螺旋藻中藻蓝蛋白提取、纯化及稳态化研究进展

姜国庆[1,2], 闫秋丽[3], 李　东[1,2], 陈玉川[4], 许洪高[1,2*]

(1. 北京市营养源研究所北京市系统营养工程技术研究中心, 北京　100069; 2. 北京市科学技术研究院生物医药与营养健康协同创新中心, 北京　100089; 3. 北京市经济管理学校, 北京　100142; 4. 内蒙古乌审召生态产业发展有限公司, 鄂尔多斯　017320)

摘　要: 藻蓝蛋白是螺旋藻中一种主要功能性蛋白质, 能占到螺旋藻(干基)的 20%, 也是一种天然着色剂(CNS: 08.137)。根据纯度(purity, P)藻蓝蛋白分为食品级(P>0.7)、试剂级(0.7<P<3.9)和分析级(P>4.0)等多种规格, 可以广泛应用于食品、化妆品及医药等领域; 但藻蓝蛋白的光、热易敏性, 以及不耐受酸碱的特性, 造成藻蓝蛋白的产业化应用尚未普及。本文对近 5 年来螺旋藻中藻蓝蛋白的提取纯化研究进展进行了回顾总结, 系统分析、比较了藻蓝蛋白分离、纯化的影响因素; 同时对藻蓝蛋白稳态化的研究进展进行了概述, 旨在为藻蓝蛋白的精深加工、应用推广提供系统性认识。

关键词: 藻蓝蛋白; 螺旋藻; 提取纯化; 稳态化

Research progress on separation, purification and stabilization of phycocyanin from *Spirulina*

JIANG Guo-Qing[1,2], YAN Qiu-Li[3], LI Dong[1,2], CHEN Yu-Chuan[4], XU Hong-Gao[1,2*]

(1. *System Nutrition Engineer and Technology Research Center*, *Beijing Research Institute for Nutritional Resources*, *Beijing* 100069, *China*; 2. *Health Collaborative Innovation Center of Biomedicine and Nutrition*, *Beijing Academy of Science and Technology*, *Beijing* 100089, *China*; 3. *Beijing Economic Management School*, *Beijing* 100142, *China*; 4. *Inner Mongolia Wushenzhao Ecological Industry Development Co*., *LTD*, *Ordos* 017320, *China*)

ABSTRACT: Phycocyanin is a major functional protein in *Spirulina*, accounting for 20% of *Spirulina* (dry basis), and also a natural colorant (CNS: 08.137). According to the purity (P), phycocyanin can be divided into food grade (P>0.7), reagent grade (0.7<P<3.9) and analytical grade (P>4.0), which can be widely used in food, cosmetics, medicine and other fields. However, due to the light and heat sensitivity of phycocyanin and its acid-base intolerance, the industrial application of phycocyanin has not been popularized. This paper reviewed the extraction and purification of phycocyanin from *Spirulina platensis* in recent 5 years, and systematically analyzed and compared the influencing factors of phycocyanin separation and purification, at the same time, summarized the research progress of phycocyanin stabilization, aiming to provide a systematic understanding for the deep processing and application of phycocyanin.

KEY WORDS: phycocyanin; *Spirulina*; separation and purification; stability

***通信作者:** 许洪高, 博士, 研究员, 主要研究方向为功能食品及配料研究。E-mail: zgndxhg@163.com

***Corresponding author:** XU Hong-Gao, Ph.D, Professor, System Nutrition Engineer and Technology Research Center, Beijing Research Institute for Nutritional Resources, Beijing 100069, China. E-mail: zgndxhg@163.com

0 引　言

藻蓝蛋白(phycocyanin, PC)是藻胆蛋白的一种, 由呈蓝色的藻蓝素(藻胆素)与可溶性蛋白结合而成, 藻胆素(藻胆蛋白)作为蓝藻、红藻、隐藻和甲藻中存在的一种具有光合作用的辅助色蛋白, 由载体蛋白和生色团辅基(开链线性延展的四吡咯化合物见图 1)组成复合蛋白质, 载体蛋白和生色团通过硫醚键链接, 每分子藻胆素含 2 条肽链 α 和 β, 每条肽链含 1 个或多个共价键连接的发色团[1−2]。藻蓝蛋白分子中含有 3 个发色基, 分别连接在 α-84、β-84 和 β-155 位上。藻蓝蛋白的分子量 44 kDa、等电点(isoelectric point, pI)为 4.3、最大吸收波长 620 nm。常以 $A_{620\ nm}/A_{280\ nm}$ 表示藻蓝蛋白的纯度, 并根据纯度(purity, P)将藻蓝蛋白分为食品级($P > 0.7$)、试剂级($0.7 < P < 3.9$)和分析级($P > 4.0$)3 种[3]。

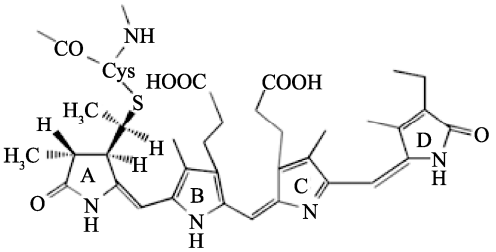

图 1　藻蓝蛋白生色团结构式

Fig.1　The molecular structure of phycocyanin

藻蓝蛋白具有光、热不稳定的特性, 在室温下光照保存 10 d, 100 mg/L 藻蓝蛋白水溶液中的色素保存率仅为 19.34%, 在 40 ℃避光保存 10 d, 藻蓝蛋白的色素保存率仅为 24.89%[4]。在 50 ℃以下热稳定性较好, 温度达到或超过 60 ℃, 热稳定性明显下降; 温度升至 70 ℃时, 藻蓝蛋白溶液立即褪成无色, 并出现蓝灰色絮状沉淀[5]。藻蓝蛋白对 pH 比较敏感, 在 pH 3 和 pH 5 条件下, 藻蓝蛋白溶解性比较低, 在 pH 5~9 条件下能较好的抑制油脂氧化, 但是藻蓝蛋白在 pH 3 和 pH 11 条件下乳化稳定性比较好[6]。

