

# 钝顶螺旋藻分离蛋白的制备及理化特性

商文慧<sup>1,2,3</sup> 薛长风<sup>1,2,3</sup> CHIN Yaoxian<sup>1,2,3</sup> 杭瑜瑜<sup>1,2,3</sup> 陈毅然<sup>1</sup> 王 刚<sup>4</sup>

(1. 海南热带海洋学院食品科学与工程学院, 海南 三亚 572022; 2. 海南热带海洋学院海南省院士团队创新中心, 海南 三亚 572022; 3. 海南热带海洋学院海南省海洋食品工程技术研究中心, 海南 三亚 572022; 4. 云界未来科技(重庆)有限公司, 重庆 400000)

**摘要:** [目的] 探究反复冻融法制备钝顶螺旋藻分离蛋白(*Spirulina platensis* protein isolate, spPI) 条件, 对比分离蛋白和市售藻蓝蛋白(commercially processed phycocyanin, cpPC) 的理化特性。[方法] 考察浸泡时间、料液比、冻结时间和冻融次数对分离蛋白提取率的影响; 测定分离蛋白和市售藻蓝蛋白的理化特性。[结果] 浸泡 16 h, 料液比 1:20 (g/mL), 冻结时间 9 h, 冻融次数 10 次, 蛋白质提取率最佳, 为(29.74±0.16)%。分离蛋白和市售藻蓝蛋白在 pH 3, 4 时分别呈现最低溶解度, 在 pH 5~7, 6~7 范围内呈现最高溶解度。分离蛋白具有更好的起泡性和泡沫稳定性。分离蛋白和市售藻蓝蛋白在 pH 6~7, 7 时乳化活性最强。[结论] 相较于分离蛋白, 市售藻蓝蛋白拥有更高的总巯基、游离巯基和二硫键含量。钝顶螺旋藻分离蛋白拥有更好的溶解性和起泡性。

**关键词:** 钝顶螺旋藻; 反复冻融法; 制备; 分离蛋白; 理化特性

## Preparation and physicochemical properties of protein isolate from *Spirulina platensis*

SHANG Wenhui<sup>1,2,3</sup> XUE Changfeng<sup>1,2,3</sup> CHIN Yaoxian<sup>1,2,3</sup> HANG Yuyu<sup>1,2,3</sup>  
CHEN Yiran<sup>1</sup> WANG Gang<sup>4</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Hainan Tropical Ocean University, Sanya, Hainan 572022, China; 2. Hainan Provincial Academician Team Innovation Center, Hainan Tropical Ocean University, Sanya, Hainan 572022, China; 3. Marine Food Engineering Technology Research Center of Hainan Province, Hainan Tropical Ocean University, Sanya, Hainan 572022, China; 4. Yunjie Future Technology (Chongqing) Co., Ltd., Chongqing 400000, China)

**Abstract:** [Objective] To investigate the conditions for preparing *Spirulina platensis* protein isolate (spPI) using repeated freeze-thaw cycles, and to compare the physicochemical properties of spPI and commercially processed phycocyanin (cpPC). [Methods] The effects of soaking time, solid-to-liquid ratio, freezing duration, and number of freeze-thaw cycles on the protein extraction yield were studied. The physicochemical properties of spPI and cpPC were also determined. [Results] Under the conditions of 16 hours soaking, a solid-to-liquid ratio of 1:20 (g/mL), 9 hours freezing time, and 10 freeze-thaw cycles, the protein extraction yield reached its optimum at (29.74±0.16)%. spPI and cpPC exhibited their lowest solubility at pH 3 and 4, respectively, and the highest solubility within the pH ranges of 5~7 and 6~7. spPI showed better foaming capacity and foam stability. The strongest emulsifying activity occurred at pH 6~7 for spPI and at pH 7 for cpPC. [Conclusion] Compared to spPI, cpPC contained higher levels of total thiol, free thiol, and disulfide bonds. spPI demonstrates superior solubility and foaming properties.

**Keywords:** *Spirulina platensis*; repeated freeze-thaw methods; preparation; protein isolate; physicochemical properties

基金项目: 海南热带海洋学院科研启动资助项目(编号: RHDR202111)

通信作者: 薛长风(1975—), 男, 海南热带海洋学院副教授, 博士。E-mail: 16356729@qq.com

收稿日期: 2024-10-18 改回日期: 2025-06-18

引用格式: 商文慧, 薛长风, CHIN Yaoxian, 等. 钝顶螺旋藻分离蛋白的制备及理化特性[J]. 食品与机械, 2025, 41(10): 112-120.

Citation: SHANG Wenhui, XUE Changfeng, CHIN Yaoxian, et al. Preparation and physicochemical properties of protein isolate from *Spirulina platensis*[J]. Food & Machinery, 2025, 41(10): 112-120.

微藻具有繁殖能力强,生长周期短,营养价值高,不与粮争地等优点。螺旋藻具有高蛋白、低脂肪、低糖类的特点,其中蛋白质含量在60%以上<sup>[1]</sup>。螺旋藻还有提高机体免疫力、降血脂、降血压等多种功效<sup>[2-4]</sup>。螺旋藻以其丰富的营养活性和环境友好的生长方式,成为理想的蛋白质资源和功能性食品原料。

螺旋藻细胞壁内表面附着有大量色素蛋白颗粒<sup>[5]</sup>,细胞壁的存在影响着细胞内蛋白质的分离提取,因此可以利用生物、物理和化学的手段破坏螺旋藻细胞结构,促进螺旋藻蛋白从细胞中释放<sup>[6]</sup>。研究人员<sup>[7-9]</sup>使用咪唑/乙酸酯缓冲液、碱溶酸沉法或超声波提取法破坏螺旋藻细胞壁,促进钝顶螺旋藻中生物物质的溶出。然而化学试剂或物理手段可能改变蛋白质的结构,对螺旋藻理化性质造成影响,且用化学法处理还可能会面临化学品残留的风险。

螺旋藻中含有3 786种蛋白质,藻蓝蛋白含量占比最高,为干基质量的25%<sup>[10-11]</sup>。有研究者<sup>[12]</sup>将生物物质纯化后获得相对分子质量约为30 000的C-藻蓝蛋白作为研究对象开展理化特性的研究。尽管藻蓝蛋白是螺旋藻细胞内蛋白的主要成分,然而制备高纯度藻蓝蛋白所需时间长,设备成本投入大。因此,从时间成本、经济成本和科学研究角度出发,有必要明确螺旋藻细胞内蛋白质的理化特性,以期开发其在工业中的用途,扩大适用范围,降低经济成本。

