

藻蓝蛋白色素稳定性及其递送体系研究进展

李奇科^{1,2}, 高彦祥^{1*}

(¹ 中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083

² 美国康奈尔大学食品科学系 纽约 14853)

摘要 藻类作为一类具有经济价值的养殖对象,在世界范围内广泛培养。藻类藻胆体中的光能色素——藻蓝蛋白以天然的蓝色、广泛的生理功能特性而受到越来越多的关注,其抗炎、抗肿瘤、抗氧化、免疫调节等生理功能已被充分验证。然而,纯化的藻蓝蛋白水溶后易发生沉淀或解离,对温度、pH 值、光照、离子等环境因素表现出较强的敏感性。在其色泽稳态方面,通过颗粒、乳液等纳米结构提高藻蓝蛋白的稳定性,从而在食品加工、生产和储运等过程中保持稳定。在其活性保持方面,通过对藻蓝蛋白进行物理、化学改性,或通过构建纳米载体递送藻蓝蛋白,以提高藻蓝蛋白的生物可利用度。此外,藻蓝蛋白具备荧光大分子的特性,在纳米壁材、金属纳米颗粒、荧光探针等领域有较大的应用空间。本综述对现有研究成果进行归纳总结,为藻蓝蛋白的开发利用提供参考。

关键词 藻蓝蛋白; 物理化学稳定性; 生理活性; 纳米递送; 光反应蛋白

文章编号 1009-7848(2022)09-0349-16 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.09.036

钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis* or *Arthrospira platensis*)在世界范围内规模化养殖,作为功能因子、药物、荧光物质的来源^[1]有很大的经济和开发潜力。在其干物质中,蛋白质占 55%~70%,藻胆蛋白(Phycobiliprotein)在总蛋白质中占 15%~20%^[2],主要以藻蓝蛋白(Phycocyanin, PC)形式存在。藻蓝蛋白在藻类生物中是一类吸收传递光能的色素蛋白,吸收橙黄色光而表现出天然的亮蓝色,最大吸收峰在波长 620 nm 左右。利用藻蓝蛋白水溶特性,将微藻细胞破碎后通过盐析、萃取或色谱法进行工业化生产,得到纯化藻蓝蛋白,蛋白纯度根据吸光度 $A_{620\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 比值划分为食品级(≥ 0.7)、反应级(≥ 3.9)和分析级(≥ 4.0)^[3]。

1 藻蓝蛋白简介

藻蓝蛋白在微藻细胞中以组装的藻胆体(Phycobilisome, PBS)形式存在,藻胆体吸收的光能依次通过藻红蛋白(Phycocerythrin, PE)、藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白(Allophycocyanin, APC)传递,到达反应中心光系统 I 和 II^[4]。藻蓝蛋白二级结构以 α -螺旋为主,占 60%以上^[5],其高级结构由 $(\alpha\beta)$ 异

二聚体单元组装而成, α -亚基分子质量 12~19 ku,含 2 个半胱氨酸残基和 2 个甲硫氨酸残基; β -亚基分子质量 14~21 ku,含 3 个半胱氨酸残基和 5 个甲硫氨酸残基,生理条件下 $(\alpha\beta)_3$ 环状三聚体和 $(\alpha\beta)_6$ 环状六聚体为藻蓝蛋白的主要存在形式^[6]。六聚体分子质量约为 104 ku。 $\alpha\beta$ 亚基间通过 α -螺旋介导相互作用结合,藻蓝蛋白分子构象中发色团称为藻蓝素,是一种线性四吡咯(卟啉)化合物,通过硫醚键与脱辅基蛋白链上半胱氨酸残基连接,连接位点一般在 α -84、 β -84 和 β -155^[7],作为亲水蛋白,水分子可进一步稳定藻蓝蛋白的发色团构型,稳定发色团与半胱氨酸残基的相互作用。

藻蓝蛋白具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化、免疫调节等多种生理功能^[8-10],其抗肺癌活性、抗黑色素瘤活性、抗结肠癌活性、抗肝癌活性已有大量研究报道^[11]。工业制备食品级藻蓝蛋白,将逐步发展成为便捷且低成本的技术。将藻蓝蛋白用作功能性食品或食品配料的前景十分广阔。然而,藻蓝蛋白稳定性易受温度、pH 值、光照、离子等因素影响,对加工处理条件十分敏感,如巴氏杀菌、调酸和氧化反应易使其沉淀或解离而导致降解,蓝色失去稳定性,最终导致其在食品工业中的应用受到限制。

Kupka 等^[12]通过提高体系中尿素浓度,诱导藻蓝蛋白六聚体发生单体化,直到失去其二级结构。

收稿日期: 2021-09-23

作者简介: 李奇科(1998—),男,博士生

通信作者: 高彦祥 E-mail: gyxcau@126.com

该研究分析此过程中藻蓝素分子构型与藻蓝蛋白高级结构变化的关系,探明了藻蓝蛋白三聚体($\alpha\beta$)₃在解聚并部分展开后,其发色团开始失去发色作用,直至蛋白质二级结构全部丧失的过程。Ma等^[13]报道天然藻蓝蛋白中 β -亚基的折叠和展开经历三步可逆的构象变化,以 β -亚基的重新折叠为例:四吡咯发色团首先由螺旋构型转变为延伸构型;通过氢键和疏水相互作用,发色团以更为刚性的结构固定在 β -亚基上,导致荧光出现线性增加;亚基间相对运动使两个发色团更接近或平行,发色团的荧光特性得到提升。Tong等^[14]应用3种蛋白酶对藻蓝蛋白进行酶切,生成残基数小于63的肽段,进而分析四吡咯发色团和脱辅基蛋白间结合位点与分子构型改变对藻蓝蛋白色泽的影响。另外,在藻蓝蛋白热稳定性评价中,许多文献报道“超色现象”的发生^[5,12],即热处理开始最初几分钟吸光度增加,随后开始下降的现象。这一现象反映蛋白质结构的改变,在天然蛋白质开始变性和聚集前,其构象改变、中间亚基变性,导致芳香基团暴露和发色团位点偏移。

对于藻蓝蛋白的应用,Nourmohammadi等^[15]尝试利用海藻酸盐和乳清蛋白包埋钝顶螺旋藻(*Arthrospira platensis*),将之作为功能成分和色素加入脱脂酸乳中。壁材间通过静电相互作用实现对钝顶螺旋藻的有效包埋,并在模拟胃肠道消化中实现全部释放,提高了生物可利用度,有利于乳酸菌在人体肠道中定植。Dev等^[16]将卡拉胶和藻蓝蛋白结合,制备一种止血凝胶。此种水凝胶显示均匀分布的大孔结构,具有良好的生物相容性,允许营养物质在伤口愈合部位的转运和气体交换,从而促进细胞增殖与伤口愈合。此外,如表1所示,还有大量报道将藻蓝蛋白或作为其原料的钝顶螺旋藻加入食品基质,藻蓝蛋白其天然的蓝色赋予产品纯净的色泽以及一定的抗氧化特性。尽管如此,对藻蓝蛋白功能特性和着色潜力的应用开发仍需继续,藻蓝蛋白的色素稳定性仍有优化空间。面对目前全球快速增长的天然色素市场,藻蓝蛋白已有大量专利,在医学领域的应用也得到较快发展^[17]。在此背景下,开发基于藻蓝蛋白的蓝色色素及其作为活性成分的递送体系,具有广阔的应用前景。

2 藻蓝蛋白色素的应用

食物中蓝色给人新鲜清凉的印象,而自然界中蓝色物质的稀缺性使藻蓝蛋白成为食品工业中天然蓝色来源的有限选择之一^[31]。人工养殖藻类使获取藻蓝蛋白提取物变得经济而便利。在一步培养法、两步培养法的基础上,Chentir等^[2]通过施以环境压力改变代谢物质积累,减少生物消耗,使藻蓝蛋白产量达230.1 mg/g干物质,实现较大的提升。目前,我国允许在食品中添加的蓝色素有人工合成的靛蓝和亮蓝(及其色淀),以及天然来源的栀子蓝和藻蓝(藻蓝蛋白)^[32]。此外,某些花青素在一定条件下也可作为食品的蓝色着色剂使用。