藻蓝蛋白具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎、增强免疫力等功能活性。藻蓝蛋白可以通过调节凋亡基因, 抑制肺癌 LTEP-a-2 细胞的体外迁移[7]。可以通过抑制 COX-2 的表达来增强放射性结肠癌的治疗作用[8]。可以显著提高辐射后小鼠血浆和肝脏中 SOD 酶活性、GSH-PX 的活性, 减少肝组织中活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)的含量, 减轻辐射对机体造成的氧化损伤[9], 且藻蓝蛋白的蛋白质部分与色基部分可以通过不同的途径发挥抗氧化作用[10]。藻蓝蛋白可以通过 TLR-MyD88-NF-κB 信号通路减轻 X 射线诱导的肺炎[11]、促进小鼠脾脏淋巴细胞增殖、增强免疫活性[12]等, 藻蓝蛋白还可以抑制成骨细胞向破骨细胞、特异性破骨细胞等转化[13]。藻蓝蛋白作为一种天然着色剂被广泛应用在化妆品、饮料、冰淇淋、口香糖和乳制品中[14]。作为一种功能性成分引起业界的广泛关注。

藻蓝蛋白高达钝顶螺旋藻干基的 20%[3,15], 显著高于巢湖蓝藻的 6%[16]和极大螺旋藻中的 7%[17]。钝顶螺旋藻集约化养殖的成功让其成为藻蓝蛋白产业化的首选原料。藻蓝蛋白的规模化提取、纯化和稳态化研究一直是螺旋藻精深加工的焦点, 本文就螺旋藻中藻蓝蛋白的提取、纯化和制剂稳态化方面近 5 年的研究进展进行了综述, 以期对藻蓝蛋白的精深开发和应用提供系统的认识。

1 藻蓝蛋白提取研究进展

藻蓝蛋白的含量与螺旋藻的养殖条件和加工工艺紧密相关。不同培养基氮源得到的螺旋藻藻蓝蛋白含量不同[18], 红光照射的螺旋藻藻蓝蛋白含量比蓝光照射的螺旋藻藻蓝蛋白含量高 42%[19], 春季和夏季培养的螺旋藻比秋季养殖螺旋藻的藻蓝蛋白含量高[20]。螺旋藻常见的干燥方式有阴凉干燥、太阳晒干、烘箱干燥、微波干燥、真空烘干、冷冻干燥、喷雾干燥等几种, 有助于藻蓝蛋白稳定的几种干燥方式分别是: 冷冻干燥、阴凉干燥和喷雾干燥, 其他干燥方式使藻蓝蛋白损失 40%~80%不等[21]。藻蓝蛋白是胞内蛋白, 提取效果与细胞破壁方法、提取工艺参数有关。

1.1 细胞破壁方法

常见的机械破壁方法有溶胀法、反复冻融法、超声波辅助破壁法、高压均质法、组织研磨法等; 还有化学溶剂法、生物酶法等。脉冲电场、电阻加热法也在近年来应用在细胞破壁提取藻蓝蛋白的应用中。在实际操作中为了达到理想的破壁效果也可以将几种破壁方法耦合使用。

1.1.1 溶胀法

将螺旋藻干粉浸泡在水溶液中, 由于细胞内外渗透压不一样, 水进入细胞, 撑破细胞壁, 藻蓝蛋白溶出, 溶胀法所需设备简单, 操作性强, 缺点是时间长。俞建峰等[22]将螺旋藻干粉加入 pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液中溶胀 6 h, 藻蓝蛋白得率是 8.08%。MARI 等[23]用去离子水、磷酸盐缓冲溶液(pH 7.0)浸泡处理螺旋藻干粉(料液比=1:250, m:V)测得螺旋藻粉中藻蓝蛋白平均含量 151.80 mg/g。

1.1.2 反复冻融法

利用低温冷冻环境使螺旋藻悬浮液结冰, 常温环境解冻, 反复几次可以达到破碎细胞的效果, 细胞破碎、藻蓝蛋白溶出, 反复冻融法操作易于实现, 缺点规模化生产时间长, 难以实现。杨莹[24]用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)分散螺旋藻粉, 反复冻融 3 次, 粗提液藻蓝蛋白的纯度为 0.97。

1.1.3 超声波辅助破壁法

主要是通过超声波传输过程中空穴效应产生的剪切力和冲击波, 使细胞壁充分破裂并释放胞内蛋白质。超声

波破壁法实验周期短, 细胞破碎率高, 缺点是工厂生产能耗高, 超声波破壁过程产生的热量导致物料温度升高, 容易造成蛋白变性。CHEN 等[25]在 4 ℃条件下用 20 kHz 超声 60 s、间歇 60 s 处理 20 min 处理螺旋藻粉溶液(料液比 1:100, *m*:*V*), 获得粗提液藻蓝蛋白浓度为 0.73 mg/mL。

1.1.4 高压均质法

高压均质机中的物料通过高压均质阀时, 在加压和骤然失压过程产生的高速剪切和冲击现象使互不相溶的液-液或液-固等实验材料, 形成极细的、均匀的乳化物态。MARI 等[23]用 1600 bar 压力均质破壁, 粗提液中藻蓝蛋白的含量为(291.9±6.7) mg/g。

