

岳瑶, 郭桂筱, 李雁群, 等. 一株新分离的嗜热蓝藻及其藻蓝蛋白的稳定性研究 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(21): 159-165. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022030149

YUE Yao, GUO Guixiao, LI Yanqun, et al. A Newly Isolated of Thermophilic Cyanobacterium and the Stability of Its Phycocyanin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(21): 159-165. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022030149

· 生物工程 ·

# 一株新分离的嗜热蓝藻及其藻蓝蛋白的稳定性研究

岳瑶<sup>1,2</sup>, 郭桂筱<sup>1,2</sup>, 李雁群<sup>1,2,3,\*</sup>, 胡雪琼<sup>1,2</sup>

(1. 广东海洋大学食品科技学院, 广东湛江 524088;

2. 广东海洋大学海洋药物研究所, 广东湛江 524088;

3. 广东省水产品加工与安全重点实验室, 广东湛江 524088)

**摘要:**目的: 明确新分离的一株嗜热微藻的分类地位, 观察其所含藻蓝蛋白的稳定性, 从而了解其藻蓝蛋白可能的应用价值。方法: 采用光学显微镜进行细胞形态观察, 基于 16S rDNA 序列建立系统发育树, 从而对藻株进行分类鉴定; 通过超声波破碎的方法获得藻蓝蛋白粗提液, 改变温度、光照强度、pH 等条件存放藻蓝蛋白溶液, 用分光光度计观察溶液吸光度的变化来反映藻蓝蛋白的稳定性。结果: 该藻为杆状单细胞结构, 直或有时弯曲, 二分裂殖, 系统发育树显示该分离藻株为嗜热聚球藻属的一支。提取得到纯度为 0.941, 色价为 196.53 的藻蓝蛋白粗提物, 得率为 11.37% (对藻干物质)。该藻蓝蛋白在 60 °C 保持 3.5 h, 色值不变; 6000 lux 光照 7 d 色值可保持在 91.4% 左右; 在 pH4.0~8.0 保持 3.5 h 色值稳定, 但在强酸和强碱性环境下藻蓝蛋白的稳定性明显下降。结论: 所分离的藻株为嗜热聚球藻属的一支, 其所含的藻蓝蛋白具有良好的热、光和酸碱稳定性, 在食品加工领域具有良好的应用前景。

**关键词:** 嗜热蓝藻, 16S rDNA, 藻蓝蛋白, 稳定性

中图分类号: Q19; TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)21-0159-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022030149

本文网刊:



## A Newly Isolated of Thermophilic Cyanobacterium and the Stability of Its Phycocyanin

YUE Yao<sup>1,2</sup>, GUO Guixiao<sup>1,2</sup>, LI Yanqun<sup>1,2,3,\*</sup>, HU Xueqiong<sup>1,2</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

2. Research Institute for Marine Drugs and Nutrition, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Product Processing and Safety, Zhanjiang 524088, China)

**Abstract:** Objects: The object of this paper was to determine the taxonomic status of a newly isolated of thermophilic microalga, and to study the stability of its phycocyanin to evaluate its possibility of application in food. Methods: The newly isolated algal strain was morphologically observed by optical microscope, and identified its taxonomic status based on its 16S rDNA sequence and the phylogenetic tree analysis. The phycocyanin of the alga was obtained by ultrasound-assisted extraction, and the stability of phycocyanin was investigated and evaluated based on the changes of the optical density measured with spectrophotometer under different levels of temperature, illumination and pH. Results: The alga cell was rod shape, straight or arc sometimes, binary fission, and was a branch of genus *Thermosynechococcus*. A crude extract of phycocyanin with a purity of 0.941 and a color value of 196.53 was obtained from the alga, and the yield was 11.37% (for dry mass weight). The stability tests showed that the phycocyanin was stable for 3.5 h at the temperature 60 °C, its

收稿日期: 2022-03-14

基金项目: 广东省国际合作项目 (2017A050501038)。

作者简介: 岳瑶 (1996-), 女, 硕士, 研究方向: 微藻生物活性物质研究与开发, E-mail: 1521400531@qq.com。

\* 通信作者: 李雁群 (1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 微藻与微生物工程, E-mail: yqli@gdou.edu.cn。

optical density retained 91.4% after illumination of 6000 lux for 7 d, the color was stable kept pH4.0~8.0 for 3.5 h, but it exhibited a poor stability in strong acid or strong alkali. Conclusion: The isolated microalga is a strain of the genus *Thermosynechococcus*. Its phycocyanin has good thermal-stability, photo-stability and acid-base-stability, exhibiting encouraging possibility for food application.

