

文章编号: 1674-5566(2025)03-0651-13

DOI: 10.12024/jsou.20240404492

钝顶螺旋藻中C-藻蓝蛋白的提取及性质

李湘河¹, 徐静雯¹, 赵 勇^{1,2,3}

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306; 3. 农业农村部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室, 上海 201306)

摘要: 采用振荡提取法(Oscillatory extraction, OE)、高速匀浆提取法(High-speed homogenization extraction, HHE)、超声提取法(Ultrasonic extraction, UE)和反复冻融提取法(Repeated freeze-thaw extraction, RFE)4种技术手段从钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)中分离制备C-藻蓝蛋白,并系统分析其分子结构特征、理化性质、功能特性及抗氧化生物活性效能。研究表明,4种提取方法所得C-藻蓝蛋白纯度都达到了试剂级标准,其中反复冻融提取法和高速匀浆提取法提取得到的C-藻蓝蛋白具有较高的纯度,分别达到了2.68和2.37。红外光谱分析显示,反复冻融得到的C-藻蓝蛋白 α -螺旋含量最高,说明其二级结构最稳定。C-藻蓝蛋白的功能特性研究表明,其溶解度、乳化能力、起泡能力、持水性、持油性、最低凝胶浓度和表面疏水性均表现为反复冻融提取法>高速匀浆提取法>超声提取法>振荡提取法($P<0.05$)。由SDS-PAGE图谱可知,所有提取方法得到的C-藻蓝蛋白均包含 α 和 β 两个螺旋亚基。抗氧化实验结果显示,C-藻蓝蛋白具有较强的抗氧化特性,4种提取方式所得C-藻蓝蛋白清除DPPH和ABTS自由基能力表现为反复冻融提取法>高速匀浆提取法>超声提取法>振荡提取法。综上所述,反复冻融提取法得到的C-藻蓝蛋白纯度最高,二级结构最稳定,具有最佳的功能特性,包括溶解度、乳化能力、起泡能力、持水性、持油性、最低凝胶浓度和表面疏水性,同时具有较强的抗氧化性,这些研究结果为拓展C-藻蓝蛋白在食品、医药和化妆品等领域的应用提供理论支持和研究基础。

关键词: 钝顶螺旋藻; C-藻蓝蛋白; 提取; 理化性质; 功能特性; 抗氧化性

中图分类号: TS 201.4 **文献标志码:** A

钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)是一种属于蓝藻门(Cyanophyta)颤藻科(Oscillatoriaceae)螺旋藻属(*Spirulina*)的低等原核藻类生物^[1],通常生长在热带和亚热带地区的高盐碱性水中^[2]。全球螺旋藻产量高达20 000 t/年,近年来,中国的螺旋藻养殖面积和产量均呈现出稳定的增长趋势^[3]。目前,中国每年螺旋藻产量超过10 000 t,占全球供应量的一半以上,中国拥有60多个螺旋藻养殖基地,年产值预计超过40亿元人民币^[3]。钝顶螺旋藻富含蛋白质、碳水化合物、维生素和矿物质^[4],蛋白质含量超过70%,被认为是未来食品的理想选择^[5-6]。此外,钝顶螺旋藻含有酚类化合物、类胡萝卜素等生物活性物质,具有营养保健品和功能食品的潜力^[7-8]。美国食品药品监督

管理局(FDA)和膳食补充剂信息专家委员会(DSI-EC)已认证钝顶螺旋藻为“公认安全”的食品^[9]。在墨西哥中部的特斯科科湖,钝顶螺旋藻被养殖并加工成食品^[2]。C-藻蓝蛋白是钝顶螺旋藻中重要的蛋白质成分,由2个多肽 α 亚基(12~19 ku)和 β 亚基(14~21 ku)^[10-11]组成,具有稳定的水溶性和促进健康的功能效益,包括抗氧化、抗肿瘤和抗糖尿病等^[7]。此外,C-藻蓝蛋白还被用于冰淇淋和酸奶中,以增加营养价值^[12-13]。