不同的蛋白质提取方法会影响其理化特性,理化特性是影响蛋白质应用的主要因素。尽管有针对螺旋藻蛋白的理化特性研究见诸报道,但不同螺旋藻细胞破碎方法制备的蛋白理化特性存在差异。Yüçetepe等<sup>[13]</sup>利用超声波辅助提取法制备钝顶螺旋藻浓缩蛋白,在43.87℃,pH 7.16处理60 min,试验样品表现出最佳的持水性(4.41 g水/g蛋白)和持油性(10.13 g油/g蛋白),起泡性(300%)和泡沫稳定性(83.94%),乳化活性(42.99%)和乳化稳定性(92.50%)。Purdi等<sup>[14]</sup>对比传统提取方法获得的分离蛋白,借助超声波辅助提取法,在振幅80%,工作周期60%,处理30 min的条件下制备的钝顶螺旋藻分离蛋白(*Spirulina platensis* protein isolate, spPI),其持水性、乳化性、起泡性和泡沫稳定性分别提高了35.99%,365.26%,121.89%,120.84%。

反复冻融法是利用冰晶在冻融过程中刺破细胞壁,可最大限度避免物理和化学因素对分离蛋白的污染和结构干扰。研究拟借助反复冻融法考察浸泡时间、料液比、冻结时间和冻融次数对钝顶螺旋藻分离蛋白提取率的影响,确定分离蛋白最优提取条件,并对分离蛋白的理化特性进行探究,以期明确钝顶螺旋藻分离蛋白的理化特性,为分离蛋白的开发和个性化应用提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

#### 1.1.1 材料与试剂

钝顶螺旋藻粉:80目,云南德科特生物工程有限公司;

藻蓝蛋白:浙江宾美生物科技有限公司;

氯化钠、硼酸、氢氧化钠等:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

十二烷基硫酸钠(SDS)、Tris、甘氨酸:生化试剂,北京索莱宝科技有限公司;

Bradford法蛋白质定量检测试剂盒:宝生物工程(大连)有限公司。

#### 1.1.2 主要仪器设备

全自动凯氏定氮仪:K1100型,海能未来技术集团股份有限公司;

多功能微孔板检测仪:Infinite 200PRO型,帝肯(上海)实验器材有限公司;

紫外可见分光光度计:T6型,北京普析通用仪器有限责任公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 钝顶螺旋藻分离蛋白提取的单因素试验 参照于晓蕾<sup>[15]</sup>和罗爱国等<sup>[16]</sup>的研究方法,探究浸泡时间、料液比、冻结时间、冻融次数与钝顶螺旋藻蛋白提取率的关系,修改如下。

(1) 浸泡时间:称取钝顶螺旋藻藻粉1 g,按照料液比1:20(g/mL)与2 g/100 mL的NaCl溶液充分混匀,室温条件下分别浸泡4, 8, 12, 16, 20 h,于-20℃下冷冻5 h,30℃水浴解冻1 h。溶液置于4℃环境中4 000×g离心20 min,收集上清测定蛋白含量,计算蛋白提取率。

(2) 料液比:称取钝顶螺旋藻藻粉1 g与2 g/100 mL的NaCl溶液充分混匀,料液比依次设置为1:10,1:20,1:30,1:40,1:50(g/mL),室温浸泡12 h,于-20℃下冷冻5 h,30℃水浴解冻1 h。溶液置于4℃环境中4 000×g离心20 min,收集上清测定蛋白含量,计算蛋白提取率。

(3) 冻融次数:称取钝顶螺旋藻藻粉1 g,按照料液比1:20(g/mL)与2 g/100 mL的NaCl溶液充分混匀,室温环境中浸泡12 h后于-20℃下冷冻5 h,30℃水浴解冻1 h,冻融次数设定为2, 4, 6, 8, 10次。溶液置于4℃环境中4 000×g离心20 min,收集上清测定蛋白含量,计算蛋白提取率。

(4) 冻结时间:称取钝顶螺旋藻藻粉1 g,按照料液比1:20(g/mL)与2 g/100 mL的NaCl溶液充分混匀,室温浸泡12 h,于-20℃下分别冻结1, 3, 5, 7, 9 h。溶液置于4℃环境中4 000×g离心20 min,收集上清测定蛋白含量,计算蛋白提取率。

1.2.2 Bradford法测定上清液中蛋白质含量 参照季雨等<sup>[17]</sup>的方法,并稍作修改。将2 mg/mL的标准BSA溶液按照表1的方法稀释,配制标准溶液。将4 μL标准溶液和

稀释后的样品溶液加入 96 孔板,并与 200  $\mu\text{L}$  Bradford 染色液混合,放置 5 min 后,测定 595 nm 处的吸光度。以 BSA 蛋白溶液浓度为横坐标,以标准溶液吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,代入样品吸光度,获得样品蛋白浓度。

表 1 BSA 标准溶液的稀释方法表

Table 1 Dilution method for BSA standard solution

序号	2 mg/mL BSA 标准溶液/ $\mu\text{L}$	稀释液/ $\mu\text{L}$	BSA 终质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
1	50	50	1 000
2	30	50	750
3	20	60	500
4	20	140	250
5	10	150	125
6	5	395	25
7	0	100	0

1.2.3 正交试验优化 以单因素试验结果作为该次正交试验的试验依据,参照三因素四水平正交试验表,以蛋白提取率为评定指标,分析影响钝顶螺旋藻分离蛋白提取率的 4 个因素:浸泡时间、料液比、单次冻结时间、冻融次数。

1.2.4 钝顶螺旋藻分离蛋白和市售藻蓝蛋白的蛋白含量、纯度和色度测定

(1) 蛋白含量:采用凯氏定氮法<sup>[18]</sup>。

(2) 蛋白纯度:参照陈盛仕等<sup>[19]</sup>的方法,并稍作修改。将 0.01 g 的蛋白样品溶于超纯水中,利用紫外可见分光光度计分别测定样品在 620, 280 nm 下的吸光度,通过式(1)计算分离蛋白中藻蓝蛋白的纯度。

$$P = A_{620\text{ nm}} / A_{280\text{ nm}}, \quad (1)$$

式中:

$P$ ——分离蛋白中藻蓝蛋白的纯度;

$A_{620\text{ nm}}$ ——分离蛋白在 620 nm 处吸光度;

$A_{280\text{ nm}}$ ——分离蛋白在 280 nm 处吸光度。

(3) 蛋白色度:参照 Malik 等<sup>[20]</sup>的方法,修改如下,取 2 g 样品置于测量容器中,测量  $L^*$ 、 $a^*$  和  $b^*$  值,按式(2)计算色差值。

$$\Delta E = \sqrt{(L_0^* - L^*)^2 + (a_0^* - a^*)^2 + (b_0^* - b^*)^2}, \quad (2)$$

式中:

$\Delta E$ ——色差值;

$L_0^*$ 、 $L_0$ ——分离蛋白和市售藻蓝蛋白的亮度;

$a_0^*$ 、 $a_0$ ——分离蛋白和市售藻蓝蛋白的红绿指数;