**Key words:** thermophilic cyanobacterium; 16S rDNA; phycocyanin; stability

蓝藻(Cyanobacteria),又名蓝细菌、蓝绿藻,是一种形态简单的产氧光合原核微生物,是重要的初级生产者,是地球上最原始的生命形式之一,距今已有超过30亿年的生活历史<sup>[1-3]</sup>。蓝藻分布范围广、适应性强、生长快速,几乎栖息在所有环境中,甚至包括各种极端环境,如高温温泉、寒冷冰川、碱性湖泊、干旱沙漠等<sup>[4-5]</sup>。蓝藻应用于食品领域已有很长的历史,其包含多种生物活性成分,如天然色素、蛋白质、脂肪酸、多糖、维生素、微量元素等,具有极高的营养价值<sup>[6]</sup>;部分蓝藻还因能产生具有抗菌、抗病毒和抗癌活性的次生代谢产物而被广泛应用于药物开发<sup>[7]</sup>。蓝藻是一大门类的微藻,有大量的藻种具有各种优良特性,但绝大多数蓝藻尚未被开发研究。嗜热蓝藻是一类能在50℃以上生长的高温藻,在食品领域的研究很少,由于其具有高温适应性,其细胞内生物活性成分往往可能具有某些特殊性质。

藻蓝蛋白是藻胆蛋白家族的一员。藻胆蛋白是存在于蓝藻、红藻及隐藻等藻类中的色素蛋白,是光合作用的捕光天线<sup>[8]</sup>。藻胆蛋白有三种类型,即藻红蛋白(phycoerythrin, PE)、藻蓝蛋白(phycocyanin, PC)和别藻蓝蛋白(allophycocyanin, APC)<sup>[9]</sup>。藻蓝蛋白是天然的蓝色色素,其吸收波长范围为610~630 nm,主要存在于蓝藻中,由脱辅基蛋白和开链四吡咯发色团组成<sup>[10-11]</sup>。藻蓝蛋白是我国批准的可以食用天然蓝色色素,目前主要用作着色剂添加在食品及化妆品行业<sup>[12-13]</sup>,同时还具有一定的抗氧化、抗肿瘤和增强免疫力等功能<sup>[14-15]</sup>。藻蓝蛋白在食品加工领域具有广阔的应用前景,但由于目前市场上的藻蓝蛋白热稳定性差,即使在巴氏杀菌条件下,藻蓝蛋白也不能耐受,因此现在主要应用于冷饮或冷制食品中<sup>[16]</sup>。除此以外,藻蓝蛋白对光照强度及酸碱环境也非常敏感,限制了其在食品领域更广泛的应用<sup>[17]</sup>。为了提高藻蓝蛋白的稳定性及拓宽其在食品加工领域的使用范围,有人通过使用添加剂(糖、柠檬酸、氯化钠、乳清蛋白等)来延长藻蓝蛋白的半衰期<sup>[18-20]</sup>;有人通过对蛋白质构象进行修饰以保持蛋白质的高级结构稳定从而达到稳定色素的目的<sup>[21]</sup>;也有人通过将藻蓝蛋白微胶囊化,通过包衣保护的方式来提高稳定性<sup>[22]</sup>,这些方法虽然能取得一定的效果,但改善作用有限,不足以满足食品加工的要求。因此,若能找到一种不会在严苛的食品加工环境中褪色的藻蓝蛋白,那么将具有非常广阔的潜在市场。

目前,国内外对藻蓝蛋白的研究主要集中在中温藻,关于利用高温藻提取藻蓝蛋白的研究较少,高

温藻由于生长环境特殊,其藻蓝蛋白可能具有某些独特的性质。本文从湖南一处高温温泉采集的样品中分离纯化得到一株嗜热微藻,初步试验表明其生长温度范围为40~65℃,具有很好的高温适应性。本研究拟采用形态学观察和分子生物学分类研究的方法,确定所分离藻株的生物学分类地位。通过提取该藻的藻蓝蛋白,研究其温度、光照及酸碱稳定性,为该藻的潜在应用提供研究数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

藻株来源 2019年8月,从湖南一处温泉中采集了藻液样本,采样时水温为70℃,采样地点位于东经113°54'59.05"、北纬25°32'6.86";BG11培养基:NaNO<sub>3</sub> 1.5 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.04 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.075 g/L, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.036 g/L, 柠檬酸 0.006 g/L, 柠檬酸铁铵 0.006 g/L, 乙二胺四乙酸二钠 0.001 g/L, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.02 g/L, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2.86×10<sup>-3</sup> g/L, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 1.81×10<sup>-3</sup> g/L, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.22×10<sup>-3</sup> g/L, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.39×10<sup>-3</sup> g/L, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.79×10<sup>-4</sup> g/L, Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.49×10<sup>-4</sup> g/L; 2×Taq Master Mix、DL2000 DNA marker、6×Loading buffer、植物DNA提取试剂盒 南京诺唯赞生物科技股份有限公司;琼脂糖、50×TAE缓冲液 生工生物工程(上海)股份有限公司;Gold View I型核酸染色剂 北京索莱宝科技有限公司;其他试剂均为分析纯 国药集团化学试剂有限公司;

HZQ-F280 恒温摇床培养箱 江苏省金坛市万花实验仪器厂;DV320 光学显微镜 重庆奥特光学仪器有限公司;752 紫外可见分光光度计 上海菁华科技仪器有限公司;X-30R 高速冷冻离心机 贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司;SC300 梯度PCR仪 上海启前科技有限公司;DYY-8C 型电泳仪 北京市六一仪器厂;EVOS XL Co 凝胶成像仪 广州誉称为生物科技有限公司;Scientz-IID 超声波细胞粉碎机 宁波新芝生物科技股份有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 藻种的分离纯化 先将温泉采集的水样用滤纸过滤掉杂质,再将其接种至BG11培养基中,置于温度50℃,光照强度4000 lux,转速150 r/min,光照周期12 h:12 h的培养箱中培养。培养液逐渐变成蓝绿色即富集培养完成,取少量样品采用稀释涂布平板法接种于加入琼脂的BG11固体培养基上,培养7 d后,挑取绿色的单藻落,再采用划线分离法接种于新鲜固体培养基上,待藻落长出,挑取长势优良

