

藻蓝蛋白的提取、纯化与应用研究进展

张玉昆, 瞿金清*

(华南理工大学 化学与化工学院, 广东 广州 510641)

摘要: 藻蓝蛋白作为极具应用价值的天然色素蛋白, 已广泛应用于食品、医药和化妆品等领域。作为藻蓝蛋白在不同领域成功应用的关键, 其提取与纯化技术一直备受关注。该文全面论述了近年来藻蓝蛋白提取与纯化的多种方法及最新研究成果; 阐释了不同粗提取与纯化工艺的工作原理及优缺点, 着重对冻融法预处理、适用于大规模工业化生产的提取与纯化方法的组合工艺进行了讨论; 对藻蓝蛋白的纯度和提取率进行了总结, 介绍了藻蓝蛋白在食品、医药及化妆品领域的研究进展与应用实例; 最后, 提出了当前研究存在的问题, 并对未来的研究方向进行了展望, 旨在为藻蓝蛋白相关的研究及应用提供全面且有价值的参考。

关键词: 藻蓝蛋白; 提取与纯化; 纯度; 提取率; 应用

中图分类号: TQ936 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2025) 11-2415-10

Research progress on extraction, purification and application of phycocyanin

ZHANG Yukun, QU Jinqing*

(School of Chemistry and Chemical Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, Guangdong, China)

Abstract: Phycocyanin, a natural pigment protein with great application value, has been widely used in food, medicine and cosmetics. And the extraction and purification of phycocyanin, the key to its successful application in different fields, have been attracted much attention. In this review, a variety of methods and the latest research results on extraction and purification of phycocyanin in recent years were comprehensively discussed, while the working principle as well as the advantages and disadvantages of various crude extraction and purification processes were elucidated, especially the combination processes of freeze-thaw pretreatment and extraction and purification methods suitable for large-scale industrial production. The purity and extraction rate of phycocyanin was then summarized, followed by introduction on the research progress and application examples of phycocyanin in food, medicine and cosmetics. Finally, the existing problems and the future research directions were discussed, aiming at providing a comprehensive and valuable reference for the research and application of phycocyanin.

Key words: phycocyanin; extraction and purification; purity; extraction rate; application

藻蓝蛋白作为具有独特结构和显著生物活性的天然色素蛋白, 广泛存在于藻类中, 如螺旋藻、鱼腥藻等^[1], 其不仅具有迷人的蓝色色泽, 还蕴含着丰富的营养和药用价值。在食品领域中, 藻蓝蛋白可作为天然的蓝色色素添加剂, 为食品增添诱人的

色彩; 在医药领域, 藻蓝蛋白所具备的抗氧化、抗肿瘤等生物活性成为潜在的药物治疗成分^[2]。然而, 要实现藻蓝蛋白的高效利用, 提取与纯化技术至关重要。因此, 深入研究和优化藻蓝蛋白的提取与纯化技术, 开发新型高效、经济和环保的纯化工艺,

收稿日期: 2024-09-22; 定用日期: 2024-12-16; DOI: 10.13550/j.jxhg.20240721

基金项目: 广东省资源厅海洋专题重点项目 (GDNRC[2024]27)

作者简介: 张玉昆 (1998—), 男, 博士生, E-mail: zhangyukun807@163.com。联系人: 瞿金清 (1970—), 男, 教授, E-mail: cejqqu@scut.edu.cn。

对推动藻蓝蛋白在各个领域的应用具有重要的意义。现有关于藻蓝蛋白的提取与纯化工艺的综述多数是介绍单一的破壁或者提取技术, 缺乏对整体工艺流程的分析讨论^[3], 对藻蓝蛋白的应用方面也未有较全面的总结。

本文在详细介绍各种工艺的工作原理及优缺点的同时, 对冻融法及有望满足大规模工业化生产的组合工艺进行归纳讨论, 并对藻蓝蛋白的提取与纯化技术进行综述, 分析各种方法的优劣, 探讨未来的发展趋势。对藻蓝蛋白的应用现状进行归纳总结, 指出目前的缺陷与进一步改进的方法, 旨在为相关研究和产业应用提供参考和借鉴。

1 藻蓝蛋白的性质

藻胆蛋白作为天然高荧光蛋白, 是海洋藻类中主要的光捕获色蛋白, 根据组成结构通常可分为藻红蛋白(PE)、藻蓝蛋白(PC)和别藻蓝蛋白(APC)。如图 1 所示, 这些蛋白位于藻胆体上, 组装在类囊体表面。

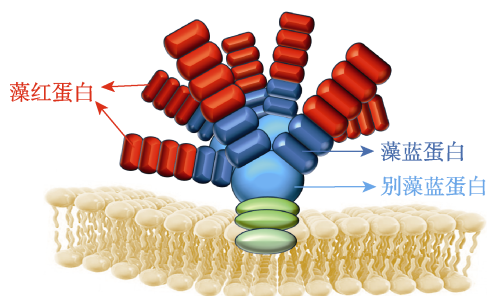


图 1 藻胆蛋白组织结构
Fig. 1 Organisation of algal bile proteins

藻蓝蛋白是水溶性蛋白, 易溶于水, 不溶于醇和油脂, 因含有藻蓝素发色团而呈亮蓝色。藻蓝蛋白水溶液在 280、348 和 620 nm 处有 3 个紫外吸收峰, 在 620 nm 处的最大吸收峰为藻蓝蛋白的特征峰, 而 280 和 348 nm 处较弱的峰分别属于藻蓝蛋白上的芳香族氨基酸分子和发色团。藻蓝蛋白纯度的测定是基于在 620/280 nm 处吸光度的比值 (A_{620}/A_{280}), 可分为食品级 ($A_{620}/A_{280} \leq 0.7$)、试剂级 ($0.7 \leq A_{620}/A_{280} \leq 3.9$) 和分析级 ($A_{620}/A_{280} \geq 4.0$)^[4]。

藻蓝蛋白的分子(图 2)是由脱辅基蛋白和开链四吡咯结构的色基通过硫醚键共价连接而成的。藻蓝蛋白含有 2 种不同的多肽亚基, 分别为小相对分子质量(简称分子量)的 α 亚基(12000~19000)和 β 亚基(14000~21000)。这 2 种亚基可通过分子间作用力形成 $\alpha\beta$ 单体, 并且进一步聚合形成聚合物 $(\alpha\beta)_n$ 。通常, 藻蓝蛋白是由三聚体 $(\alpha\beta)_3$ 和六聚体 $(\alpha\beta)_6$ 等多聚体形态出现^[5]。