$b_0^*$ 、 $b_0$ ——分离蛋白和市售藻蓝蛋白的黄蓝指数。

1.2.5 SDS-PAGE 电泳检测 参照商文慧<sup>[21]33</sup>的方法。

1.2.6 溶解度测定 参照杜椅楠<sup>[22]</sup>的方法,并稍作修改。将含有 0.1 g 蛋白的样品与 10 mL 超纯水混合,使用 1 mol/L HCl 和 NaOH 调整溶液的 pH,室温环境中搅拌 30 min,将样品溶液置于离心机中,在 4  $^{\circ}\text{C}$ 、6 000  $\times g$  条件

下离心 30 min,收集上清,用 Bradford 试剂盒测定样品溶液中蛋白的浓度。通过式(3)计算蛋白溶解度。

$$S = \frac{C_1}{C_2} \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

$S$ ——蛋白样品的溶解度,%;

$C_1$ ——上清液中蛋白的含量,g;

$C_2$ ——总蛋白的含量,g。

1.2.7 持水性和持油性测定 参照张晓慧等<sup>[23]</sup>的方法并加以修改。

(1) 持水性:4 mL 超纯水与含有 0.2 g 蛋白的样品混合,室温环境中放置 30 min 后,将样品溶液置于离心机中,在 4  $^{\circ}\text{C}$ 、8 000  $\times g$  条件下离心 30 min,收集上清,测量未吸附的水的体积,计算蛋白的持水性。

(2) 持油性:4 mL 大豆油与含有 0.2 g 蛋白的样品混合,室温环境中放置 30 min 后,将样品溶液置于离心机中,在 4  $^{\circ}\text{C}$ 、8 000  $\times g$  条件下离心 30 min,收集上清,测量未吸附的大豆油的体积,计算蛋白的持油性。

1.2.8 起泡性和泡沫稳定性测定 参照 Jin 等<sup>[24]</sup>的方法,并稍作修改。向 100 mL 量筒中加入含有 0.15 g 蛋白的样品,加入 10 mL 超纯水,在 15 600 r/min 条件下,匀浆 3 min,然后测定液体的总体积。将样品在室温下分别放置 10, 30 min,分别测定液体的总体积。计算蛋白的起泡性和泡沫稳定性。

1.2.9 乳化活性和乳化稳定性测定 参照 Drozłowska 等<sup>[25]</sup>的方法,并加以修改。将样品配制为 0.2 g/100 mL 的溶液,配制 1 mol/L HCl 和 NaOH 溶液,调整样品溶液 pH 至 3~9。向蛋白溶液中加入 10 mL 大豆油,使用匀浆机在 13 500 r/min 条件下匀浆 2 min。从容器底部吸取 20  $\mu\text{L}$  溶液,与 40 倍体积的 0.1 g/100 mL SDS 溶液振荡混合,移取 200  $\mu\text{L}$  溶液注入透明 96 孔板,然后置于酶标仪中,在 500 nm 处测定溶液的吸光度。匀浆后的溶液静置 10 min,再次从底部移取 20  $\mu\text{L}$  溶液,注入 40 倍体积的 0.1 g/100 mL SDS 溶液,振荡混匀后,500 nm 处测定吸光度。空白对照为 0.1 g/100 mL SDS 溶液的吸光度。计算蛋白的乳化活性和乳化稳定性。

1.2.10 巯基和二硫键测定 参照商文慧<sup>[21]36</sup>的方法。

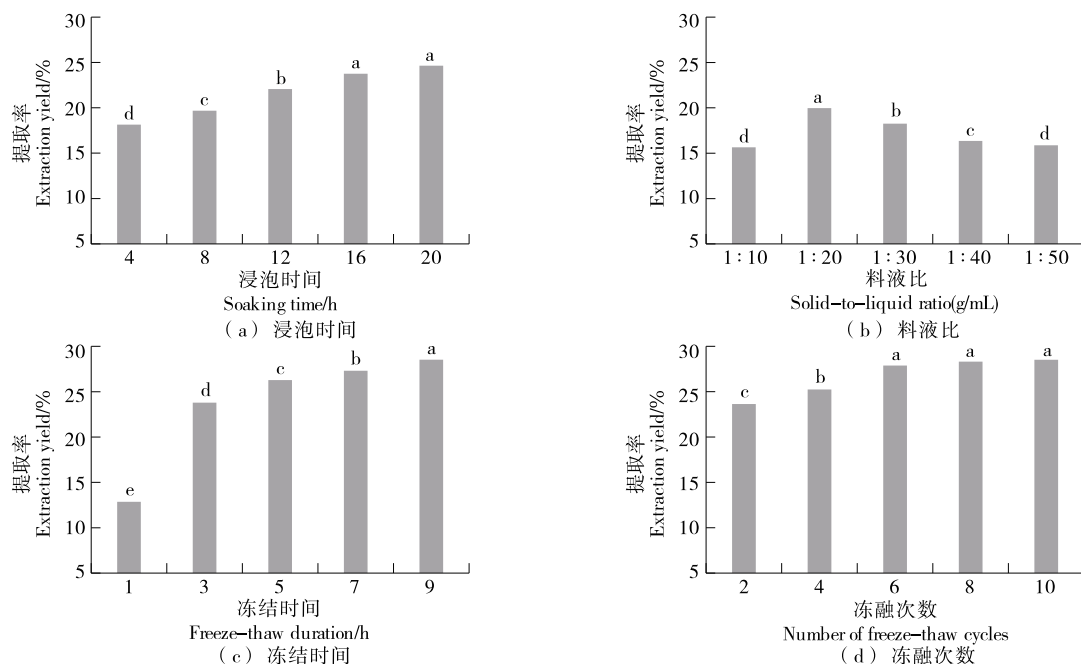
### 1.3 数据分析

所有试验至少重复 3 次,试验数据以“平均值 $\pm$ 标准偏差”表示。数据统计和作图使用 Excel 2019 软件,正交试验设计和显著性分析使用 IBM SPSS Statistics 27 软件 ( $P < 0.05$  表明存在显著性差异)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 各因素与蛋白提取率的关系

2.1.1 浸泡时间 如图 1(a)所示,随着浸泡时间的延长,蛋白提取率逐渐上升,浸泡时间为 4 h 时,分离蛋白的提



字母不同表示不同处理条件下钝顶螺旋藻分离蛋白提取率之间存在显著差异( $P < 0.05$ )

图1 浸泡时间、料液比、冻结时间和冻融次数对钝顶螺旋藻分离蛋白提取率的影响

Figure 1 Effects of soaking time, solid-to-liquid ratio, freezing duration, and number of freeze-thaw cycles on spPI yield

