與過氧化氫對細胞在 4 小時內的影響；而後將各實驗組與對照組培養12小時後，再分別拍照觀察，比較藻藍素處理之細胞與其

他抗氧化劑處理過之細胞形態，以受氧化攻擊之傷害情形與抗氧化劑抑制氧化攻擊之情形分析相較於其他抗氧化劑結果之優劣程度。



伍、結果與討論

一、藍菌培養

藍菌生長較一般細菌慢，一般藍菌增殖期多在 12 hr 以上，看其吸收養分速度的快慢，細胞越小，生長越快，單細胞狀快過纖維狀，因面積對體積比相對較大。本實驗取 *Lyngbya* sp. 先以固態培養基小量純化，純化後再以液態培養基進行大量培養，再進行藻藍素的萃取。

1.1 固態培養小量純化

固態培養用含有 1.5 % agar 的 C-10 培養基 (agar plate)，平面培養基使用前三日預備，倒放置於無菌操作台內，避免表面潮濕。由於藍菌一般培養時間較長，至少約 10 ~ 14 天，接種菌原後，放入光合作用培養箱中約一至二週即可看見菌體生長 (圖十)，經顯微鏡觀察後，確認其為預期中之鞘絲藍菌 *Lyngbya* sp. (圖十一)。

1.2 液態小量培養

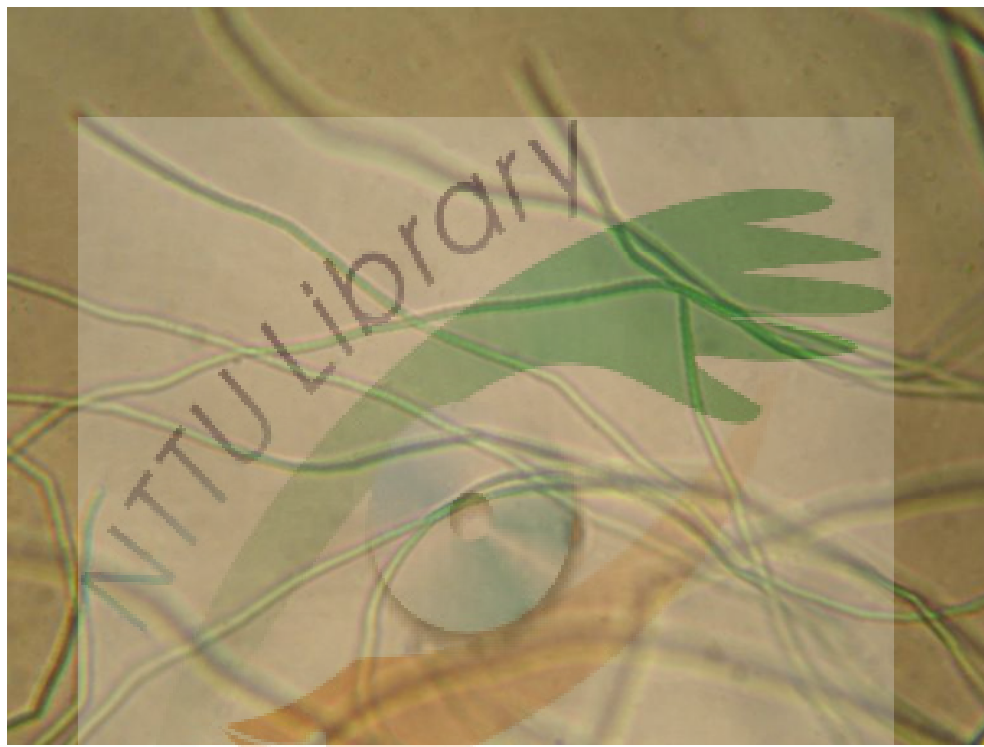
取固態培養基純化後之菌體，以無菌白金耳刮下後置入小量液態培養基中培養，室溫下震盪培養並照光，約一個月後，即可得到長滿的 *Lyngbya* sp. (圖十二)。

1.3 液態大量培養

小量培養後之藍菌，可移至較大型的培養槽中進行大量增殖培養，利用 20 L 的方型培養槽，以打氣方式取代震盪培養，可移至室外以日光照射，室溫下大量培養，培養時間約一個半月至二個月 (圖十三)。



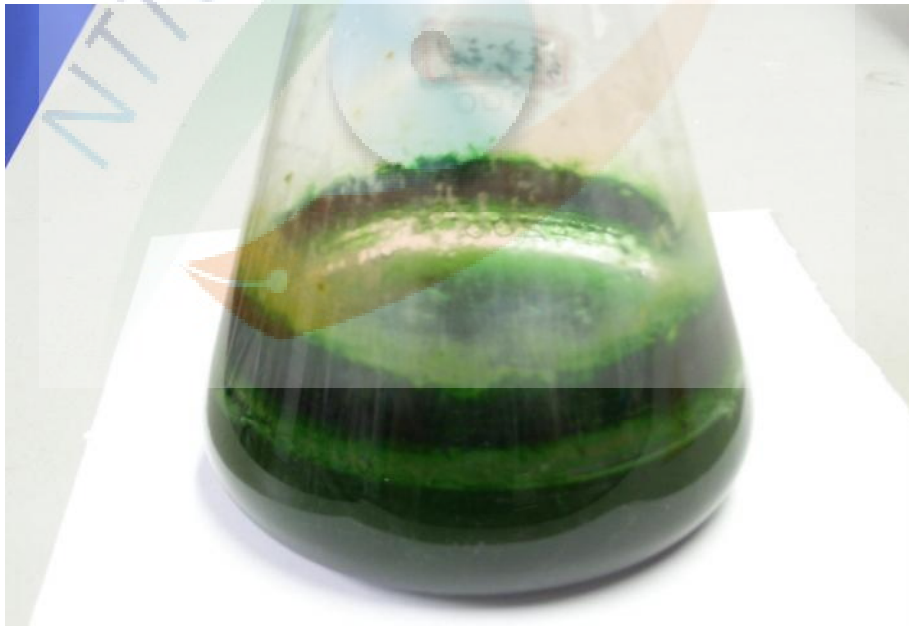
圖十. *Lyngbya* sp. 固態培養圖



圖十一.顯微鏡下 *Lyngbya* sp. 圖(Nikon YS100 目鏡 20x；物鏡 40x)



圖十二. (1)小量液態震盪培養之 *Lyngbya* sp.



圖十二. (2)小量液態培養之 *Lyngbya* sp. (放大圖)



圖十三.大量液態培養之 *Lyngbya* sp.

1.4 藍菌純化

純化過程當中約二至三次反覆固態培養即為 *Lyngbya* sp. 純菌。若藍菌是由野外採集，分離出之藍菌亦有可能為綠氧菌，可以甲醇或丙酮做一簡單之檢測，萃取其色素體，因藍菌除具有 chlorophyll a 之外，還具有藻膽體，或是藻藍素，和 異藻藍素，(此 2 項各藍菌均有)，以及藻紅素、藻紅藍素(此 2 項各藍菌有些有，有些無)；但綠氧菌因只含有 chlorophyll a 與 chlorophyll b，不具藻膽體，而 chlorophyll a 和 chlorophyll b 皆可被甲醇或丙酮萃取，菌體本身就呈很淡的綠色或已無色素，沒有其他雜色，而藍菌在以甲醇或丙酮萃取後，它的菌體還會有藍或紅色(李 2005)。

二、藻藍素萃取條件方法開發

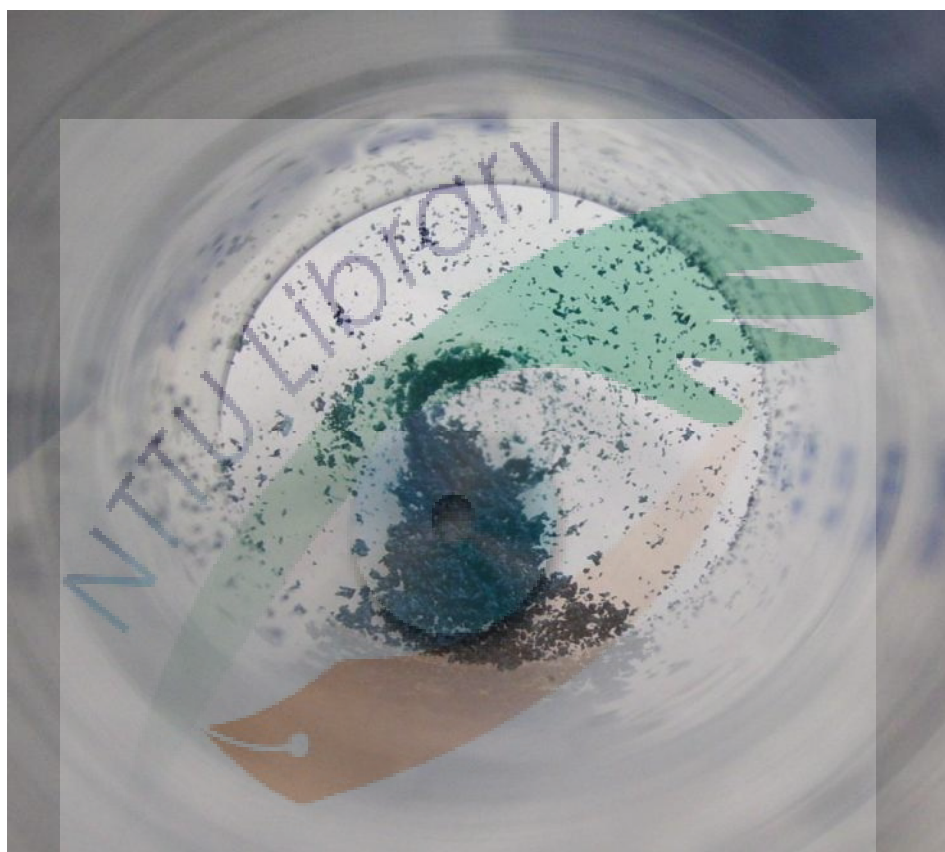
2.1 冷凍乾燥法

將大量液態培養後的藍菌，取出適量，先以抽氣過濾將菌體水分去除並秤乾重，再以研鉢磨碎後高速離心(10000 rpm，30 min)，離心完後可見到深藍色之上清液，收集其深藍色上清液進行低溫冷凍乾燥可得深藍色粉末(圖十四)。