钝顶螺旋藻具有多层次结构,包含细胞壁,细胞膜和细胞质等,C-藻蓝蛋白为细胞内化合物,存在于钝顶螺旋藻细胞质内,因此破碎细胞对C-藻蓝蛋白的提取至关重要。目前常用的C-藻蓝蛋白提取方法包括均质化、超声波、冻融法、脉冲

收稿日期: 2024-04-12 修回日期: 2024-09-12

基金项目: 国家自然科学基金(32372292)

作者简介: 李湘河(1999—),男,硕士研究生,研究方向为食品营养与加工。E-mail: lixianghe2050@163.com

通信作者: 赵 勇, E-mail: yzhao@shou.edu.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydxxb.com>

电场法、溶菌酶法等^[14]。然而,目前还没有关于不同的提取方法对从钝顶螺旋藻中提取的C-藻蓝蛋白及其结构、理化性质、功能特性、抗氧化性的系统性研究。因此,本研究选择了4种提取方法提取钝顶螺旋藻中的C-藻蓝蛋白,包括振荡提取法(Oscillatory extraction, OE)、高速匀浆提取法(High-speed homogenization extraction, HHE)、超声提取法(Ultrasonic extraction, UE)和反复冻融提取法(Repeated freeze-thaw extraction, RFE),并对提取的藻蓝蛋白进行分离纯化,进一步解析C-藻蓝蛋白的结构、理化性质、功能特性、抗氧化性。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

主要材料与试剂:螺旋藻粉购自上海迈瑞尔化学技术有限公司;大豆油购自金龙鱼官方旗舰店;硫酸铵(AR,纯度99%)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;透析袋[RC,100%,22 mm (MD34), MW: 14 000]购自上海禾汽玻璃仪器有限公司;MES SDS电泳缓冲液(20×)购自上海碧云天生物技术股份有限公司;考马斯亮蓝R-250购自上海迈瑞尔化学技术有限公司;2,2-二苯基-1-苦基肼(DPPH)购自上海麦克林生化科技股份有限公司;2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS)购自上海麦克林生化科技股份有限公司。所有其他化学试剂均购自上海麦克林生化科技股份有限公司。

主要设备:恒温振荡器(CHA-S, 50 Hz, 杭州晶飞科技有限公司);均质机(S10, 宁波新知生物科技有限公司);超声波仪(KQ-300DE, 昆山超声波仪器有限公司);实验室冷冻箱(DW-86L338, 中国青岛海尔股份有限公司);高速离心机(Avanti J-26XP, 美国贝克曼库尔特公司);扫描电子显微镜(Scanning electron microscope, SEM, SU500, 日立中国有限公司);傅里叶变换红外光谱仪(Fourier transform infrared, FTIR, PerkinElmer Spotlight 400, 上海人和科学仪器有限公司)。

1.2 钝顶螺旋藻C-藻蓝蛋白的提取和纯化

1.2.1 C-藻蓝蛋白的提取

通过4种方法提取钝顶螺旋藻中的C-藻蓝蛋白,包括振荡提取法、高速匀浆提取法、超声提

取法和反复冻融提取法。准确称取螺旋藻粉2 g溶于40 mL去离子水中,提取比例为1:20。振荡提取时,需要在恒温振荡器中以25 °C下振荡处理30 min。高速均质提取则需要使用均质机以10 000 r/min的速度均质30 min。超声提取时则需要使用超声波仪以40 kHz的频率超声30 min。而反复冻融提取则需要将钝顶螺旋藻溶液在-80 °C冷冻箱内冷冻1 h,再在室温下解冻1 h,重复5次。最后,提取液需要以4 000 r/min的速度离心30 min,将上清液收集用于进一步纯化。