取率最低,为18.15%。当浸泡时间为20 h时,提取率提升至24.65%。浸泡过程中,螺旋藻细胞内的水含量逐渐增多,在随后的冻结过程中,细胞内水分结晶导致体积增大,冰晶刺破细胞壁,胞内蛋白溶出量增加,从而获得较高的蛋白提取率<sup>[5]</sup>。浸泡时间为16,20 h时,钝顶螺旋藻分离蛋白的提取率最高,选择浸泡时间12,16,20 h开展正交试验。

**2.1.2 料液比** 如图1(b)所示,随着料液比的提升,分离蛋白的提取率呈先上升后降低的趋势,料液比为1:20 (g/mL)时,蛋白提取率最高,为19.98%。这与沈向阳等<sup>[26]</sup>针对钝顶螺旋藻藻蓝蛋白提取的研究结果相一致。因此,1:20 (g/mL)的料液比可能是提取钝顶螺旋藻分离蛋白的最佳比例,选择料液比1:20,1:30,1:40 (g/mL)进行正交试验。

**2.1.3 冻结时间** 如图1(c)所示,冻结时间1 h时,分离蛋白提取率最低,仅为12.86%,可能是由于时间过短,NaCl溶液尚未完全冻结,钝顶螺旋藻的细胞壁破坏程度较小,导致蛋白质提取率较低。随着冻结时间的增加,提取率逐渐升高,表明冻结时间越长,螺旋藻的细胞壁被破坏的程度越大,溶出的蛋白质越多。冻结时间延长至9 h时,蛋白提取率增加至28.53%。该趋势与Sianipar等<sup>[27]</sup>的试验结果不尽相同,但随着冻结时间的延长,不同冻结时间下,溶液中螺旋藻细胞壁被破坏程度和细胞内蛋白质释放量趋向一致。因此,冻结时间为9 h时,钝顶螺旋藻分离蛋白提取率最高,选择冻结时间5,7,9 h开展正交

试验。

**2.1.4 冻融次数** 如图1(d)所示,冻融次数从2次增加到6次时,分离蛋白提取率由23.63%提高至27.88%。螺旋藻细胞破碎率持续增加,细胞内蛋白持续溶出,说明该条件下,螺旋藻细胞壁被破坏的程度较大。而Tian等<sup>[28]</sup>仅使用1次冻融即获得了最高浓度的藻蓝蛋白。这可能与冻融条件之间的差异有关,该研究中的冻结温度为 $-80^{\circ}\text{C}$ ,融化时间为24 h。当冻融次数增加至8次和10次时,相较于6次冻融,分离蛋白提取率无显著提高,说明继续增加冻融次数不会使分离蛋白提取率明显提高。在冻融6,8,10次后,钝顶螺旋藻分离蛋白的提取率最高,然而,要结合其他单因素试验的条件才能够确定最适宜的冻融次数,因此,选择冻融次数6,8,10次进行正交试验。

## 2.2 提取条件优化

在单因素试验的基础上,选择四因素三水平的正交试验对钝顶螺旋藻分离蛋白的提取条件进行优化,试验因素水平见表2,正交试验结果见表3。

表2  $L_9(3^4)$  正交试验因素水平表

Table 2  $L_9(3^4)$  factors and levers of orthogonal test

水平	A 浸泡 时间/h	B 料液比 (g/mL)	C 冻结 时间/h	D 冻融 次数
1	12	1:20	5	6
2	16	1:30	7	8
3	20	1:40	9	10

表 3 正交试验结果及分析表

Table 3 Results and analysis of orthogonal test

试验号	A	B	C	D	提取率/%
1	1	1	1	1	14.12
2	1	2	2	2	17.85
3	1	3	3	3	20.34
4	2	1	2	3	19.86
5	2	2	3	1	15.27
6	2	3	1	2	14.94
7	3	1	3	2	19.50
8	3	2	1	3	15.29
9	3	3	2	1	14.45
$k_1$	17.44	17.83	14.78	14.61	
$k_2$	16.69	16.14	17.39	17.43	
$k_3$	16.41	16.58	18.37	18.50	
R	1.02	1.69	3.59	3.88	

由表 3 可知,分离蛋白提取率的影响因素为冻结次数 > 冻融时间 > 料液比 > 浸泡时间,最佳工艺组合为浸泡时间 12 h,料液比 1:20 (g/mL),冻结时间 9 h,冻融次数 10 次。该条件下,分离蛋白的提取率为 29.74%。Purdi 等<sup>[14]</sup>发现,在 pH 12 溶液环境中钝顶螺旋藻分离蛋白提取率为 32.48%,利用超声波提取法振幅为 80% 时,分离蛋白的提取率在 90% 以上。然而蛋白质在高 pH 环境和超声波处理条件下,空间结构可能会发生改变,进而影响其理

化特性。沈向阳等<sup>[26]</sup>和 Menegotto 等<sup>[29]</sup>均是借助改变溶液 pH 的方法促进藻蓝蛋白溶出,提高蛋白溶出率。与上述研究相比,试验优化的工艺条件相对温和,能够减少提取过程中对蛋白结构的破坏。

2.3 蛋白质含量和纯度

凯氏定氮结果表明,钝顶螺旋藻分离蛋白中蛋白质含量为 55.55%。钝顶螺旋藻分离蛋白中藻蓝蛋白的纯度为 0.52±0.02。藻蓝蛋白的纯度与其用途密切相关,藻蓝蛋白纯度  $P \geq 0.7$  时为食品级,  $P \geq 3.0$  时为医药级,  $P \geq 4.0$  时为分析级<sup>[19]</sup>。藻蓝蛋白的纯度低于食品级,这是由于分离蛋白未经纯化,含有其他蛋白质。

2.4 色度

表 4 给出了钝顶螺旋藻分离蛋白和市售藻蓝蛋白色度。钝顶螺旋藻分离蛋白的  $L^*$  值显著高于市售藻蓝蛋白,说明前者的颜色较为明亮,后者的颜色较暗。市售藻蓝蛋白的  $a^*$  值高于分离蛋白,但市售藻蓝蛋白的  $b^*$  值低于分离蛋白,说明市售藻蓝蛋白的颜色更偏向于蓝色。García 等<sup>[30]</sup>测定不同 pH 条件下制备藻蓝蛋白样品的色度,其  $L^*$  值为 88.16~94.04,高于分离蛋白和市售藻蓝蛋白;  $a^*$  值为 -15.50~-7.26,高于分离蛋白,低于市售藻蓝蛋白;  $b^*$  值为 -9.79~1.31,高于分离蛋白和市售藻蓝蛋白。由此推测,样品中蛋白种类和含量可能是导致颜色差异的原因。与该研究不同的是,文献报道中利用磷酸盐缓冲液提取藻蓝蛋白,因此,提取溶剂和提取方法可能是造成蛋白颜色差异的原因。

表 4 钝顶螺旋藻分离蛋白与市售藻蓝蛋白色度<sup>†</sup>

Table 4 Color composition of spPI and cpPC (n=3)