的单藻落接种于 96 孔板,然后逐步扩大培养,按 10% 的接种量进行接种,全过程均在 50 °C 条件下培养,直至最终完成藻种的分离纯化。

**1.2.2 分离藻株的形态观察** 取对数生长期的藻液 50  $\mu\text{L}$ ,置于光学显微镜下观察,并拍照记录。根据《中国淡水藻类——系统、分类及生态》进行初步分类鉴定<sup>[23]</sup>。

**1.2.3 DNA 提取、PCR 扩增及测序** 取适量对数生长期的藻液,3500 r/min 离心 5 min,弃上清,用液氮将藻泥冻结后研磨成藻粉,采用植物 DNA 提取试剂盒提取微藻 DNA,具体步骤按试剂盒说明书进行。

以提取的微藻 DNA 为模板,PCR 扩增 16S rRNA 基因 DNA 序列片段,引物序列为:27f(5'-AGAGTTT GATCCTGGCTCAG-3'),1492r(5'-GGTTACCTTGT TACGACTT-3')<sup>[24-26]</sup>,PCR 反应体系为:模板 2.5  $\mu\text{L}$ 、引物 1  $\mu\text{L}$ 、2 $\times$ Taq PCR Master Mix 12.5  $\mu\text{L}$ ,用 ddH<sub>2</sub>O 将体系补至 25  $\mu\text{L}$ 。PCR 扩增条件为:94 °C 预变性 4 min、94 °C 变性 30 s、55 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 30 s,30 个循环,72 °C 再延伸 10 min。

扩增完成后,扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶,100 V 电泳 25 min,电泳完成后,将其置于凝胶成像仪中观察结果。PCR 扩增产物送至上海生工生物公司进行测序。

**1.2.4 系统发育树的构建** 测序完成后,用 DNAMAN 8.0 软件将测序结果进行序列拼接,并于 NCBI 网站上(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行 Blast 同源性比对分析,选取同源序列,使用 MEGA7.0 软件进行序列比对分析,并采用 M-L 法构建系统发育树,bootstrap 值 1000 次重复计算以评估分支可信度。

**1.2.5 藻粉的制备** 取 1.2.1 中分离的藻种,按 10% 接种量接种至 BG11 培养基,以 0.4 L/min 的恒定流量连续通气并搅拌培养物,在 50 °C、通入含 15% CO<sub>2</sub> 的空气、4000 lux 光照条件下培养,在指数生长期结束时(第 5 d)收集藻液,4500 r/min 离心 5 min,收集藻体,用去离子水洗去残留的盐分,经冷冻干燥 48 h 后获得藻粉。

**1.2.6 藻蓝蛋白的提取** 称取 0.1 g 藻粉于 50 mL 离心管,加入 10 mL 水,浸泡 2 h,使用超声破碎仪在冰水浴中破碎细胞,超声功率 550 W,超声 2 s,间隔 3 s,总时间 15 min,超声完毕后,藻液在 8000 r/min 离心 10 min(4 °C),收集上清液即为藻蓝蛋白粗提液<sup>[15]</sup>。整个实验过程保持样品避光。

**1.2.7 藻蓝蛋白色价** 将上述藻蓝蛋白粗提液经冷冻干燥获得藻蓝蛋白粉。准确称取 0.025 g 藻蓝蛋白粉,用磷酸盐缓冲液(pH6.8)溶解并定容至 10 mL,稀释 10 倍后,测定 620 nm 的吸光值<sup>[27]</sup>。将测定结果带入式(1),计算色价值:

$$E_{1\text{cm}}^{10\%620} = \frac{A_{620}}{m} \times f \quad \text{式(1)}$$

式中:  $E_{1\text{cm}}^{10\%620}$  表示试样浓度 10%,用 1 cm 比色皿,在 620 nm 处的吸光度;  $A_{620}$  为待测试样液在 620 nm 处的吸光度读数;  $m$  为藻蓝蛋白的质量,  $g$ ;  $f$  为稀释倍数。

## 1.2.8 藻蓝蛋白稳定性试验

**1.2.8.1 温度稳定性试验** 取上述 1.2.6 中提取得到的藻蓝蛋白粗提液(浓度为 1.137 mg/mL),分别置于 4、30、40、50、60、70、80 °C 下,避光放置,每隔 0.5 h 取样,每组 3 个平行,测定其在 620 nm 下的吸光度。

**1.2.8.2 光照稳定性试验** 取上述 1.2.6 中提取得到的藻蓝蛋白粗提液(浓度为 1.137 mg/mL),分别置于 1000、2000、3000、4000、5000 和 6000 lux 的光照强度下,室温放置,每隔 1 d 取样,每组 3 个平行,测定其在 620 nm 下的吸光度。

**1.2.8.3 酸碱稳定性试验** 用 0.01 mol/L 的 HCl 和 0.01 mol/L 的 NaOH 溶液调节藻蓝蛋白粗提液的 pH,调节 pH 为 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0,在 4 °C 避光放置,每隔 0.5 h 取样,每组 3 个平行,测定其在 620 nm 下的吸光度。