1.1.5 高速剪切法

高速旋转刀片产生的强大剪切力使破碎物料与溶剂介质在高速流动中充分进行物质传递, 促进可溶性物质溶出。沈向阳等[15]在 10000 r/min 对钝顶螺旋藻分散液分 3 次进行合计 40 min 的匀浆处理, 藻蓝蛋白得率为 213.32 mg/g。利用胶体磨、球磨机等所产生的机械力破坏螺旋藻细胞壁的方法。POTT 等[26]用氧化锆珠持续研磨新鲜螺旋藻悬浮液 48 h, 钝顶螺旋藻中 90%的藻蓝蛋白溶出。

1.1.6 化学试剂法

化学试剂[2-(N-吗啉)乙基磺酸、氯化钙等]可以直接破坏细胞壁的组织结构, 提高通透性, 使蛋白质从胞内流出。处理后的样品中细胞杂质少, 但化学试剂的引入, 不利于后续的纯化, 且化学试剂容易引起蛋白质结构破坏。PUROHIT 等[27]用 2-(N-吗啉)乙基磺酸缓冲液处理螺旋藻, 粗提液中藻蓝蛋白纯度为 0.64。KHAZI 等[18]用 1.5%氯化钙溶液, 浸泡螺旋藻 12 h, 藻蓝蛋白纯度达到 1.18。

1.1.7 生物酶法

用生物酶处理细胞壁, 促进胞内物质溶出。TAVANANDI 等[28]用 1%溶菌酶处理螺旋藻, 藻蓝蛋白的纯度为 1.19。超声波辅助酶处理(0.6%溶菌酶, 温度 37 ℃±2 ℃)比单独使用表面活性剂(Triton X-100、Tween 20、Tween 80)和酶提取效率高, 藻蓝蛋白的提取率达到 92.73 mg/g, 纯度达到 1.09。IZADI 等[29]用 100 μg/mL 的溶菌酶处理螺旋藻粉悬浮液 24 h, 粗提液藻蓝蛋白纯度 0.70, 蛋白浓度是 0.23 mg/mL。

1.1.8 脉冲电场法

将细胞暴露在脉冲电场中, 细胞内外形成跨膜电压。造成细胞膜破坏, 从而胞内物质溶出。AKABERI 等[30]用脉冲电场(40 kV/cm, 1 μs)处理在 pH 8 缓冲液中培养的螺旋藻获得粗提液藻蓝蛋白纯度为 0.51。AOUIR 等[31]用脉冲电场和超声波 2 种方法提取藻蓝蛋白, 脉冲电场破壁法提取的藻蓝蛋白纯度(*P*=0.50)比超声波法(*P*=0.44)更高。粗提液中藻蓝蛋白的纯度相较传统提取的低, 但效率更高。

1.1.9 电阻加热法

使用一个适当的电场通过半导体材料提供一个电阻, 直接在材料内部产生热量, 导致膜无序化产生极性模式, 最终导致胞内成分流出。PEDRO 等[32]在室温下通过电阻加热法处理螺旋藻粉溶液, 测得螺旋藻粉藻蓝蛋白含量为(45.54±1.93) mg/g, 比直接加热螺旋藻溶液提取藻蓝蛋白得率高 51%。

候兆乾等[33]比较了冻融法、超声波法单独使用和先冻融再超声组合发现先冻融再超声比单独使用的提取率高 3.07%。俞建峰等[22]比较溶胀法、超细剪切法、超声波法、反复冻融法、溶胀-超细剪切法、溶胀-超细剪切法-超声波法提取藻蓝蛋白, 发现溶胀耦合超细剪切法适合藻蓝蛋白的提取, 提取率可高达 9.22%。一般而言细胞破碎越完全, 藻蓝蛋白溶出率越高, 但螺旋藻细胞鞘多糖等的溶出使后续的藻蓝蛋白分离纯化难度更大。

1.2 提取工艺

1.2.1 提取溶剂

庞晓宇[34]用反复冻融法比较 0.3% (*m*:*V*)Acolectin-CHAPS(AC)缓冲液(pH 6.7)、0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)以及 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0)提取藻蓝蛋白的效果, 其中 AC 缓冲液最高, 磷酸盐缓冲液次之, Tris-HCl 缓冲液最低。KHAZI 等[18]用 1.5%的氯化钙溶液提取藻蓝蛋白, 藻蓝蛋白粗提液的纯度是 1.18。

1.2.2 料液比

WANIDA 等[35]对比了 0.06、0.04、0.02 g/mL 3 个不同料液比提取藻蓝蛋白的实验, 粗提液中藻蓝蛋白的浓度分别是 6.64、4.18、2.19 mg/mL。刘玉环等[36]在 PH 7.0 磷酸钠-柠檬酸缓冲液, 30 ℃条件下, 浸提 1.5 h, 对比料液比 1:20~1:60(*m*:*V*)几个浓度的螺旋藻溶液发现, 当料液比大于 1:50(*m*:*V*)时, 藻蓝蛋白的量($A_{618\,nm}$)增加不显著。料液比高, 粗提液中藻蓝蛋白的浓度高, 但藻蓝蛋白的得率降低; 料液比越低, 蛋白溶解更充分, 藻蓝蛋白的得率越高, 但后续蛋白浓缩和纯化的工作量增加。