將冷凍乾燥完之粉末加入甲醇，將粉末充分溶解於甲醇中，可得黃綠色之上清液，此黃綠色上清液初步判定為被甲醇萃取出之藻膽體(包含藻紅素、異藻藍素)，底下有深藍色沉澱粉末，倒出黃綠色上清液，再次加入甲醇充分混勻，反覆數次不斷以甲醇清洗，直至上清液呈透明無色為止，進行離心 (5000 rpm，10 min)，吸出透明上清液留下深藍色沉澱粉末，此粉末溶於水中呈深藍色，進行光譜吸收實驗發現 620 nm 處有強吸收；經UV燈照射呈深紅色，由此判斷即為藻藍素粉末，加入蒸餾水將

其溶解後，即為藻藍素水溶液(圖十五)，以 UV 燈照射可呈現紅色，對照標準品結果相同(圖十六)。

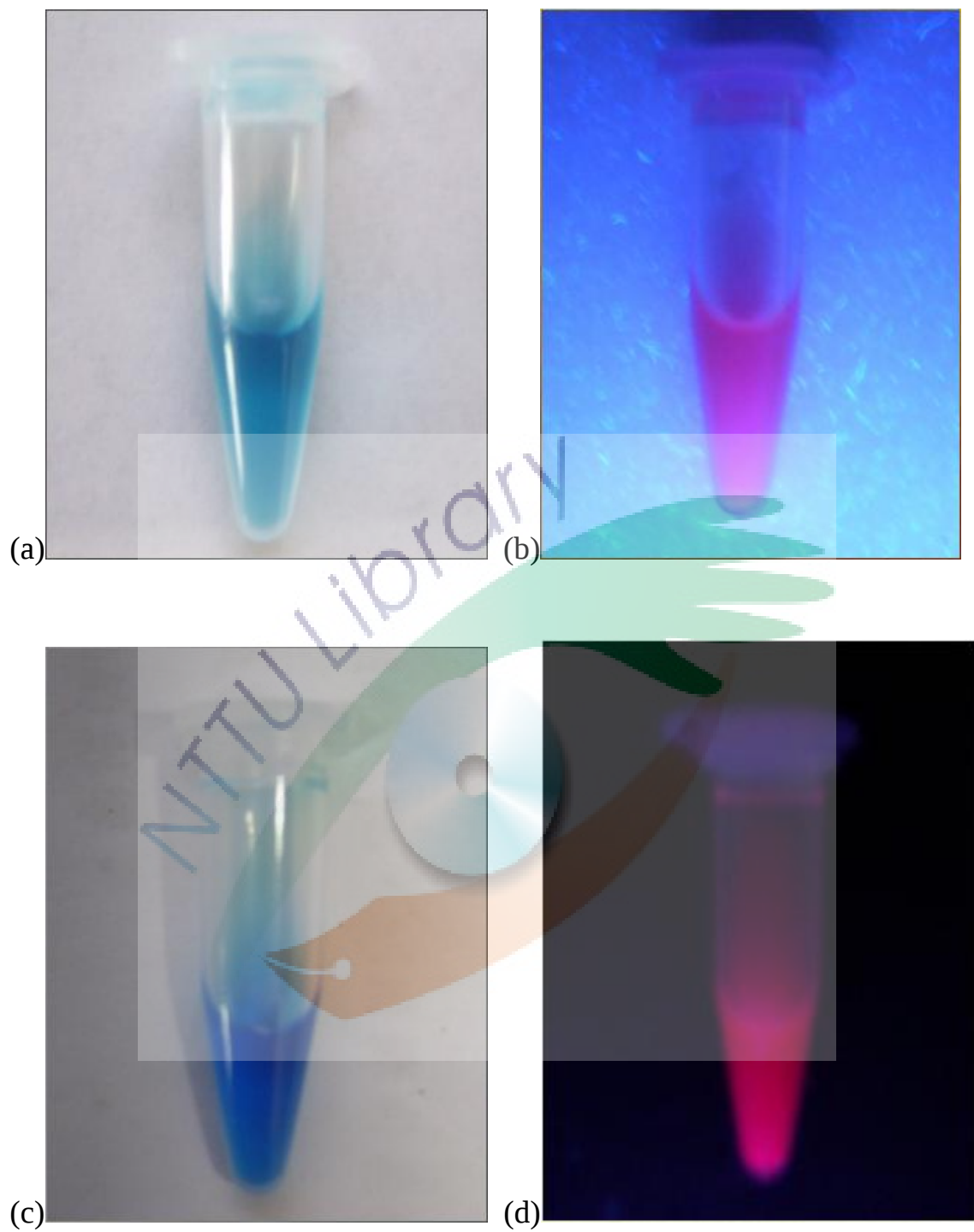




圖十四.萃取出來的藻藍素粉末



圖十五.萃取出之藻藍素水溶液



圖十六. 萃取出之藻藍素水溶液 (a) 無 UV 燈照 (b) 以 UV 燈照射
標準品藻藍素水溶液 (c) 無UV燈照 (d) 以UV燈照射

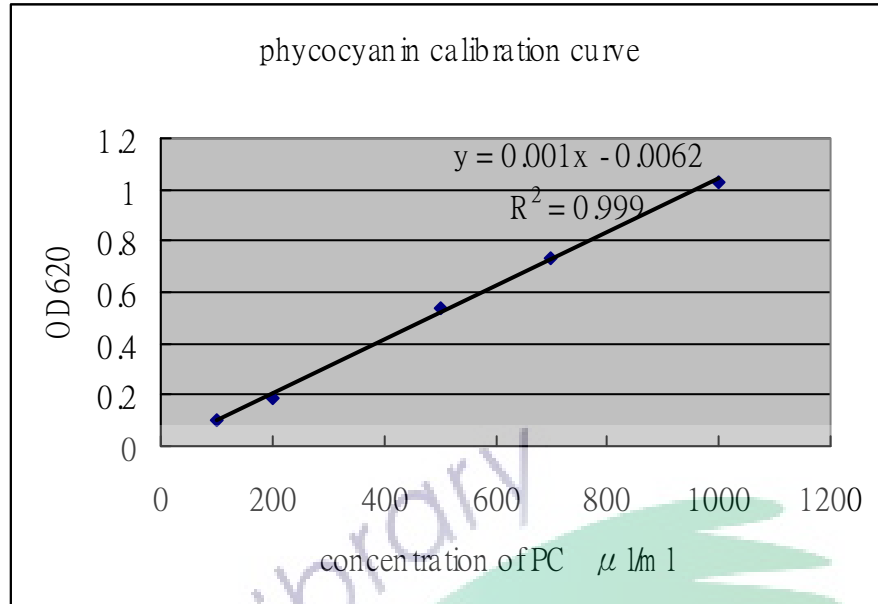
2.2 膠體過濾層析法

將大量液態培養後的藍菌，取出適量，直接離心（5000 rpm，10 min），將離心後的藍菌倒掉上清液並以研鉢磨碎，倒入離心管中再次離心（10000 rpm，30 min），可得深藍色上清液，上清液經過矽膠管柱層析分離後，可發現藻膽蛋白以及藻紅素等物質會被甲醇沖提出（李 2005），而藻藍素則無法通過矽膠層，可將之分離出，將有吸附藻藍素之矽膠層取出後加入適量蒸餾水以超音波震盪機分離，可將藻藍素自矽膠中洗出而溶於蒸餾水中，即為藻藍素水溶液，以冷凍乾燥機濃縮後，可得藻藍素粉末。

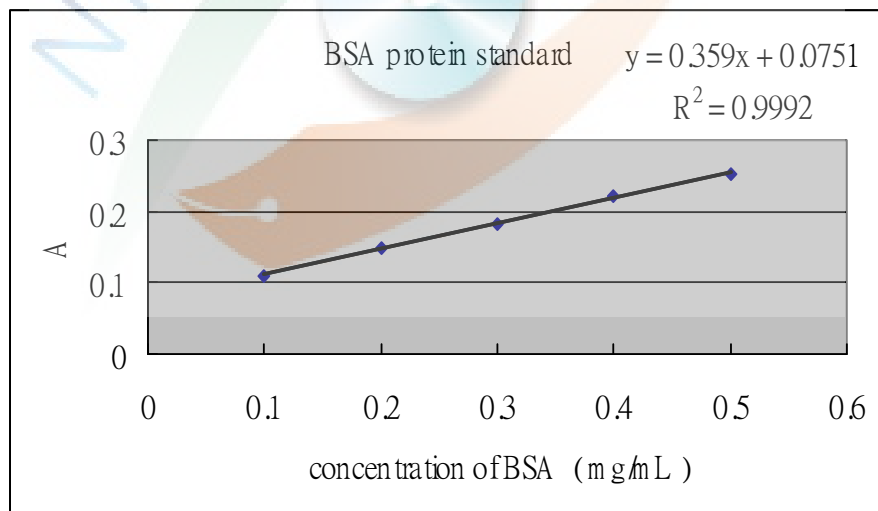
三、藻藍素特性分析

3.1 藻藍素定量分析

藻藍素本身不是酵素，無法以偵測活性的方式定量，但藻藍素本身的光感物質特性可應用於濃度測定。本實驗分別測定藻藍素之吸收強度對應濃度之關係，結果顯示藻藍素之吸收強度與濃度之間具有良好的線性關係，本實驗以吸收強度對樣品中的藻藍素進行定量分析，由於藻藍素本身為藍色，在紅光部分有強烈的吸收，且吸收波長範圍廣，以 620 nm 波長分析藻藍素吸收光譜結果與標準品比較顯示藻藍素濃度為 3.021 mg/ml（圖十七）；而以 Bradford 法偵測蛋白質質量可得濃度為 1.81 mg/mL（圖十八）。



圖十七.光譜強度之線性關係 620 nm處吸收強度與濃度之線性關係



圖十八.Bovine serum albumin (BSA) 蛋白質定量標準曲線

3.2 分子量

將萃取與純化所得之產物與標準品以 10 % SDS-PAGE 電泳分析分子量。電泳膠片上可清楚看見兩條主要色帶 (major band)，分別代表藻藍素之 α -subunit 及 β -subunit，其位置與標準品無異(圖十九)， α -subunit 及 β -subunit 分子量分別為 17 kDa 及 18 kDa。