在水中或磷酸盐缓冲液中,纯化藻蓝蛋白难以长时间保持稳定状态,随着藻蓝蛋白亚基的不断解聚,聚集形式从($\alpha\beta$)₆六聚体转变为($\alpha\beta$)₃三聚体,再转变为($\alpha\beta$)单体。当原有藻蓝蛋白解离形成动态平衡后,混合物的量子产率(藻蓝蛋白在光能输送中吸收和传导的光量子与荧光激发相关,用于评价纯化藻蓝蛋白的变性情况)降低到原有的50%^[33]。当其低浓度(<30 mmol/L)溶于稀磷酸盐缓冲液时, ($\alpha\beta$)单体占主导地位,松散的结构使发色团以较高的构象自由度存在,基于其共轭平面的荧光量子产率降低,导致体系的吸光度不断降低^[12,34],呈现出“漂白”的现象。Gustiningtyas等^[35]引入三聚磷酸钠,使藻蓝蛋白与水溶性壳聚糖(壳寡糖)在pH 7介质中实现分子交联,筛选出藻蓝蛋白与壳寡糖以质量比3:4结合时具有最小粒径和最高的热稳定性,在50℃条件下保温90 min仍无明显色泽变化。Selig等^[36]通过与多糖的结合提高藻蓝蛋白色泽稳定性,评估甜菜果胶、瓜尔豆胶和可溶性大豆多糖对藻蓝蛋白热稳定性和蛋白酶处理中水解稳定性的增强作用。以柠檬酸盐缓冲液为介质,在搅拌条件下实现藻蓝蛋白与多糖的结合,研究表明甜菜果胶稳定的藻蓝蛋白颗粒具有较大的Zeta电位,这一体系的加工后色差值 ΔE 最小,在热处理和蛋白酶处理中有更好的稳定性。

在此基础上,Zhang等^[37]利用乳清蛋白在pH 3介质中转为透明的特性,分析乳清蛋白提高藻蓝蛋白酸稳定性的能力,并进一步评价乳清蛋白中 α -乳白蛋白 β -乳球蛋白、牛血清白蛋白、免疫

表1 藻蓝蛋白及钝顶螺旋藻在食品中应用的典型案例

食品类别	目标产品	藻蓝蛋白/生物质来源	藻蓝蛋白/生物质添加量及性质	食品基质	其它稳定剂	产品特性	参考文献
乳及乳制品	营养强化干酪	钝顶螺旋藻 (<i>Arthrospira platensis</i>)	钝顶螺旋藻 0.3%~0.8%	灭菌乳 (接种嗜酸乳杆菌和嗜酸乳球菌)	-	蓝色色调,质地改良,铁离子强化,益生菌活性提升	2016 ^[8]
	藻蓝蛋白发醇乳	钝顶螺旋藻 (<i>Arthrospira platensis</i>)	藻蓝蛋白 2%~8%	脱脂发酵乳	-	蓝色色调,酸乳质地提升,生理活性增效	2019 ^[9]
	蓝色炼乳	肥鱼腥藻分离株 PUPCCC 410.5 (<i>Anabaena fertilissima</i> PUPC-CC 410.5)	藻蓝蛋白 0.1%纯度 3.28	市售炼乳	-	抗氧化活性提升,避光保存使藻蓝蛋白半衰期达 110 d	2019 ^[20]
冷冻饮品	蓝色脱脂乳	念珠藻分离株 LLC-10 / CAQ-15 (<i>Nostoc sp.</i> LLC-10 / CAQ-15)	藻蓝蛋白 0.12%	脱脂乳	-	蓝色色调,超高温处理下损失有限,感官测试得分较脱脂乳提升	2020 ^[21]
	螺旋藻发醇乳	钝顶螺旋藻 (<i>Arthrospira platensis</i>)	钝顶螺旋藻 0.5%	脱脂发酵乳	海藻酸钠、乳清蛋白、吐温 80	蓝绿色色调,营养强化,可实现微藻递送,藻类异味掩蔽效果好	2020 ^[15]
	蓝色冰淇淋	钝顶螺旋藻分离株 LEB-52 (<i>Arthrospira platensis</i> LEB-52)	藻蓝蛋白 2.5% 纯度 1.1	乳、蔗糖、奶油、乳粉	-	蓝色色调,抗氧化活性提升	2020 ^[22]
可可制品,巧克力制品及糖果	蓝色糖果	钝顶螺旋藻 (<i>Arthrospira platensis</i>)	藻蓝蛋白 0.36% 纯度 1.52	软糖、硬糖、软糖糖衣	-	亮蓝色色调,光敏蛋白需避光包装	2005 ^[23]
	蓝色果冻	钝顶螺旋藻 (<i>Arthrospira platensis</i>)	微囊化藻蓝蛋白 1%~5%	海藻提取物、蔗糖	麦芽糊精、海藻酸钠	亮蓝色色调	2018 ^[24]
粮食及粮食制品	营养强化意大利面	钝顶螺旋藻 (<i>Arthrospira platensis</i>)	钝顶螺旋藻 1%~15%	车前子胶质、米粉	-	营养强化,抗氧化活性提升	2020 ^[25]
	营养强化曲奇	钝顶螺旋藻分离株 F&M-C256 (<i>Arthrospira platensis</i> F&M-C256)	钝顶螺旋藻 2%~6%	面粉、蔗糖、黄油	-	蓝绿色色调,抗氧化活性及总酚含量提升	2017 ^[26]

(续表 1)

食品类别	目标产品	藻蓝蛋白/生物质来源	藻蓝蛋白/生物质添加量及性质	食品基质	其它稳定剂	产品特性	参考文献
营养强化饼干	营养强化饼	钝顶螺旋藻分离株 F&M-C256 (<i>Arthrospira platensis</i> F&M - C256)	钝顶螺旋藻 2%~6%	通用小麦粉 T55、植物油	氯化钠、蔗糖	蓝绿色色调,质地改良,抗氧化活性及蛋白质含量提升	2019 ^[27]
				营养强化面包片	钝顶螺旋藻分离株 F&M-C256 (<i>Arthrospira platensis</i> F&M - C256)	藻蓝蛋白 6% 纯度 1.5	酸面团、面粉、植物油
水产及其制品	鱼肉汉堡饼	钝顶螺旋藻 (<i>Arthrospira platensis</i>)	钝顶螺旋藻 0.5%~1.5%	鱼肉糜	氯化钠、淀粉	营养强化, 抑菌及抗氧化活性提升	2019 ^[29]
饮料	益生菌饮料	钝顶螺旋藻分离株 F&M-C256 (<i>Arthrospira platensis</i> F&M - C256)	钝顶螺旋藻 5%	植物乳杆菌发酵液	-	抗氧化活性及总酚含量提升	2019 ^[30]

球蛋白和糖巨肽提高藻蓝蛋白热稳定性的能力,结果表明:天然且完整的乳清蛋白对藻蓝蛋白提供最佳的保护作用,以 10%乳清蛋白稳定的 3%藻蓝蛋白体系具有在酸性饮料中应用的潜力,但其缺陷在于无法将藻蓝蛋白热稳定性提至食品工业生产应用水平。在 80 °C 条件下,受热后的藻蓝蛋白亮度减弱,颜色开始变绿。另外,Zhang 等^[38]还使用高压技术促进藻蓝蛋白与乳清蛋白、卡拉胶结合,研究表明:经 450 MPa 和 600 MPa 高静压处理后,藻蓝蛋白和藻蓝蛋白-卡拉胶体系的分子结构、荧光特性发生变化,在酸性到中性介质中的稳定性均得到改善,热稳定性增强,藻蓝蛋白在光照下贮藏稳定性显著提高。进一步研究发现:当乳清蛋白以 0.1%质量分数加入同等含量的藻蓝蛋白时,乳清蛋白对于藻蓝蛋白体系的护色效果最为显著。经夏日伊萨卡的阳光直射 5 d 后,含有 0.1%乳清蛋白的藻蓝蛋白分散体系保留了最多的蓝色色调^[39]。

除与多糖和蛋白结合外,有研究使用十二烷基硫酸钠胶束稳定藻

蓝蛋白的蓝色色泽^[40]。对其稳定机制的分析表明:十二烷基硫酸钠通过疏水作用结合于胶束内部,稳定藻蓝蛋白中占据主导的螺旋结构,从而稳定藻蓝蛋白的非质子化(蓝色)形式,防止其在低 pH 值下转变为质子化(绿色)形式。然而,十二烷基硫酸钠未被列入食品添加剂使用标准中,且形成胶束所需十二烷基硫酸钠浓度使食品带有去污剂的味道,使消费者难以接受。在 Marie 等^[41]发表的专利中,描述了使用水/油/水三重乳液结构实现藻蓝蛋白的递送,此项应用虽可保持内相中色素的相对稳定,但缺陷在于需要大量的封装材料,导致终产品中藻蓝蛋白占比非常低。此外,这种蓝色递送体系不具备良好的透明度,限制其在水基食品中的应用。同样,Batista 等^[42]报道:藻蓝蛋白与叶黄素被分别添加在水包油乳液中的水相与油相中,其稳定的分散状态和抗氧化特性在高脂食品中有较大应用价值,如蛋黄酱。