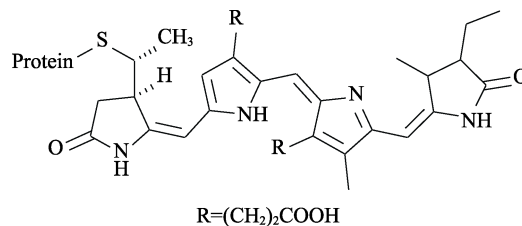


图 2 藻蓝蛋白的结构式
Fig. 2 Structure of phycocyanin

2 藻蓝蛋白的提取与纯化

如何高效且准确地提取藻蓝蛋白是发挥其价值的前提, 藻蓝蛋白的提取工艺复杂, 且受到多种因素的影响, 如藻类的选择和细胞破碎的手段等^[6]。藻蓝蛋白的提取效率很大程度上取决于藻细胞的破坏程度, 而藻细胞破碎的方法在很大程度上能够影响藻蓝蛋白的提取效率和纯度。通过物理、化学或者酶解等方法, 对合适的藻类细胞的细胞壁和细胞膜进行破碎, 以达到藻蓝蛋白从胞内释放的过程, 称为藻蓝蛋白的粗提取。

2.1 藻蓝蛋白的粗提取

目前, 许多方法都能将藻蓝蛋白从复杂的藻类细胞中分离出来, 这类粗提取工艺技术常作为藻蓝蛋白分离与纯化的预处理, 包括研磨、高压均质和冻融等传统方法以及新兴的超声波法。不同工艺的工作原理及优缺点不同, 因此, 适用的场景也有所不同(表 1)^[6-10]。为获得更经济有效的提取工艺, 下面将针对各种方法的原理以及优缺点进行深入探究。

陈裕^[11]将单一高压均质法破壁提取藻蓝蛋白与引入降温措施得到的藻蓝蛋白纯度与得率进行对比分析, 最终确定将冻融法与高压均质法联用, 可有效避免单一使用高压均质法造成的藻蓝蛋白变性问题。由于高压提取技术能够一次性高效率处理大量物料, 因此, 常与其他控温工艺结合, 用于螺旋藻工业化大规模破碎。侯兆乾等^[12]深入研究了循环次数对提取螺旋藻类中藻蓝蛋白收率和纯度的影响, 结果发现, 当冻融循环 4 次为最佳条件。

SARAN 等^[13]以钝顶螺旋藻为模型, 分别探究了柠檬酸盐(pH=5.0)、乙酸盐(pH=6.0)和磷酸钠(pH=7.0)等缓冲液为溶剂对藻胆蛋白提取率的影响。研究发现, 磷酸钠缓冲液的提取效果最优异, 藻胆蛋白的提取率达到 146.0 mg/g。于晓蕾^[14]通过超声技术辅助提取藻蓝蛋白, 有效减少了工作时间, 并发现, 超声技术具有重现性好、低溶剂消耗和低温工作等特点, 能够最大程度地维持藻蓝蛋白的活性(表 2)。

表 1 藻蓝蛋白的粗提取方法
Table 1 Crude extraction methods of phycocyanin

粗提取方法	原理	优点	缺点	适用场景	参考文献
研磨法	通过适度的力量和频率对藻类进行研磨, 达到破坏细胞壁的目的, 从而释放藻蓝蛋白	对设备要求简单	提取效率较为低下	实验室	[6]
珠磨法	利用表面光滑的珠子在容器内高速旋转和碰撞产生的摩擦力和剪切力将藻类细胞的细胞壁破坏, 从而释放藻蓝蛋白	相对手工研磨, 劳动力得到解放, 提高了藻蓝蛋白的提取效率; 细胞破碎率较高	选择性较低; 需要增加后处理工艺用于去除细胞碎片和其他杂质	大规模工业化	
高压均质法	利用压力使细胞液泡发生泄漏	一次性高效率处理大量物料	操作过程中产生的高温会使藻蓝蛋白失活	与降温工艺结合用于大规模工业化	[7]
冻融法	通过反复的冷冻与解冻, 使细胞内外形成冰晶, 破坏细胞膜的疏水键结构, 进一步使细胞壁破裂, 从而释放藻蓝蛋白	操作简单、对设备要求不高、能够处理大量的物料	不能一次性破碎所有的细胞, 需要多次循环才能取得较好的效果	实验室; 大规模工业化	[8]
盐析法	通过电荷相互作用降低蛋白质的溶解度, 使其从溶液中沉淀出来	对设备要求不高、条件温和	盐析剂配制过程复杂且难保存; 循环次数少(一步或两步)的盐析工艺得到的藻蓝蛋白纯度较低	实验室; 大规模工业化	[8]
超声波法	利用超声波在溶液中产生的空穴, 对细胞进行破碎处理	能够有效减少工作时间, 是一种绿色加工技术	操作过程中产生的高温会使藻蓝蛋白失活	实验室(作为辅助工艺用于提高藻蓝蛋白的提取效率)	[9]
酶提取法	通过酶分解藻类的细胞膜和细胞壁使藻蓝蛋白从细胞中释放出来	较为温和, 有助于保持藻蓝蛋白的天然结构与活性	提取率较低、酶制剂的成本较高、残留的酶可能会对藻蓝蛋白的应用产生潜在影响	实验室	[10]

表 2 超声波辅助盐析法提取藻蓝蛋白^[14]

Table 2 Extraction of phycocyanin by ultrasound-assisted salting out method^[14]

盐析条件	盐析法	超声波辅助盐析法
固液比/(L/g)		20
转速/(r/min)		125
浸提时间/h		24
NaCl 质量浓度/(g/L)		40
温度/°C		15
pH		7
超声功率/W	—	60
超声频率/kHz	—	40
超声时间/min	—	15
提取率/(mg/g)	92.4	107.5

注: “—” 未使用。

2.2 藻蓝蛋白的纯化

通过上述一系列操作, 得到的藻蓝蛋白粗提取液中含有大量的杂蛋白, 而某些特定行业需要使用的藻蓝蛋白原料必须为试剂级别以上。因此, 在对藻类进行预处理后, 需进一步将粗提取液分离纯化, 以获得更高纯度的藻蓝蛋白。目前, 纯化藻蓝蛋白常用的方法有层析法、双水相萃取法、三相萃取法

以及活性炭吸附法等。

2.2.1 层析法

层析法作为纯化蛋白质最常用的方法, 目前对螺旋藻粗提取液的纯化已基本达到产业化生产的要求。AMARANTE 等^[15]开发了一种 pH 梯度洗脱结合离子层析法从螺旋藻中提取藻蓝蛋白的单步纯化工艺, 并通过该工艺得到纯度分别为 4.2 和 3.5 的藻蓝蛋白, 回收率分别为 32.6% 和 49.5%。凝胶过滤层析法能够按照目标物的相对分子质量大小进行分离, 其中, 填料大多为具有多孔网状结构的惰性材料。羟基磷灰石 (HAP) 是一种由钙和磷组成的天然磷酸钙晶体, 其表面具有钙离子和磷酸根离子, 钙离子能够与藻蓝蛋白发生离子交换作用, 磷酸根离子能够与藻蓝蛋白产生吸附作用^[16]。同时, HAP 具有高度的耐碱性和独特的分离机制, 是唯一能够直接用于蛋白质和核酸纯化的无机层析填料。此外, HAP 可以同时分离纯化藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白, 因此, HAP 常被用作亲和层析法中的填料, 用于 2 种蛋白的同时分离与纯化^[17]。