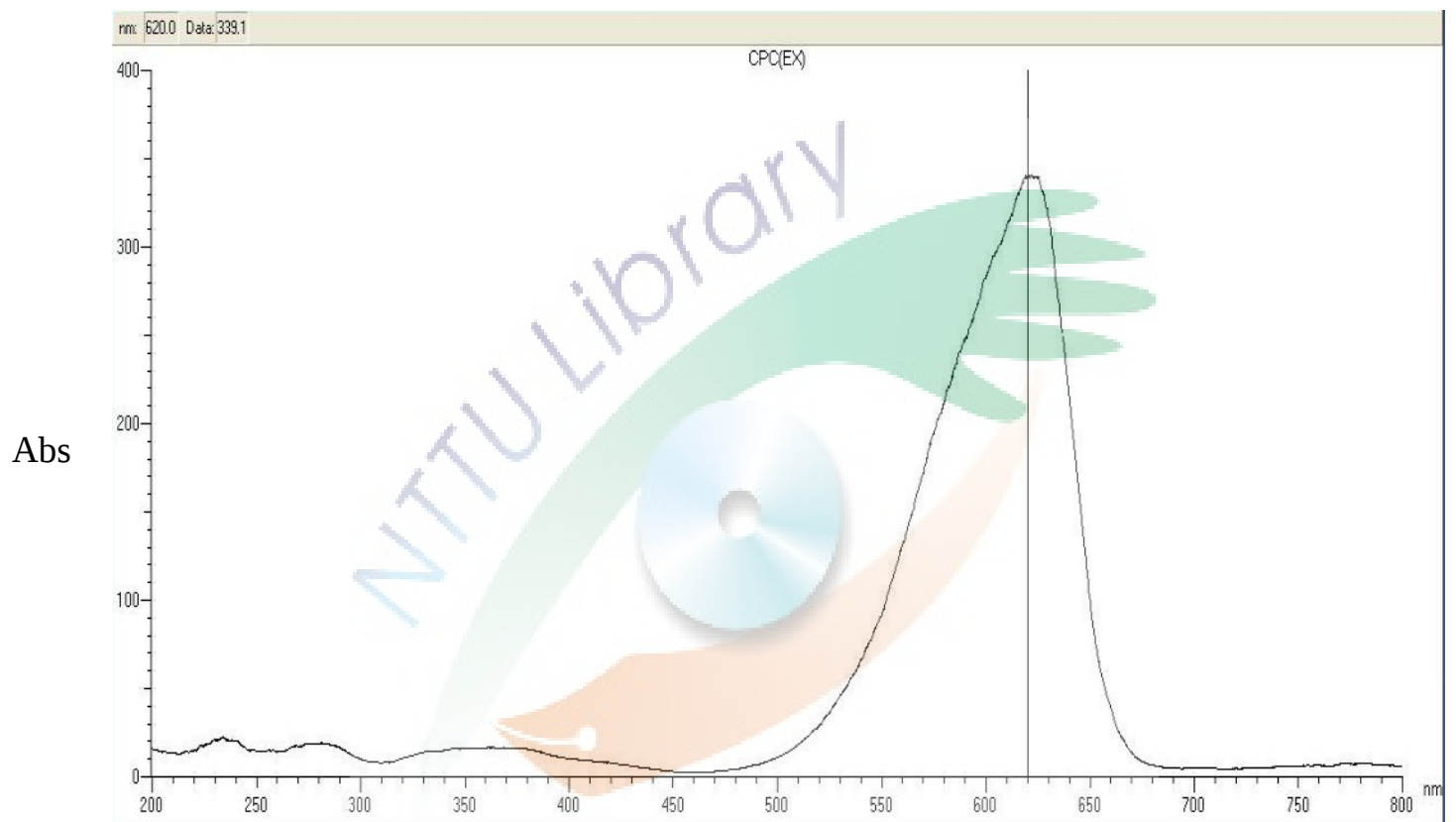
3.3 吸收光譜

測定純化後之藻藍素溶液在波長 250-700 nm 間之吸收光譜，可發現有兩個吸收峰：最大吸收峰位於波長 620 nm 處，與理論值相同，為藻藍素之激發波長；另一吸收峰位於 350 nm 處，與多肽鏈上之芳香類胺基酸有關。藻藍素之吸收光譜見圖二十。

standard



圖十九. 10% 聚丙烯醯胺膠體電泳結果



圖二十. 藻藍素吸收光譜

四、藻藍素細胞抗氧化能力分析

4.1 過氧化氫誘導細胞氧化模型建立

利用過氧化氫來誘導細胞氧化，依照不同的濃度來對細胞做測試，濃度分別為 9%、7%、5%、3%、1%、0.5%、0.1%、0.08%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.025、0.0125%、0.00625%，測試結果如下(Nikon eclipse TS100 目鏡 20x；物鏡 40x):

將細胞受氧化損傷程度分別分成以下等級：

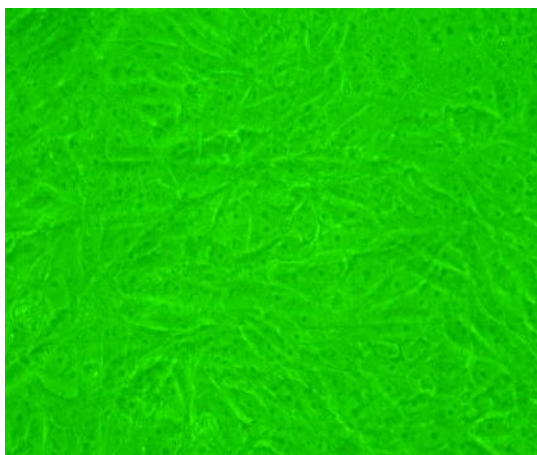
0°：細胞正常

1°：細胞受氧化損傷小於 20%

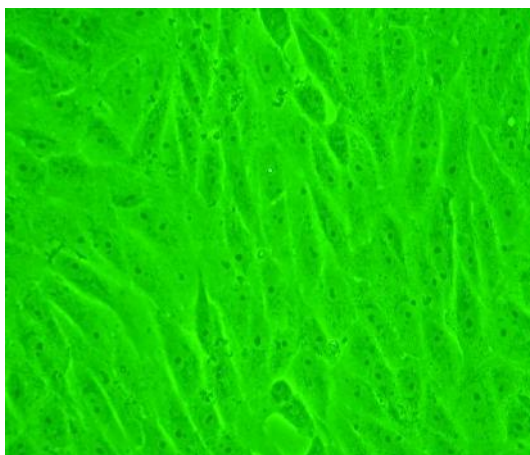
2°：細胞受氧化損傷小於 40%

3°：細胞受氧化損傷小於 80%

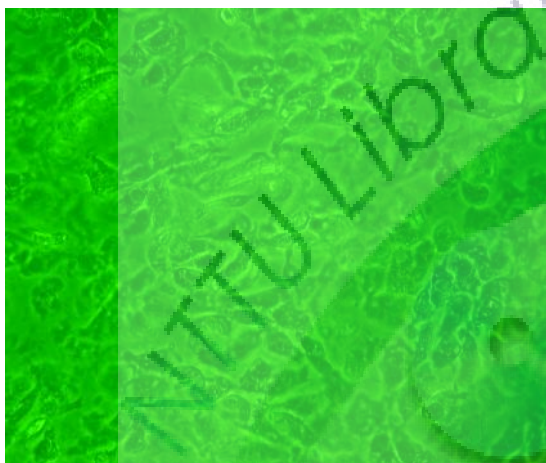
4°：細胞受氧化損傷大於 80%



正常細胞形態(未添加 H_2O_2) 0°



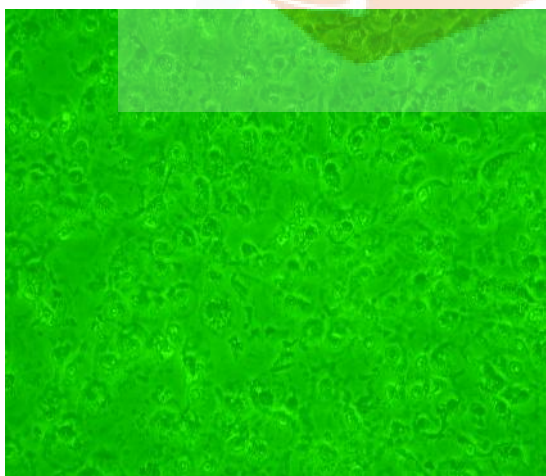
H_2O_2 0.00625% - 0.02% 0°



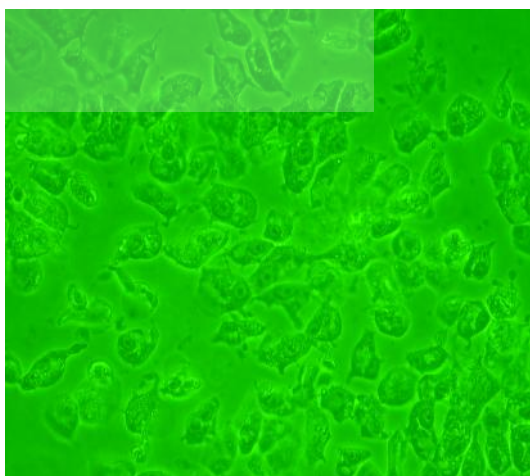
H_2O_2 0.03% - 0.04% 1°



H_2O_2 0.05% - 0.5% 2°



H_2O_2 0.5% - 1% 3°



H_2O_2 1% - 9% 4°

結果顯示：當 H_2O_2 濃度 1% - 9% 時，細胞核破裂，超過 80% 以上的細胞受到氧化損傷以及死亡，損傷程度為 4°；0.5% - 1% 時，細胞嚴重皺縮，脫壁懸浮死亡，損傷程度為 3°；0.05% - 0.5% 時，細胞亦脫壁懸浮，形態內縮嚴重，但隨濃度降低有緩和的趨勢，損傷程度為 2°；0.03% - 0.04% 時細胞受氧化損傷程度小於 20%，損傷程度為 1°；可發現在 0.03% 之後形態與正常形態無明顯分別；0.02% 以下形態亦正常，故判斷 0.03% 的 H_2O_2 為進行細胞抗氧化之最適濃度。