3 藻蓝蛋白在纳米递送体系中的应用

3.1 小分子物质稳态藻蓝蛋白

如前文所述,为保护藻蓝蛋白所具有的抗炎、抗肿瘤、抗氧化、免疫调节等生理功能,可添加小分子提高其口服生物可利用度。表 2 列出近年出现的小分子稳定藻蓝蛋白典型案例。藻蓝蛋白作为一种酸性蛋白质,等电点约为 3.4,易在胃肠道消化过程中发生聚集和降解。对此,有研究表明小分子糖类具有维持稳定的作用,如蔗糖和海藻糖,这与其维持蛋白质的天然高级结构和发色团的稳定有关^[43]。“优先排除理论”^[44-45]认为:分散体系中双糖作为藻蓝蛋白的共溶质,其对藻蓝蛋白的热保护效果不是由于其本身与藻蓝蛋白的相互作用,而取决于蛋白质与含有双糖的溶剂间发生的诱导修饰,其结果是系统自由能的增加,该条件有利于蛋白质维持折叠状态^[46]。同时有观点认为小分子物质的添加导致的水分活度变化,也是影响藻蓝蛋白稳定性的原因之一^[47]。

Faieta 等^[43]通过分光光度法和圆二色谱分析不同浓度蔗糖和海藻糖对藻蓝蛋白热稳定性的影响。藻蓝蛋白为热不稳定蛋白质,在恒定温度下色泽损失随时间的延长而增加,随着溶质浓度的增加而减少。在热稳定性实验和模拟食品加工的热处理中,同一浓度的蔗糖比海藻糖具有更好的热稳定效果。Antelo 等^[48]研究发现在体系中添加 10%~50%山梨糖醇,可在巴氏杀菌条件下提供良好的藻蓝蛋白热稳定性。在以聚环氧乙烷($\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$)_n对藻蓝蛋白实现静电纺丝保护后,Braga 等^[49]向体系中添加 50%山梨糖醇和 20%葡萄糖,明显延长了热处理中藻蓝蛋白的半衰期。

为分析不同类型糖类对藻蓝蛋白的护色效果,Martelli 等^[50]通过分析不同浓度的葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖和麦芽糖对藻蓝蛋白的护色能力,判断糖类对藻蓝蛋白的护色效果与其最终添加浓度有关,而糖的种类对藻蓝蛋白护色效果影响较小。具体而言,当糖类含量超过 40%时,体系对藻蓝蛋白有较好的稳定作用,而相同浓度的不同糖类对藻蓝蛋白的稳定程度没有明显区别。对此,可将糖类稳定的藻蓝蛋白溶液用于工业生产,可单独使用或与红花黄复配形成绿色体系,在 80 °C 条件下加热 30 min 仍可保持良好的热稳定性。其

制约因素在于,在生产加工过程中需维持原有高糖体系,此条件限制了藻蓝蛋白糖浆在食品工业中的应用范围。

此外,藻蓝蛋白体系长期储藏过程中需要控制微生物生长,添加防腐剂可维持藻蓝蛋白的稳定性。Kannaujiya 等^[51]研究低温到高温环境中藻蓝蛋白在不同种类防腐剂(苯甲酸、柠檬酸、蔗糖、抗坏血酸和氯化钙)中保温 30 d 的热动力学稳定性,筛选出苯甲酸对藻蓝蛋白有良好的护色和稳定作用,使藻蓝蛋白体系在 4 °C 保存 30 d 后仍可工业应用。

3.2 接枝改性稳态藻蓝蛋白

除在藻蓝蛋白体系中添加小分子糖外,也可通过改性手段提高藻蓝蛋白稳定性,通过对天然蛋白质进行必要的修饰,改变其理化性质,使之在营养特性和功能特性上符合进一步的加工需求。蛋白质改性方式主要分为物理改性、化学改性、酶法改性和基因工程改性等,其中物理改性以加热、机械挤压、外加电场、超声处理等操作为主要手段,其优势在于操作成本较低,并避免了有机物质的添加^[54-55]。物理改性使得蛋白质结构发生变化,内部基团暴露,对于改善特定蛋白质的稳定性具有良好的效果,然而,藻蓝蛋白热稳定性差,在巴氏杀菌条件下即可发生变性和颜色漂白,仅通过物理方式对其改性的研究尚未见报道。

在化学改性中,通过化学试剂对蛋白质结构进行修饰,从分子改性角度可将化学改性分为酸碱改性、甲基化、乙酰化、磷酸化、糖基化等手段^[54-56]。针对藻蓝蛋白在低浓度下($<10^{-6}$ mol/L)容易从三聚体分解为单体,发生降解的特点,有研究利用甲醛或戊二醛介导藻蓝蛋白亚基之间交联,增加藻蓝蛋白的光稳定性,如 Munawaroh 等^[57]的研究结果表明,使用甲醛对藻蓝蛋白的化学改性可有针对性地提高其对黄光的稳定性。此外,为稳定藻蓝蛋白的三级和四级结构,Fukui 等^[58]使用 DSP 交联剂修饰藻蓝蛋白分子中的赖氨酸残基,使氨基交联,以维持藻蓝蛋白的高级结构,通过此种方式提高藻蓝蛋白的化学稳定性,使之在尿素存在下褪色、漂白现象明显改善,且在尿素经透析脱除后可基本恢复原有显色。Martelli 等^[50]使用丙酮醛介导藻蓝蛋白分子内部的共价结合,交联稳定蛋白质

表2 小分子物质稳定藻蓝蛋白的典型案例

藻蓝蛋白来源	藻蓝蛋白含量及性质	稳定剂	小分子添加量	稳定效果	参考文献
纯顶螺旋藻分离株 LEB-52 (<i>Arthrospira platensis</i> LEB 52)	-	山梨糖醇	10%~50%	随着添加量从10%升高到50%，藻蓝蛋白在热处理中的半衰期提高10倍，山梨糖醇对蛋白结构有明显的稳定效果	2008 ^[48]
纯顶螺旋藻(<i>Arthrospira platensis</i>)	0.1%	葡萄糖 蔗糖 氯化钠	40% 40% 5%	经15 min, 60 °C热处理, 葡萄糖、蔗糖、氯化钠分别使藻蓝蛋白相对保留率从47%提高到82%、70%和65%, 半衰期从19.1 min提高到87.8 min、44.2 min和40.0 min	2012 ^[52]
纯顶螺旋藻(<i>Arthrospira platensis</i>)	0.16%	果糖 蔗糖 葡萄糖	62% 54% 37%	经60 min, 80 °C热处理, 果糖使藻蓝蛋白稳定性显著提升, 620 nm处的吸光值降低至50%; 蔗糖次之, 降低至25%; 葡萄糖对藻蓝蛋白的稳定增效最小, 降低至7%(对照组为5%)	2014 ^[50]
念珠藻分离株 HKAR-2 (Nostoc sp. HKAR-2)	0.01% 纯度 3.18	苯甲酸 柠檬酸 抗坏血酸 氯化钙	0.5~5.0 mmol/L	经30 d, 4 °C/25 °C/40 °C热解育, 苯甲酸的稳定效果最为显著, 3种温度下藻蓝蛋白半衰期从111 d/18 d/8 d提高到630 d/100 d/86 d; 柠檬酸次之, 半衰期提高到385 d/77 d/49 d; 抗坏血酸和氯化钙的稳定效果有限, 仅为150 d/25 d/11 d和121 d/21 d/9 d	2016 ^[51]
纯顶螺旋藻(<i>Arthrospira platensis</i>)	0.04% 纯度 1.5	葡萄糖 蔗糖 氯化钠	2.5%~20%	经30 min, 65 °C热处理, 氯化钠在pH 5~8范围内均表现出最优的稳定效果(随添加量递增), 葡萄糖的稳定效果略优于蔗糖, 与对照组相比均可见增效作用	2016 ^[53]
纯顶螺旋藻(<i>Arthrospira platensis</i>)	0.012% 纯度 1.65	蔗糖 海藻糖	20%~70% 20%~40%	等效热处理对藻蓝蛋白降解、建模, 蔗糖的热稳定效果更优, 使DSC热降解峰值由58.9 °C提高到70.7 °C(蔗糖含量30%)和74.4 °C(蔗糖含量50%), 而同样浓度海藻糖使热降解峰值提高到64.2 °C和69.7 °C	2020 ^[45]