2.2.2 双水相萃取法

除了使用单一水溶液提取藻蓝蛋白之外, 还有一种特殊的水溶液提取法就是双水相萃取法。一般

意义上的水溶液提取法通常是指直接使用单一的水作为溶剂来溶解和提取目标物质, 虽然双水相萃取法也是在水溶液环境中进行, 却是 2 种能够形成互不溶解的水相成分构建的特殊体系, 目前常见的双水相体系如表 3 所示^[18]。双水相体系的确定通常依靠蛋白质的分配系数 (K_p) 来决定。与其他分离技

术相比, 双水相萃取法具有生物相容性高、操作条件温和、提取速率快和适用于放大工艺而被广泛应用于藻蓝蛋白的提取。CHETHANA 等^[19]对使用双水相萃取技术提取与纯化藻蓝蛋白的工艺进行了深入研究, 在标准化条件下得到了纯度为 4.32 的藻蓝蛋白, 回收率为 79%。

表 3 常见的双水相体系构建方案

Table 3 Common schemes for the construction of two-phase aqueous systems

构建方案	A 类	B 类
两种非离子型聚合物	聚丙二醇 聚乙二醇	聚乙二醇/聚乙烯醇/葡萄糖/羟丙基葡萄糖 聚乙烯醇/葡萄糖/聚乙烯吡咯烷酮
其中一种为带电荷的聚电解质	硫酸葡聚糖钠盐/羧甲基葡聚糖钠盐	聚丙烯乙二醇/甲基纤维素
两种均为聚电解质	羧甲基葡聚糖钠盐	羧甲基纤维素钠盐
聚合物与盐类	聚乙二醇	磷酸钾/硫酸铵/硫酸钠/硫酸镁/酒石酸钾钠

2.2.3 三相萃取法

20 世纪末, PANADARE 等^[20]提出了三相萃取法 (TPP), 其可简单、快速地提取与纯化蛋白质。与传统的方法相比, TPP 作为新兴的非色谱生物分离技术, 可克服许多相关的限制。

将藻蓝蛋白粗提取液与适量的缓冲溶液和有机试剂均匀混合形成三相, 上层有机相能够对色素和脂质进行收集, 中层的沉淀物通常为蛋白质等目标大分子, 下层水相包含糖类等极性成分。与其他有机试剂相比, 叔丁醇具有高沸点、低可燃性, 且具有特殊的支链结构等, 能够防止蛋白质变性。因此, 叔丁醇常作为 TPP 中的有机试剂, 常用于藻蓝蛋白的提取与纯化^[21]。TPP 作为简单有效、成本相对较低且有应用前景的提取技术, 目前已用于上游和下游生物分子的纯化。同时, 该技术较为绿色环保, 可用于规模化制备, 是非常具有发展潜力的新型纯化技术。

2.2.4 超滤法

超滤法是利用具有特定孔径的超滤膜, 根据分子大小和形状的差异来分离和纯化物质。在纯化藻蓝蛋白时, 首先需对含有藻蓝蛋白的溶液进行预处理, 如去除杂质、调整溶液的 pH 和离子强度等, 以优化超滤效果。选择孔径小于藻蓝蛋白分子大小的超滤膜, 以确保藻蓝蛋白被保留在膜的一侧, 而较小的杂质分子和溶剂可以通过膜。在超滤过程中, 施加一定的压力或采用离心等方式, 促使溶液通过超滤膜。藻蓝蛋白被截留在浓缩侧, 而杂质和小分子则透过膜进入渗透侧, 从而实现初步的分离和纯化。超滤法具有操作简单、能够大规模应用、可较好保持蛋白质活性等优点, 同时也存在局限性, 如

膜受到污染导致分离效率下降, 对相对分子质量相近的杂质分离效果可能不理想等^[22]。总之, 超滤法在藻蓝蛋白的纯化中是一种有效的手段, 但在实际应用中需综合考虑各种因素, 常需与其他工艺结合, 以获得高质量的纯化产物。

2.2.5 活性炭吸附法

活性炭是经过人为加工处理得到的具有强吸附能力的一种吸附剂, 根据其形状, 可分为直径 < 0.18 mm 的粉末活性炭和直径 > 0.18 mm 的颗粒活性炭。活性炭具有发达的孔隙结构, 孔径在 50 nm 以上的称为大孔, 在 2 nm 以下的称为微孔, 介于二者之间的称为中孔。其中, 微孔也被称为吸附孔, 是活性炭主要的吸附孔径, 对活性炭的吸附性能起决定作用^[23]。活性炭在污水处理和去除甲醛等环境方面表现出良好的应用价值, 研究发现, 活性炭在藻蓝蛋白的分离与纯化方面具有潜在的应用价值^[24]。

2.2.6 自由流电泳

自由流电泳是一种在温和条件下能够连续分离纯化蛋白质等大分子的重要电泳技术, 能够很好地保持目标物结构的完整和生物活性。该技术的工作原理示意图如图 3 所示, 分离室是由 2 块距离非常近的平行板组成, 这 2 块平行板能够形成非常薄的分离腔, 当缓冲液通过压力泵进入分离腔后能够形成稳定的层流。无电场作用时, 包含目标蛋白的粗提取液进入分离腔后随缓冲液流向出口端; 当向缓冲液流动方向的垂直方向施加电场时, 通过粗提取液中带电颗粒的电泳迁移速率不同, 导致不同成分在分离腔中的移动距离不同, 最终在出口端的不同位置被收集, 实现目标蛋白的分离纯化。

传统的自由流电泳装置结构复杂、缓冲液入口

较少, 且进入分离腔后需要长距离才能形成稳定层流, 因此导致分离纯化效果不佳。近年来, 对自由流装置进行了大量的改进, 开发了一种利用气液缓冲装置和重力诱导平衡收集器在分离腔形成层流, 解决了缓冲液需进入分离腔长距离后才能形成层流的问题, 目前, 该装置已用于天然生物样本中的有机物、细胞和蛋白质等的分离纯化。为进一步提高自由流电泳装置的性能, YANG 等^[25]对进样方式进行了改进, 得到新兴自由流电泳装置构造, 引入了鞘流进样技术、简化了操作流程, 有效提高了蛋白质的分离效率及避免了传统装置中由样品引起的气液缓冲装置污染问题。该团队通过改进后的鞘流进样方法, 对螺旋藻粗提取液中的藻蓝蛋白进行分离与纯化, 得到的藻蓝蛋白纯度达到 4.60, 回收率为