**1.2.9 藻蓝蛋白分析方法** 在 280、620、650 nm 处测定粗提液的吸光值(A),由式(2)~(4)分别计算藻蓝蛋白纯度(P)<sup>[28]</sup>、浓度(C)<sup>[29]</sup>和得率(Q)<sup>[29]</sup>。

$$P = \frac{A_{620}}{A_{280}} \quad \text{式(2)}$$

$$C = \frac{A_{620} - 0.7 \times A_{650}}{7.38} \quad \text{式(3)}$$

$$Q(\%) = \frac{C \times V \times K}{m} \times 100 \quad \text{式(4)}$$

式中:  $P$  为藻蓝蛋白纯度;  $C$  为藻蓝蛋白浓度, mg/mL;  $Q$  为藻蓝蛋白得率, %;  $K$  为样品稀释倍数;  $V$  为提取液总体积, mL;  $m$  为原料质量, mg。

## 1.3 数据处理

每组实验重复三次,采用 SPSS 23.0 和 Excel 2010 对数据进行分析处理,实验数据以平均值和标准差表示。采用 GraphPad Prism 8.0.2 和 Origin 2018 进行绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 分离藻株的形态观察

本研究室将从湖南高温温泉采集样品中分离得到的微藻进行纯培养,建立起株系,将其命名为 HN-54。经光学显微镜观察,藻细胞为细长杆状的单细胞,直或有时弯曲,细胞繁殖的方式为二分裂,如图 1 所示。

### 2.2 PCR 扩增

琼脂糖凝胶电泳结果显示,经 PCR 扩增出的 16S rRNA 基因目的片段是单一条带,片段大小在 1500 bp 左右,结果如图 2。

### 2.3 系统发育树的构建

采用双向测序的方法得到的序列长度为

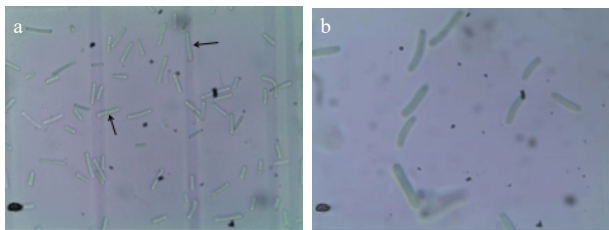


图 1 光学显微镜图

Fig.1 Optical micrographs

注: a: 400×; b: 1000×; 黑色箭头处表示藻细胞正在进行分裂。

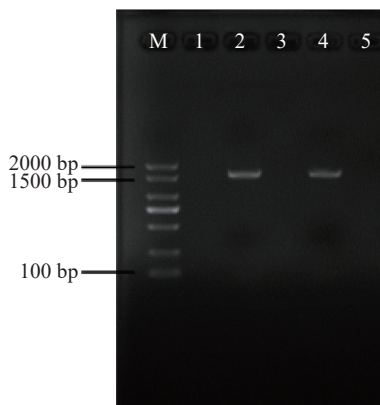


图 2 微藻的 16S rDNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of 16S rDNA of the alga

注: M: DL 2000 DNA Marker; 2、4: 16S rDNA 扩增结果; 1、3、5: 阴性对照。

1395 bp, 完整序列在 NCBI 网站上经 Blast 同源性比对, 再使用 MEGA7.0 软件构建系统发育树, 结果如图 3 所示。

系统发育树显示其与 *Thermosynechococcus elongatus* WFW(KC621876.1)、*Thermosynechococcus elongatus* BP-1(MF191714.1)、*Thermosynechococcus vulcanus* NIES-2134(MF191712.1)同源性最高, 该分离藻株与蓝藻门中的嗜热聚球藻属最为接近, 结合形态学观察结果分析, 应将其定为嗜热聚球藻属的一

支, 将其命名为 *Thermosynechococcus* sp. HN-54 (NCBI 登录号: ON212490)。由于 16S rRNA 基因在整个遗传进化过程中相对保守, 不足以提供关于不同藻株之间关系的充足信息, 无法鉴定至种水平, 因此种一级的分类学地位鉴定尚需要依赖于进一步的研究结果。

### 2.4 藻蓝蛋白的提取得率和纯度

在超声辅助条件下从 HN-54 中得到的色素粗提物中藻蓝蛋白纯度为 0.941, 得率为 11.37%, 相较于行业标准螺旋藻藻蓝蛋白的含量 10%~20% 而言<sup>[30]</sup>, HN-54 藻蓝蛋白含量较高, 可以作为提取藻蓝蛋白的来源。

### 2.5 藻蓝蛋白色价

经计算, 藻蓝蛋白的色价为 196.53, 与宾美生物科技有限公司中产品藻蓝蛋白 E18 的企业标准 ( $E^{1\%}_{618\text{ nm}} \geq 180$ ) 相比, 达到其色值指标, 说明本研究的藻蓝蛋白可以达到目前市场上同类产品的色值标准。