样品	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$E^*$
钝顶螺旋藻分离蛋白	51.54±0.01 <sup>a</sup>	-18.93±0.10 <sup>b</sup>	-18.37±0.01 <sup>a</sup>	57.89±0.01 <sup>a</sup>
市售藻蓝蛋白	34.23±0.02 <sup>b</sup>	-1.78±0.03 <sup>a</sup>	-30.87±0.02 <sup>b</sup>	46.12±0.01 <sup>b</sup>

<sup>†</sup> 字母不同表示不同样品的特性之间存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。

2.5 SDS-PAGE 电泳图谱

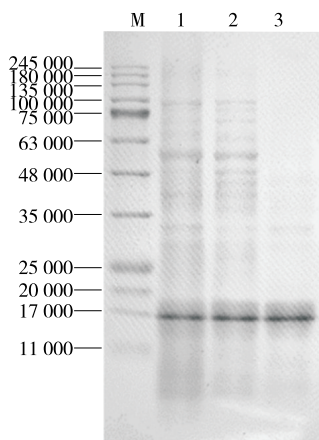
将蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳分析。由图 2 可知,钝顶螺旋藻粉和分离蛋白呈现相似的条带,主要分布在相对分子质量 17 000~135 000 范围内。藻粉、分离蛋白和市售藻蓝蛋白在相对分子质量 17 000 附近均有蛋白质条带分布,并且市售藻蓝蛋白仅在该相对分子质量附近分布最为明显。于淑坤等<sup>[31]</sup>和李湘河等<sup>[32]</sup>报道了钝顶螺旋藻藻蓝蛋白在相对分子质量 20 000 左右有 2 个明显的条带,分别为藻蓝蛋白的  $\alpha$ 、 $\beta$  亚基。因此,图 1 中位于相对分子质量 17 000 的条带可能为钝顶螺旋藻中藻蓝蛋白的亚基。因此,存在于分离蛋白中的其他蛋白质可能是造成两种蛋白样品理化特性差异的原因。

2.6 溶解度

钝顶螺旋藻分离蛋白和市售藻蓝蛋白在不同 pH 环

境中的溶解度如图 3 所示。pH 为 3~4 和 4 时,分离蛋白和市售藻蓝蛋白获得最低的溶解度,分别为 11.51%~12.26% 和 5.17%。Fernández-Rojas 等<sup>[33]</sup>报道,不同来源的藻蓝蛋白等电点介于 4.1 和 6.4 之间。尽管在等电点附近获得大量的藻蓝蛋白。然而根据 Patil 等<sup>[34]</sup>的发现,在低于 pH 5 的溶液环境中回收的藻蓝蛋白纯度低于其他 pH 值。

随着 pH 的升高,两种蛋白样品的溶解度同时呈上升的趋势,并且分离蛋白的溶解度高于市售藻蓝蛋白。在 pH 5~7 和 6~7 时,分离蛋白和市售藻蓝蛋白的溶解度最高,分别为 45.44%~47.29% 和 44.98%~45.15%。由此可见,分离蛋白具有好的稳定性和更宽泛的溶液 pH 适应性。然而,在 pH 8 时,两种蛋白样品溶解度突然下降,并且分离蛋白的下降幅度大于藻蓝蛋白。该趋势与 Patil 等<sup>[34]</sup>和 Su 等<sup>[35]</sup>的报道相一致,即藻蓝蛋白在 pH 6~7 的溶



M. Marker 1. 钝顶螺旋藻粉 2. 钝顶螺旋藻分离蛋白 3. 市售藻蓝蛋白

图2 钝顶螺旋藻粉、钝顶螺旋藻分离蛋白和市售藻蓝蛋白 SDS-PAGE 电泳条带

Figure 2 Electrophoresis bands of *Spirulina platensis* powder, spPI, and cpPC by SDS-PAGE

液中最稳定,在 pH<5 或 pH>8 的溶液环境中处于不稳定状态。另外,两种样品蛋白组成的差异,可能也是导致该结果的原因。

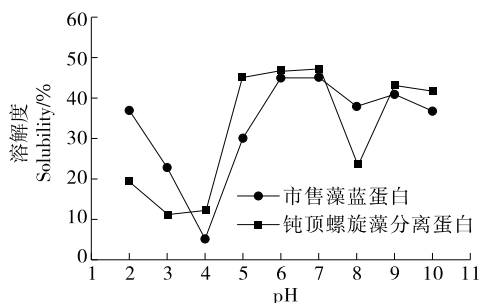


图3 钝顶螺旋藻分离蛋白和市售藻蓝蛋白溶解度

Figure 3 Solubility of spPI and cpPC

### 2.7 持水性、持油性和泡沫性

由表5可知,钝顶螺旋藻分离蛋白和市售藻蓝蛋白样品在持水性和持油性方面无显著性差异。Sangian 等<sup>[36]</sup>向酸奶中添加藻蓝蛋白,结果表明不同藻蓝蛋白的添加量无法提高酸奶的持水性。蛋白质的制备方法、蛋白的

二级结构均能够影响蛋白的持水性和持油性<sup>[37]</sup>。在该试验中,两种蛋白样品持水性和持油性相似,可能与样品中小相对分子质量的蛋白质含量较高,溶解性较好,蛋白组成相近有关。

钝顶螺旋藻分离蛋白和市售藻蓝蛋白的起泡性和泡沫稳定性如表5所示。分离蛋白的起泡性远高于市售藻蓝蛋白。Li等<sup>[38]</sup>发现,在 pH 3, 4, 5 的条件下,藻蓝蛋白的起泡性无显著变化。此外,Li等<sup>[38]</sup>还发现未经处理的藻蓝蛋白起泡性介于 60% 与 80% 之间,该结果与试验中的市售藻蓝蛋白的起泡性(80.93%)相近,这可能与样品中蛋白质组成相近有关。随着时间的推移,容器中泡沫总体积逐渐减少,放置 10, 30 min 后,分离蛋白泡沫稳定性的变化幅度比市售藻蓝蛋白的更大。随着放置时间的延长,藻蓝蛋白的泡沫稳定性在不同 pH 环境中没有显著的变化<sup>[38]</sup>。蛋白质的相对分子质量能够影响其泡沫性,匀浆过程中高相对分子质量蛋白质的存在会增强分子间作用力,降低表面张力,促使更多的气体与其结合形成气泡,保持稳定性<sup>[39]</sup>。从图2中可以看出,分离蛋白中高相对分子质量蛋白质的含量高于市售藻蓝蛋白,因此,分离蛋白表现出更好的起泡性,以及放置 10 min 后的泡沫稳定性。由于市售藻蓝蛋白中含有的蛋白质种类更加单一,而且相对分子质量更小,因而在放置 30 min 后表现出更好的泡沫稳定性。