1.2.2 硫酸铵盐析结合透析法纯化C-藻蓝蛋白

C-藻蓝蛋白的粗提液采用硫酸铵盐析法与透析纯化。粗提液通过50%硫酸铵盐析沉淀后,在4 °C下保存过夜。随后在9 000 r/min下离心30 min以进行回收,然后将沉淀溶解于去离子水中,4 °C条件下,进行72 h的透析处理^[15]。透析结束后,收集纯化的C-藻蓝蛋白沉淀,将透析结束的溶液进行收集然后测定其纯度和得率。最后进行冻干,收集冻干的C-藻蓝蛋白粉末并于4 °C下储存备用。C-藻蓝蛋白的纯度(P)、质量浓度(C)和得率(Y)的计算公式^[16]:

$$P = \frac{A_{620}}{A_{280}} \quad (1)$$

$$C = \frac{A_{620} - 0.7 \times A_{652}}{7.38} \quad (2)$$

$$Y = \frac{C \times V}{m} \quad (3)$$

式中:P为纯度;A₆₂₀为620 nm处吸光度;A₂₈₀为280 nm处吸光度;C为质量浓度,mg/mL;A₆₅₂为652 nm处的吸光度;Y为得率,mg/g;V为透析后收集所得溶液体积,mL;m为螺旋藻藻粉质量,g。

1.3 C-藻蓝蛋白的理化性质

本研究采用扫描电子显微镜研究钝顶螺旋藻蛋白的形态特性。将螺旋藻蛋白粗提物粉末负载在10 nm金层上,测量过程中,使用5 kV的电压,并将图像放大了500倍进行观察分析^[17]。

通过傅里叶变换红外光谱仪研究C-藻蓝蛋白的二级结构。实验中扫描范围为400~4 000 cm⁻¹^[18]。

1.4 C-藻蓝蛋白功能特性

1.4.1 溶解度

本研究基于文献[19]的测定方法,经过轻微修改测定C-藻蓝蛋白的溶解度。首先,取C-藻蓝蛋白粉末溶解于去离子水中,搅拌30 min后,

以5 000 r/min的速度离心30 min。之后,使用BCA蛋白检测试剂盒(上海碧云天生物技术股份有限公司)分别测定离心前后蛋白质的质量浓度(上清液)并计算蛋白含量。样品在室温下与BCA反应溶液反应2 h,并在562 nm处测量吸光度。蛋白溶解度的计算公式:

$$S = \frac{C_1}{C_2} \times 100\% \quad (4)$$

式中:S为蛋白溶解度,%;C₁为上清液蛋白质量浓度,mg/mL;C₂为离心前溶液总蛋白质量浓度,mg/mL。

1.4.2 乳化性能

根据DU^[20]的方法测定乳化能力(Emulsifying capacity, E₁)和乳化稳定性(Emulsion stability, E₂)。首先,将蛋白质溶液与等体积大豆油混合,在室温下均质化5 min以获得乳液。此时管内乳液体积为V₀,接着以5 000 r/min将乳液离心20 min,所得乳液测量体积记为V₁,之后,将乳液在4 °C冰箱中保存过夜,随后90 °C孵育30 min,再次以5 000 r/min离心20 min,冷却至室温(25 °C),冷却后乳液测量体积记为V₂。蛋白乳化能力和乳化稳定性的计算公式:

$$E_1 = \frac{V_1}{V_0} \times 100\% \quad (5)$$

$$E_2 = \frac{V_2}{V_1} \times 100\% \quad (6)$$

式中:E₁为蛋白的乳化能力,%;E₂为蛋白的乳化稳定性,%;V₀为乳液体系初始体积,mL;V₁为离心后乳液体积,mL;V₂为离心前乳液体系体积,mL。

1.4.3 发泡性能

根据ZHENG等^[21]的方法测定发泡能力(Foaming ability, F₁)和泡沫稳定性(Foaming stability, F₂)。实验过程包括蛋白溶解、均质和静置等步骤。首先,准确称取30 mg的C-藻蓝蛋白粉末溶解于10 mL去离子水中,测量该蛋白溶液体积记为V₃,然后通过高速匀浆机以10 000 r/min的速度均质1 min,此时该蛋白溶液体积记为V₄。之后让混合液在室温下静置30 min,观察泡沫体积的变化,静置后的蛋白质溶液体积记为V₅。