4.2 藻藍素對過氧化氫誘導細胞氧化之影響

藻藍素對過氧化氫誘導氧化模型的測試依照不同時間以及反應之先後順序所測得的結果如下 (Nikon eclipse TS100 目鏡 20x；物鏡 40x)：

H_2O_2 與藻藍素對細胞的作用時間測試：

	30min 細胞形態	1h 細胞形態	2h 細胞形態	3h 細胞形態	4h 細胞形態
加入藻藍素	0°	0°	0°	0°	0°
加入 H_2O_2	0°	0°	0°	0°	0°

結果顯示： H_2O_2 與藻藍素在 4 小時之內對於細胞形態無顯著影響，細胞受損程度皆為 0°。

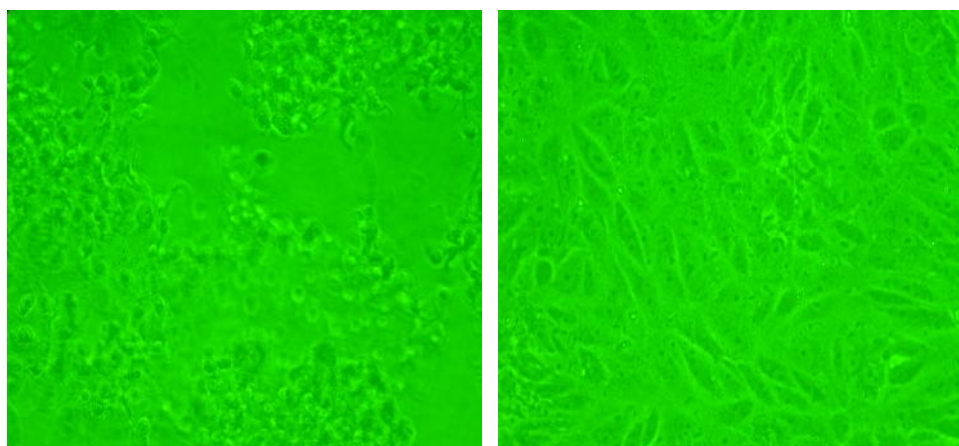
H_2O_2 組加入藻藍素對細胞形態測試 (先以 H_2O_2 培養再加入藻藍素) 培養 12 小時後之形態：

	30min 細胞形態	1h 細胞形態	2h 細胞形態	3h 細胞形態	4h 細胞形態
先加H ₂ O ₂ 再加藻藍素	0°	0°	0°	0°	1°
未加藻藍素	3°	3°	3°	3°	3°

結果顯示：在 H₂O₂ 的培養下從 30min 至 3h 之間分別加入藻藍素並培養 12 小時之後，發現藻藍素有抵抗氧化壓力的能力，細胞形態與正常形態無明顯差異，但在 H₂O₂ 加入 4 小時後再加入藻藍素培養 12 小時，發現細胞形態有受到氧化攻擊，細胞損傷程度為 1°；顯示藻藍素在 3 小時內對於 H₂O₂ 的氧化攻擊有抑制作用；對照組未加藻藍素細胞明顯受到氧化攻擊，細胞損傷程度為 2°。

藻藍素組加入 H₂O₂ 對細胞形態測試 (先以藻藍素培養再加入H₂O₂) 培養 12 小時後之形態：

	30min 細胞形態	1h 細胞形態	2h 細胞形態	3h 細胞形態	4h 細胞形態
先加藻藍素 再加H ₂ O ₂	3°	3°	3°	3°	3°
未加H ₂ O ₂	0°	0°	0°	0°	0°



加入藻藍素培養 30min-4h

未加 H_2O_2 0°

再加入 H_2O_2 3°

結果顯示：先以藻藍素培養後再加入 H_2O_2 ，發現從 30min 至 4h 內加入藻藍素並無明顯抑制氧化壓力的能力，細胞形態皆皺縮且懸浮死亡，細胞受損程度為 3° ；未加 H_2O_2 的對照組，形態則無明顯變化，為 0° ；顯示藻藍素在細胞受到氧化攻擊的 3 小時內，具有一定程度的抗氧化力。

4.3 維生素C 對過氧化氫誘導細胞氧化之影響

維生素 C 對過氧化氫誘導氧化模型的測試依照不同時間以及反應之先後順序所測得的結果如下 (Nikon eclipse TS100 目鏡 20x；物鏡 40x)：

4.3.1 維生素C 10 mM 對細胞抗氧化測試

H_2O_2 與維生素C 對細胞的作用時間測試：

	30min 細胞形態	1h 細胞形態	2h 細胞形態	3h 細胞形態	4h 細胞形態
加入維生素C	0°	0°	0°	0°	0°
加入H ₂ O ₂	0°	0°	0°	0°	0°

結果顯示：H₂O₂ 與維生素C 在 4 小時之內對於細胞形態無顯著影響，細胞受損程度皆為 0°。

H₂O₂ 組加入維生素C 對細胞形態測試 (先以H₂O₂ 培養再加入維生素C) 培養 12 小時後之形態：

	30min 細胞形態	1h 細胞形態	2h 細胞形態	3h 細胞形態	4h 細胞形態
先加H ₂ O ₂ 再加維生素C	0°	2°	2°	3°	3°
未加維生素C	3°	3°	3°	3°	3°

結果顯示：H₂O₂ 培養 30 min 內加入維生素C，細胞形態與常態無明顯差異，損傷程度為 0°；但在H₂O₂ 培養超過 30 min 後再加入維生素C，細胞形態開始產生皺縮，受到氧化攻擊明顯，損傷程度隨時間增加為 2°-3°，顯示維生素C 在 30min 內可抑制氧化壓力；而未加維生素C的對照組，細胞受到氧化攻擊皆產生形態皺縮的現象，損傷程度為 2°以上。

維生素C 組加入 H₂O₂ 對細胞形態測試 (先以維生素C 培養再加入 H₂O₂) 培養 12 小時後之形態：

	30min 細胞形態	1h 細胞形態	2h 細胞形態	3h 細胞形態	4h 細胞形態
先加維生素C 再加H ₂ O ₂	3°	3°	4°	4°	4°
未加H ₂ O ₂	0°	0°	0°	0°	0°



加入維生素C 培養 30min-4h 後

再加入 H₂O₂ 4°

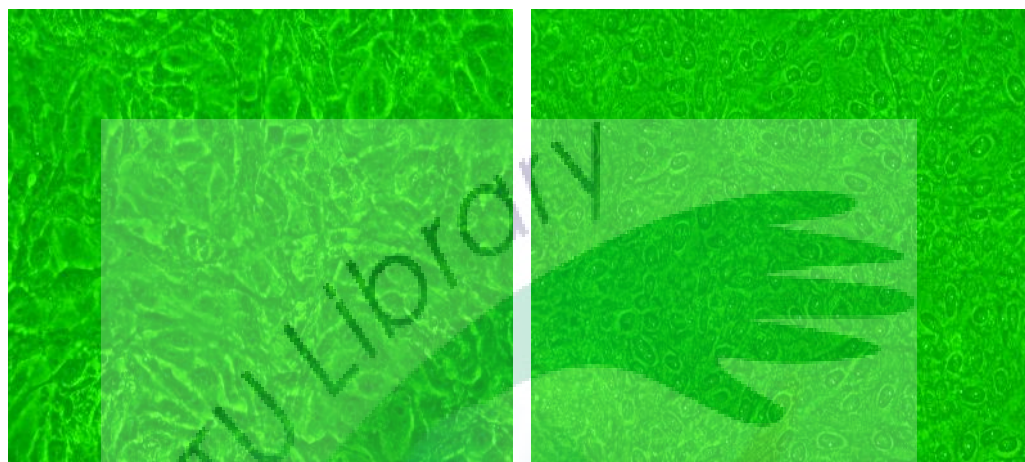
未加 H₂O₂ 0°

結果顯示：維生素C 培養 30min 至 4 小時後加入 H₂O₂，細胞仍會受到氧化性攻擊，而產生皺縮的形態，細胞損傷程度為 3° - 4°；而未加 H₂O₂ 的對照組，形態則與常態無明顯分別，為 0°。

4.3.2 維生素C 20 mM 對細胞抗氧化測試

H₂O₂ 與維生素C 對細胞的作用時間測試：

	30min 細胞形態	1h 細胞形態	2h 細胞形態	3h 細胞形態	4h 細胞形態
加入維生素C	0°內縮	0°內縮	0°內縮	0°內縮	0°內縮
加入H ₂ O ₂	0°	0°	0°	0°	0°



加入 H₂O₂ 30min-4h 0° 加入維生素C 20mM 30min-4h 0°

結果顯示：加入 H₂O₂ 後 4 個小時對細胞形態無明顯影響，損傷程度為 0°；但加入 20 mM 維生素C 30 min之後，細胞開始出現形態收縮的現象，但並非受到氧化攻擊，判斷為 20mM 維生素C 溶液對細胞而言為高張溶液，導致細胞形態內縮，損傷程度為 0°。

H₂O₂ 組加入維生素C 對細胞形態測試 (先以H₂O₂ 培養再加入維生素C)
培養 12 小時後之形態：

	30min 細胞形態	1h 細胞形態	2h 細胞形態	3h 細胞形態	4h 細胞形態
先加H ₂ O ₂ 再加維生素C	1°	1°	1°	1°	1°
未加維生素C	3°	3°	3°	3°	3°



加入 H₂O₂ 培養 30 min-4h 後

未加維生素C 3°

再加入維生素C 1°

結果顯示：在 H₂O₂ 培養 30 min 至 4h 後，加入 20 mM 的維生素C，細胞呈現極度的內縮，但形態並非如同受到氧化攻擊，僅約 20%受到氧化攻擊，損傷程度為 1°，可能維生素C濃度過高所導致；對照組未加維生素C，細胞明顯受到氧化攻擊，形態改變，損傷程度為 3° - 4°。

維生素C 組加入 H₂O₂ 對細胞形態測試 (先以維生素C 培養再加入 H₂O₂) 培養 12 小時後之形態：

	30min 細胞形態	1h 細胞形態	2h 細胞形態	3h 細胞形態	4h 細胞形態
先加維生素C 再加H ₂ O ₂	2°	2°	2°	2°	2°
未加H ₂ O ₂	0°內縮	0°內縮	0°內縮	0°內縮	0°內縮