### 2.6 藻蓝蛋白稳定性试验

2.6.1 热稳定性试验 环境温度对藻蓝蛋白稳定性的影响如图 4 所示。以藻蓝蛋白溶液在 620 nm 处的吸光值为指标来表达色值的高低, 通过  $A_{620}$  的变化来反应藻蓝蛋白的稳定性, 从图 4 的结果可见 HN-54 的藻蓝蛋白在 60 °C 以内的温度条件下非常稳定, 吸光值随着时间的延长基本保持不变。但在 70 和 80 °C 时, 藻蓝蛋白的吸光值随着时间的延长不断下降, 2 h 后逐渐趋于稳定。温度越高, 色值下降越迅速, 当温度为 70 °C 时吸光度下降了 26.7%; 而在 80 °C 时吸光度下降了 75.4%。欧瑜等<sup>[30]</sup> 研究发现, 钝顶螺旋藻藻蓝蛋白在温度升高到 50 °C 时稳定性就会降低, 60 °C 时保持 3.5 h 吸光值下降约 66.7%, 70 °C 时几乎完全褪色。Martelli 等<sup>[18]</sup> 在钝顶螺旋藻藻蓝蛋白溶液中添加 62% 的果糖, 在 80 °C 时加热

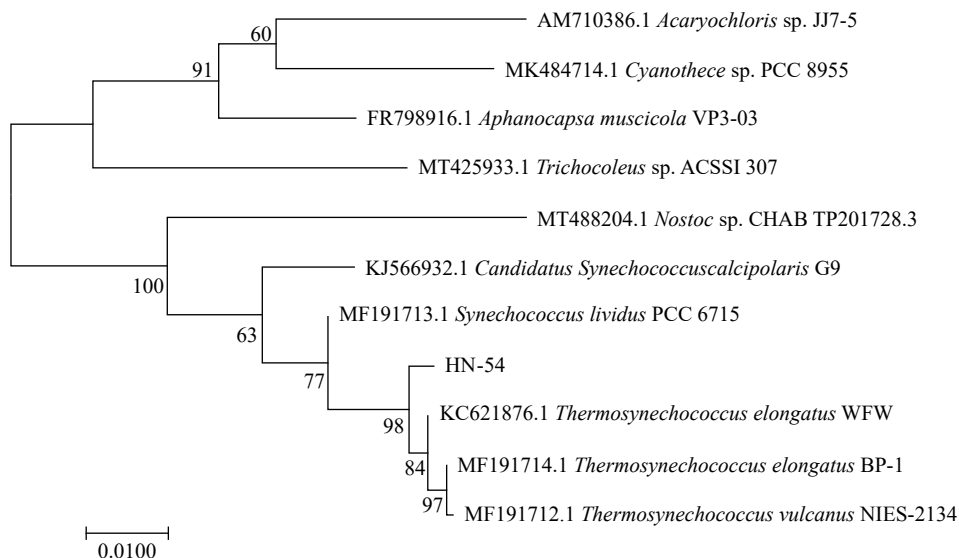


图 3 基于 16S rDNA 序列构建系统发育树

Fig.3 The phylogenetic tree constructed based on the 16S rDNA sequence

1 h 后色值也只能保留 50%, HN-54 藻蓝蛋白在未添加任何稳定剂的情况下经 80 °C 时加热 1 h 色值仍能保留 39%。由此可知, HN-54 藻蓝蛋白耐热性能良好, 与市场上所使用的藻蓝蛋白耐热性相比有较明显的优势, 这一特性很可能与 HN-54 藻株具有高温适应性有关, 在高温状态时其细胞内蛋白质非常稳定, 因此藻蓝蛋白发色团的整体构象在高温时也能保持稳定状态。

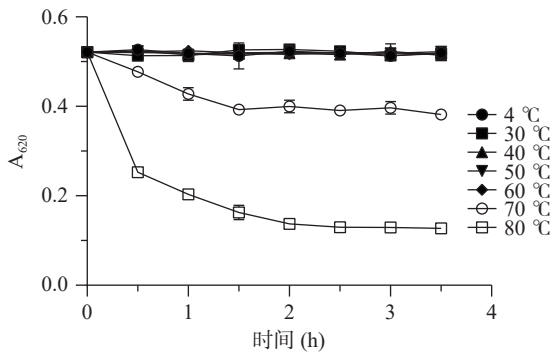


图 4 HN-54 藻蓝蛋白在不同温度下的稳定性  
Fig.4 The stability of the phycocyanin of HN-54 at different temperatures

2.6.2 光照稳定性试验 光照对藻蓝蛋白色值稳定性的影响如图 5 所示。光照强度不同, 对藻蓝蛋白色值稳定性的影响不同。当光照强度为 1000 和 2000 lux 时, 藻蓝蛋白的吸光值在 7 d 的保存期内基本保持不变。当光照强度为 3000 和 4000 lux 时, 吸光值在第 3 d 时有所下降随后逐渐趋于稳定, 吸光值分别保留了 94.1% 和 94.8%。当光照强度为 5000 和 6000 lux 时, 吸光值在第 7 d 时均保留了 91.4%。由此可见, 在 7 d 的观察时间内, 藻蓝蛋白对光照较为稳定, 没有发生严重的褪色现象。张岩等<sup>[31]</sup>研究表明, 螺旋藻藻蓝蛋白置于室内自然光环境下 2 d 吸光值就下降了约 50.0%。Wu 等<sup>[32]</sup>将钝顶螺旋藻藻蓝蛋白连续暴露于 100 μmol/m<sup>2</sup>·s 环境下 36 h, 最终藻蓝蛋白浓度下降约 21.6%, 且光照强度越高, 降解程度越高。可见 HN-54 藻蓝蛋白在光照稳定性方面与其他藻蓝蛋白相比具有更好的表现。藻蓝蛋白吸