注:“纯度”指所用藻蓝蛋白原料吸光度 $A_{630\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 比值, 一般划分为食品级(≥ 0.7)、反应级(≥ 3.9)、分析级(≥ 4.0)。

高级结构,从而提升藻蓝蛋白的热稳定性,使之在 pH 7 环境中玻璃化转变温度 T_m 值从 57.5 °C 提高到 62.8 °C,其中丙酮醛为蜂蜜中抗菌的主要功能成分^[59-60],具有对食用蛋白质进行改性应用的潜力。

除用上述交联剂对藻蓝蛋白进行化学改性外,糖基化反应也成为化学改性中一种重要手段,如催化还原糖的羰基与藻蓝蛋白的氨基发生美拉德反应,从而提高其热稳定性。在糖基化过程中,干热接枝法一般使用蛋白质和糖的冻干混合物在一定温度和湿度下直接反应^[61],其接枝反应虽较为彻底,但较难控制反应进程,易造成过度褐变;湿热接枝法将蛋白质和糖的混合物在液体环境中加热,然后通过迅速降低温度来终止反应,此方法在接枝过程中有更好的可控性,然而反应效率不如干热接枝^[62-63]。近年来发展的超高压接枝法是糖基化的一种补充方法。在 Zheng 等^[64]的研究中,超高压处理促使藻蓝蛋白分子形变、暴露糖基化位点,显著加快了糖基化进程。此研究发现,当糖基化接枝材料为葡聚糖 20 000 时,在反应温度为 84 °C 条件下,以 340 MPa 压力处理 15 min 为最佳复合改性工艺,改善了藻蓝蛋白功能特性。

3.3 生物大分子稳态藻蓝蛋白

除上述添加小分子和对藻蓝蛋白进行接枝改性提高藻蓝蛋白稳定性外,更为广泛的研究聚焦在利用多糖或蛋白质结合稳定藻蓝蛋白,例如淀粉^[65]、果胶^[36]和乳清蛋白^[37]等,呈现出以生物大分子与藻蓝蛋白结合而成的纳米颗粒。表 3 对大分子物质稳定藻蓝蛋白的典型案例进行汇总归纳。在较宽 pH 值范围,藻蓝蛋白表面带有负电,易凭借静电作用、疏水作用和氢键等分子间作用力与大分子结合,形成均匀分散的纳米颗粒,藻蓝蛋白稳定性因而提高,经人体摄入消化后,其生物可利用度同样得到提高。

Lemos 等^[69]利用不同来源的淀粉包埋藻蓝蛋白,发现其被包封在交联淀粉的非晶链之间,淀粉交联促进了溶胀水凝胶网络的形成,起到一定的缓释作用,并通过动物实验验证了藻蓝蛋白的抗炎特性以及藻蓝蛋白-淀粉复合物的缓释特性。Selig 等^[36]对甜菜果胶、瓜尔豆胶和可溶性大豆多糖对藻蓝蛋白热降解和蛋白酶水解的保护能力进

行评估,在藻蓝蛋白体系中添加甜菜果胶,该阴离子亲水胶体在加热时出现负电荷,负电荷在藻蓝蛋白表面的富集,增强了藻蓝蛋白的热稳定性,并减缓了其在蛋白酶作用下的水解进程。

Braga 等^[49]尝试将藻蓝蛋白与聚环氧乙烷混合,利用聚环氧乙烷的成纤维特性制备针对藻蓝蛋白的静电纺丝。正极纺丝针头内径 0.45 mm,距负极铝收集器 125 mm,电位 24.3 kV,通过安装在针头上的泵将溶液的流速保持在 2.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。此项研究得到平均直径为 295 nm 的静电纺丝,在不同温度下,藻蓝蛋白降解的半衰期延长 1 倍,热稳定性得到显著提升。Schmatz 等^[66]尝试用静电喷雾,利用聚乙烯醇对藻蓝蛋白进行封装,并维持其稳定,使用 11% 聚乙烯醇稳定 3% 藻蓝蛋白得到最优的效果,其喷嘴内径 0.45 mm,电位 20 kV,进料流速设置为 50 $\mu\text{L}/\text{h}$ 。此条件下制备的藻蓝蛋白颗粒平均粒径为 395 nm,其封装率约为 75.1%,且在 ABTS 自由基清除实验和 DPPH 自由基清除实验中均有良好表现。

除纳米尺度构建藻蓝蛋白递送体系外,也可采用海藻酸盐对藻蓝蛋白进行微囊化,如 Pradeep 等^[67]将海藻酸钠与藻蓝蛋白以 1:1 质量比混合,自注射泵中以 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速挤入 2% 氯化钙溶液中,得到冻干后的平均粒径为 1.05 mm 的藻蓝蛋白-海藻酸盐微球,该微球表现出良好的热稳定性,提高了藻蓝蛋白作为功能因子的贮藏期限,提供了一个高载封装藻蓝蛋白的方法。Yan 等^[68]通过上述方法制备藻蓝蛋白-海藻酸盐微球,将产品置于 2.0% 的壳聚糖溶液中保温孵育,得到冻干粒径为 1.03 mm 的藻蓝蛋白-海藻酸盐-壳聚糖微球,相对原有二元微球(1.81 mm)粒径减小,原因在于内部疏松的藻蓝蛋白-海藻酸盐微球与壳聚糖作用后,内部结构趋向紧密。三元复合结构表现出更好的热稳定性和酸稳定性,而在弱碱性条件下会迅速释放藻蓝蛋白,表现出良好的控释能力。

藻蓝蛋白的稳定性也可通过其它技术手段予以改善。Manconi 等^[69]在大豆卵磷脂和胆固醇成膜的基础上,使用黄原胶将藻蓝蛋白稳定于脂质体中,并用壳聚糖实现进一步包封,得到最高可达 68% 的包埋率,脂质体具有均匀良好的分散性和肠道黏附性。Yagoubi 等^[70]采用固体脂质纳米颗粒

表3 大分子物质稳定藻蓝蛋白的典型实例

藻蓝蛋白来源		藻蓝蛋白添加量及性质		大分子稳定剂		大分子添加量/%		分子间相互作用		稳定效果		参考文献	
钝顶螺旋藻 (<i>Spirulina platensis</i>)	0.075%藻蓝蛋白粉	藻蓝蛋白粉纯度1.33	水溶性壳聚糖(壳聚糖)	0.1	静电作用	经90 min, 50 °C热处理, 壳聚糖使藻蓝蛋白色度变化值下降	2020 ^[8]						
钝顶螺旋藻 (<i>Arthrospira platensis</i>)	2%藻蓝蛋白提取液	藻蓝蛋白提取液含量4.3%	甜菜果胶	2	疏水作用	甜菜果胶的结合使藻蓝蛋白在20 min, 50 °C/65 °C热处理中稳定性提升, 在蛋白酶消化中稳定性提升	2018 ^[9]						
钝顶螺旋藻 (<i>Arthrospira platensis</i>)	藻蓝蛋白粉纯度0.8		瓜尔胶	2	-								
			可溶性大豆多糖	2	-								
			麦芽糊精	5~10	-								
													2020 ^[7]
钝顶螺旋藻 (<i>Spirulina platensis</i>)	0.2%藻蓝蛋白提取液	藻蓝蛋白提取液含量0.3%	乳清蛋白	0.5~10	静电作用	经20 min, 80 °C热处理, 乳清蛋白使藻蓝蛋白色度变化值降低, 使蛋白稳定性分散, 不产生絮凝沉淀	2020 ^[7]						
			蛋清蛋白	10	疏水作用								
			豌豆蛋白	10	-								
钝顶螺旋藻 (<i>Spirulina platensis</i>)	0.1%藻蓝蛋白粉	藻蓝蛋白粉纯度1.79	淀粉(分别源于马铃薯、香蕉、玉米、木薯、面包果)	0.7	静电作用	淀粉通过溶胀交联, 以最高可达67.58%的包埋率使藻蓝蛋白稳定性存在于交联淀粉的非晶链之间	2020 ^[6]						
			乳清蛋白	0.1	疏水作用								
			ι -卡拉胶	0.25	静电作用	乳清蛋白或 ι -卡拉胶的包封使藻蓝蛋白在150 s, 90 °C热处理和5 d自然光照射下的稳定性提高	2021 ^[8]						
钝顶螺旋藻 (<i>Spirulina platensis</i>)	0.1%藻蓝蛋白粉	藻蓝蛋白粉纯度>4.0	乳清蛋白	0.05~1	静电作用	乳清蛋白含量在0.1%时稳定效果最佳, 通过二级结构的保护, 将藻蓝蛋白的光降解时长延后2 d	2020 ^[9]						