加入維生素C 培養 30min-4h 後

未加 H₂O₂ 0°內縮

再加入 H₂O₂ 2°

結果顯示：維生素C 濃度提高為 20 mM 時，對細胞產生強烈的作用，約 40%受氧化損傷，損傷程度為 2°；加入 H₂O₂ 與未加入 H₂O₂ 之實驗組與對照組細胞形態均呈現大幅內縮，由結果可得知維生素C 濃度過高並不能使細胞維持正常形態。

4.4 維生素 E 對過氧化氫誘導細胞氧化之影響

維生素 E 對過氧化氫誘導氧化模型的測試依照不同時間以及反應

之先後順序所測得的結果如下(Nikon eclipse TS100 目鏡 20x;物鏡 40x):

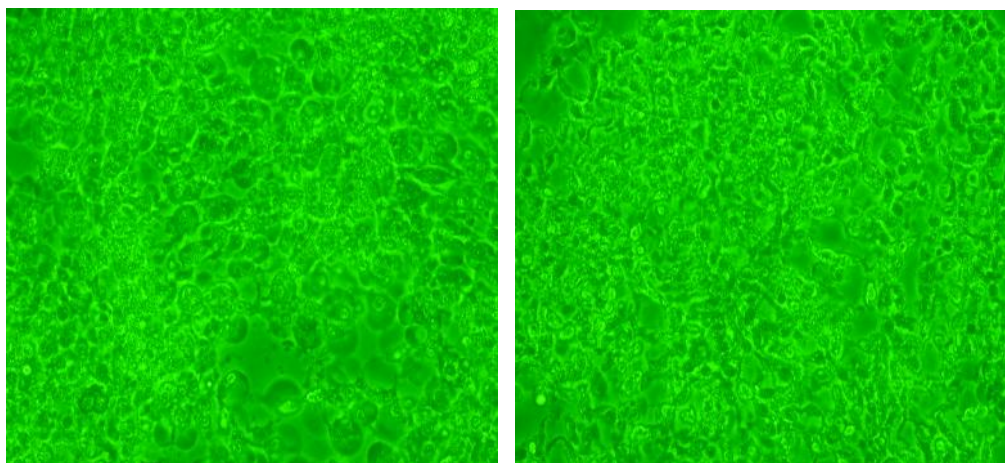
H₂O₂與維生素 E 對細胞的作用時間測試：

	30min 細胞形態	1h 細胞形態	2h 細胞形態	3h 細胞形態	4h 細胞形態
加入維生素E	0°	0°	0°	0°	0°
加入H ₂ O ₂	0°	0°	0°	0°	0°

結果顯示：H₂O₂ 與維生素E 在4小時之內對於細胞形態無顯著影響，細胞受損程度皆為0°。

H₂O₂組加入維生素E 對細胞型態測試 (先以H₂O₂ 培養再加入維生素E)
培養 12 小時後之型態：

	30min 細胞形態	1h 細胞形態	2h 細胞形態	3h 細胞形態	4h 細胞形態
先加H ₂ O ₂ 再加維生素E	1°	1°	1°	2°	2°
未加維生素E	3°	3°	3°	3°	3°



加入 H_2O_2 培養 30min-4h 後

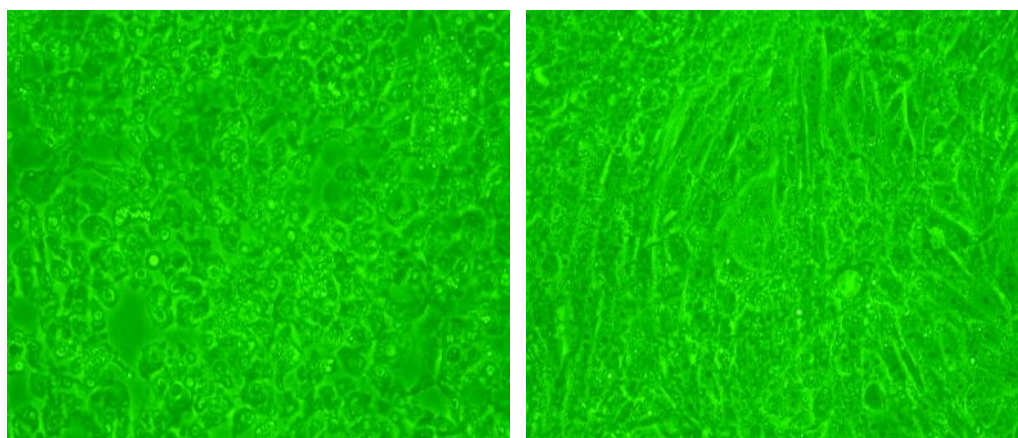
未加維生素E 3°

再加入維生素E 1°

結果顯示：在 H_2O_2 培養的條件下加入維生素E，可以發現 30min 至4小時內細胞皆會受到氧化攻擊，細胞呈現皺縮，受損程度為1°-2°；但未加維生素E 的對照組受到的氧化壓力更為嚴重，受損程度為3°；因此維生素E 在30min 至4小時內仍具有抗氧化的效果，但效果不強烈。

維生素E 組加入 H_2O_2 對細胞型態測試 (先以維生素E 培養再加入 H_2O_2) 培養 12 小時後之型態：

	30min 細胞形態	1h 細胞形態	2h 細胞形態	3h 細胞形態	4h 細胞形態
先加維生素E 再加 H_2O_2	2°	2°	2°	2°	2°
未加 H_2O_2	0°	0°	0°	0°	0°



加入維生素E 培養 30min-4h 後

未加 H_2O_2 0°

再加入 H_2O_2 2°

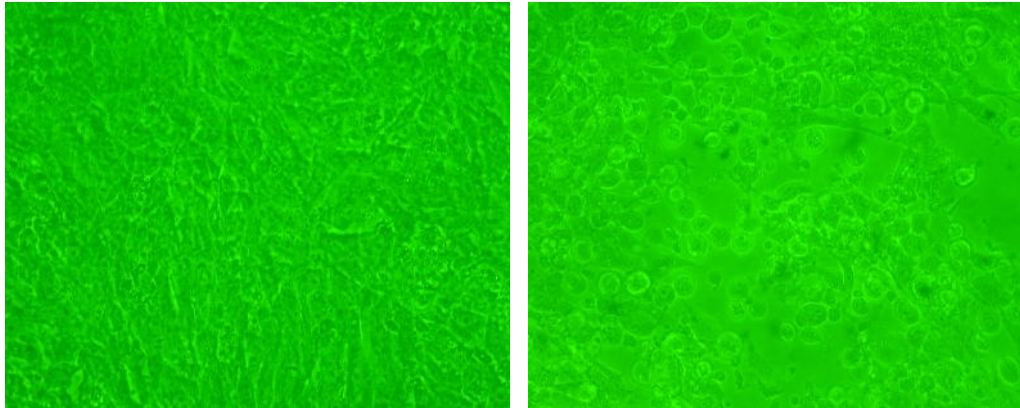
結果顯示：在加入 H_2O_2 30min 至 4 小時，經過 12 小時的培養，細胞還是會受到氧化攻擊，呈現氧化的型態，受損程度為 2° ；而對照組未加 H_2O_2 細胞則與正常型態無明顯差異，受損程度為 0° ，顯示 10mM 維生素 E 的濃度可能不足以抵抗 H_2O_2 。

4.5 β -carotene 對過氧化氫誘導細胞氧化之影響

β -carotene 對過氧化氫誘導氧化模型的測試依照不同時間以及反應之先後順序所測得的結果如下(Nikon eclipse TS100 目鏡 20x；物鏡40x):

H_2O_2 與 β -carotene 對細胞的作用時間測試：

	30min 細胞形態	1h 細胞形態	2h 細胞形態	3h 細胞形態	4h 細胞形態
加入 β -carotene	0°	0°	0° 內縮	0° 內縮	0° 內縮
加入 H_2O_2	0°	0°	0°	0°	0°

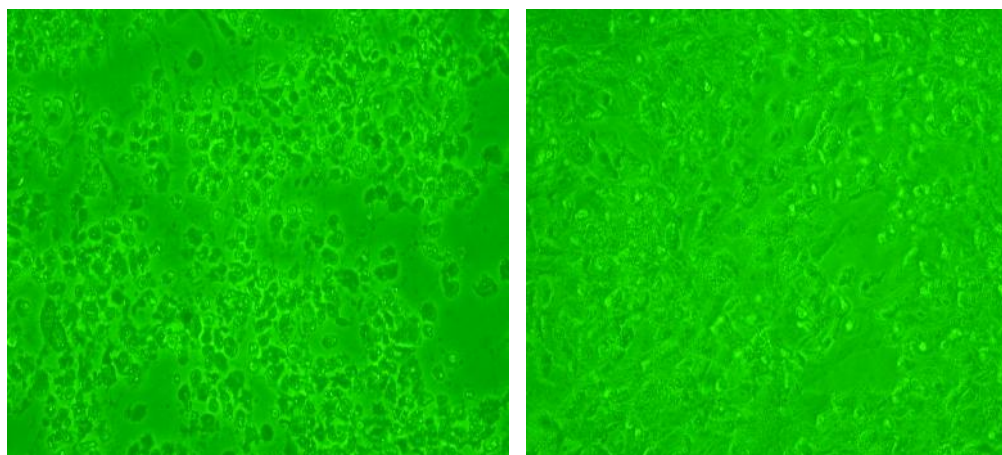


加入 H_2O_2 30min-4h 0° 加入 β -carotene 2h-4h 0° 內縮

結果顯示：當 H_2O_2 加入4小時內對細胞無顯著影響，損傷程度皆為 0° ；而 β -carotene 在加入1小時之內對細胞無影響，但加入後 2 小時至 4 小時則細胞開始產生內縮現象，此內縮形態與受氧化壓力所產生之內縮形態不同，損傷程度為 0° ，可能的因素為 10 mM 之 β -carotene 對細胞而言屬高張溶液，導致細胞呈現內縮，而發生內縮反應時間為1小時。