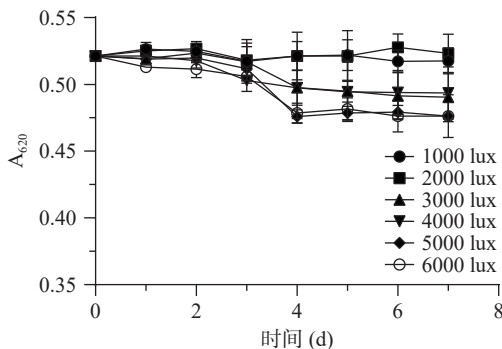


图 5 HN-54 藻蓝蛋白在不同光照强度下的稳定性  
Fig.5 The stability of the phycocyanin of HN-54 at different illumination strength

光度的降低可能是因为当藻蓝蛋白置于强光下或是长期暴露在光照下, 会导致其失去发色团, 从而导致其稳定性降低, 蓝色逐渐消失<sup>[19]</sup>。因此, 为延长藻蓝蛋白的保存时间, 最好避光放置, 以防止藻蓝蛋白结构被光破坏。

2.6.3 酸碱稳定性试验 酸碱对藻蓝蛋白稳定性影响结果如图 6 所示。在 pH6.0 和 pH8.0 时, 藻蓝蛋白吸光值基本保持不变, 藻蓝蛋白非常稳定。在酸性条件下, pH4.0 时藻蓝蛋白吸光值比中性条件下的吸光值高 14.8%; pH2.0 时, 藻蓝蛋白在 3.5 h 后吸光值下降了 28.8%。在碱性条件下, pH10.0 时在 1 h 吸光值下降了 10.6%, 此后直至 3.5 h 基本保持稳定; pH12.0 时吸光值明显下降, 在 3.5 h 后吸光值下降了 65.3%。结果表明, 藻蓝蛋白在 pH4.0~10.0 的范围内较为稳定, 但在极端酸性和碱性条件下稳定性较差, 特别是在碱性条件下对色值影响较大。刘杨等<sup>[33]</sup>研究表明, 钝顶螺旋藻藻蓝蛋白在中性环境下 (pH7.0~8.0) 稳定性良好, 超出此范围稳定性开始下降; 在碱性环境下, HN-54 藻蓝蛋白与钝顶螺旋藻藻蓝蛋白类似, 稳定性下降较明显。pH 是影响藻蓝蛋白在溶液中以单体、三聚体、六聚体形式聚集比例的主要因素。藻蓝蛋白的稳定性依赖于蛋白质的聚集状态, 有报道表明, 六聚体是最稳定的结构, 能避免藻蓝蛋白发生变性, 而在较高或较低的 pH 下, 这种结构很容易解离, 从而导致稳定性降低, 发生褪色<sup>[21, 34]</sup>。本试验表明, 该藻蓝蛋白在 pH4.0~8.0 范围内高度稳定, 可能是溶液中六聚体占主导地位, 从而导致观察到较高的稳定性。因此, 为了保护藻蓝蛋白的高溶解度和吸光度, 最好在弱酸性和中性的环境下使用。

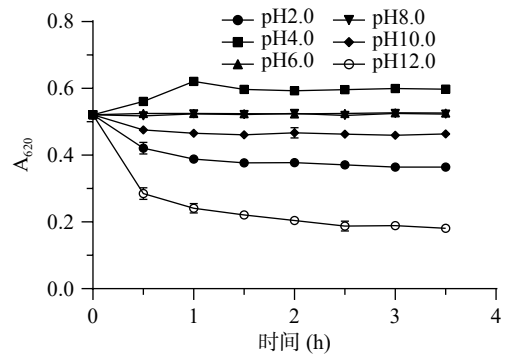


图 6 HN-54 藻蓝蛋白在不同 pH 条件下的稳定性  
Fig.6 The stability of the phycocyanin of HN-54 at different pH

图 7 是藻蓝蛋白溶液在不同 pH 条件下的吸收光谱图, 从图中可见, 藻蓝蛋白的特征吸收峰波长在较强酸碱条件下发生了偏移, pH4.0、pH6.0、pH8.0 的特征吸收峰保持在 620 nm, pH2.0 的吸收峰红移到 625 nm, pH10.0 的吸收峰蓝移到 615 nm, 该结果表明 pH 会影响藻蓝蛋白特征吸收峰的位置, 另外, 从特征吸收峰的吸收强度可以看出, 在强酸和强碱环境下, 藻蓝蛋白发生了较明显的褪色。