79%^[26]。该技术的成功应用为大规模生产分析级藻蓝蛋白提供了新的手段。

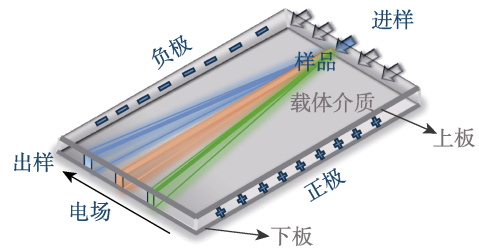


图 3 自由流电泳工作原理图示意图
Fig. 3 Working principal diagram of free flow electrophoresis

不同纯化藻蓝蛋白工艺的原料、所用材料及优点见表 3。

表 4 藻蓝蛋白的纯化工艺
Table 4 Purification process of phycocyanin

纯化方法	原理	材料	优点	参考文献
层析法	根据流动相中的离子与交换剂上的平衡离子进行可逆交换时的结合力大小的不同, 从而使样品中的目标物进行分离纯化	纤维素、葡聚糖、树脂	操作简单、灵敏度高	[27]
凝胶过滤层析法	按照目标物分子量大小进行纯化	琼脂糖、葡聚糖	适用范围广	
亲和层析法	利用亲和分子与蛋白质的相互作用	羟基磷灰石	同时分离藻蓝蛋白与别藻蓝蛋白	
双水相萃取法	通过氢键、疏水或静电作用等, 与成相物质之间发生相互作用形成浓度差, 进而进行分配和选择性富集, 从而实现提取和分离	两种能够形成互不混溶的水相的成分构建的特殊体系	条件温和、选择性高、操作简单	[28]
三相萃取法	将粗提取液与适量的缓冲溶液和有机试剂均匀混合, 混合物能够形成 3 个相, 上层有机相能够对色素和脂质进行收集, 中层的沉淀物通常为蛋白质等目标大分子, 下层水相包含糖类极性成分	有机相-水相	纯化效果好、适用范围广、易于调控	[29]
超滤法	利用具有特定孔径的超滤膜, 根据分子的大小和形状的差异来分离和纯化物质	超滤膜	操作简单、保持蛋白活性	[30]
活性炭吸附法	吸附作用	活性炭	成本较低、条件温和、重复性好	
自由流电泳法	带电颗粒的电泳迁移速率不同	—	能够连续分离、高分辨率	[31]

注: “—” 未提及, 下同。

3 提取与纯化联合工艺

实际应用中, 藻蓝蛋白的提取与纯化无法通过单一的工艺获得较高纯度的藻蓝蛋白, 因此常需将 2 种或者多种工艺结合, 以高产率获得高纯度的藻蓝蛋白。目前, 在藻蓝蛋白的提取与纯化工艺流程中, 常将冻融法用于藻蓝蛋白的预处理, 以获得藻蓝蛋白的粗提液。经过冻融法提取的藻蓝蛋白粗提液纯度较低, 需要后续结合一些纯化工艺, 以达到藻蓝蛋白纯度的进一步提高 (图 4)。

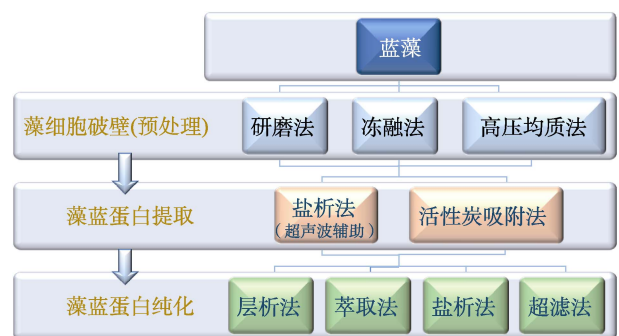


图 4 藻蓝蛋白提取与纯化流程示意图
Fig. 4 Schematic diagram of extraction and purification process of phycocyanin

3.1 盐析法联合工艺

经过冻融法处理得到的藻蓝蛋白粗提液纯度较低,需后处理才能得到满足条件的藻蓝蛋白。盐析法作为一种传统的蛋白质纯化手段,工艺流程较为成熟、材料来源相对广泛、操作简单且易于实现工业化生产。因此,在处理冻融法得到的粗提液时,联合盐析法能够极大程度地提高藻蓝蛋白的纯度和回收率。

3.1.1 盐析法联合层析法纯化粗提液

巢湖蓝藻经冻融法处理后,通过二步盐析法,得到了藻蓝蛋白粗提液;随后,分别结合凝胶层析

法、离子交换层析法、亲和层析法对藻蓝蛋白纯化^[27,32-33]。首先,通过单因素实验,确定了一步盐析和二步盐析分别添加 1.0 和 1.8 mol/L 的(NH₄)₂SO₄,得到纯度为 2.40 的藻蓝蛋白粗提液;随后,将粗提液通过 3 种层析法分别进行纯化(表 5)。其中,凝胶层析法的回收率较高,离子交换层析法较为经济。值得一提的是,亲和层析法能够同时纯化,得到分析级的藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白。盐析法联合亲和层析法,为同时分离纯化藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白提供了新的技术思路,对今后的放大化生产起到积极的指导意义。

表 5 3 种层析法纯化藻蓝蛋白
Table 5 Purification of phycocyanin by three chromatographic methods

层析条件	填料	加样质量浓度/ (mg/L)	加样流速/ (mL/min)	pH	蛋白种类	回收率/%	纯度/ (A ₆₂₀ /A ₂₈₀)	参考文献
凝胶层析法	葡萄糖凝胶 G-75	—	1.5	7.5	藻蓝蛋白	24.1	3.66	[27]
离子交换层析法	纤维素 A-500	1.0~2.0	2.0	7.0	藻蓝蛋白	11.0	4.00	[32]
亲和层析法	HAP	1.6~2.0	2.0	7.0	别藻蓝蛋白	14.1	4.05	[33]
					别藻蓝蛋白	5.9	4.20	

3.1.2 盐析法联合萃取法纯化粗体液

袁梦媛等^[34]对盐析法与双水相工艺流程的操作顺序进行了深入研究,首先对比了硫酸铵、柠檬酸三铵和柠檬酸钾 3 种盐析剂在藻蓝蛋白粗提取中的效果,确定了硫酸铵为最佳盐析剂。通过两步盐析并结合双水相萃取法,得到纯度为 3.0 以上的藻蓝蛋白。同时对工艺中盐析法和双水相萃取法的先后顺序也进行了探索^[35]。结果表明,聚乙二醇在藻蓝蛋白提取液中较难去除,因此确定工艺为先通过盐

析法提取,最后通过双水相萃取法对藻蓝蛋白进行纯化。WANG 等^[36]改变盐析剂的浓度和双水相萃取法的体系,最终得到纯度为 4.60 的荧光试剂级别藻蓝蛋白,回收率为 91.0%。除了与双水相萃取法联合使用纯化藻蓝蛋白外,王雪莹^[29]将盐析法与三相萃取体系联用,得到纯度为 3.46 的藻蓝蛋白,回收率为 52.4%(表 6)。将该工艺规模放大 10 倍时萃取体系仍稳定,为工业化大规模藻蓝蛋白的纯化提供了快速、温和且高效的路线。

表 6 盐析法联合萃取法纯化藻蓝蛋白
Table 6 Salt chromatography combined with extraction for purification of phycocyanin

纯化条件	盐析剂	盐析剂用量/(mol/L)		盐析后藻蓝蛋白 纯度/(A ₆₂₀ /A ₂₈₀)	萃取法体系	纯度/(A ₆₂₀ /A ₂₈₀)	回收率/%	参考文献
		一步盐析	二步盐析					
盐析法-双水相萃取	硫酸铵	1.20	2.00	1.95	PEG(1000)-硫酸铵	3.00	—	[34]
	硫酸铵	1.50	3.75	2.29	PEG(2000)-磷酸钾	4.60	91.0	[36]
盐析法-三相萃取	硫酸铵	2.25	3.38	2.78	硫酸铵-叔丁醇	3.46	52.4	[29]