H_2O_2 組加入 β -carotene 對細胞型態測試（先以 H_2O_2 培養再加入 β -carotene）培養 12 小時後之型態：

	30min 細胞形態	1h 細胞形態	2h 細胞形態	3h 細胞形態	4h 細胞形態
先加 H_2O_2 再加 β -carotene	1° 內縮	1° 內縮	1° 內縮	2° 內縮	2° 內縮
未加 β -carotene	3°	3°	3°	3°	3°



加入 H_2O_2 培養 30 min-4h 後

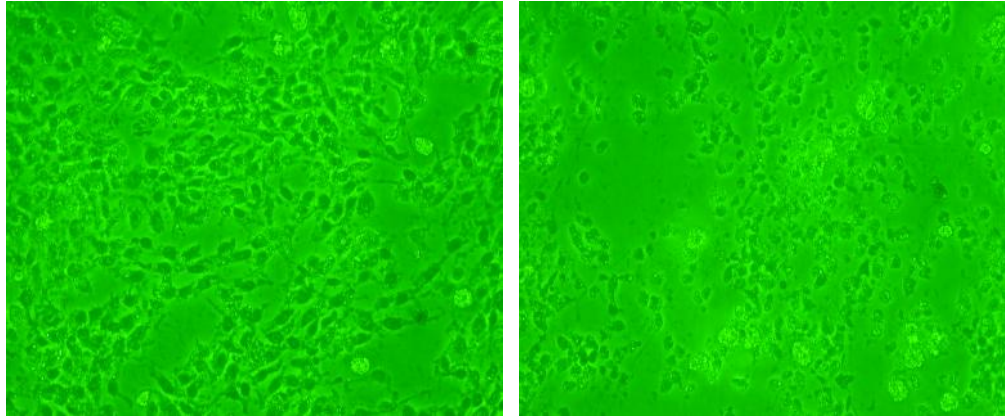
未加 β -carotene 3°

再加入 β -carotene $1^\circ-2^\circ$

結果顯示：加入 H_2O_2 後再加入 β -carotene，細胞呈現嚴重內縮且甚至破裂死亡，但形態與受氧化壓力明顯不同，氧化損傷程度為 $1^\circ-2^\circ$ ，判斷是由於過高濃度的 β -carotene 所導致；而未加 β -carotene 的對照組則皆受到氧化攻擊，形態呈現皺縮，氧化損傷程度為 3° 。

β -carotene 組加入 H_2O_2 對細胞型態測試 (先以 β -carotene 培養再加入 H_2O_2) 培養 12 小時後之型態：

	30min 細胞形態	1h 細胞形態	2h 細胞形態	3h 細胞形態	4h 細胞形態
先加 β -carotene 再加 H_2O_2	0°	0°	1°	1°	1°
未加 H_2O_2	0° 嚴重 內縮	0° 嚴重 內縮	0° 嚴重 內縮	0° 嚴重 內縮	0° 嚴重 內縮



加入 β -carotene 培養 30min-1h 未加 H_2O_2 0° 嚴重內縮
後再加入 H_2O_2 0°

結果顯示：加入 β -carotene 後再加入 H_2O_2 可發現 30 min 至 1h 內抗氧化效果最好，細胞雖因高濃度 β -carotene 產生內縮但未發現有受氧化攻擊的現象，氧化損傷程度為 0° ；2h 至 4h 細胞逐漸減少，但整體而言細胞型態相較於先加 H_2O_2 再加入 β -carotene 之實驗組為佳，氧化損傷程度為 1° ；而未加 H_2O_2 的對照組細胞型態皆發生內縮部份甚至破裂死亡，判斷為高濃度 β -carotene 所導致，氧化損傷程度為 0° 。

4.6 藻藍素抗氧化能力分析

在經過藻藍素、維生素C、維生素E 以及 β -carotene 對細胞氧化壓力的實驗後結果歸納如下(藻藍素、維生素C、維生素E 以及 β -carotene 濃度皆為 10mM； H_2O_2 濃度為 0.03%；表格結果為培養12h後)：

單獨加入各種抗氧化劑與過氧化氫之形態比較：

	30min 細胞型態	1h 細胞型態	2h 細胞型態	3h 細胞型態	4h 細胞型態
只加藻藍素	0°	0°	0°	0°	0°
只加維生素C	0°	0°	0°	0°	0°
只加維生素E	0°	0°	0°	0°	0°
只加β-carotene	0°	0°	0°內縮	0°內縮	0°內縮
只加H ₂ O ₂	3°	3°	3°	3°	3°

從表格中可發現，當只分別加入抗氧化劑未加入 H₂O₂ 時，除了β-carotene 會在 2h 後發生形態內縮的現象之外，細胞形態皆維持正常，氧化損傷程度為皆為0°；但單獨加入 H₂O₂ 時，細胞受到氧化攻擊呈現皺縮、細胞膜破裂、脫離培養皿，細胞核外露等傷害，氧化損傷程度為3°以上。

先加入 H₂O₂ 再加入各種抗氧化劑之形態比較：

	30min 細胞型態	1h 細胞型態	2h 細胞型態	3h 細胞型態	4h 細胞型態
先加H ₂ O ₂ 再加藻藍素	0°	0°	0°	0°	1°
先加H ₂ O ₂ 再加維生素C	0°	2°	2°	3°	3°
先加H ₂ O ₂ 再加維生素E	1°	1°	1°	2°	2°
先加H ₂ O ₂ 再加β-carotene	1°內縮	1°內縮	1°內縮	2°內縮	2°內縮

先加入 H_2O_2 再加入抗氧化劑測試抗氧化力的實驗顯示：藻藍素相較其他抗氧化劑擁有最佳抗氧化力，當細胞受氧化攻擊3小時內仍具有相當程度的抗氧化效果，可讓細胞維持一定的正常形態，氧化損傷程度為 0° ；維生素C 則在受氧化攻擊的 30 分鐘內對其有抑制效果，氧化損傷程度為 0° ，30分鐘之後再加入則無法抑制，細胞氧化損傷的程度隨時間增加，氧化損傷程度為 $2^\circ - 3^\circ$ ；維生素E 在 10mM 的濃度下從 30min 至 4 小時內皆無法完全有效抑制氧化壓力，細胞皆會發生形態改變，但相較同濃度的維生素C有較好的抗氧化力，細胞受氧化損傷的程度較低，氧化損傷程度為 $1^\circ - 2^\circ$ ；10 mM 的 β -carotene 對細胞而言濃度可能過高，會使細胞造成內縮的現象，有部分甚至破裂死亡，為四種抗氧化劑中對細胞影響程度較高，氧化損傷程度為 $1^\circ - 2^\circ$ 。

先加入 各種抗氧化劑再加入 H_2O_2 之形態比較：

	30min 細胞型態	1h 細胞型態	2h 細胞型態	3h 細胞型態	4h 細胞型態
先加藻藍素 再加 H_2O_2	3°	3°	3°	3°	3°
先加維生素C 再加 H_2O_2	3°	3°	4°	4°	4°
先加維生素E 再加 H_2O_2	2°	2°	2°	2°	2°
先加 β -carotene 再加 H_2O_2	0°	0°	1°	1°	1°

先加抗氧化劑再加入 H_2O_2 的實驗顯示：除了 β -carotene 雖因濃度高造成細胞內縮，但在 1h 內並無受到氧化攻擊的現象，氧化損傷程度為 0° ，2h 之後細胞才逐漸破裂死亡，判斷 β -carotene 先加入 1h 內可有效抑制氧化壓力，而超過 1h 之後則因細胞持續處於高張溶液下，造成細胞開始形態改變；而其他抗氧化劑無論先作用細胞多久時間，當 H_2O_2 加入，細胞還是無法抑制所造成的氧化壓力，氧化損傷程度為 $2^\circ - 4^\circ$ 。由此可知當細胞受到氧化性攻擊時，在特定時效內進行抗氧化作用，才可達到抗氧化效果。



陸、結論

- 1.本實驗所利用冷凍乾燥法以及中壓層析管柱分離法所分離出之藻藍素樣品經定性定量分析並與標準品比對後，確認其純度與標準品相同；濃度可達 3.021 mg/ml。
- 2.以冷凍乾燥法萃取藻藍素，不僅節省成本，時間短並排除了前人研究繁瑣的前處理步驟，而所萃取出之樣品濃度高且純度夠，日後可進行大量生產。
- 3.管柱分離法分離之藻藍素，由於有通過矽膠層，在分離的後續步驟需花較長的時間，但所得之藻藍素經實驗證明濃度與純度與標準品亦同。
- 4.抗氧化能力測試，過氧化氫誘導 Vero 細胞產生抗氧化最適濃度為 0.03%，可造成細胞形態改變。
- 5.過氧化氫誘導細胞產生氧化壓力時，在 3 小時內，加入藻藍素可有效抑制其氧化攻擊。
- 6.維生素 C 與維生素 E 在細胞受到氧化壓力時也可對其產生抑制，但須以適當濃度作用，在 10mM 濃度下，抗氧化能力不如藻藍素佳。
7. β -carotene 在 10mM 時對細胞而言濃度過高，會導致細胞產生皺縮現象，但在抗氧化測試方面由結果顯示，先加入 β -carotene 在 1 小時內對氧化攻擊有明顯的抑制作用，但隨時間增長則對細胞會造成死亡，抗氧化效果亦不及同濃度的藻藍素來的佳。
- 8.經過實驗的結果顯示，抗氧化劑加入的時間先後對細胞而言影響甚鉅，在細胞受到氧化攻擊時之後的適當時間加入，才可達到抑制效果；但本實驗結果顯示 β -carotene 在細胞受氧化壓力之前一小時加入，有明顯的效

果，由此可知抗氧化劑若先加入或超過了有效時間，則無法有效抑制氧化壓力，因種類而異。

9.由此實驗可得知，當身體細胞受到外來的氧化攻擊時，必須儘早做抗氧化的動作，例如食用富含藻藍素、維生素等食品，若超過時間，抗氧化效果則不明顯。

10.本實驗可作為*Lyngbya* sp.內所含有的藻藍素抗氧化能力基礎的研究，在濃度 10mM 下，抗氧化的能力即優於一般抗氧化劑，證明*Lyngbya* SP.所萃取出來的藻藍素日後有極高的商業價值。