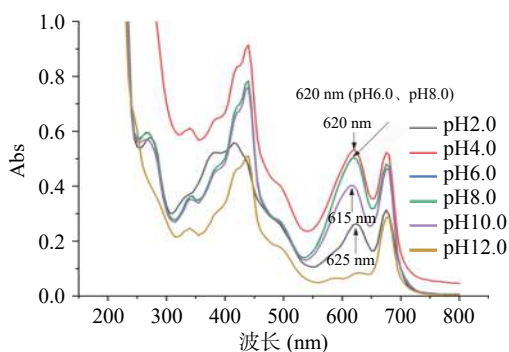


图7 HN-54藻蓝蛋白在不同pH条件下的吸收光谱

Fig.7 The absorption spectrum of the phycocyanin of HN-54 at different pH

### 3 结论

本研究从湖南一处温泉分离得到的藻株为嗜热聚球藻属(*Thermosynechococcus*)的一支,但其种一级的分类学地位尚不能确定。该藻为杆状单细胞结构,直或有时弯曲,二分裂殖。该藻可以得到纯度为0.941、色价为196.53的藻蓝蛋白粗提物,得率为11.37%(对藻干物质)。该藻所含藻蓝蛋白具有良好的热、光和酸碱稳定性。在60℃保持3.5h色值不变,在70℃处理3.5h仍保留73.3%的吸光值,在6000 lux光照7d,色值可保持91.4%,在pH4.0~8.0保持3.5h色值稳定,该藻蓝蛋白在食品加工领域具有良好的应用前景。

热不稳定是藻蓝蛋白市场开发应用最主要的限制条件之一,HN-54藻蓝蛋白表现出比市场上绝大多数藻蓝蛋白更好的耐热性,可以作为耐热性藻蓝蛋白的一个潜在来源,尽管目前的热稳定水平尚需要进一步提高才能满足食品工业更广泛的应用,但是其在较高热稳定性的基础上具备更好的条件进一步优化以满足严苛的食品加工条件。

#### 参考文献

- [1] 古扎丽阿依·牙生,库热西·马木提汗,艾山江. 5株塔克拉玛干沙漠蓝藻的形态学与分子生物学鉴定[J]. *分子植物育种*, 2019, 17(19): 6525-6529. [YASIN G, MAMUTHAN K, AI S J. Morphological and molecular biology identification of 5 cyanobacteria from the Taklimakan desert[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2019, 17(19): 6525-6529.]
- [2] SINGH S, KATE B N, BANERJEE U C. Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: An overview[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2005, 25(3): 73-95.
- [3] GHASEMI Y, YAZDI M T, SHAFIEE A, et al. Parsiguine, a novel antimicrobial substance from *Fischerella ambigua*[J]. *Pharmaceutical Biology*, 2008, 42(4-5): 318-322.
- [4] 雒义凡,李俐珩,李玫锦,等. 不同培养条件对嗜热蓝细菌生长及活性物质的影响研究[J]. *可再生能源*, 2020, 38(1): 1-7. [LUO Y F, LI L H, LI M J, et al. Effects of different culture conditions on the growth and active substances of thermophilic cyanobacteria[J]. *Renewable Energy*, 2020, 38(1): 1-7.]
- [5] SCIUTO K, ANDREOLI C, RASCIO N, et al. Polyphasic ap-

proach and typification of selected *Phormidium* strains (Cyanobacteria)[J]. *Cladistics*, 2011, 28(4): 1-18.

[6] PRIYADARSHANI I, RATH B. Bioactive compounds from microalgae and cyanobacteria: Utility and applications[J]. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2012, 3(11): 4123.

[7] NAINANGU P, ANTONYRAJ A P M, SUBRAMANIAN K, et al. *In vitro* screening of antimicrobial, antioxidant, cytotoxic activities, and characterization of bioactive substances from freshwater cyanobacteria *Oscillatoria* sp. SSCM01 and *Phormidium* sp. SSCM02[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2020, 29: 101772.

[8] 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.

[9] SILVEIRA S T, BURKERT J F M, COSTA J A V, et al. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design[J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98(8): 1629-1634.

[10] CARFAGNA S, LANDI V, CORAGGIO F, et al. Different characteristics of C-phycocyanin (C-PC) in two strains of the extremophilic *Galdieria phlegrea*[J]. *Algal Research*, 2018, 31: 406-412.

[11] MOON M, MISHRA S K, KIM C W, et al. Isolation and characterization of thermostable phycocyanin from *Galdieria sulphuraria*[J]. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 2014, 31(3): 490-495.

[12] 张成武,曾昭琪,张媛贞. 钝顶螺旋藻藻胆蛋白的分离、纯化及其理化特性[J]. *天然产物研究与开发*, 1996, 8(2): 29-34.

[ZHANG C W, ZENG Z Q, ZHANG Y Z. Purification and physicochemical properties of phycobiliprotein of *Spirulina platensis* var. *nanjingensis*[J]. *Natural Product Research and Development*, 1996, 8(2): 29-34.]

[13] SANTIAGO-SANTOS M C, PONCE-NOYOLA T, OLVERA-RAMÍREZ R, et al. Extraction and purification of phycocyanin from *Calothrix* sp.[J]. *Process Biochemistry*, 2004, 39(12): 2047-2052.

[14] 余佳,陈颖,马淑梅,等. 葛仙米藻胆蛋白和藻蓝蛋白对S180荷瘤小鼠肿瘤生长的影响及其作用机制[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(8): 399-405. [YU J, CHEN Y, MA S M, et al. Effects of phycobiliprotein and phycocyanin from *Nostoc sphaeroides* Kützing on the growth of S180 tumor-bearing mice and its mechanism[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(8): 399-405.]