3.2 活性炭法联合工艺

化学法需要向体系中加入化学试剂,容易导致蛋白质发生不可逆变性,同时也提高了后续工艺提纯的难度。因此,开发一种联合物理法的工艺,使藻蓝蛋白的纯度与产量提升。活性炭法作为更经济高效的纯化工艺与其他工艺联合,有助于进一步提高藻蓝蛋白的纯度,为大规模工业化生产提供较为经济的工艺思路。经过对椰壳、果壳、木质和煤质等活性炭与其不同粒径(100、200、300、400 和 500

目)纯化效果的筛选,兼顾藻蓝蛋白的纯度和回收率,综合考虑,选用 400~500 目的煤质粉末活性炭进行吸附,效果最佳^[37]。

盛晶梦等^[38]通过活性炭法与萃取法联合工艺,得到藻蓝蛋白的纯度相对于单一的萃取工艺有很大的提升,从 0.49 提高至 3.46^[37]。相对于联合盐析法和萃取法,活性炭法与层析法联合使用,更适用于试剂级别藻蓝蛋白的工业化制备^[39]。通过冻融法和粉末活性炭吸附法得到医药级别藻蓝蛋白后,使用

超滤法对藻蓝蛋白提取液进一步浓缩, 最后通过 HAP 层析进一步纯化, 将藻蓝蛋白的纯度提升至试剂级 (表 7)。该工艺路线为试剂级别藻蓝蛋白的工业化生产提供了可能, 但一步 HAP 层析不足以完全去除藻蓝蛋白溶液中的小分子杂质和杂蛋白, 后续可采取其他工艺对藻蓝蛋白进一步纯化。

表 7 活性炭法联合工艺纯化藻蓝蛋白

Table 7 Purification of phycocyanin by combined process of activated carbon method

联合工艺	纯度/(A_{620}/A_{280})	回收率/%	参考文献
萃取法	0.49	99.3	[37]
活性炭-萃取法	3.46	63.0	
盐析法	2.52	63.5	[38]
活性炭-盐析法	3.16	45.0	
层析法	3.54	60.0	[39]
活性炭-层析法	4.51	36.0	

表 8 藻蓝蛋白在食品领域的应用

Table 8 Application of phycocyanin in food

类别	产品	藻蓝蛋白含量/%	藻蓝蛋白纯度/(A_{620}/A_{280})	产品特性	参考文献
乳制品	藻蓝蛋白发酵乳	2~8	—	酸乳质地提升	[30]
	蓝色炼乳	0.10	3.28	抗氧化活性提升, 避光保质期增加	[40]
	蓝色脱脂乳	0.12	—	蓝色色泽	[41]
冷冻饮品	冰激凌	2.50	1.10	蓝色色泽, 抗氧化活性提升	[42]
饮料	蛋白饮料	—	0.96	蓝色色泽, 滋补饮品	[43]
酒类	啤酒	—	—	蓝色色泽, 泡沫丰富细腻	[44]
糖果制品	糖果	0.36	1.52	亮蓝色光泽	[45]
	果冻	1~5	—	亮蓝色光泽	
糕点	烘烤类糕点	6	1.50	抗氧化活性提升	[46]

藻蓝蛋白的抗菌和抗氧化特性受到食品包装行业的青睐。GOLMAKANI 等^[47]将负载藻蓝蛋白的麦醇溶蛋白电纺纳米纤维通过静电纺丝技术得到的多酚化合物 (GSPE) 化学结构与热稳定性均显著增强, 其良好的杀菌与抗氧化性能在活性食品包装领域得到出色的应用。

4.2 医药领域

除了具有蓝色光泽外, 藻蓝蛋白具有抗氧化、抗肿瘤、止血及天然荧光特性, 已在医药领域得到广泛的应用。

藻蓝蛋白因高生物相容性与光动力的特性被广泛用于光敏剂的研究, SHEN 等^[48]从富硒钝顶螺旋藻中提取到的富硒藻蓝蛋白 (Se-PC) 被证实能够降低小鼠肺癌细胞的存活率, 为治疗肺癌提供一种潜在的有效光敏剂 (图 5)。为提高藻蓝蛋白针对癌细胞的特异性, 常将其制作为不同性质的纳米颗粒, 虽然可提高光敏剂在细胞中的表达能力, 但目前针

4 藻蓝蛋白的应用

藻蓝蛋白含有除色氨酸以外的 17 种人体必需和非必需的氨基酸, 是人类理想的蛋白质来源。因藻蓝蛋白具有独特的物化性质和生物活性, 在食品、医药和化妆品等领域均有良好的表现。

4.1 食品领域

食品中的蓝色是一种不可或缺的色调, 天然的蓝色物质较为稀缺, 中国允许人工合成蓝色色素用于食品添加。藻蓝蛋白无毒兼具良好的水溶性而被作为天然食品着色剂代替合成色素, 满足了消费者对天然无害健康食品的需求, 在食品领域受到广泛的关注 (表 8)。然而, 藻蓝蛋白在水溶液或者磷酸盐溶液中难以长时间维持稳定状态, 随着藻蓝蛋白亚基的不断解聚, 藻蓝蛋白聚集形式会从 $(\alpha\beta)_6$ 逐渐转变为 $\alpha\beta$ 单体, 导致色泽出现偏差。近年来, 通过藻蓝蛋白与多糖结合、添加乳清蛋白或形成胶束等手段来提高藻蓝蛋白的光、热稳定性。

对癌细胞细胞器环境的光敏剂鲜有报道。除了将藻蓝蛋白作为主体通过光动力用于杀死癌细胞之外, 联合用药也是癌细胞治疗的常用方案。与单一原药的效果相比, 联合藻蓝蛋白极大程度地缓解了原药对机体的损伤, 增强了癌细胞的凋亡效果 (表 9)^[49-51]。

藻蓝蛋白在吸收激发光后能发出强烈的荧光信号, 与其他天然荧光剂相比, 具有较高的量子产率、更大的斯托克斯位移和更高的摩尔消光系数, 因此, 可用于荧光探针的制作, 进一步在细胞或生物组织中实现原位可视化荧光成像, 为环境检测以及疾病的诊断提供了新的思路。HOU 等^[52]以藻蓝蛋白为原材料, 开发了一款用于检测汞离子的荧光探针, 该探针在海产品 (牡蛎和鲢鱼) 中的汞离子检测中表现出良好的效果, 为环境污染物检测提供了新的手段。SHAO 等^[53]报道了一款藻蓝蛋白-碳点纳米探针, 能够对过氧亚硝酸盐进行比率荧光测定, 为癌症与神经退行性疾病发病机制的探究提供了新的