1.2.3 离子强度

LI 等[37]发现 NaCl 的离子强度大于 5 g/L 时, 才能更有效地减少同时提取出来的叶绿素。POTT 等[26]比较了 0.1~0.8 mol/L 氯化钙溶液对藻蓝蛋白提取效果的影响, 发现 0.5 mol/L 氯化钙, 0.35 mol/L、pH 6.0 的醋酸盐缓冲液提取效果最好, 该条件下处理 24 h, 藻蓝蛋白溶出达 60%。

1.2.4 pH 值

藻蓝蛋白的聚合状态(单体、三聚体、六聚体或其他寡聚体)与 pH 值有关, pH 7.0 时, 82%的藻蓝蛋白以三聚体形式存在[38]。沈向阳等[15]对比不同 pH(5.0~9.0)缓冲体系对藻蓝蛋白提取的影响, 发现 pH 7.0 时藻蓝蛋白的得率可达 157.75 mg/g。

1.2.5 温 度

蛋白质对温度敏感是一个常识, BÖCKER 等[5]通过差示扫描量热法发现藻蓝蛋白在 50~70 ℃会发生快速的解聚和变性, 藻蓝蛋白三聚体较六聚体更容易变性。WANIDA

等[39]通过对比发现 0.06 g/mL 螺旋藻用 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液在 25、4 和–20 ℃溶胀 12 h, 粗提液中藻蓝蛋白的浓度分别为 7.52、6.25 和 4.06 mg/mL。在合适范围内提高提取温度将有助于藻蓝蛋白提取率的提高。

2　藻蓝蛋白纯化研究进展

螺旋藻粗提液中成分众多, 既包括多糖、蛋白质、矿物盐等, 还包括其他功能性成分(叶绿素、胡萝卜素、维生素、γ-亚麻酸等), 粗提液中的藻蓝蛋白需纯化到一定纯度方可满足不同的需求。常见的藻蓝蛋白纯化方法有盐析沉淀法、膜过滤法、双水相萃取法、自由流电泳法、柱层析法等, 几种纯化方法的联合使用可以获得高纯度藻蓝蛋白。

2.1　盐析沉淀法

低浓度的硫酸铵溶液(饱和度小于 25%)可以沉淀核酸、叶绿素、部分杂蛋白等杂质, 高浓度的硫酸铵溶液(饱和度大于 40%)可以沉淀藻蓝蛋白; 既可以用高浓度硫酸铵溶液一步沉淀藻蓝蛋白, 朱孝晨[40]用 40%饱和度的硫酸铵一步盐析使藻蓝蛋白粗提液纯度比由 0.56 提升至 1.08。也可以用低浓度硫酸铵溶液和高浓度硫酸铵溶液分级多步沉淀纯化藻蓝蛋白, 第一步先除去粗提液中的部分杂质, 第二步收集藻蓝蛋白沉淀。徐润[41]用 10%/40%饱和度的硫酸铵盐析使藻蓝蛋白的纯度比由 0.59 上升至 1.62。沈向阳[42]用 20%/50%饱和度的硫酸铵两步盐析将藻蓝蛋白纯度由 0.3 提升至 2.3。

用硫酸铵纯化藻蓝蛋白时, 藻蓝蛋白溶液中引入的硫酸铵, 为后续的处理带来了麻烦。

2.2　膜过滤法

膜过滤工艺, 已经在水处理、植物提取物、食品加工等领域得到大规模应用, 运用膜过滤法可以获得食品级以上的藻蓝蛋白。

GARCÍA-LÓPEZ 等[20]将藻蓝蛋白粗提液用 0.2 μm 微滤膜过滤后再用 10 kDa 超滤膜过滤, 藻蓝蛋白的纯度由 2.65 提升至 3.72。秦松等[43]用 300~200 kD、100~50 kD 超滤膜分级纯化得到的藻蓝蛋白浓缩液, 纯度 > 1.0。

2.3　双水相萃取法

齐清华等[44]制备螺旋藻粉悬浮液用反复冻融法破壁加双水相(PEG 2000-硫酸镁)萃取, 藻蓝蛋白的纯度由 0.78 提升至 2.64。

朱孝晨[40]纯化藻蓝蛋白时在硫酸铵一步盐析后, 再用 PEG 4000-磷酸盐双水相萃取后, 藻蓝蛋白的纯度由 1.08 提升至 3.47。

双水相萃取法可以有效分离藻蓝蛋白和杂质, 但是双水相物料的成本限制了该方法在工业生产的应用, 且整个体系容易乳化, 不易控制, 另外, 藻蓝蛋白中新引入的杂质为后续分离造成困难。

2.4　自由流电泳

杨莹[24]用两步硫酸铵盐析沉淀藻蓝蛋白粗提液, 然后用自由流电泳(温度 14 ℃, 电压 500 V, 样品流速 200 μL/min)纯化藻蓝蛋白, 藻蓝蛋白纯度由 2.19 提升至 4.60。

2.5　柱层析

沈向阳[42]将两步硫酸铵盐析后纯度为 2.3 的藻蓝蛋白溶液经过二乙氨乙基琼脂糖快速分离(DEAE Tanrose FF)弱阴离子交换色谱纯化, 藻蓝蛋白纯度最高达到 4.0。

邵明飞[45]将藻蓝蛋白粗提液加 1.25 mol/L 的硫酸铵盐析后用 Macro-Prep Methy1 HIC(甲基丙烯酰胺酯疏水柱层析)一步柱层析, 可以使藻蓝蛋白的纯度由 0.506 提升至 4.017。