[15] 李思梦,高凤正,曾名湧. 聚球藻7002藻蓝蛋白的分离纯化研究[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(23): 96-102,108. [LI S M, GAO F Z, ZENG M Y. Study on extraction and purification of C-phycocyanin in *Synechococcus* sp. PCC 7002[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(23): 96-102,108.]

[16] 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.

[17] 李俐珩,梁园梅,李玫锦,等. 嗜热蓝细菌PKUAC-E542藻蓝蛋白耐热性以及不同光照条件对其含量影响研究[J]. *北京大学学报(自然科学版)*, 2021, 57(3): 529-535. [LI L H, LIANG Y

- M, LI M J, et al. Thermophilic cyanobacteria PKUAC-E542 phycocyanin heat resistance and effects of different light conditions on its accumulation[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis*, 2021, 57(3): 529–535. ]
- [ 18 ] MARTELLI G, FOLLI C, VISAI L, et al. Thermal stability improvement of blue colorant C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* for food industry applications[J]. *Process Biochemistry*, 2014, 49(1): 154–159.
- [ 19 ] GOYUDIANTO B A, MELIANA C, MULIANI D, et al. The stability of phycocyanin, phycoerythrin, and astaxanthin from algae towards temperature, pH, light, and oxygen as a commercial natural food colorant[J]. *Indonesian Journal of Life Sciences*, 2021, 3(2): 28–42.
- [ 20 ] 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.
- [ 21 ] 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.
- [ 22 ] PRADEEP H N, NAYAK C A. Enhanced stability of C-phycocyanin colorant by extrusion encapsulation[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2019, 56(10): 4526–4534.
- [ 23 ] 胡鸿钧, 魏印心. 中国淡水藻类--系统、分类及生态 [M]. 科学出版社, 2006. [ HU H J, WEI Y X. The freshwater algae of China-systematics, taxonomy and ecology[M]. Science Press, 2016. ]
- [ 24 ] 胡晓龙. 浓香型白酒窖泥中梭菌群落多样性与窖泥质量关联性研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2015. [ HU X L. Illumination the correlation between anaerobic clostridial community diversity and quality of pit mud used for the production of Chinese strong-flavor liquor[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2015. ]
- [ 25 ] 杜金城, 徐敏, 李柏良, 等. 具有抑制大肠杆菌作用的乳酸菌的初步筛选及其益生潜能的研究[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(13): 152–156. [ DU J C, XU M, LI B L, et al. Preliminary screening of lactic acid bacteria against *Escherichia coli* and the research of probiotic potential for the screening bacteria[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(13): 152–156. ]
- [ 26 ] 范德朋, 胡亚冬, 杨敏志, 等. 鱼腥藻藻华水体一株溶藻菌 B WFA55 的鉴定及溶藻特性[J]. *广东海洋大学学报*, 2021, 41(6): 9–17. [ FAN D P, HU Y D, YANG M Z, et al. Identification and algicidal characteristics of an algicidal bacterium BWFA55 in anabaena bloom water[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2021, 41(6): 9–17. ]
- [ 27 ] 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 X Y. Study on extraction and purification of phycocyanin from *Spirulina platensis* and its application[D]. Nanning: Guangxi University, 2019. ]
- [ 28 ] HERRERA A, BOUSSIBA S, NAPOLEONE V, et al. Recovery of C-phycocyanin from the cyanobacterium *Spirulina maxima*[J]. *Journal of Applied Phycology*, 1989, 1(4): 325–331.
- [ 29 ] SONI B, KALAVADIA B, TRIVEDI U, et al. Extraction, purification and characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata*—isolated from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India[J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41(9): 2017–2023.
- [ 30 ] 欧瑜, 叶瑞玲. 钝顶螺旋藻藻蓝蛋白稳定性研究[J]. *食品研究与开发*, 2013, 34(4): 11–14. [ OU Y, YE R L. Study on the stability of phycocyanin from *Spirulina platensis*[J]. *Food Research and Development*, 2013, 34(4): 11–14. ]
- [ 31 ] 张岩, 王凤, 陈炼红. 螺旋藻藻蓝素的提取及其稳定性研究 [J]. *食品工业*, 2014, 35(11): 16–20. [ ZHANG Y, WANG F, CHEN L H. The extraction of *Spirulina* phycocyanobilin and the study of its stability[J]. *The Food Industry*, 2014, 35(11): 16–20. ]
- [ 32 ] WU H L, WANG G H, XIANG W Z, 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.
- [ 33 ] 刘杨, 王雪青, 庞广昌, 等. 钝顶螺旋藻藻蓝蛋白的富集分离及其稳定性研究 [J]. *食品科学*, 2008, 29(7): 39–42. [ LIU Y, WANG X Q, PANG G C, et al. Enrichment separation and stability of C-phycocyanin from *Spirulina platensis*[J]. *Food Science*, 2008, 29(7): 39–42. ]
- [ 34 ] HSIEH-LO M, CASTILLO G, OCHOA-BECERRA M A, et al. Phycocyanin and phycoerythrin: Strategies to improve production yield and chemical stability[J]. *Algal Research*, 2019, 42: 101600.