$$F_1 = \frac{V_4}{V_3} \times 100\% \quad (7)$$

$$F_2 = \frac{V_5}{V_4} \times 100\% \quad (8)$$

式中:F₁为蛋白发泡能力,%;F₂为蛋白泡沫稳定性,%;V₃为原蛋白溶液体积,mL;V₄为均质1 min后蛋白溶液体积,mL;V₅为室温下静置30 min后的蛋白质溶液体积,mL。

1.4.4 持油能力和持水能力

为了测定蛋白质的持油能力(Oil holding capacity, A₁)和持水能力(Water holding capacity, A₂),将C-藻蓝蛋白分为两组进行操作:一组将蛋白与大豆油按1:1.2混合,另一组蛋白与去离子水按1:20混合,两组分开进行实验,分别测定蛋白持油能力和持水能力。然后将混合溶液在室温下涡旋混合5 min,5 000 r/min离心25 min。接着去除上清液,收集沉淀并称重。根据OMURA等^[22]的方法,计算蛋白持油能力和持水能力,公式:

$$A_1 = \frac{m_1 - m_0}{m_0} \times 100\% \quad (9)$$

$$A_2 = \frac{m_2 - m_0}{m_0} \times 100\% \quad (10)$$

式中:A₁为蛋白持油能力,%;A₂为蛋白持水能力,%;m₁为大豆油混合组离心后的沉淀质量(湿重),mg;m₀为离心前的蛋白质量(干重),mg;m₂为去离子水混合组离心后的沉淀质量(湿重)。

1.4.5 最低凝胶浓度的测定

根据DENG等^[23]改良的方法评估最低凝胶浓度(Least gel concentration, L)。将C-藻蓝蛋白粉末分散在5 mL蒸馏水中,使其浓度分别为5%、10%、15%、20%和25%,之后涡旋5 min使其混合均匀。接着将这些分散液置于100 °C水浴中保持1 h,随后迅速在流动的水中冷却,并将其存放在4 °C下2 h。当试管倒置时,C-藻蓝蛋白不下降或不滑落的最低浓度被记录为最低凝胶浓度。

1.4.6 表面疏水性

C-藻蓝蛋白的表面疏水性测定根据前人的方法进行了修改^[24]。采用溴酚蓝固定(BPB bound)法计算不同蛋白组分的表面疏水性。将1 mL的C-藻蓝蛋白溶液(5 mg/mL,溶于去离子水)加入200 μL BPB(1 mg/mL)中。对照组不含蛋白质。将混合物在25 °C下搅拌10 min并且在4 000 r/min下离心15 min。在595 nm处测定上清液的吸光度。蛋白表面疏水性的计算方式:

$$W_{\text{BPB}} = 200 \times \frac{A_{595C} - A_{595S}}{A_{595C}} \quad (11)$$

式中: W_{BPB} 为溴酚蓝固定量, μg ; 200 为样品中加入的溴酚蓝质量, μg ; A_{595C} 为对照组 595 nm 处吸光度; A_{595S} 为样品组 595 nm 处吸光度。

1.5 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳

十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 按照之前的方法进行修改^[25]。将 10 μL 蛋白溶液与 10 μL 蛋白上样缓冲液混合, 并将混合物涡旋 1 min, 以 3 000 r/min 离心 2 min。置于 95 °C 水浴中 10 min 后加样, 负载凝胶板在 200 V 下电泳 60 min。然后用考马斯亮蓝 R-250 溶液过夜染色, 之后用去离子水去除。