张晓萌等[46]将 1.0 mg/mL 的藻蓝蛋白粗提液, 采用粉末活性炭和羟基磷灰石柱层析相结合, 可以使藻蓝蛋白的纯度由 0.77 提升至 4.51。

柱层析处理量小, 效率较低, 另外树脂的绿色再生技术面临挑战, 适合于制造高纯度的藻蓝蛋白。

2.6　几种方法混合使用

PUROHIT 等[27]用含 2-吗啉乙磺酸的缓冲液溶胀鲜活螺旋藻, 粗提液经透析后, 藻蓝蛋白的纯度由 0.64 提升至 1.34, 经过 DEAE 柱层析后纯度比达到 6.17。

张发宇[16]用反复冻融加 1.0、1.8 mol/L 的硫酸铵两步盐析使藻蓝蛋白粗提液的纯度比由 0.40 提升至 1.69, 两步盐析后藻蓝蛋白溶液用 PEG/$(NH_4)_2SO_4$ 双水相萃取, 藻蓝蛋白纯度由 1.69 上升至 2.62; 两步盐析的藻蓝蛋白溶液依次通过 CellufineA-500 和 HA 层析, 藻蓝蛋白纯度可以达到 4.59。

3　藻蓝蛋白稳态化研究进展

藻蓝蛋白有液体藻蓝蛋白、藻蓝蛋白粉、藻蓝蛋白片、藻蓝蛋白微胶囊等制剂形式。藻蓝蛋白生理活性的维持与其存在状态密切相关。目前提高藻蓝蛋白理化稳定性的方法有调节 pH、添加稳定剂或防腐剂、制作藻蓝蛋白微胶囊或纳米颗粒等。

3.1　调节 pH

齐清华等[44]发现纯度 0.78 的藻蓝蛋白溶液在低温条件下储存较稳定, > 40 ℃后稳定性迅速下降, 在 pH 4~7 时稳定性较好, pH 5 时稳定性最好, 避光放置 7 h 藻蓝蛋白吸光度无变化。

3.2　添加稳定剂或防腐剂

徐润等[47]发现藻蓝蛋白溶液在中性条件下, 低于

40 ℃避光保存时, 添加葡萄糖、氯化钠和山梨酸钾后放置 72 h, 藻蓝蛋白的保存率分别提高 53.4%、31.7%和 35.7%。

WANIDA 等[39]通过对比 1 mg/mL 的藻蓝蛋白液含 0.4%的柠檬酸和不含柠檬酸的 2 种溶液, 在 80 ℃条件下放置 1 h 后, 加入柠檬酸的藻蓝蛋白溶液藻蓝蛋白浓度从 65%下降到 19%, 不含柠檬酸的溶液藻蓝蛋白浓度从 51%下降到 11%。

FAIETA 等[48]通过分光光度法和圆二色谱法研究糖对藻蓝蛋白稳定性的影响, 发现随着保存时间的延长藻蓝蛋白溶液的颜色逐渐损失、结构不稳定, 加入蔗糖的藻蓝蛋白溶液, 藻蓝蛋白更稳定性, 藻蓝蛋白在 65 ℃条件下存放 1 h 在 70%浓度的蔗糖溶液比 20%和 40%的蔗糖溶液更稳定藻蓝蛋白。

3.3 微胶囊化

SCHMATZ 等[49]用电雾化来制作藻蓝蛋白胶囊, 保护藻蓝蛋白的活性, 做成的 PC-PVC(藻蓝蛋白-聚乙烯醇)超细颗粒可以把藻蓝蛋白的耐受温度提高到 216 ℃, 同时 DPPH 清除率由藻蓝蛋白的 27%降低到微胶囊的 9.2%。

FAIETA 等[50]利用纯海藻糖/海藻糖和麦芽糊精混合粉、藻蓝蛋白(含量 0.5%)用冻干法、喷雾干燥法制作藻蓝蛋白微胶囊。发现用冻干法制备的微胶囊, 藻蓝蛋白含有率 89%, 喷雾干燥法藻蓝蛋白 77%, 海藻糖含量越多, 对藻蓝蛋白的保护作用好。将藻蓝蛋白微胶囊放置在 80 ℃条件下 1 h, 冻干法微胶囊中的藻蓝蛋白降为原来的 64%, 喷雾干燥法藻蓝蛋白降至原来的 90%。

GUSTININGTYAS 等[51]用可溶性壳聚糖纳米粒子制作藻蓝蛋白微胶囊, 当壳聚糖和藻蓝蛋白质量比 1:0.75 时, 藻蓝蛋白微胶囊可以在 50 ℃保存 90 min 在 620 nm 处的光吸收基本不变。

3.4 化学修饰

MUNAWAROH 等[52]用甲醛修饰藻蓝蛋白, 藻蓝蛋白-甲醛复合物的最大吸收波长移至 611 nm, 暴露在黄色光下 5 h, 藻蓝蛋白-甲醛复合物在 612 nm 处光吸收减少了 3.95%, 藻蓝蛋白在 620 nm 处的光吸收减少了 5.71%; 经甲醛修饰过的藻蓝蛋白较未经修饰的藻蓝蛋白稳定; 但在白光和 UV-A(320~400 nm)下不稳定。

欧瑜等[53]用聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)修饰藻蓝蛋白, 当聚乙二醇与藻蓝蛋白摩尔比为 5 时, 藻蓝蛋白修饰率为 55%, 在大鼠体内做模拟实验, 发现 PEG-PC 和 PC 半衰期分别为(1366±55) min 和(817±42) min。

一般来说, 粉末藻蓝蛋白比液体藻蓝蛋白稳定, 微胶囊化藻蓝蛋白和化学修饰的藻蓝蛋白更稳定。目前的藻蓝蛋白一般包括液体藻蓝蛋白和粉体藻蓝蛋白两类剂型, 粉体藻蓝蛋白一般是通过喷雾干燥工艺或冷冻干燥工艺制作而成, 产品中的主要辅料有海藻糖、葡萄糖和麦芽糊精等。