柒、參考文獻

- 丁克祥。1996。SOD生物醫學淺論。藝軒出版社。台北。
- 王子慶。2002。葡萄子與皮抗氧化性之研究。國立屏東科技大學食品科技研究所碩士論文。屏東。
- 李炎。2005。藍菌研究。藝軒出版社。台北。
- 金鳴、蔡亞欣、李金榮、趙輝。1996。Fe(phen) 氧化法檢測 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{3+}$ 產生的羥自由基。生物化學與生物物理進展。23 (6)：553-555。
- 拱玉郎。1997。天然抗氧化劑發展近況。食品工業月刊。29: 29-37。
- 陳惠英、顏國欽。1998。自由基抗氧化防禦與人體健康。中華民國營養學會雜誌。23: 105-121。
- 高馥鈞、李敏雄。1998。食品保存與抗氧化劑。食品工業月刊。30: 17-24。
- 莫照、徐懷恕。2001。益生菌在水產養殖中的應用。青島海洋大學海洋生命學院。
- 廖遠東。2006。泛談藻藍素之保健功效。農業生技產業季刊。7：37-45。
- 增山吉成。1997。自由基的陰謀。健康出版社。臺北市。
- 蕭華山、何文錦、傅文慶、曹紅雲、范子南。1999。一種用分光光度計檢測氧自由基的新方。生物化學與生物物理進展。26 (2)：180-182。
- 鐘飛、王曉春、林麗。2004。葛根體外清除氧自由基作用的研究。湖南中醫學院學報。24 (2)：17-19。

Ames, B. N., Shigenaga, M. K., and Hagen, T. M. 1993. Oxidants,

antioxidants and the degenerative diseases of aging. Proc. Natl. Acad.Sci., 90: 7915-7922.

Ayehunie, S., Ruprecht, R. M., Baba, T. W., Li, A., Hu, Y., and Liska, V. 1998.Live attenuated HIV as a vaccine for AIDS: pros and cons. Seminars in Virology. 7: 147-155.

Bachur, N. R., Ordon, S. L., Gee, M.V., and Kon, H. 1979. NADPH cytochrome P450 reductase activation of quinine anticancer agents to free radicals. Proc. Natl. Acad. Sci. 76: 954-957.

Badrish ,S., Beena, K., Ujjval, T. and Datta, M. 2006. Extraction, purification and characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata*—Isolated from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India. Process Biochemistry 41 (9) 2017-2023.

Badrish, S., Ujjval, T., and Datta, Madamwar. 2007. A novel method of single step hydrophobic interaction chromatography for the purification of phycocyanin from *Phormidium fragile* and its characterization for antioxidant property. Bioresource Technology 99 (2008) 188–194.

Barbara, M. C., Jenny, D.C.M. and Elisabeth, G. 1985. Characterization of a Purified Photosystem II-Phycobilisome Particle Preparation from *Porphyridium cruentum*. Plant Physiol. 1985 March; 77(3): 626–629.

Beams, H.W., and Kessel, R.G. 1977. Physical Properties of Blue-green Algae: Ultracentrifugation and Electron Microscope Studies. Protoplasm 92: 229-242.

Belay, A., Ota, Y., Miyakawa, K., and Shimatsu, H. 1993.Current knowledge on potential health benefits of Spirulina. J. Appl. Phycol. 5: 235-241.

Bhat, V.B., and Madyastha, K.M. 2000. C-phycocyanin: a potent peroxy

radical scavenger in vivo and in vitro. Biochemical and biophysical research communications 275: 20-5.

Bhat, V.B., and Madyastha, K.M. 2001. Scavenging of peroxynitrite by phycocyanin and phycoanobilin from *Spirulina platensis*: protection against oxidative damage to DNA. Biochem Biophys Res Commun.285: 262-266.

Bonorben, W. R., and Pariza, M. W. 1994. Antioxidant nutrients and protection from free radicals, In: Nutr. Toxicol. Raven press. New York. p. 19-48.

Bryce, J.H., and Hill, S.A. 1999. Energy Production in Plant Cells. In: Lea PJ, Leegood RC. Editors. Plant Biochemistry and Molecular Biology. New York: J Wiley. p 1-2, 5.

Cain, R.B. 1994. Biodegradation of Detergents. Current Opinion in Biotechnology. 5 (3): 266-274.

Castenholz, R.W., and Waterbury, J.B. 1989. Oxygenic Photosynthetic Bacteria. In: Staley JT, Bryant MP, Pfennig N, Holt JG, editors. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 1st edition. Vol.3: 1711-1805.

Chambers, D. 2001. Phycoerythrin Conjugation Protocol

Chen,Y.F., C.Y.Wu, C.H.Wang, Y.H.Wei, M.T. Hsu, S.F.Tsai, and T.F. Tsai. 2009. Cisd2 deficiency drives premature aging and causes mitochondria-mediated defects in mice. Genes & Development, 23(10):1183-94.

Cifelli, O. 1983 *Spirulina* : the edible organism. Microbiol. Rev. 47 : 551-578.

Davies, K.J.A. .1986. Intracellular proteolytic systems may function as secondary antioxidant defenses: a hypothesis. J. Free Radic. Biol. Med. 2:155-173.

Dix, T. A., and Aikens, J. 1993. Mechanisms and biological relevance of lipid

peroxidation initiation. Chem. Res. Toxicol. 6: 2-18.

Duerring, M., Schmidt, G.B., and Huber, R. 1991. Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of constitutive C-phycocyanin from the chromatically adapting cyanobacterium *Fremyella diplosiphon* at 1.66 Å resolution. J Mol Biol. 217: 577-592.

Farrera, J.A., Jauma, A., Ribo, J.M., Peire, M.A., Parellada, P.P., Roques-Choua, S., Bienvenue, E., and Seta, P. 1994. The antioxidant role of bile pigments evaluated by chemical tests. Bioorganic and medicinal chemistry 2:181-185.

Fridovich, I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. Annu. Rev. Biochem. 64: 97-112.

Ganapathi, P., S. Chethana., M.C. Madhusudhan., and K.S.M.S. Raghavarao. 2008. Fractionation and purification of the phycobiliproteins from *Spirulina platensis*. Bioresource Technology 99 (2008) 7393–7396.

Gantt, E., and Conti, S.F. 1965. The ultrastructure of *Porphyridium cruentum*. J Cell Biol. 26: 365-381.

Gantt, E. and Conti, S.F. 1966a. Granules associated with the chloroplast lamellae of *Porphyridium cruentum*. J Cell Biol. 29: 423 -434.

Gantt, E., and Conti, S.F. 1966b. Phycobilisome localization in algae. Brookhaven Symp Biol. 19: 393-381.

Gantt, E., Lipschultz, C.A., and Zilinskas, B. 1976. Further evidence for a phycobilisome model from selective dissociation, fluorescence emission, immunoprecipitation, and electron microscopy. Biochim Biophys Acta. 430: 375-388.

Giese, J. 1996. Antioxidants; tools for preventing lipid oxidation. Food Technol. 50:73-78.

- Goldstein, S., Meyerstein, D., and Czapski, G.** 1993. The fenton reagents. Free Radical Biol. Med. 15: 435-445.
- Grossman, A.R., Schaefer, M.R., Chiang, G.G., and Collier, J.L.** 1993. The Phycobilisome, a Light-Harvesting Complex Responsive to Environmental Conditions. Microbiol. Rev. 57(3): 725-749.
- Halliwell, B.** 1987. Oxidants and human disease: some new concepts. FASEB J. 1:358-364.
- Halliwell, B.** 1994. Free radicals and antioxidants: a personal view. Nutr. Rev. 52: 253 - 265.
- Halliwell, B., and Cuttidge, J.M.C.** 1986. Oxygen free radical and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. Arch. Biochem. Biophys. 246:501-514.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C.** 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. Methods Enzymol. 186:1-85.
- Hamilton, R.J., Kalu, C., Prisk, E., Pasley, F. B., and Pierce, H.** 1997. Chemistry of free radicals in lipids. Food Chem. 60:193 -199.
- Herrero, M., Ibanez, E., Senorains, F.J., and Cifuentes, A.** 2003. Accelerated solvent extracts from *Spirulina platensis* microalga: determination of their antioxidant activity and analysis by Micellar Electrokinetic Chromatography. Journal of Chromatography A 1047: 195-203.
- Hirschberg, J.** 1999. Production of High-Value Compounds : Carotenoids and Vitamin E. Current Opinion in Biotechnol. 10:186-191.
- Imlay, J.A., and Fridovich, I.** 1991. Assay of metabolic superoxide production in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 266:6957 -6965.
- Jacobi, P.A., DeSimone, R.W., Ghosh, I., Guo, J., Leung, S.H., and Pippin,**

- D.** 2000. New syntheses of the C, D-ring pyrromethenones of phytochrome and phycocyanin. *J Org Chem.* 65: 8478-8489.
- Jayant, M. D.** 2005. An Improved and Efficient Method for the Extraction of Phycocyanin from *Spirulina* sp. *International Journal of Food Engineering* Vol. 1 : Iss. 5, Article 2.
- Julio, A., Liliana, B., Enrique, T., Angeles, C., and Clive, B.** 1998. Purification and characterization of phycocyanin from marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. 109201. *Plant Science* 136 (1998) 109- 120.
- Janssen, Y.M.W., Houten, B.V., Borm, P.J.A., and Mossman, B. T.** 1993. Cell and tissue response to oxidative damage. *Lab. Invest.* 69: 261 -271.
- Kasai, H., Okada, Y., Nishimura, S., Rao, M.S., and Reddy, J.K.** 1989. Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in liver DNA of rat following long-term exposure to a peroxisome proliferator. *Cancer Res.* 49: 2603-2605.
- Kerby, N.W., and Rowell, P.** 1992. Applications for photosynthetic prokaryotes. In: Mann NH, Carr NG, editors. *Photosynthetic Prokaryotes*. New York. Plenum Press. p 233-254.
- Kitts, D.** 1997. An evaluation of the multiple effects of the antioxidant vitamins. *Trends Food Sci. Technol.* 8: 198-203.
- Kronik, M., and Grossman, P.** 1983. Immunoassay techniques with fluorescent phycobiliprotein conjugates. *Clin Chem.* 29: 1582 -1586.
- Kukreja, R.C., and Hess, M. L.** 1992. The oxygen free radical system: from equations through membrane-protein interactions to cardiovascular injury and protection. *Cardiovasc. Res.* 26: 641-665.
- Kurechi, T., Kikugawa, K., and Kato, T.** 1980. Studies on the antioxidant. Hydrogen donating capability of antioxidants to 2,2-diphenyl-1-

picrylhydrazide. Chem. Pharm. Bull. 28: 2089-2093.