1.6 抗氧化特性

1.6.1 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基清除活性测定

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 自由基清除活性测定^[17]: 将不同质量浓度的 C-藻蓝蛋白 (25、50、100、150、200 和 250 $\mu\text{g/mL}$) 与预先制备的 DPPH 自由基溶液混合均匀, 混合液于 25 °C 条件下避光处理 30 min 后, 测定 517 nm 条件下的吸光度, 并作空白对照。C-藻蓝蛋白的 DPPH 自由基清除活性计算方法:

$$R_{\text{DPPH}} = \left(1 - \frac{A_{517C}}{A_{517}} \right) \times 100\% \quad (12)$$

式中: R_{DPPH} 为 DPPH 自由基清除活性, %; A_{517} 和 A_{517C} 分别为 DPPH 溶液在 517 nm 处的吸光度及添加 C-藻蓝蛋白到 DPPH 溶液反应 30 min 后在 517 nm 处的吸光度。

1.6.2 2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸自由基清除活性测定

2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 (ABTS) 自由基清除活性测定^[17]: 将不同质量浓度的 C-藻蓝蛋白 (25、50、100、150、200 和 250 $\mu\text{g/mL}$) 与预先制备的 ABTS 自由基溶液混合均匀, 混合液于 25 °C 条件下避光处理 30 min 后, 测定 734 nm 条件下的吸光度, 并作空白对照。C-藻蓝蛋白的 ABTS 自由基清除活性计算方法:

$$R_{\text{ABTS}} = \left(1 - \frac{A_{734C}}{A_{734}} \right) \times 100\% \quad (13)$$

式中: R_{ABTS} 为 ABTS 自由基清除活性, %; A_{734} 和

A_{734C} 分别为 ABTS 溶液在 734 nm 处的吸光度及添加 C-藻蓝蛋白到 ABTS 溶液反应 30 min 后在 734 nm 处的吸光度。

1.7 统计分析

结果使用 SPSS 软件 (version 19.0, IBM 公司, 纽约, 美国) 进行分析。数据以平均值±标准差 (Mean±SD) 表示。采用 One-way ANOVA 和 Duncan's 检验进行统计学分析 ($P<0.05$)。

2 结果

2.1 C-藻蓝蛋白的纯度和得率

4 种提取方法获得的 C-藻蓝蛋白纯度和得率见表 1。C-藻蓝蛋白纯度和得率以反复冻融提取和高速匀浆提取最高, 其次为超声提取和振荡提取 ($P<0.05$)。4 种提取方法所得 C-藻蓝蛋白纯度都达到了试剂级^[26], 其中反复冻融提取和高速匀浆提取处理的 C-藻蓝蛋白纯度达到 2.68 和 2.37, 此结果与 MAITY 等^[15] 和 MUNAWAROH 等^[27] 的报告结果相符, 均高于 AMARANTE 等^[26] 报道的 C-藻蓝蛋白纯度 1.8。

表 1 从 4 种提取方法获得的 C-藻蓝蛋白的纯度和得率

Tab. 1 Purity and yield of C-phycocyanin obtained from four extraction methods

提取方式 Extraction Methods	得率 Y/(mg/g)	纯度 P
振荡提取法 OE	13.37±1.10 ^b	1.92±0.11 ^c
高速匀浆提取法 HHE	15.56±0.28 ^a	2.37±0.17 ^b
超声提取法 UE	13.20±0.74 ^b	2.09±0.09 ^{bc}
反复冻融提取法 RFE	16.18±0.15 ^a	2.68±0.22 ^a