方案。虽然藻蓝蛋白探针的研发在近年来得到了一些发展，但其研究成果的数量远低于藻红蛋白以及

别藻蓝蛋白探针，这可能归因于藻蓝蛋白的光、热稳定性问题尚未得到有效解决。

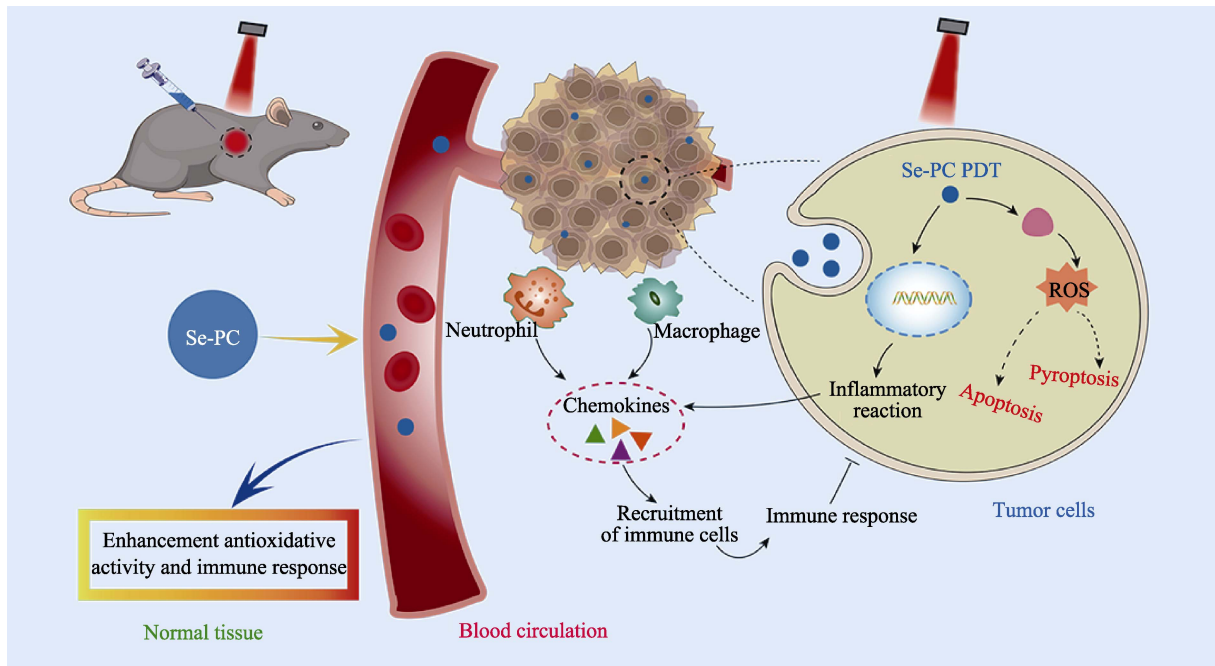


图 5 富硒藻蓝蛋白作为光敏剂的作用示意图^[48]

Fig. 5 Schematic diagram of selenium-enriched phycocyanin as photosensitizer^[48]

表 9 藻蓝蛋白与原药联合用药

Table 9 Co-administration of phycocyanin with prodrugs

联合用药	效果	治疗用途	参考文献
托泊替康-藻蓝蛋白	激活 Caspase-9 和 Caspase-3 的表达活性；增加 ROS 的表达水平，诱导肿瘤细胞的凋亡；降低托泊替康单独使用时的副作用	前列腺癌	[49]
吡罗昔康-藻蓝蛋白	使 DNA 片段化，降低环氧合酶-2 (COX-2) 及前列腺素 E2 (PGE2) 的表达	结肠癌	[50]
甜菜碱-藻蓝蛋白	降低 A549 细胞的活力、NF-κB 的表达，增加了促凋亡蛋白 p38 的表达，引起细胞 G2/M 细胞周期阻滞	肺癌	[51]

无毒且具备止血能力的天然材料是伤口敷料设计的核心，AZAZA 等^[54]使用壳聚糖和藻蓝蛋白等物质合成了一种复合水凝胶 HG-20，该凝胶在大鼠实验中表现出一定的促进伤口愈合的能力，为经济高效的伤口敷料提供了新的研究思路。

藻蓝蛋白除了在上述医药领域的应用外，因其在保护生殖系统、抗糖尿病和预防结肠癌等细胞模型中的良好表现而被广泛应用于保健品药物的生产中^[55-56]。

4.3 化妆品领域

化妆品和护肤品中的某些化学合成添加剂经常接触人体皮肤会导致一些用户过敏，随着人们对化妆品中使用的化学物质的健康问题的日益关注，源自天然的产品越来越受到欢迎。藻蓝蛋白作为天然的色素来源，同时具备抗氧化性与抗炎作用，是有吸引力的化妆品配方替代品。从螺旋藻中提取的 C-藻蓝蛋白通过调节小鼠黑色素瘤细胞 (B16F10) 细

胞系中酪氨酸酶的表达，具有抗黑色素生成的作用，因此，藻蓝蛋白在化妆品中已用作皮肤美白剂^[57]。KRASEASINTRA 等^[58]将天然的藻蓝蛋白作为染发剂，避免了化学染发剂造成用户过敏的问题。ADLI 等^[59]通过溶剂浇铸法，将聚乳酸、藻蓝蛋白以及海藻酸盐等复合材料加工为无毒害作用且抗氧化的化妆品贴，该化妆品贴具备可降解能力，避免了传统化妆品贴不可降解而对环境造成的污染问题。

4.4 其他领域

藻蓝蛋白绿色且廉价，不仅在食品、医药以及化妆品领域具有良好的应用，在农业领域也有着出色的表现。VARIA 等^[60]将富含藻蓝蛋白的螺旋藻提取物作为生物刺激剂用于莴苣的水培种植，莴苣的生长周期缩短了 6 d，产量增加了 12.5%，结果表明，藻蓝蛋白有望成为经济且绿色的生物刺激剂用于农作物的生长发育。

5 结束语与展望

藻蓝蛋白作为具有重要生物活性和应用价值的天然色素蛋白, 其提取与纯化工艺的不断发展为其在食品、医药和化妆品等领域的应用提供了保障。通过对不同提取方法和纯化技术的研究和比较, 发现物理提取法虽然操作简单, 但提取效率低; 化学法能够提高提取率, 但可能会对蛋白的结构和活性产生影响; 生物法具有较好的环保性和温和性, 但成本高。在纯化方面, 层析法因其高效、高选择性成为主流, 但也需要结合其他技术来进一步提高纯度和回收率。需根据原料特点、目标纯度、成本等多方面因素, 选择合适的提取与纯化方法。

藻蓝蛋白的提取与纯化技术有望在以下几个方面取得突破: 目前选取的藻类蛋白的藻类较为单一, 后续可探索适用于其他藻类的藻蓝蛋白的提取与纯化工艺; 开发更加高效、绿色、低成本的细胞破壁方法, 组合新的藻蓝蛋白提取与纯化工艺, 实现更高效、高纯度的纯化效果, 同时降低操作成本。

另外, 随着对藻蓝蛋白的生物活性和功能进行深入研究, 其在医药、食品、化妆品等领域的应用也将不断拓展, 需改善藻蓝蛋白的一些缺陷, 例如: 藻蓝蛋白的光热以及化学稳定性较差, 使得其在光敏剂和荧光探针方面的开发较为受限; 藻蓝蛋白在水溶液中长时间会发生解聚, 导致产品色泽出现偏差。