4 结束语

近年来, 藻蓝蛋白的提取分离取得了一定进展, 但仍存在生产效率偏低、能耗偏高等现象。螺旋藻的高效破壁技术和藻蓝蛋白特异性纯化技术仍需研究和发掘。藻蓝蛋白自身的不稳定特性在一定程度上限制了其在下游产业的应用。藻蓝蛋白稳态化与活性保持技术更多地仍集中于藻蓝蛋白配料的稳定性, 稳态化后的藻蓝蛋白配料在食品中应用的稳定性仍有待深入研究, 以便使藻蓝蛋白的精深加工和应用得到进一步发展。

参考文献

[1] 潘子康, 胡丽莉. 螺旋藻的化学成分、生物学活性和应用范围的研究概述[J]. 生物学教学, 2020, 45(2): 2–3.
PAN ZK, HU LL. Review on the chemical composition, biological activity and application of *Spirulina* [J]. Biol Teach, 2020, 45(2): 2–3.

[2] HSIEH LM, CASTILLO G, MOJICA L, *et al*. Phycocyanin and phycoerythrin: Strategies to improve production yield and chemical stability [J]. Algal Res, 2019, 42: 101600.

[3] KANNAUJIYA VK, SINHA RP. Thermokinetic stability of phycocyanin and phycoerythrin in food-grade preservatives [J]. J Appl Phycol, 2016, 28: 1063–1070.

[4] 吕平平, 李传茂, 杨登亮, 等. 螺旋藻藻蓝蛋白稳定性的实验研究[J]. 广东化工, 2019, 46(5): 60–61.
LV PP, LI CM, YANG DL, *et al*. Experimental study on the stability of phycocyanin in *Spirulina* [J]. Guangdong Chem Ind, 2019, 46(5): 60–61.

[5] BÖCKER L, HOSTETTLER T, DIENER M, *et al*. Time-temperature-resolved functional and structural changes of phycocyanin extracted from *Arthrospira platensis*/*Spirulina* [J]. Food Chem, 2020, 316: 126374.

[6] 陈旭辉. pH 对藻蓝蛋白乳化性质的影响[J]. 现代食品科技, 2020, 36(9): 117–125
CHEN XH. Effect of pH on the emulsifying activity of C-phycocyanin [J]. Mod Food Sci Technol, 2020, 36(9): 117–125.

[7] 闫燕, 郝帅, 李爽, 等. 藻蓝蛋白对肺癌 LTEP-a-2 细胞的体外功能[J]. 中国食品学报, 2018, 18(8): 24–32.
YAN Y, HAO S, LI S, *et al*. *In vitro* function of phycocyanin on lung cancer LTEP-a-2 cells [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2018, 18 (8): 24–32.

[8] KEFAYAT A, GHAHREMANI F, SAFAVI A, *et al*. C-phycocyanin: A natural product with radio sensitizing property for enhancement of colon cancer radiation therapy efficacy through inhibition of COX-2 expression [J]. Sci Report, 2019, 9(1): 19161.

[9] 刘琪, 李文军, 陆丽娜, 等. 藻蓝蛋白对辐射致小鼠氧化损伤的保护作用[J]. 核技术, 2018, 41(1): 1–6.
LIU Q, LI WJ, LU LN, *et al*. Protective effect of phycocyanin on radiation-induced oxidative damage in mice [J]. Nuclear Technol, 2018, 41 (1): 1–6.

[10] 梅邢, 王广, 程超, 等. 五种不同纯度藻蓝蛋白的抗氧化特性[J]. 食品科学, 2020, DOI: 10.7506/spkx1002-6630-20200209-059.
MEI X, WANG G, CHENG C, *et al*. Studies on the antioxidant properties of five different phycocyanins with different purity [J]. Food Sci, 2020,

DOI: 10.7506/spkx1002-6630-20200209-059.

[11] LIU Q, LI W J, LU L, *et al*. Phycocyanin attenuates X-ray-induced pulmonary inflammation via the TLR2-MyD88-NF-κB signaling pathway [J]. J Oceanol Limnol, 2019, 37(5): 1678–1685.

[12] 赵小霞, 邱丽君, 宣成睿, 等. 螺旋藻藻蓝蛋白亚基的提取和免疫活性研究[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2016, 22(2): 156–160.
ZHAO XX, QIU LJ, XUAN CR, *et al.* Extract of phycocyanin subunits and immunological activity [J]. Chin J Surg Integr Tradit Western Med, 2016, 22(2): 156–160.

[13] MOHAMMED S A, HANAN A, SUNIPA M, *et al*. C-phycocyanin attenuates RANKL induced osteoclastogenesis and bone resorption *in vitro* through inhibiting ROS levels, NFATc1 and NF-κB activation [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 2513.

[14] KISSOUDI M, SARAKATSIANOS I, SAMANIDOU V. Isolation and purification of food-grade C-phycocyanin from *Arthrospira platensis* and its determination in confectionery by HPLC with diode array detection [J]. J Sep Sci, 2018, 41(4): 975−981.

[15] 沈向阳, 梁霄, 付云, 等. 钝顶螺旋藻藻蓝蛋白的提取工艺研究[J]. 现代食品科技, 2019, 35(7): 198−204, 136.
SHEN XY, LIANG X, FU Y, *et al*. Study of the extraction process of phycocyanin from *Spirulina platensis* [J]. Mod Food Sci Technol, 2019, 35(7): 198−204, 136.