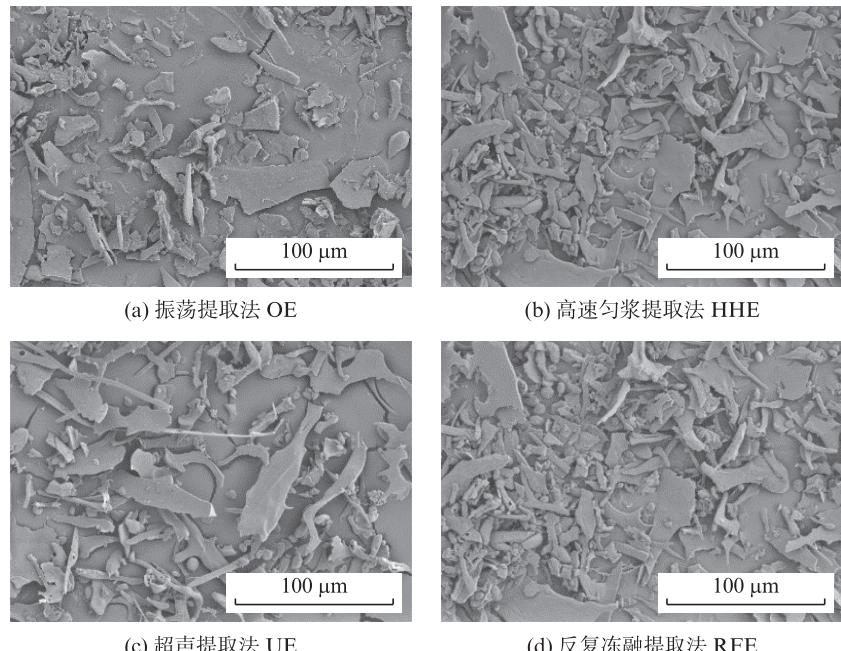
注: 同一列不同字母表示统计学显著差异 ($P<0.05$)。

Notes: Different letters in the same column indicate statistically significant differences ($P<0.05$).

2.2 C-藻蓝蛋白的理化性质

2.2.1 扫描电子显微镜

钝顶螺旋藻蛋白粗提物的扫描电子显微镜所得图谱如图 1 所示, 钝顶螺旋藻蛋白粗提物为扁平的粗糙颗粒状, 这与 YANG 等^[28] 实验数据一致, 验证了螺旋藻蛋白粗提物在形态上的一致性。反复冻融 (图 1d) 和高速匀浆 (图 1b) 提取的钝顶螺旋藻蛋白粗提物中有较多不规则的颗粒和碎片, 表明这 2 种提取方式和另外 2 种提取方式相比对细胞壁的破坏更强。

图1 C-藻蓝蛋白的扫描电子显微镜($\times 500$)Fig. 1 SEM analysis of C-phycocyanin($\times 500$)

2.2.2 红外光谱

根据FTIR光谱分析(图2),C-藻蓝蛋白在3 280 cm⁻¹处有一个特征峰,是由于OH拉伸和分子间氢键作用形成^[29]。另外,2 911 cm⁻¹处有一吸收峰源于脂肪酸侧链中甲基的振动^[30]。在1 600~1 700 cm⁻¹和1 500~1 600 cm⁻¹区域分别与I型酰胺带(C=O)和II型酰胺带(N-H和C-n)相关^[31]。其中,I型酰胺带(C=O)代表二级结构,主要源于酰胺基的C=O拉伸振动与N-H键弯曲和C-n键拉伸相结合^[28]。C-藻蓝蛋白的二级结

构含量表如表2所示,实验表明,不同提取方法得到的C-藻蓝蛋白二级结构含量也有所不同,反复冻融提取法提取得到的蛋白质 α -螺旋含量明显高于其他类型($P<0.05$),表明结构更稳定^[21]。提取方式不同会导致C-藻蓝蛋白的FTIR吸收峰强度变化,而反复冻融处理方式显示出最大的峰面和最强的峰值强度,与 α -螺旋的含量呈正相关^[32]。因此,反复冻融提取法提取得到的C-藻蓝蛋白比其他提取方法得到的更稳定。