### 2.8 乳化性

钝顶螺旋藻分离蛋白和市售藻蓝蛋白的乳化活性如表6所示。pH 为 3 和 4 时,分离蛋白和市售藻蓝蛋白的乳化活性最低,并且前者高于后者。随着 pH 的升高,两种蛋白样品的乳化活性同时上升,分离蛋白在 pH 6 和 7 时的乳化活性最高,市售藻蓝蛋白在 pH 6 表现出最高的乳化活性,且高于分离蛋白。随着 pH 继续升高,分离蛋白和市售藻蓝蛋白的乳化活性呈下降的趋势,在该范围内,市售藻蓝蛋白的乳化活性均高于分离蛋白。两种蛋白质的乳化活性呈现 pH 依赖性。Li 等<sup>[38]</sup>测定 pH 3, 4, 5 条件下藻蓝蛋白的乳化活性(70~100 m<sup>2</sup>/g)高于市售藻蓝蛋白的(1.77~11.27 m<sup>2</sup>/g)。这可能与蛋白质的浓度和油相在溶液中的比例有关<sup>[40]</sup>。Zhou 等<sup>[41]</sup>测定分析级的藻蓝蛋白在 2 mg/mL 时乳化活性为 68.64 m<sup>2</sup>/g。该结果高于两种试验样品,可能与分析级藻蓝蛋白的纯度和含量更高有关。

表5 钝顶螺旋藻分离蛋白和市售藻蓝蛋白的持水性、持油性、起泡性和泡沫稳定性†

Table 5 Water-holding capacity, oil-holding capacity, foaming capacity, and foaming stability of spPI and cpPC (n=3)

样品	持水性/(mL·g <sup>-1</sup> )	持油性/(mL·g <sup>-1</sup> )	起泡性/%	泡沫稳定性/%	
				10 min	30 min
钝顶螺旋藻分离蛋白	19.93±0.02	19.01±0.03	231.00±0.14 <sup>a</sup>	167.70±0.13 <sup>a</sup>	60.43±0.12 <sup>b</sup>
市售藻蓝蛋白	19.81±0.06	19.05±0.05	80.93±0.10 <sup>b</sup>	74.97±0.05 <sup>b</sup>	72.06±0.06 <sup>a</sup>

† 字母不同表示不同样品的特性之间存在显著差异(P<0.05)。

表 6 钝顶螺旋藻分离蛋白和市售藻蓝蛋白乳化活性<sup>†</sup>  
Table 6 Emulsifying activity index of spPI and cpPC (n=3)

pH	乳化活性/(m <sup>2</sup> ·g <sup>-1</sup> )	
	钝顶螺旋藻分离蛋白	市售藻蓝蛋白
3	5.62±0.40 <sup>c</sup>	1.77±0.06 <sup>d</sup>
4	6.69±0.13 <sup>c</sup>	3.47±0.33 <sup>d</sup>
5	10.08±0.25 <sup>b</sup>	11.27±1.04 <sup>c</sup>
6	14.24±0.60 <sup>a</sup>	18.45±1.43 <sup>a</sup>
7	14.26±0.03 <sup>a</sup>	15.01±1.36 <sup>b</sup>
8	11.19±0.48 <sup>b</sup>	14.18±1.36 <sup>bc</sup>
9	10.76±1.25 <sup>b</sup>	16.83±1.57 <sup>ab</sup>

† 字母不同表示不同样品的特性之间存在显著差异(P<0.05)。

钝顶螺旋藻分离蛋白和市售藻蓝蛋白的乳化稳定性如表 7 所示。随着 pH 的增加,两种蛋白样品的乳化稳定性均呈先上升后下降再上升的趋势。分离蛋白在 pH 4 和 5 溶液环境中的乳化稳定性高于 pH 3。该结果与 Li 等<sup>[38]</sup>的报道相一致。从表 7 中可以看出,pH 为 3~6 时,分离蛋白的乳化稳定性高于市售藻蓝蛋白,pH 为 7~9 时,后者的乳化稳定性高于前者。分离蛋白在 pH 4~6 范围内表现出最佳的乳化稳定性,市售藻蓝蛋白在 pH 5~7 和 9 时呈现较高的乳化稳定性。Dickinson 等<sup>[42]</sup>指出,静电排斥力能够维持乳液油/水界面膜蛋白的稳定,也是影响蛋白质聚集或絮凝的重要因素。

表 7 钝顶螺旋藻分离蛋白和市售藻蓝蛋白乳化稳定性<sup>†</sup>  
Table 7 Emulsion stability index of spPI and cpPC (n=3)

pH	乳化稳定性/min	
	钝顶螺旋藻分离蛋白	市售藻蓝蛋白
3	22.98±5.60 <sup>bc</sup>	15.55±1.67 <sup>c</sup>
4	41.03±5.92 <sup>a</sup>	13.52±0.64 <sup>c</sup>
5	37.03±2.40 <sup>a</sup>	20.49±1.71 <sup>ab</sup>
6	32.77±0.67 <sup>ab</sup>	26.52±5.09 <sup>ab</sup>
7	13.05±0.28 <sup>d</sup>	25.72±4.87 <sup>ab</sup>
8	14.93±0.11 <sup>c</sup>	19.01±0.99 <sup>b</sup>
9	24.41±5.48 <sup>bc</sup>	29.28±5.84 <sup>a</sup>

† 字母不同表示不同样品的特性之间存在显著差异(P<0.05)。

### 2.9 巯基和二硫键

钝顶螺旋藻分离蛋白和市售藻蓝蛋白的总巯基、游离巯基和二硫键含量如表 8 所示。分离蛋白的总巯基、游离巯基和二硫键含量均低于市售藻蓝蛋白。两种蛋白样品之间的差异,可能与蛋白提取方法有关。提取方法直接影响蛋白质分子中化学键的含量,进而影响分子结

构<sup>[43]</sup>。Tian 等<sup>[44]</sup>测定藻蓝蛋白中游离巯基含量为 15~16 μmol/g。该结果与市售藻蓝蛋白游离巯基含量相近。巯基和二硫键是维持蛋白质空间的主要结构。市售藻蓝蛋白可能较分离蛋白拥有更加稳定的分子结构。而不稳定的分子结构在受到温度、光照和 pH 影响后,更容易失去原有的颜色<sup>[45]</sup>。因此,分离蛋白的分子结构可能更容易受到外部因素的影响。两种蛋白样品的巯基和二硫键含量存在差异,可能是样品中蛋白种类差异造成的。

表 8 钝顶螺旋藻分离蛋白和商业藻蓝蛋白总巯基、游离巯基和二硫键含量<sup>†</sup>

Table 8 Total thiol, free thiol, and disulfide bonds of spPI and cpPC (n=3) μmol/g

样品	总巯基	游离巯基	二硫键
钝顶螺旋藻分离蛋白	27.29±0.36 <sup>b</sup>	12.52±0.88 <sup>b</sup>	7.39±0.55 <sup>b</sup>
市售藻蓝蛋白	35.01±0.31 <sup>a</sup>	16.52±0.87 <sup>a</sup>	9.25±0.28 <sup>a</sup>