[16] 张发宇. 试剂级藻蓝蛋白提取纯化工艺研究及光谱分析[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2016.
ZHANG FY. Study on extraction and purification technology of reagent grade phycocyanin and spectral analysis [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2016.

[17] RAY K, MUKHERJEE C. An improved method for extraction and quantification of polyphosphate granules from microbial cells [J]. Protocol Exchange, 2015, 7(1): 67.

[18] KHAZI MI, DEMIREL Z, DALAY MC. Evaluation of growth and phycobiliprotein composition of *Cyanobacteria* isolates cultivated in different nitrogen sources [J]. J Appl Phycol, 2018, 30: 1513−1523.

[19] WICAKSONO HA, SATYANTINI WH, MASITHAH ED. The spectrum of light and nutrients required to increase the production of phycocyanin *Spirulina platensis* [J]. IOP Conf Series Earth Environ Sci, 2019, 236, DOI: 10.1088/1755-1315/236/1/012008.

[20] GARCÍA-LÓPEZ DA, OLGUÍN EJ, GONZÁLEZ-PORTELA RE, *et al*. A novel two-phase bioprocess for the production of *Arthrospira* (*Spirulina*) maxima LJGR1 at pilot plant scale during different seasons and for phycocyanin induction under controlled conditions [J]. Bioresource Technol, 2020, 298: 122548.

[21] NOURI E, ABBASI H, RAHIMI E. Effects of processing on stability of water- and fat-soluble vitamins, pigments (C-phycocyanin, carotenoids, chlorophylls) and colour characteristics of *Spirulina platensis* [J]. Qual Assur Saf Crop, 2018, 10(4): 335−349.

[22] 俞建峰, 傅剑, 马潇, 等. 细胞破壁对螺旋藻藻蓝蛋白提取效果的影响[J]. 食品与机械, 2017, 55(5): 173−177.
YU JF, FU J, MA X, *et al*. Comparison of cell disruption methods for the extraction of phycocyanin from *Spirulina platensis* [J]. Food Mach, 2017, 55(5): 173−177.

[23] MARI CR, MARJORIE J, ELENA M. Rapid green extractions of C-phycocyanin from *Arthrospira maxima* for functional applications [J]. J Appl Phycol, 2019, 9(10), 1987.

[24] 杨莹. 自由流电泳快速分离纯化藻蓝蛋白的方法学研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2016.
YANG Y. Methodological research about fast separation and purification of phycocyanin via free flow electrophoresis [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2016.

[25] CHEN KH, WANG SS, SHOW PL, *et al*. A rapid and efficient technique for direct extraction of C-phycocyanin from highly turbid *Spirulina platensis* algae using hydrophobic interaction chromatography in stirred fluidized bed [J]. Biochem Eng J, 2018, 140: 47−56.

[26] POTT RWM. The release of the blue biological pigment C-phycocyanin through calcium-aided cytolysis of live *Spirulina* sp. [J]. Color Technol, 2018, 135(1): 17−21.

[27] PUROHIT A, KUMAR V, CHOWNK M, *et al*. Processing-independent extracellular production of high purity C-phycocyanin from *Spirulina platensis* [J]. ACS Biomater Sci Eng, 2019, 5(7): 3237−3245.

[28] TAVANANDI HA, RAGHAVARAO KSMS. Ultrasound-assisted enzymatic extraction of natural food colorant C-phycocyanin from dry biomass of *Arthrospira platensis* [J]. LWT-Food Sci Technol, 2020, 118: 108802.

[29] IZADI M, FAZILATI M. Extraction and purification of phycocyanin from *Spirulina platensis* and evaluating its antioxidant and anti- inflammatory activity [J]. Asian J Green Chem, 2018, 2(4): 364–379.

[30] AKABERI S, KRUST D, MÜLLER G, *et al*. Impact of incubation conditions on protein and C-phycocyanin recovery from *Arthrospira platensis* post-pulsed electric field treatment [J]. Bioresource Technol, 2020, 306: 123099.

[31] AOUIR A, AMIALI M, KIRILOVA-GACHOVSKA T, *et al*. The effect of pulsed electric field (PEF) and ultrasound (US) technologies on the extraction of phycobiliproteins from *Arthrospira platensis* [C]//. Ottawa: Canada IEEE International Humanitarian Technology Conference, 2015.

[32] PEDRO FS, RAFAELA N, CRISTINA MR. Influence of thermal and electrical effects of ohmic heating on C-phycocyanin properties and biocompounds recovery from *Spirulina platensis* [J]. LWT-Food Sci Technol, 2020, 128: 109491.

[33] 候兆乾, 刘鑫阳, 史超, 等. 冻融法和超声破碎法提取螺旋藻中藻蓝蛋白的工艺研究[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 2017, 38(2): 69−75.
HOU ZQ, LIU XY, SHI C, *et al*. The research of extraction procedure by using method of freezing-thawing and ultrasonic broken frocess to extract phycocyanin from *Spirulina algae* [J]. J Inner Mongolia Agric Univ (Nat Sci Ed), 2017, 38(2): 69−75.

[34] 庞晓宇. 藻蓝蛋白提取方法比较研究及其在遥感中的应用[D]. 西安: 西北大学, 2013.
PANG XY. Study and comparison of the extraction methods of phycocyanin and it's applicationin remote sensing [D]. Xi'an: Northwest University, 2013.

[35] WANIDA PU, WAREERAT K, SIRILUCK I. Extraction of C-phycocyanin from *Arthrospira* (*Spirulina*) and its thermal stability with citric acid [J]. J Appl Phycol, 2017, 30: 231−242.