注: “纯度”指所用藻蓝蛋白原料吸光度 $A_{620\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 比值, 一般划分为食品级(≥ 0.7)、反应级(≥ 3.9)、分析级(≥ 4.0)。

和纳米脂质体对藻蓝蛋白进行包埋,在油相(单硬脂酸甘油酯、双硬脂酸甘油酯、中链甘油三酯)和水相(吐温 80、Poloxamer 188)中添加藻蓝蛋白,通过不同的油水相内容物组合,在超声辅助的高剪切均质下形成粒径最小可达 88.45 nm 的纳米颗粒,最高可达 69.25% 的包埋率和 9.88 mg/g 的负载量,在后续颗粒表征中不出现藻蓝蛋白峰,说明该载体对藻蓝蛋白实现了包埋。基于脂质的包埋,有助于在特定环境下提高藻蓝蛋白的稳定性和生理活性。目前虽有多种方式用于藻蓝蛋白稳态和递送,但尚未见其在食品工业中广泛应用,其原因在于未能平衡藻蓝蛋白稳定性提升与食品工业加工条件限制、食品添加剂的使用和用量等因素的关系,且在巴氏杀菌条件下,藻蓝蛋白失色、漂白现象仍难以避免。

3.4 藻蓝蛋白在医学领域中的应用

除保健功能外,藻蓝蛋白在医学领域因其特殊的性质而得到广泛应用。如表 4 所示,在针对癌细胞的药物递送中,藻蓝蛋白既可被包埋并递送进入癌细胞,经光动力学治疗引发癌细胞凋亡和自噬;也可配合顺铂、磁性颗粒等传统抗癌药物,提升其引发的芬顿反应程度^[72],从而杀灭癌细胞;也可仅作为一种荧光蛋白,组装形成稳定的药物递送载体,使纳米颗粒在体液运输中稳定且不引起溶血、排异等反应。Al-Malki^[73]采用血浆中含量最高的人血清白蛋白包埋藻蓝蛋白,此二元纳米颗粒表现出可观的抗氧化潜力和自由基清除能力,其针对肝癌和乳腺癌的抗增殖和促凋亡能力也在体外实验中得到体现。此外,藻蓝蛋白在纳米颗粒到达靶向器官以及提高生物可利用度方面发挥关键的作用。Cheng 等^[74]设计了一种由藻蓝蛋白修饰的生物素-壳寡糖-二硫代二丙酸结构,用于负载姜黄素,在 4 °C 环境中将上述颗粒与藻蓝蛋白结合,通过生物素与藻蓝蛋白间的相互作用以及带正电荷的壳寡糖和带负电荷的藻蓝蛋白之间的静电作用,实现藻蓝蛋白的稳定接枝。姜黄素位于由壳寡糖与藻蓝蛋白形成的空腔中,壳寡糖与姜黄素之间形成的二硫键赋予此载体氧化-还原敏感性,使药物响应肿瘤细胞中高浓度谷胱甘肽而释放,具有针对肿瘤部位实现靶向运输的潜力。

另外,藻蓝蛋白作为一种光反应蛋白,其在光

遗传学研究中的巨大潜力逐渐得到发掘。自 2006 年科学家 Deisseroth 提出“光遗传学”理论^[75]以来,在神经科学领域,通过光控技术实现对人体细胞的微电流调控,指出了—个解决现有疑难杂症的可行方向^[76]。涉及藻蓝蛋白的光遗传学研究鲜有报道,Zhao 等^[7]对其进行初步探索,制备并将平均粒径为 5 nm 的金纳米颗粒结合到两亲性聚合物中^[77],由两亲性聚合物包被的金纳米颗粒通过疏水相互作用与藻蓝蛋白以类似于“榫卯”的形态连接,此结构在琼脂糖凝胶电泳中仍可保持稳定。此研究有利于将金纳米颗粒在生物催化^[78-79]、纳米传感和生物医学,如标记、成像、示踪、治疗等功能^[80-81]与藻蓝蛋白的独特光学特性充分结合。利用藻蓝蛋白合成银纳米颗粒的手段则更为简便,这是由于藻蓝蛋白在光照条件下使电子由基态转变为激发态,发生能级跃迁的电子在环境中使硝酸银(AgNO₃)发生还原反应,从而形成藻蓝蛋白介导的银纳米颗粒^[82]。银纳米颗粒可充分发挥其优势,表现出对革兰氏阳性和阴性细菌的广谱抗菌活性,通过体内外实验均验证了其优异的抗肿瘤特性^[83]。

将藻胆蛋白结合到荧光探针的应用已得到较快发展,随着与之对应的荧光激活、免疫分析等领域的快速发展,将藻红蛋白、别藻蓝蛋白应用到荧光探针的研究专利不断涌现^[33,84]。然而,藻蓝蛋白作为藻胆蛋白中的一种,所得专利数量较同一分支下的上述两种蛋白相差甚远^[17],其原因在于其应用稳定性未得到根本性提升^[85]。尽管如此,为利用藻蓝蛋白独特的荧光特性,也可将之同特定的识别元素(如生物素、抗体和链霉亲和素)结合作为诊断探针^[43,74]。Sun 等^[86]先使用甲醛稳定藻蓝蛋白($\alpha\beta$)₃三聚体结构,抑制其在较低浓度或较严苛的加热条件下发生降解,然后,通过戊二醛使之与 R-藻红蛋白结合,藻蓝蛋白与藻红蛋白表现出高度的能量耦合并保持稳定,可应用于免疫测定中的荧光探针。Singh 等^[87]对藻蓝蛋白进行提取优化,并在 25 °C 条件下研究其对红细胞、白细胞、血小板、淋巴细胞基因组 DNA 染色的可能性,判断出藻蓝蛋白可部分替代溴化乙锭,用于免疫学分析和 DNA 染色。Zhao^[88]将藻蓝蛋白与包埋有竹杆菌乙素的明胶纳米颗粒连接,其中藻蓝蛋白被

表4 藻蓝蛋白颗粒在药物递送领域的典型案例

藻蓝蛋白来源	藻蓝蛋白添加量及性质	结合材料	相互作用	应用范围	应用效果	参考文献
钝顶螺旋藻(<i>Spirulina platensis</i>)	0.04%~0.2%	羧甲基壳聚糖	CaCl ₂ 交联	靶向癌症药物递送	羧甲基壳聚糖实现对藻蓝蛋白的包埋, 通过配体CD59sp对HeLa细胞实现靶向递送, 下调其增殖基因表达, 上调凋亡基因表达, 抑制癌细胞生长	2017 ^[89]
-	8%	磁性氧化铁纳米颗粒	共价结合	光动力学癌症治疗	藻蓝蛋白修饰的磁性氧化铁纳米颗粒经近红外光催化产生大量活性氧自由基, 加强了对小鼠乳腺癌的抑制效果, 而未见对正常组织细胞的毒性	2018 ^[90]
钝顶螺旋藻(<i>Spirulina platensis</i>)	0.1%	多孔牛血清白蛋白纳米颗粒	氢键 疏水作用	大剂量药物递送 抑制淀粉样纤维形成	藻蓝蛋白的加入, 改变了多孔牛血清白蛋白纳米颗粒的结构及形态, 使其由球型转变为尺寸更小的“口袋”型, 增加了纳米颗粒的药物运载能力	2018 ^[91]
钝顶螺旋藻(<i>Spirulina platensis</i>)	0.05%	PLGA—壳聚糖颗粒	-	过敏性皮炎治疗	藻蓝蛋白稳定了由壳聚糖包封的负载神经酰胺的PLGA颗粒, 提升其在表皮施药后的缓释能力, 发挥消炎作用, 加快角质化进程	2019 ^[92]
钝顶螺旋藻(<i>Spirulina platensis</i>)	0.1%	生物素—壳聚糖胶束	静电作用	靶向癌症药物递送	藻蓝蛋白稳定胶束结构, 防止其在血液循环中的吸附效应, 以其氧化—还原敏感的壳结构实现非小肺癌细胞A549的靶向药物递送	2019 ^[74]
钝顶螺旋藻(<i>Spirulina platensis</i>)	6.25%~12.50%	蜂胶纳米颗粒	-	龋齿致病菌抑制	藻蓝蛋白与蜂胶纳米颗粒的结合产生对变形链球菌(<i>S. mutan</i>)的协同抑制效果, 抑制其菌膜基因表达同时减少对牙龈成纤维细胞的毒性, 预防龋齿	2020 ^[93]
钝顶螺旋藻(<i>Spirulina platensis</i>)	0.2% 纯度4.17	介孔生物硅纳米颗粒	共价结合	光动力学癌症治疗	在波长620 nm处可见光激发下, 杂化颗粒产生单线态氧, 对人乳腺癌细胞RAW264.7有良好的清除作用, 稳定了藻蓝蛋白, 提升其光动力学治疗功效	2020 ^[94]
钝顶螺旋藻(<i>Spirulina platensis</i>)	0.06%	蚕丝蛋白纳米颗粒	酰胺反应 结合	靶向化疗增效	针对多种癌细胞实现了阿霉素与Mn ²⁺ 的靶向递送, 阿霉素抑制癌细胞生长并产生H ₂ O ₂ , 经Mn ²⁺ 催化激活芬顿反应, 藻蓝蛋白催化自由基级联反应增效	2021 ^[95]