† 字母不同表示不同样品的特性之间存在显著差异(P<0.05)。

## 3 结论

该研究利用单因素试验和正交试验优化了钝顶螺旋藻分离蛋白的提取工艺,得到最优制备条件为:浸泡时间 16 h,料液比 1:20 (g/mL),冻结时间 9 h,冻融次数 10 次。在该条件下,钝顶螺旋藻分离蛋白提取率为 29.74%。将分离蛋白和市售藻蓝蛋白的理化特性对比后发现,两种样品的蛋白质相对分子质量集中在 17 000 附近。pH 5~7 和 6~7 时,分离蛋白和市售藻蓝蛋白获得最高的溶解度,分别为 45.44%~47.29%,44.98%~45.15%。分离蛋白具有更好的起泡性(231.00%),放置 10 min 后,分离蛋白的泡沫稳定性(167.70%)依然高于市售藻蓝蛋白。分离蛋白和市售藻蓝蛋白在 pH 6~7 和 7 时乳化活性最强,分别为 14.24~14.26, 18.45 m<sup>2</sup>/g。因此,相较于市售藻蓝蛋白,拥有更多杂蛋白的钝顶螺旋藻分离蛋白表现出良好的溶解性和起泡性。尽管该研究制备的分离蛋白中藻蓝蛋白的纯度低于市售藻蓝蛋白,然而钝顶螺旋藻作为一种可食用藻类,分离蛋白的安全性能得到保障,可作为一种潜在天然色素。

### 参考文献

[1] 王志忠,穆洁,巩东辉,等.钝顶螺旋藻与五种常见食物营养成分对比分析[J].食品与发酵科技,2023,59(4):111-115,121.  
WANG Z Z, MU J, GONG D H, et al. Comparative analysis of nutritional components of *Spirulina platensis* from Erdos Plateau and five common foods[J]. Food and Fermentation Science & Technology, 2023, 59(4): 111-115, 121.

[2] 张廷新.藻蓝蛋白免疫肽的酶解制备、结构鉴定及功效评价[D].济南:齐鲁工业大学,2024:2-9.

- ZHANG T X. Enzymatic hydrolysis preparation, structural identification, and activity evaluation of immunopeptides from phycocyanin[D]. Jinan: Qilu University of Technology, 2024: 2-9.
- [3] 黑立新, 唐超, 王清吉. 复合螺旋藻多糖降血脂作用研究[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(35): 1-3.  
HEI L X, TANG C, WANG Q J. Antihyperlipidemic effect of compound polysaccharides from *Spirulina platensis*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2018, 46(35): 1-3.
- [4] 操德群, 何艳丽, 余虹, 等. 海洋生物 ACE 抑制肽研究进展[J]. 核农学报, 2017, 31(5): 927-937.  
CAO D Q, HE Y L, YU H, et al. Advance on angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from marine resources[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2017, 31(5): 927-937.
- [5] 胡鸿钧. 螺旋藻生物学及生物技术原理[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 40-41.  
HU H J. The biological and biotechnological principles of spirulina[M]. Beijing: Science Press, 2003: 40-41.
- [6] 孟丹阳, 杜艳, 陈复生. 微藻中蛋白质的提取方法研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(21): 346-357.  
MENG D Y, DU Y, CHEN F S. Research progress on extraction methods of proteins from microalgae[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(21): 346-357.
- [7] BENELHADJ S, GHARSALLAOUI A, DEGRAEVE P, et al. Effect of pH on the functional properties of *Arthrospira (Spirulina) platensis* protein isolate[J]. Food Chemistry, 2016, 194: 1 056-1 063.
- [8] BASHIR S, SHARIF M K, BUTT M S, et al. Functional properties and amino acid profile of *Spirulina platensis* protein isolates[J]. Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research Series B: Biological Sciences, 2016, 59(1): 12-19.
- [9] BLEAKLEY S, HAYES M. Functional and bioactive properties of protein extracts generated from *Spirulina platensis* and *Isochrysis galbana T-Iso*[J]. Applied Sciences, 2021, 11: 3964.
- [10] LI Q Y, CHANG R, SUN Y J. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of *Spirulina platensis* in response to low temperature stress[J]. PLoS One, 2016, 11(11): e0166876.
- [11] MARZORATI S, SCHIEVANO A, IDÁ A, et al. Carotenoids, chlorophylls and phycocyanin from *Spirulina*: supercritical CO<sub>2</sub> and water extraction methods for added value products cascade[J]. Greening Chemistry, 2020, 22(1): 187-196.
- [12] CHEN Q, LI S H, XIONG H, et al. Effect of different extraction methods on physicochemical characteristics and antioxidant activity of C-phycocyanin from dry biomass of *Arthrospira platensis*[J]. Foods, 2022, 11(9): 1 296.
- [13] YÜCETEPE A, SAROĞLU Ö, ÖZÇELİK B. Response surface optimization of ultrasound-assisted protein extraction from *Spirulina platensis*: investigation of the effect of extraction conditions on techno-functional properties of protein concentrates[J]. Journal of Food Science and Technology, 2019, 56(7): 3 282-3 292.
- [14] PURDI T S, SETIOWATI A D, NINGRUM A. Ultrasound-assisted extraction of *Spirulina platensis* protein: physicochemical characteristic and techno-functional properties [J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2023, 17(5): 5 474-5 486.
- [15] 于晓蕾. 钝顶螺旋藻藻蓝蛋白提取与纯化的研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2023: 18-19.  
YU X L. Study on extraction and purification of phycocyanin from *Spirulina platensis*[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2023: 18-19.
- [16] 罗爱国, 范瑶瑶, 杨艳君, 等. 多目标因素钝顶螺旋藻藻蛋白提取工艺分析[J]. 食品工业, 2021, 42(2): 100-103.  
LUO A G, FAN Y Y, YANG Y J, et al. Optimal extraction process analysis of *Spirulina platensis* protein based on multi-objective factors[J]. Food Industry, 2021, 42(2): 100-103.
- [17] 季雨, 林洪, 李振兴, 等. 加工食品中花生蛋白夹心酶联免疫吸附测定的前处理方法探究与改进[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(20): 246-256.  
JI Y, LIN H, LI Z X, et al. Exploration and improvement of the pretreatment method for peanut proteins sandwich enzyme-linked immunosorbent assay in processed food[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2024, 15(20): 246-256.
- [18] 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 食品中蛋白质的测定: GB 5009.5—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.  
National Health and Family Planning Commission. National food safety standard determination of protein in foods: GB 5009.5—2016[S]. Beijing: China Standard Press, 2016.
- [19] 陈盛仕, 刘梓宜, 李梦琪, 等. 钝顶螺旋藻藻蓝蛋白的提取工艺优化及其纯化研究[J]. 广西科学院学报, 2022, 38(4): 388-402.  
CHEN S S, LIU Z Y, LI M Q, et al. Study on the optimization of the extraction and purification of phycocyanin from *Spirulina platensis*[J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences, 2022, 38(4): 388-402.
- [20] AHMAB MALIK M, SAINI C S. Polyphenol removal from sunflower seed and kernel: effect on functional and rheological properties of protein isolates[J]. Food Hydrocolloids, 2017, 63: 705-715.
- [21] 商文慧. 海胆卵黄蛋白及其酶解物的功能特性研究[D]. 大连: 大连工业大学, 2019.  
SHANG W H. Functional properties of gonad proteins and hydrolysates from sea urchin[D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2019.
- [22] 杜椅楠. 大黄鱼卵分离蛋白及 Fe<sup>2+</sup>螯合肽的功能特性研究[D]. 大连: 大连工业大学, 2019: 22-23.  
DU Y N. Functional properties of protein isolates and Fe<sup>2+</sup> chelate peptides from large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) roe[D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2019: 22-23.
- [23] 张晓慧, 郭全友, 郑尧, 等. 变性淀粉协同非肌肉蛋白对鱿鱼鱼糜制品凝胶特性及其蛋白构象的影响[J]. 食品科学, 2023,