[36] 刘玉环, 李彩霞, 李冬莲. 真空冷冻干燥后藻蓝蛋白提取工艺及稳定性的研究[J]. 中国食物与营养, 2016, 22(9): 51−55.
LIU YH, LI CX, LI DL. Extraction technology and stability of

phycocyanin from *Spirulina maxima* by vacuum freeze-drying [J]. Food Nutr Chin, 2016, 22(9): 51−55.

[37] LI Y, ZHANG Z, PACIULLI M, *et al*. Extraction of phycocyanin—A natural blue colorant from dried spirulina biomass: Influence of processing parameters and extraction techniques [J]. J Food Sci, 2020, 85(3): 727−735.

[38] AFTARI RV, REZAEI K, MORTAZAVI A, *et al*. The optimized concentration and purity of *Spirulina platensis* C-phycocyanin: A comparative study on microwave-assisted and ultrasound-assisted extraction methods [J]. J Food Proc Preserv, 2016, 39(6): 3080−3091.

[39] WANIDA PU, SIRILUCK I. Physical extraction and extrusion entrapment of C-phycocyanin from *Arthrospira platensis* [J]. J King Saud Univ Sci, 2019, 31: 1535–1542.

[40] 朱孝晨. 钝顶螺旋藻藻蓝蛋白与多糖的制备及生物活性[D]. 烟台: 烟台大学, 2018.
ZHU XC. Preparation of C-phycocyanin and Polysaccharides from *Spirulina platensis* and their biological activities [D]. Yantai: Yantai University, 2018.

[41] 徐润. 钝顶螺旋藻藻蓝蛋白储存稳定性研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2017.
XU R. Research of the storage stability of phycocyanin from *Spirulina platensis* [D]. Tianjin: Journal of Tianjin University of Science & Technology, 2017.

[42] 沈向阳. 钝顶螺旋藻藻蓝蛋白的提取纯化精制研究及应用[D]. 南宁: 广西大学, 2019.
SHEN XY. Study on extraction and purification of phycocyanin from *Spirulina platensis* and it's application [D]. Nanning: Guangxi University, 2019.

[43] 秦松, 刘冰, 闫明艳, 等. 一种食品级藻蓝蛋白及其制备方法: 中国, CN 101942014 A[P]. 2011-01-12.
QIN S, LIU B, YAN MY, *et al*. The way of produce a food grade phycocyanin: China, CN 101942014 A [P]. 2011-01-12.

[44] 齐清华, 陈宇熹, 叶舟. 双水相法分离螺旋藻藻蓝蛋白与多糖[J]. 武夷科学, 2015, 31: 154–160.
QI QH, CHEN YX, YE Z. The extraction of C-phycocyanin and polysaccharides from *Spirulina* using aqueous two-phase system [J]. Wuyi Sci J, 2015, 31: 154–160.

[45] 邵明飞. 螺旋藻藻蓝蛋白的分离纯化及食品级藻蓝蛋白中试制备技术研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2013.
SHAO MF. Study on extraction and purification of phycocyanin and pilot preparation technology of food grade phycocyanin from *Arthrospira* (*Spirulina*) platensis [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2013.

[46] 张晓萌, 张发宇, 汪家权, 等. 粉末活性炭联合柱层析法纯化藻蓝蛋白的研究[J]. 安徽农业大学学报, 2020, 47(4): 554–558.
ZHANG XM, ZHANG FY, WANG JQ, *et al*. Extraction and purification of C-phycocyanin from blue algae by combined use of powdered activated carbon treatment and column chromatography [J]. J Anhui Agric Univ, 2020, 47(4): 554–558.

[47] 徐润, 陈野, 孙平. 钝顶螺旋藻藻蓝蛋白储存稳定性研究[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(12): 25–30.
XU R, CHEN Y, SUN P. The research of the storage stability of phycocyanin from *Spirulina platensis* [J]. Food Res Dev, 2017, 38(12): 25–30.

[48] FAIETA M, NERI L, SACCHETTI G, *et al*. Role of saccharides on thermal stability of phycocyanin in aqueous solutions [J]. Food Res Int, 2020, 132: 1–9.

[49] SCHMATZ DA, MASTRANTONIO DJDS, COSTA JVA. Encapsulation of phycocyanin by electrospraying: A promising approach for the protection of sensitive compounds [J]. Food Bioprod Proc, 2020, 119: 206–215.

[50] FAIETA M, CORRADINI MG, MICHELE AD, *et al*. Effect of encapsulation process on technological functionality and stability of *Spirulina platensis* extract [J]. Food Biophy, 2020, 15(1): 50–63.

[51] GUSTININGTYAS A, SETYANINGSIH I, HARDININGTYAS SD, *et al*. Improvement stability of phycocyanin from *Spirulina platensis* encapsulated by water soluble chitosan nanoparticles [J]. IOP Conf Seri, 2020, 414(1): 012005.

[52] MUNAWAROH HSH, GUMILAR GG, SHOW PL. Photostabilization of phycocyanin from *Spirulina platensis* modified by formaldehyde [J]. Proc Biochem, 2020, 94: 297–304.

[53] 欧瑜, 高冰, 马鹏. 聚乙二醇修饰的藻蓝蛋白及其制备方法与制药应用: 中国, CN 109535247 A [P]. 2019-03-29.
OU Y, GAO B, MA P. Preparation and pharmaceutical application of modified phycocyanin by polyethylene glycol: China, CN 109535247 A [P]. 2019-03-29.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介

姜国庆, 硕士, 工程师, 主要研究方向为功能配料研究。
E-mail: j123gq@163.com

许洪高, 博士, 研究员, 主要研究方向为功能食品及配料研究。
E-mail: zgndxhg@163.com