注: “纯度”指所用藻蓝蛋白原料吸光度 $A_{630\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 比值, 一般划分为食品级(≥ 0.7)、反应级(≥ 3.9)、分析级(≥ 4.0)。

吸附在纳米颗粒表面,与不直接接触的竹红菌乙素发生以偶极-偶极相互作用主导的能量转移。该体系以藻蓝蛋白为反应指示剂,明确了竹红菌乙素的光诱导损伤与氧自由基产生和氧气供给的关系。

4 展望

藻蓝蛋白为食品工业中稀缺的天然蓝色色素资源,应充分发挥其在食品工业中的应用潜力。为保持藻蓝蛋白在人体内的生理活性,目前研究主要通过构建纳米颗粒递送藻蓝蛋白来提高其生物可利用度。然而,尚需进一步研发出稳定性好、负载率高、缓释性优的藻蓝蛋白递送体系,从而拓展其在保健食品乃至药品领域中的应用范围。本文总结了实现藻蓝蛋白稳态的途径并提供了相应的实例,目前,藻蓝蛋白的实际应用中,最大瓶颈在于其结构保持和色泽稳定。可喜的是,不断有新的藻蓝蛋白稳态方案和手段出现,相信在我国“2035年远景目标”的指引下,假以时日,定位于生命健康重点领域的藻蓝蛋白将有更广阔的发展空间,藻蓝蛋白将以其特殊的色泽和功能活性在食品领域中获得更广泛的应用。

参 考 文 献

- [1] ERIKSEN N T. Production of phycocyanin—a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 80(1): 1–14.
- [2] CHENTIR I, HAMD I M, LI S, et al. Stability, bio-functionality and bio-activity of crude phycocyanin from a two-phase cultured Saharian *Arthrospira* sp. strain[J]. Algal Research, 2018, 35: 395–406.
- [3] 俞丽燕. 藻蓝蛋白的性质和提取技术研究进展[J]. 福建轻纺, 2020(5): 46–51.
YU L Y. Advances in properties and extraction techniques of phycocyanin[J]. The Light & Textile Industries of Fujian, 2020(5): 46–51.
- [4] PUZORJOV A, MCCORMICK A J. Phycobiliproteins from extreme environments and their potential applications[J]. Journal of Experimental Botany, 2020, 71(13): 3827–3842.
- [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 Chemistry, 2020, 316: 126374.
- [6] FERRARO G, IMBIMBO P, MARSEGLIA A, et al. X-ray structure of C-phycocyanin from *Galdieria phlegrea*: Determinants of thermostability and comparison with a C-phycocyanin in the entire phycobilisome[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics, 2020, 1861(9): 148236.
- [7] ZHAO X, ZHAO X, YUAN M, et al. Study on physisorption between phycocyanin and gold nanoparticles[J]. Luminescence, 2019, 34(6): 623–627.
- [8] TABARZAD M, ATABAKI V, HOSSEINABADI T. Anti-inflammatory activity of bioactive compounds from microalgae and cyanobacteria by focusing on the mechanisms of action[J]. Molecular Biology Reports, 2020, 47: 6193–6205.
- [9] 刘琪, 李文军, 唐志红, 等. 藻蓝蛋白对氧化应激相关疾病防治作用的研究进展[J]. 海洋科学, 2017, 41(10): 132–138.
LIU Q, LI W J, TANG Z H, et al. Research advances in the preventative and therapeutic effects of phycocyanin on oxidative stress-related diseases [J]. Marine Sciences, 2017, 41(10): 132–138.
- [10] 郝帅, 秦玉, 王成涛. 功能食品藻蓝蛋白的生理活性研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(12): 1233–1240.
HAO S, QIN Y, WANG C T. Research progress of the physiological activity of functional food phycocyanin[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2017, 36(12): 1233–1240.
- [11] PRABAKARAN G, SAMPATHKUMAR P, KAVISRI M, et al. Extraction and characterization of phycocyanin from *Spirulina platensis* and evaluation of its anticancer, antidiabetic and antiinflammatory effect [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 153: 256–263.
- [12] KUPKA M, SCHEER H. Unfolding of C-phycocyanin followed by loss of non-covalent chromophore-protein interactions[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–Bioenergetics, 2008, 1777(1): 94–103.
- [13] MA Y, XIE J, ZHANG C, et al. Three-stage re-

- folding/unfolding of the dual-color β -subunit in R-phycocyanin from *Polysiphonia urceolata*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007, 352(3): 787-793.
- [14] TONG X, PRASANNA G, ZHANG N, et al. Spectroscopic and molecular docking studies on the interaction of phycocyanobilin with peptide moieties of C-phycocyanin[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2020, 236: 118316.
- [15] NOURMOHAMMADI N, SOLEIMANIAN - ZAD S, SHEKARCHIZADEH H. Effect of *Spirulina (Arthrospira platensis)* microencapsulated in alginate and whey protein concentrate addition on physicochemical and organoleptic properties of functional stirred yogurt[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020, 100(14): 1-9.
- [16] DEV A, MOHANBHAI S J, KUSHWAHA A C, et al. κ -carrageenan-C-phycocyanin based smart injectable hydrogels for accelerated wound recovery and real-time monitoring [J]. Acta Biomaterialia, 2020, 109: 121-131.
- [17] SEKAR S, CHANDRAMOHAN M. Phycobiliproteins as a commodity: Trends in applied research, patents and commercialization[J]. Journal of Applied Phycology, 2008, 20(2): 113-136.
- [18] MAZINANI S, FADAEI V, KHOSRAVI-DARANI K. Impact of *Spirulina platensis* on physicochemical properties and viability of *Lactobacillus acidophilus* of probiotic UF feta cheese: microalgal incorporation probiotic UF feta cheese[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2016, 40(6): 1318-1324.
- [19] MOHAMMADI-GOURAJI E, SOLEIMANIAN-ZAD S, GHIACI M. Phycocyanin-enriched yogurt and its antibacterial and physicochemical properties during 21 days of storage[J]. LWT, 2019, 102: 230-236.
- [20] KAUR S, KHATTAR J I S, SINGH Y, et al. Extraction, purification and characterisation of phycocyanin from *Anabaena fertilissima* PUPCCC 410.5: as a natural and food grade stable pigment [J]. Journal of Applied Phycology, 2019, 31(3): 1685-1696.
- [21] GALETOVIĆ A, SEURA F, GALLARDO V, et al. Use of phycobiliproteins from Atacama cyanobacteria as food colorants in a dairy beverage prototype[J]. Foods, 2020, 9(2): 244-257.
- [22] CAMPOS ASSUMPÇÃO DE AMARANTE M, CAV-ALCANTE BRAGA A R, SALA L, et al. Colour stability and antioxidant activity of C-phycocyanin-added ice creams after in vitro digestion[J]. Food Research International, 2020, 137: 109602.
- [23] JESPERSEN L, STRØMDAHL L D, OLSEN K, et al. Heat and light stability of three natural blue colorants for use in confectionery and beverages[J]. European Food Research and Technology, 2005, 220(3/4): 261-266.
- [24] DEWI E N, KURNIASIH R A, PURNAMAYATI L. The application of microencapsulated phycocyanin as a blue natural colorant to the quality of jelly candy [C]/IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. Yogyakarta, INDONESIA: IOP Publishing Ltd, Dirac House, Temple Back, Bristol BS1 6BE, England, 2018, 116: 012047.
- [25] FRADINHO P, NICCOLAI A, SOARES R, et al. Effect of *Arthrospira platensis (Spirulina)* incorporation on the rheological and bioactive properties of gluten-free fresh pasta [J]. Algal Research, 2020, 45: 101743.
- [26] BATISTA A P, NICCOLAI A, FRADINHO P, et al. Microalgae biomass as an alternative ingredient in cookies: sensory, physical and chemical properties, antioxidant activity and *in vitro* digestibility[J]. Algal Research, 2017, 26: 161-171.
- [27] BATISTA A P, NICCOLAI A, BURSIC I, et al. Microalgae as functional ingredients in savory food products: application to wheat crackers [J]. Foods, 2019, 8(12): 611-633.
- [28] NICCOLAI A, VENTURI M, GALLI V, et al. Development of new microalgae-based sourdough "crostini": Functional effects of *Arthrospira platensis (Spirulina)* addition[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 19433.
- [29] BARKALLAH M, BEN ATITALLAH A, HENTATI F, et al. Effect of *Spirulina platensis* biomass with high polysaccharides content on quality attributes of common carp (*Cyprinus carpio*) and common barbel (*Barbus barbus*) fish burgers[J]. Applied Sciences, 2019, 9(11): 2197.
- [30] NICCOLAI A, SHANNON E, ABU-GHANNAM N, et al. Lactic acid fermentation of *Arthrospira platensis (Spirulina)* biomass for probiotic-based products