如何经济与绿色地获得高纯度、高稳定性及多样化的藻蓝蛋白是未来的研究重点。相信通过持续的研究和创新, 将为藻蓝蛋白大规模生产和应用提供更有力的支持, 为相关产业带来更大的经济效益和社会效益。

参考文献:

- ZHONG X (钟熙), WANG L (王磊). Research on the cultivation and culture technology of marine spirulina[J]. Journal of Aquaculture (水产养殖), 2020, 41(1): 58-60.
- SPILLERT C R, PELOSI M A, PARMER L P, et al. A peroxide-induced inflammation model for drug testing[J]. Agents Actions, 1987, 21(3/4): 297-298.
- FU L L (付丽丽), NA R (那日), GUO J F (郭九峰), et al. Research progress on the extraction and purification of phycocyanin from spirulina[J]. Biotechnology Bulletin (生物技术通报), 2016, 32(1): 65-68.
- CHEW K W, CHIA S R, KRISHNAMOORTHY R, et al. Liquid biphasic flotation for the purification of C-phycocyanin from spirulina platensis microalga[J]. Bioresource Technology, 2019, 288: 121519-121526.
- SHAO M F (邵明飞), ZHAO N (赵楠), LIU B (刘冰), et al. Progress of process technology for the preparation of algal blue protein on a large scale[J]. Food and Fermentation Industries (食品和发酵工业), 2013, 39(2): 135-139.
- ZENG J H (曾剑华), YANG Y (杨杨), SHI Y G (石彦国), et al. Research progress on mild disruption technology of microalgae for functional protein releasing[J]. Science and Technology of Food Industry (食品工业科技), 2018, 39(17): 319-327.
- FAIETA M, COLARUOTOLO L A, HUYNH L, et al. High-pressure processing (HPP) of phycocyanin extract solutions: Enhancing stability through molecular interactions[J]. LWT-Food Science and Technology, 2024, 198(15): 115965-115975.
- MAO M X, HAN G X, ZHAO Y L, et al. A review of phycocyanin: Production, extraction, stability and food applications[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 280(3): 135860-135873.
- MARTINEZ J E, EATARRON E V, ESCALANTE F M. Comparative study of the efficiency of additives in the extraction of phycocyanin-C from *Arthrospira maxima* using ultrasonication[J]. Molecules, 2023, 28(1): 334-344.
- WANG Z W, ZHOU J W, LI J H, et al. Rational design of key enzymes to efficiently synthesize phycocyanobilin in *Escherichia coli*[J]. Biomolecules, 2024, 14(3): 301-316.
- CHEN Y (陈裕). Research of brokening methods of phycocyanin extraction from blue algae in Lake Chaohu[D]. Hefei: Hefei University of Technology (合肥工业大学), 2015.
- HOU Z Q (侯兆乾), LIU X Y (刘鑫阳), SHI C (史超), et al. The research of extraction procedure by using method of freezing-thawing and ultrasonic broken process to extract phycocyanin from spirulina algae[J]. Journal of Inner Mongolia Agricultural University (内蒙古农业大学学报), 2017, 38(2): 69-75.
- SARAN S, PURI N K, JASUJA N D, et al. Optimization, purification and characterization of phycocyanin from *Spirulina platensis*[J]. International Journal of Applied and Pure Science and Agriculture, 2016, 2(3): 15-20.
- YU X L (于晓蕾). Study on extraction and purification of phycocyanin from spirulina platensis[D]. Zhenjiang: Jiangsu University (江苏大学), 2023.
- AMARANTE M C A D, JÚNIOR L C S C, SALA L, et al. Analytical grade C-phycocyanin obtained by a single-step purification process[J]. Process Biochemistry, 2020, 90: 215-222.
- CAI C, WU L, LI C X, et al. Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of phycocyanin and phycoerythrin from *Porphyrta yezeensis* Ueda[J]. Acta Crystallogr Sect F-Struct Biol Cryst Commun, 2011, 67(5): 579-583.
- YU L Y (余丽燕). Progress of research on the nature and extraction technology of algal blue protein[J]. The Light and Textile Industries of Fujian (福建轻纺), 2020, 5: 46-51.
- SALABAT A, MOGHADAM S T, FAR M R. Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems composed of Triton X-100 and sodium citrate or magnesium sulfate salts[J]. Calphad, 2010, 34(1): 81-83.
- CHETHANA S, NAYAK C A, MADHUSUDHAN M C, et al. Single step aqueous two-phase extraction for downstream processing of C-phycocyanin from *Spirulina platensis*[J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 52(4): 2415-2421.
- PANADARE D C, RATHOD V K. Three phase partitioning for extraction of oil: A review[J]. Trends in Food Science and Technology, 2017, 68: 145-151.
- CHEW K W, LING T C, SHOW P L. Recent developments and applications of three-phase partitioning for the recovery of proteins[J]. Separation and Purification Reviews, 2019, 48(1): 52-64.
- PORAV A S, BOCNEAL M, FLMA A, et al. Sequential aqueous two-phase system for simultaneous purification of cyanobacterial phycobiliproteins[J]. Bioresource Technology, 2020, 315: 123794-123803.
- WANG W T (王文涛), LAI X T (赖欣婷), HE X B (何旭斌), et al. Degradation of dye wastewater by reductive organic acids coupled with ferric supported activated carbon fiber[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2021, 38(5): 1023-1029.
- DING N N (丁娜娜), LIANG J H (梁锦华), WU L (乌兰), et al. Preparation of biochars and its applications in adsorption[J]. Analysis and Testing Technology and Instruments (分析测试技术与仪器), 2022, 28(4): 363-374.
- YANG Y, KONG F Z, LIU J, et al. Enhancing resolution of free-flow zone electrophoresis via a simple sheath-flow sample injection[J]. Electrophoresis, 2016, 37(14): 1992-1997.
- YANG Y (杨莹). Methodological research about fast separation and