- 44(20): 43-52.
- ZHANG X H, GUO Q Y, ZHENG Y, et al. Effects of combined addition of modified starch and non-muscle protein on gel properties and protein conformation of squid surimi products[J]. Food Science, 2023, 44(20): 43-52.
- [24] JIN W G, WU H T, ZHU B W, et al. Functional properties of gelation-like protein hydrolysates from scallop (*Patinopecten yessoensis*) male gonad [J]. European Food Research and Technology, 2012, 234(5): 863-872.
- [25] DROZŁOWSKA E, WERONIS M, BARTKOWIAK A. The influence of thermal hydrolysis process on emulsifying properties of potato protein isolate[J]. Journal of Food Science and Technology, 2020, 57(3): 1 131-1 137.
- [26] 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 X Y, LIANG X, FU Y, et al. Study of the extraction process of phycocyanin from *Spirulina platensis*[J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(7): 198-204, 136.
- [27] SIANIPAR A J, DIANURSANTI D. Enhancement of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* by freeze-thaw method: a study about synergy with ultrasonication process and optimization of freezing[J]. AIP Conference Publishings, 2024, 2 710(1): 040002.
- [28] TAN H T, KHONG N M H, KHAU Y S, et al. Optimization of the freezing-thawing method for extracting phycobiliproteins from *Arthrospira* sp.[J]. Molecules, 2020, 25(17): 3 894.
- [29] LUPATINI MENEGOTTO A L, DE SOUZA L E S, COLLA L M, et al. Investigation of techno-functional and physicochemical properties of *Spirulina platensis* protein concentrate for food enrichment[J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 114: 108267.
- [30] GARCÍA A B, LONGO E, BERMEJO 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(5): 3 059-3 070.
- [31] 于淑坤, 岳思君, 李敏, 等. 钝顶螺旋藻藻蓝蛋白分离纯化[J]. 食品科技, 2019, 44(5): 248-252.
- YU S K, YUE S J, LI M, et al. Isolation and purification of C-phycocyanin from *Spirulina platensis*[J]. Food Science and Technology, 2019, 44(5): 248-252.
- [32] 李湘河, 徐静雯, 赵勇. 螺旋藻中 C-藻蓝蛋白的提取及性质研究[J/OL]. 上海海洋大学学报. (2024-09-24) [2024-12-09]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2024.S.20240924.1343.002.html>.
- LI X H, XU J W, ZHAO Y. Extraction and characterization of C-phycocyanin from *Spirulina* sp[J/OL]. Journal of Shanghai Ocean University. (2024-09-24) [2024-12-09]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2024.S.20240924.1343.002.html>.
- [33] FERNÁNDEZ-ROJAS B, HERNÁNDEZ-JUAREZ J, PEDRAZA-CHAVERRI J. Nutraceutical properties of phycocyanin[J]. Journal of Functional Foods, 2014, 11: 375-392.
- [34] PATIL G, RAGHAVARAO K S M S. Aqueous two phase extraction for purification of C-phycocyanin[J]. Biochemical Engineering Journal, 2007, 34(2): 156-164.
- [35] SU C H, LIU C S, YANG P C, et al. Solid-liquid extraction of phycocyanin from *Spirulina platensis*: kinetic modeling of influential factors[J]. Separation and Purification Technology, 2014, 123: 64-68.
- [36] SANGIAN M, SOLTANI M, HANIFI H, et al. Investigation of the effect of phycocyanin extracted from *Spirulina platensis* and persimmon powder on physicochemical and sensory characteristics of yogurt[J]. Egyptian Journal of Veterinary Sciences, 2022, 53(1): 75-86.
- [37] GHRIBI A M, GAFSI I M, BLECKER C, et al. Effect of drying methods on physico-chemical and functional properties of chickpea protein concentrates[J]. Journal of Food Engineering, 2015, 165: 179-188.
- [38] LI Y, ZHANG Z, ABBASPOURRAD A. Improving solubility and functional properties of phycocyanin under acidic conditions by glutaminase deamidation and succinylation[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 133: 107994.
- [39] ABDOLLAHI M, UNDELAND I. Structural, functional, and sensorial properties of protein isolate produced from salmon, cod, and herring by-products[J]. Food and Bioprocess Technology, 2018, 11(9): 1 733-1 749.
- [40] AZIZ A, KHAN N M, ALI F, et al. Effect of protein and oil volume concentrations on emulsifying properties of acorn protein isolate[J]. Food Chemistry, 2020, 324: 126894.
- [41] ZHOU Y, HUANG Z H, LIU Y H, et al. Stability and bioactivities evaluation of analytical grade C-phycocyanin during the storage of *Spirulina platensis* powder[J]. Journal of Food Science, 2024, 89(3): 1 442-1 453.
- [42] DICKINSON E, SEMENOVA M G, ANTIPOVA A S. Salt stability of casein emulsions[J]. Food Hydrocolloids, 1998, 12(2): 227-235.
- [43] ZHANG T, XU J M, ZHANG X C, et al. Gelatins as emulsifiers for oil-in-water emulsions: extraction, chemical composition, molecular structure, and molecular modification [J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 106: 113-131.
- [44] TIAN H Y, ZHANG Z, NING F J, et al. Effect of ultrasound pretreatment complex glycation on the structure and functional activity of phycocyanin modified by mannose[J]. LWT-Food Science and Technology, 2023, 188: 115390.
- [45] PEZ JAESCHKE D, ROCHA TEIXEIRA I, MARCZAK L D F, et al. Phycocyanin from spirulina: a review of extraction methods and stability[J]. Food Research International, 2021, 143: 110314.