- [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2019, 31(2): 1077–1083.
- [31] 徐春明, 李婷, 王英英, 等. 食用蓝色素及其使用现状研究进展[J]. *中国食品添加剂*, 2014(1): 208–214.
- XU C M, LI T, WANG Y Y, et al. Research progress of edible blue pigments and its application status[J]. *China Food Additives*, 2014(1): 208–214.
- [32] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准: GB 2760–2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
- National Health and Family Planning Committee of China. National food safety standard for food additive use: GB 2760–2014[S]. Beijing: Standards Press of China, 2014.
- [33] KUDDUS M, SINGH P, THOMAS G, et al. Recent developments in production and biotechnological applications of C–phycocyanin[J]. *BioMed Research International*, 2013, 2013: 742859.
- [34] THOREN K L, CONNELL K B, ROBINSON T E, et al. The free energy of dissociation of oligomeric structure in phycocyanin is not linear with denaturant[J]. *Biochemistry*, 2006, 45: 12050–12059.
- [35] GUSTININGTYAS A, SETYANINGSIH I, HARDININGTYAS S D, et al. Improvement stability of phycocyanin from *Spirulina platensis* encapsulated by water soluble chitosan nanoparticles [C]//IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. Penang, Malaysia. The World Seafood Congress 2019 – "Seafood Supply Chains of the Future: Innovation, Responsibility, Sustainability". 2020, 414: 012005.
- [36] SELIG M J, MALCHIONE N M, GAMALELDIN S, et al. Protection of blue color in a *spirulina* derived phycocyanin extract from proteolytic and thermal degradation via complexation with beet–pectin[J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 74: 46–52.
- [37] ZHANG Z, LI Y, ABBASPOURRAD A. Improvement of the colloidal stability of phycocyanin in acidified conditions using whey protein–phycocyanin interactions[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 105: 105747.
- [38] ZHANG Z, CHO S, DADMOHAMMADI Y, et al. Improvement of the storage stability of C–phycocyanin in beverages by high–pressure processing[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 110: 106055.
- [39] ZHANG S, ZHANG Z, DADMOHAMMADI Y, et al. Whey protein improves the stability of C–phycocyanin in acidified conditions during light storage[J]. *Food Chemistry*, 2020, 344: 128642.
- [40] FALKEBORG M F, RODA–SERRAT M C, BURNÆS K L, et al. Stabilising phycocyanin by anionic micelles[J]. *Food Chemistry*, 2018, 239: 771–780.
- [41] BONNET M, MASON S L. Multiple emulsions for colorants: China, WO2012059590 A1[P]. 2012–05–10 (EPI0190127A).
- [42] BATISTA A P, RAYMUNDO A, SOUSA I, et al. Rheological characterization of coloured oil–in–water food emulsions with lutein and phycocyanin added to the oil and aqueous phases[J]. *Food Hydrocolloids*, 2006, 20(1): 44–52.
- [43] FAIETA M, NERI L, SACCHETTI G, et al. Role of saccharides on thermal stability of phycocyanin in aqueous solutions[J]. *Food Research International*, 2020, 132: 109093.
- [44] LEE J C, TIMASHEFF S N. The stabilization of proteins by sucrose[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1981, 256(14): 7193–7201.
- [45] BARBIROLI A, MARENGO M, FESSAS D, et al. Stabilization of beta–lactoglobulin by polyols and sugars against temperature–induced denaturation involves diverse and specific structural regions of the protein[J]. *Food Chemistry*, 2017, 234: 155–162.
- [46] GHARSALLAOUI A, ROGÉ B, GÉNOTELLE J, et al. Relationships between hydration number, water activity and density of aqueous sugar solutions[J]. *Food Chemistry*, 2008, 106(4): 1443–1453.
- [47] MIYAWAKI O, DOZEN M, HIROTA K. Cooperative hydration effect causes thermal unfolding of proteins and water activity plays a key role in protein stability in solutions[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2016, 122(2): 203–207.
- [48] ANTELO F S, COSTA J A V, KALIL S J. Thermal degradation kinetics of the phycocyanin from *Spirulina platensis*[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2008, 41(1): 43–47.
- [49] BRAGA A R C, FIGUEIRA F DA S, SILVEIRA J T DA, et al. Improvement of thermal stability of C–phycocyanin by nanofiber and preservative agents[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2016, 40(6): 1264–1269.
- [50] MARTELLI G, FOLLI C, VISAI L, et al. Thermal

- stability improvement of blue colorant C-phycoyanin from *Spirulina platensis* for food industry applications [J]. *Process Biochemistry*, 2014, 49(1): 154–159.
- [51] KANNAUJIYA V K, SINHA R P. Thermokinetic stability of phycocyanin and phycoerythrin in food-grade preservatives[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2016, 28(2): 1063–1070.
- [52] CHAIKLAHAN R, CHIRASUWAN N, BUNNAG B. Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: Influence of temperature, pH and preservatives[J]. *Process Biochemistry*, 2012, 47(4): 659–664.
- [53] WU H, WANG G, XIANG W, et al. Stability and antioxidant activity of food-grade phycocyanin isolated from *Spirulina platensis* [J]. *International Journal of Food Properties*, 2016, 19(10): 2349–2362.
- [54] 张蓓, 郭晓娜. 燕麦蛋白质糖基化改性及乳化性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2015.
- ZHANG B, GUO X N. Study on modification of oat protein isolate by glycation reaction and emulsifying properties[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2015.
- [55] WILDE P J. Physically modified proteins[J]. *Developments in Food Science*, 2000, 41: 161–180.
- [56] WIJAYANTI H B, BANSAL N, DEETH H C. Stability of whey proteins during thermal processing: a review[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2014, 13(6): 1235–1251.
- [57] MUNAWAROH H S H, GUMILAR G G, ALIFIA C R, et al. Photostabilization of phycocyanin from *Spirulina platensis* modified by formaldehyde[J]. *Process Biochemistry*, 2020, 94: 297–304.
- [58] FUKUI K, SAITOA T, NOGUCHIA Y, et al. Relationship between color development and protein conformation in the phycocyanin molecule[J]. *Dyes and Pigments*, 2004, 63(1): 89–94.
- [59] FRENCH V M, COOPER R A, MOLAN P C. The antibacterial activity of honey against coagulase-negative *staphylococci* [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2005, 56(1): 228–231.
- [60] ATROTT J, HENLE T. Methylglyoxal in Manuka honey – correlation with antibacterial properties [J]. *Czech Journal of Food Sciences*, 2009, 27(Special Issue 1): 163–165.
- [61] KATO A, SASAKI Y, FURUTA R, et al. Functional protein-polysaccharide conjugate prepared by controlled dry-heating of ovalbumin-dextran mixtures [J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1990, 54(1): 107–112.
- [62] ZHU D, DAMODARAN S, LUCEY J A. Formation of whey protein isolate (WPI)-dextran conjugates in aqueous solutions [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(16): 7113–7118.
- [63] GUAN J, QIU A, LIU X, et al. Microwave improvement of soy protein isolate-saccharide graft reactions[J]. *Food Chemistry*, 2006, 97(4): 577–585.
- [64] ZHENG J, YIN H, SHEN C, et al. Functional and structural properties of *Spirulina* phycocyanin modified by ultra-high-pressure composite glycation[J]. *Food Chemistry*, 2020, 306: 125615.
- [65] LEMOS P V F, OPRETZKA L C F, ALMEIDA L S, et al. Preparation and characterization of C-phycoyanin coated with STMP/STPP cross-linked starches from different botanical sources[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 159: 739–750.
- [66] SCHMATZ D A, DA SILVEIRA MASTRANTONIO D J, VIEIRA COSTA J A, et al. Encapsulation of phycocyanin by electrospraying: a promising approach for the protection of sensitive compounds[J]. *Food and Bioproducts Processing*, 2020, 119: 206–215.
- [67] PRADEEP H N, NAYAK C A. Enhanced stability of C-phycoyanin colorant by extrusion encapsulation [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2019, 56(10): 4526–4534.
- [68] YAN M, LIU B, JIAO X, et al. Preparation of phycocyanin microcapsules and its properties[J]. *Food and Bioproducts Processing*, 2014, 92(1): 89–97.
- [69] MANCONI M, MURA S, MANCA M L, et al. Chitosomes as drug delivery systems for C-phycoyanin: preparation and characterization[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2010, 392(1/2): 92–100.
- [70] YAGOUBI A S, SHAHIDI F, MOHEBBI M, et al. Preparation, characterization and evaluation of physicochemical properties of phycocyanin-loaded solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers[J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2018, 12(1): 378–385.
- [71] 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]. *Journal of Food*