Liu, Y.Y., Xie, Q., Wang, H., Lin, L.Y., Jiang, S., Zhou, X.Q., Yu, H., and Guo, Q. 2008. The effect of N-acetyl-L-cysteine on endoplasmic reticulum stress mediated apoptosis of HepG2 cells. Chin J Hepatol, V01.16, 7:524-527.

Lopes, G.K.B., Schulman, H.M., Lima, M.H. 1999. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. Biochimica et Biophysica Acta (1472) : 142-152

Lovley, D.R., Coates, J.D. 1997. Bioremediation of Metal Contamination. Current Opinion in Biotechnol. 8(3): 285-289.

Luft, R. 1994. The development of light by chlorophyll solutions. J. Biol. Chem. 140: 315-322.

MacColl, R., and Guard-Frair, D. 1987 Phycobiliproteins. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Madyastha, K.M. 2000. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 by C-phycoerythrin, a biliprotein from *Spirulina platensis*. Biochem Biophys Res Commun. 277: 599-603.

Mathew, S., Abraham, T. E. 2006. In vitro antioxidant activity and scavenging effects of *Cinnamomum verum* leaf extract assayed by different methodologies. Food and Chemical Toxicology (44) : 198-206

Mendes, R.L., Nobre, B.P., Cardoso, M.T., Pereira, A.P., and Palabra, A.F. 2003. Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. Inorganica chimica acta 356:328-334.

Minkova K.M., A.A. Tchernov, M.I. Tchorbadjieva, S.T. Fournadjieva, R.E. Antova, and M.Ch. Busheva. 2003. Purification of C-phycoerythrin

- form *Spirulina* (*Arthrospira*) *fusiformis*. *J Biotechnol* 102: 55 -59.
- Moncada, S., and Higgs, A.** 1991. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl. J. Med.* 329:2002-2011.
- Mori, T., Gustafson, K.R., Pannell, L.K., Shoemaker, R.H., Wu, L., McMahon, J.B., and Boyd, M.R.** 1998. Recombinant Production of Cyanovirin-N, a Potent HIV Human Immunodeficiency Virus)-Inactivating Protein Derived from a Cultured Cyanobacterium. *Protein Expr. Purif.* 12:151-158.
- Narro, M.L., Cerniglia, C.E., Van Baalen, C., and ibson, D.T.** 1992. Metabolism of Phenanthrene by the Marine Cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(4): 1351-1359.
- Niki, E.** 1992. Active oxygens and free radicala in biology. *J. Jpn. Oil Chem. Soc.* 41:768-773.
- Oi, V.T., Glazer, A.N., and Stryer, L.** 1982. Fluorescent phycobiliprotein conjugates for analyses of cells and molecules. *J Cell Biol.* 93:981 -986.
- Padula M. and S. Boiteux.** 1999. Photodynamic DNA damage induced by phycocyanin and its repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Br az J Med Biol Res* 32: 1063-1071.
- Padyana, A.K., Bhat, V.B., Madyastha, K.M., Rajashankar, K.R., and Ramakumar, S.** 2001. Crystal structure of a light-harvesting protein C-Phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biochem Biophys Res Commun.* 282: 893-898.
- Priya, S.W. and Neefus, C.D.** 2007. An improved method for estimating R-phycoerythrin and R-phycocyanin contents from crude aqueous extracts of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* 19 (2) : 123-129.

- Rathee, J.S., Hassarajani, S.A., Chattopadhyay S.** 2006 .Antioxidant activity of *Mammea longifolia* bud extracts Food Chemistry (99) : 436-443
- Plude, J.L., Parker, D.L., Schommer, O.J., Timmerman, R.J., Hangstrom, S.A., Joers, J.M., and Hnasko, R.** 1991. Chemical characterization of Polysaccharide from the Slime Layer of the cyanobacterium *Microcystis flos-aquae* C3-40. Appl. Environ. Microbiol. 57(6): 1696-1700.
- Reddy, M.C., Bhat, V.B., Kiranmai, G., Reddy, M.N., Reddanna, P., and Romay, C., Ledon, N., and Gonzalez, R.** 2000. Effect of phycocyanin extract on prostaglandin E2 levels in mouse ear inflammation test. Arzneimittelforschung, 50: 1106-1109.
- Ris, H., and Sing, R.N.** 1961. Electron Microscope Studies on Blue-Green Algae. J. Biophys. Biochem. Cytol. 9: 63-80.
- Romay, C., and Gonzalez, R.** 2000. Phycocyanin is an antioxidant protector of human erythrocytes against lysis by peroxy radicals. J Pharm Pharmacol. 52: 367-368.
- Romay, C., Armesto, J., Ramirez, D., Gonzalez, R., Ledon, N., and Garcia, I.** 1998a. Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycocyanin from blue-green alage. Inflamm Res. 47: 36-41.
- Romay, C., Delgado, R., Ramirez, D., Gonzalez, R., and Rojas, A.** 2001. Effects of phycocyanin extract on tumor necrosis factor -alpha and nitrite levels in serum of mice treated with endotoxin. Arzneimittelforschung. 51: 733-736.
- Romay, C., Gonzalex, R., Ledon, N., Ramirez, D., and Rimbau, V.** 2003. Current protein and peptide science 4:207 -16.
- Romay, C., Ledon,N., and Gonzalez, R.** 1998b. Further studies on anti-inflammatory activity of phycocyanin in some models of

inflammation. *Inflam. Res.* 47: 334-338.

Sakanaka ,S.,Ishihara, Y. 2008. Comparison of antioxidant properties of persimmon vinegar and some other commercial vinegars in radicalscavenging assays and on lipid oxidation in tuna homogenates .*Food Chemistry* , (107) : 739-744.

Sarada, R., Pillai, M.G., and Ravishankar, G.A. 1999. Phycocyanin from spirulina sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. *Process Biochem.* 34: 795-801.

Schechter, S. R. 1996. Fighting free radicals with antioxidant. *Health Food Business.* 6:28-29.

Silveira, S.T., Burkert, J.F.M. and Costa, J.A.V. 2007. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design . *Bioresource Technology* 98 (8) 1629-1634.

Sridevi Devaraj, Rong Tang, Beverley Adams-Huet, Andrea Harris, Thanalakshmi Seenivasan, James A de Lemos, and Ishwarlal Jialal. 2007. Effect of high-dose α -tocopherol supplementation on biomarkers of oxidative stress and inflammation and carotid atherosclerosis in patients with coronary artery disease . *Am J Clin Nutr.* 86(5): 1392–1398.

Stadtman, E. R. 1992. Protein oxidation and aging. *Science.* 257: 1220-1224.

Stec, B., Troxler, R.F., and Teeter, M.M. 1999. Crystal structure of C-Phycocyanin from *Cyanidium caldarium* provides a new perspective on phycobilisome assembly. *Biophys J.* 76: 2912-2921.

Stolz, J.F. 1991. Structure of Phototrophic Prokaryotes. CRC Press. p 1 -11, 15-39, 105-120.

Sundaresan, M., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Irani, K., and Finkel, T. 1995 Requirement for generation of H_2O_2 for platelet-derived growth factor

signal transduction. Science 270: 296-299.

Swanson R. V. and A. N. Glazer. 1990. Separation of phycobiliprotein subunits by reverse-phase high-pressure liquid chromatography. Anal Biochem 188: 295-299.

Tamura, H., Kitta, K., and Shibamoto, T. 1991. Formation of reactive aldehydes from fatty acids in a $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ oxidation system. J. Agric. Food Chem. 39:439-442.

Tandeau de Marsac, N., and Cohen-Bazire, G. 1977. Molecular composition of cyanobacterial phycobilisomes. Proc Natl Acad Sci USA. 74: 1635-1639.

Takao, F., Shuichi, M., Satoshi, I., Tetsuya, H., Tsutomu, A., Takahiko, H., Kazuo, I. and Hiroko, N. 2003. Rapid and selective extraction of phycocyanin from *Spirulina platensis* with ultrasonic cell disruption. J Appl. Phycol 15:319–324.

Toni Laaksonen, Juan J. Negro, Sami Lyytinen, Jari Valkama, Indrek Ots, Erkki Korpimäki. 2008. Effects of Experimental Brood Size Manipulation and Gender on Carotenoid Levels of Eurasian Kestrels *Falco tinnunculus*. PLoS ONE. 3(6): e2374.

Wang, H.Y., Zhao,M., Yang,B., Jiang,Y., Rao ,G.h. 2008. Identification of polyphenols in tobacco leaf and their antioxidant and antimicrobial activities[J] · Food Chemistry , 2008(107) : 1399~1406

Wang, M.Y., and Liehr, J.G. 1995. Lipid hydroperoxide-induced endogenous DNA adducts in hamsters; possible mechanism of lipid hydroperoxide-mediated carcinogenesis. Arch Biochem Biophys.316:38-46

Weiss, S.J. 1989. Tissue destruction by neutrophils. New Engl. J. Med. 320: 365-375.

Woff, S.P., and Dean, R.T. 1987. Glucose antioxidation and protein modification. *Biochem. J.* 245: 243-250.



附錄一、C-10 培養基配方

C-10 培養基 (藥品單位為每公升蒸餾水中所含公克數 :g/L)

HEPES(N-2-hydroxyethyl-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid)	1.2 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.25 g/L
K ₂ HPO ₄	0.05 g/L
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0.025 g/L
KNO ₃	1.0 g/L
Na ₂ -EDTA (Na ₂ -ethylenediaminetetraacetic acid)	0.01 g/L
Fe ₂ (SO ₄) ₃ ·6H ₂ O	0.004 g/L
微量元素	1 ml/L

微量元素 (藥品單位為每公升蒸餾水中所含公克數 :g/L)

H ₃ BO ₃	2.86 g/L
MnCl ₂ ·4 H ₂ O	1.81 g/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.222 g/L
MoO ₃ (85%)	0.018 g/L
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.079 g/L
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.01 g/L