- purification of phycocyanin via free flow electrophoresis[D]. Guangzhou: South China University of Technology (华南理工大学), 2016.
- [27] SU Y (苏雨). Study on purification of phycocyanin by multiple column chromatography[D]. Hefei: Hefei University of Technology (合肥工业大学), 2018.
- [28] FABRE J F, NIANGORAN N, GAIGNARD C, *et al.* Extraction, purification and stability of C-phycocyanin from *Arthrospira platensis*[J]. *European Food Research and Technology*, 2022, 248: 1583-1599.
- [29] WANG X Y (王雪莹). Application of three-phase partitioning in purification of C-phycocyanin[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology (哈尔滨工业大学), 2021.
- [30] ZHANG X M (张晓萌). Comparison of powdery activated carbon adsorption combined with column chromatography and ultrafiltration for purifying phycocyanin[D]. Hefei: Hefei University of Technology (合肥工业大学), 2018.
- [31] CHEN S, PALMER J F, ZHANG W, *et al.* A simple preparative free-flow electrophoresis joined with gratis gravity: I. Gas cushion injector and self-balance collector instead of multiple channel pump[J]. *Electrophoresis*, 2010, 30(11): 1998-2007.
- [32] SU Y (苏雨), ZHANG F Y (张发宇), SHE J W (余金卫), *et al.* Purification of phycocyanin from Chaohu *Cyanobacteria* by fractional salting out and two steps column chromatography[J]. *Journal of Anhui Agricultural University (安徽农业大学学报)*, 2018, 45(3): 487-491.
- [33] WU K (武康), ZHANG F Y (张发宇), ZHAO B B (赵冰冰), *et al.* Optimization and mechanism analysis of purification of phycocyanin by column chromatography[J]. *Hans Journal of Biomedicine (生物医学)*, 2019, 9(2): 81-88.
- [34] YUAN M Y (袁梦媛), ZHANG F Y (张发宇), SHENG J M (盛晶梦), *et al.* Influences of different salting-out agents on effect of phycocyanin from blue algae[J]. *Food Science and Technology (食品科技)*, 2016, 41(5): 267-272.
- [35] YUAN M Y (袁梦媛). The study of extraction of phycocyanin by salting-out and aqueous two-phase system from cyanobacteria[D]. Hefei: Hefei University of Technology (合肥工业大学), 2016.
- [36] WANG F, YU X, CUI Y, *et al.* Efficient extraction of phycobiliproteins from dry biomass of *spirulina platensis* using sodium chloride as extraction enhancer[J]. *Food Chemistry*, 2023, 406: 135005-135015.
- [37] SHENG J M (盛晶梦). Study on efficient extraction and purification technology of C-phycocyanin from Chaohu algae[D]. Hefei: Hefei University of Technology (合肥工业大学), 2016.
- [38] SHENG J M (盛晶梦), ZHANG F Y (张发宇), YUAN M Y (袁梦媛), *et al.* Study of extraction and purification of C-phycocyanin from blue algae by combined use of powdered activated carbon treatment and salt precipitation[J]. *Journal of Hefei University of Technology (Natural Science) (合肥工业大学学报: 自然科学版)*, 2017, 40(2): 242-247.
- [39] MOHAMMADI E, SOLEIMANIAN S, GHIACI M. Phycocyanin-enriched yogurt and its antibacterial and physicochemical properties during 21 days of storage[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2019, 102: 230-236.
- [40] KAUR S, KHATTAR J, SINGH Y, *et al.* Extraction, purification and characterization of phycocyanin from *Anabaena fertilissima pupccc* 410.5: As a natural and food grade stable pigment[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2019, 31: 1685-1696.
- [41] GALETOVIC A, SEURA F, GALLARDO V, *et al.* Use of phycobiliproteins from atacamya cyanobacteria as food colorants in a dairy beverage prototype[J]. *Foods*, 2020, 9(224): 1-14.
- [42] AMARANTE M C, 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: 109602-109609.
- [43] GARCIA A B, LONGO E, BERMEJI R. The application of a phycocyanin extract obtained from *Arthrospira platensis* as a blue natural colorant in beverages[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2021, 33: 3059-3070.
- [44] ZHANG G J, ZHAO H M, GUAN T Z, *et al.* Complexation of phycocyanin with hydroxypropyl- β -cyclodextrin and its application in blue beer containing quinoa saponins as foaming agents[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2023, 10: 1209193-1209204.
- [45] DEWI E N, KURNIASIH R A, PURNAMAYATI L. The application of microencapsulated phycocyanin as a blue natural colorant to the quality of jelly candy[J]. *IOP Conference Series Earth and Environmental Science*, 2018, 116: 12047-12055.
- [46] 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: 19433-19445.
- [47] GOLMAKANI M, HAJJARI M M, KIANI F, *et al.* Application of electrospinning to fabricate phycocyanin- and spirulina extract-loaded gliadin fibers for active food packaging[J]. *Food Chemistry: X*, 2024, 22(30): 101275-101283.
- [48] SHEN J, XIA H D, ZHOU X J, *et al.* Selenium enhances photodynamic therapy of C-phycocyanin against lung cancer via dual regulation of cytotoxicity and antioxidant activity[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2023, 55(12): 1925-1937.
- [49] GANTAR M, DHANDAYUTHAPANI S, RATHINAVELU A. Phycocyanin induces apoptosis and enhances the effect of topotecan on prostate cell line LNCaP[J]. *Journal of Medicinal Food*, 2012, 15(12): 1091-1095.
- [50] SAINI M K, VAIPHEI K, SANYAL S N. Chemoprevention of DMH-induced rat colon carcinoma initiation by combination administration of piroxicam and C-phycocyanin[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2021, 361: 217-228.
- [51] BINGULA R, DUPUIS C, PICHON C, *et al.* Study of the effects of betaine and/or C-phycocyanin on the growth of lung cancer a549 cells *in vitro* and *in vivo*[J]. *Journal of Oncology*, 2016, 11: 8162952-8162963.
- [52] HOU Y H, YAN M H, WANG Q F, *et al.* C-phycocyanin from *Spirulina maxima* as a green fluorescent probe for the highly selective detection of mercury(II) in seafood[J]. *Food Analytical Methods*, 2017, 10: 1931-1939.
- [53] SHAO J J, SUN S, ZHAN D, *et al.* Phycocyanin-carbon dots nanoprobe for the ratiometric fluorescence determination of peroxynitrite[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2022, 275(5): 121177-121185.
- [54] AZAZA Y B, FEKI A, AMARA I B, *et al.* Controlled release of phycocyanin from chitosan/protein isolate hydrogel for effectively accelerating wound healing[J]. *Cellulose*, 2023, 30: 9543-9561.
- [55] YANG F H, DONG X L, LIU G X, *et al.* The protective effect of C-phycocyanin in male mouse reproductive system[J]. *Food and Function*, 2022, 13(5): 2631-2646.
- [56] ZIYAEI K, ABDI F, MOKHTARI M, *et al.* Phycocyanin as a nature-inspired antidiabetic agent: A systematic review[J]. *Phytomedicine*, 2023, 119: 154964-154975.
- [57] WU L C, LIN Y Y, YANG S Y, *et al.* Antimelanogenic effect of C-phycocyanin through modulation of tyrosinase expression by upregulation of ERK and downregulation of p38 MAPK signaling pathways[J]. *Journal of Biomedical Science*, 2021, 18(74): 1-11.
- [58] KRASEASINTRA O, TRAGOOLPUA Y, PANDITH H, *et al.* Application of phycocyanin from *Arthrospira (Spirulina) platensis* as a hair dye[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2022, 9: 1024988-1025003.
- [59] ADLI S A, ALI F, AZMI A S, *et al.* Development of biodegradable cosmetic patch using a polylactic acid/phycocyanin-alginate composite[J]. *Polymers*, 2022, 12(8): 1669-1680.
- [60] VARIA J, KAMALESON C, LERER L. Biostimulation with phycocyanin-rich *Spirulina* extract in hydroponic vertical farming[J]. *Scientia Horticulturae*, 2022, 299(1): 111042-111049.