- Science, 2020, 85(3): 727–735.
- [72] SHEN Z, LIU T, LI Y, et al. Fenton–reaction–acceleratable magnetic nanoparticles for ferroptosis therapy of orthotopic brain tumors[J]. ACS Nano, 2018, 12(11): 11355–11365.
- [73] AL–MALKI A L. *In vitro* cytotoxicity and pro–apoptotic activity of phycocyanin nanoparticles from *Ulva lactuca* (*Chlorophyta*) algae[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2020, 27(3): 894–898.
- [74] CHENG Z, ZHANG W, HOU X, et al. Synthesis, characterization, and evaluation of redox–sensitive chitosan oligosaccharide nanoparticles coated with phycocyanin for drug delivery[J]. Nanoscale Research Letters, 2019, 14(1): 389.
- [75] DEISSEROTH K, FENG G, MAJEWSKA A K, et al. Next–generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits[J]. Journal of Neuroscience, 2006, 26(41): 10380–10386.
- [76] ROST B R, SCHNEIDER–WARME F, SCHMITZ D, et al. Optogenetic tools for subcellular applications in neuroscience[J]. Neuron, 2017, 96(3): 572–603.
- [77] LIU Y, ZHONG R, ZHANG P, et al. Understanding the robust physisorption between bovine serum albumin and amphiphilic polymer coated nanoparticles[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2016, 8(4): 2478–2485.
- [78] NAVALÓN S, GARCÍA H. Nanoparticles for Catalysis[J]. Nanomaterials, 2016, 6(7): 123.
- [79] CORMA A, GARCIA H. Supported gold nanoparticles as catalysts for organic reactions[J]. Chemical Society Reviews, 2008, 37(9): 2096–2126.
- [80] KIRANDA H K, MAHMUD R, ABUBAKAR D, et al. Fabrication, characterization and cytotoxicity of spherical–shaped conjugated gold–cockle shell derived calcium carbonate nanoparticles for biomedical applications[J]. Nanoscale Research Letters, 2018, 13(1): 1.
- [81] ZHANG Y, XIAO J, SUN Y, et al. Flexible nanohybrid microelectrode based on carbon fiber wrapped by gold nanoparticles decorated nitrogen doped carbon nanotube arrays; in situ electrochemical detection in live cancer cells[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2018, 100: 453–461.
- [82] PATEL V, BERTHOLD D, PURANIK P, et al. Screening of cyanobacteria and microalgae for their ability to synthesize silver nanoparticles with antibacterial activity[J]. Biotechnology Reports, 2015, 5: 112–119.
- [83] EL–NAGGAR N E–A, HUSSEIN M H, EL–SAWAH A A. Bio–fabrication of silver nanoparticles by phycocyanin, characterization, *in vitro* anticancer activity against breast cancer cell line and *in vivo* cytotoxicity[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 10844.
- [84] TELFORD W G, MOSS M W, MORSEMAN J P, et al. Cryptomonad algal phycobiliproteins as fluorochromes for extracellular and intracellular antigen detection by flow cytometry[J]. Cytometry, 2001, 44: 16–23.
- [85] SUN L, WANG S, CHEN L, et al. Promising fluorescent probes from phycobiliproteins[J]. IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics, 2003, 9(2): 177–188.
- [86] SUN L, WANG S, QIAO Z. Chemical stabilization of the phycocyanin from cyanobacterium *Spirulina platensis* [J]. Journal of Biotechnology, 2006, 121(4): 563–569.
- [87] SINGH P, KUDDUS M, THOMAS G. An efficient method for extraction of C–phycocyanin from *Spirulina* sp. and its binding affinity to blood cells, nuclei and genomic DNA[J]. International Research Journal of Biotechnology, 2009, 1(5): 80–85.
- [88] ZHAO B. A novel water–soluble nanoparticles of hypocrellin B and their interaction with a model protein: C–phycocyanin[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects, 2004, 1670(2): 113–120.
- [89] YANG P, LI B, YIN Q, et al. Carboxymethyl chitosan nanoparticles coupled with CD59–specific ligand peptide for targeted delivery of C–phycocyanin to HeLa cells[J]. Tumor Biology, 2017, 39(3): 87–108.
- [90] DU S, ZHANG L, HAN K, et al. Combined phycocyanin and hematoporphyrin monomethyl ether for breast cancer treatment via photosensitizers modified Fe₃O₄ nanoparticles inhibiting the proliferation and migration of MCF–7 cells[J]. Biomacromolecules, 2018, 19(1): 31–41.
- [91] LUO X, AL–ANTAKI A H M, HARVEY D P, et al. Vortex fluidic mediated synthesis of macroporous bovine serum albumin–based microspheres[J]. ACS

- Applied Materials & Interfaces, 2018, 10 (32): 27224–27232.
- [92] MIN S K, LEE H C, SONG H, et al. Multifunctional chitosan-coated poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for spatiotemporally controlled codelivery of ceramide and C-phycoerythrin to treat atopic dermatitis [J]. Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 2019, 34(2): 163–177.
- [93] AFRASIABI S, POURHAJIBAGHER M, CHINIFORUSH N, et al. Propolis nanoparticle enhances the potency of antimicrobial photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* in a synergistic manner [J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 15560.
- [94] PU Y, WEI M, WITKOWSKI A, et al. A hybrid biomaterial of biosilica and C-phycoerythrin for enhanced photodynamic effect towards tumor cells [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2020, 533(3): 573–579.
- [95] CHEN Q, MA Y, BAI P, et al. Tumor microenvironment-responsive nanococktails for synergistic enhancement of cancer treatment via cascade reactions [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2021, 13 (4): 4861–4873.

Research Progress of the Color-shade Stability and Delivery Systems of Phycocyanin

Li Qike^{1,2}, Gao Yanxiang^{1*}

¹College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083

²Department of Food Science, Cornell University, New York 14853

Abstract *Spirulina* (*Arthrospira platensis*), a paragon of commercial applications of alga, has been widely cultivated as an economic product around the world. As one of the luminous energy transporters in a structure called phycobilisomes in cyanobacteria and microalgae, phycocyanin has been gaining attention as a natural blue colorant and a physiological active compound. Phycocyanin showed several health benefits such as anti-inflammatory, anti-tumor, anti-oxidant, and immunomodulatory, which have been fully tested, hence it is very promising for the application of phycocyanin in the area of drug delivery. However, purified phycocyanin is prone to precipitating and/or dissociating when dissolved in the water, and demonstrates high sensitivity to environmental stresses such as temperature, pH, light, and ion. In the field of colorant protection, researchers devoted themselves to the stability improvement of phycocyanin on the nanoscale such as nanoparticles and nanoemulsions, to keep its robustness in harsh conditions in food processings and storages. In the field of physiological activity maintenance, researchers hammered at bioaccessibility improvement of phycocyanin by adding oligosaccharides and/or preservatives, or modifying its molecular structure via physical methods and/or chemical methods, as well as forming various nanocarriers for phycocyanin delivery. In addition, phycocyanin, a fluorescent protein, has been employed as a shell material of nanoparticles, applied to the mediation of metal nanoparticles, utilized in the formation of fluorescent probes, and so on. In this paper, applications of phycocyanin were summarized, and prospects for its development were presented as well.

Keywords phycocyanin; physicochemical stability; physiological activity; nanocarrier; photo-responsive protein