表2 C-藻蓝蛋白的二级结构含量
Tab. 2 Secondary structure content of C-phycocyanin

提取方式 Extraction methods	α -螺旋 α -helix	β -折叠 β -sheet	β -转角 β -turn	无规则卷曲 Random coil	%
振荡提取法 OE	17.02 \pm 0 ^c	37.33 \pm 0.34 ^b	27.80 \pm 0.40 ^b	17.85 \pm 0.06 ^c	
高速匀浆提取法 HHE	19.38 \pm 0.03 ^b	39.45 \pm 0.08 ^a	20.42 \pm 0.08 ^c	20.75 \pm 0.03 ^b	
超声提取法 UE	17.34 \pm 0.08 ^{bc}	35.39 \pm 1.36 ^c	29.59 \pm 1.77 ^a	17.68 \pm 0.33 ^c	
反复冻融提取法 RFE	20.60 \pm 0.25 ^a	36.50 \pm 0.10 ^{bc}	21.25 \pm 0.10 ^c	21.65 \pm 0.06 ^a	

注:同一列不同字母表示统计学显著差异($P<0.05$)。

Notes: Different letters in the same column indicate statistically significant differences ($P<0.05$).

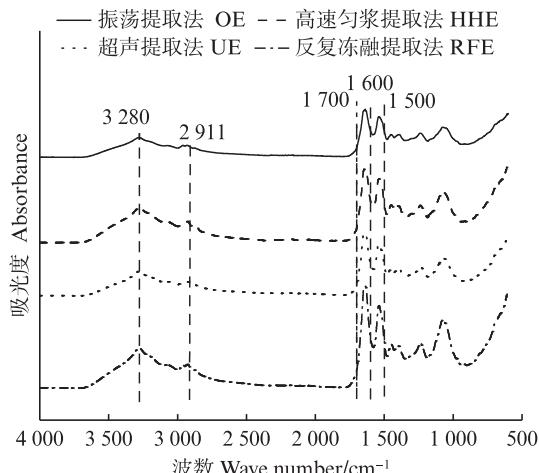


图2 C-藻蓝蛋白的FTIR光谱
Fig. 2 FTIR spectra of C-phycocyanin

2.3 C-藻蓝蛋白的功能特性

2.3.1 溶解度

C-藻蓝蛋白的溶解度如图3a所示。本研究详细探讨了C-藻蓝蛋白在pH为2~10时的溶解度变化, pH为2~4时, 溶解度呈降低趋势; 而pH为4~10时, 溶解度则呈现增加趋势。这种变化与蛋白质等电点有关, 在等电点附近, 蛋白质由于强烈的分子间相互作用而聚集, 导致与水的相互作用减少, 从而降低蛋白质的溶解度^[33]。尤其是在等电点(pH=4)^[34]时其溶解度最低, 在远离等电点的pH下显示出良好的溶解度曲线。此外, 研究^[35]表明碱性pH处理可以显著提高蛋白溶解度。实验数据还表明, 不同的提取方式对C-藻蓝蛋白的溶解度产生了影响, 反复冻融提取法处理的C-藻蓝蛋白溶解度最高, 高速匀浆提取法和超声提取法次之, 振荡提取法最低($P<0.05$)。蛋白质的溶解度与表面疏水性有一定关系, 溶解度越高, 蛋白质暴露的疏水表面也越多^[24]。因此, 通过不同的提取处理方法, 如反复冻融提取和高速匀浆提取, 可以改变蛋白质的表面电荷和二级构象^[36], 从而影响其溶解度。这些发现对于进一步了解蛋白质功能和性质具有重要意义。

2.3.2 乳化性能

C-藻蓝蛋白的乳液性能如图3b和3c所示。C-藻蓝蛋白的乳液性受pH的影响, 在4~8时, 乳化能力和乳化稳定性逐渐增强, 呈现上升趋势。溶解度是形成乳液能力的决定因素^[37], pH通过影响溶解度影响蛋白乳液性能, 溶解度的增加导致蛋白质在油水界面聚集, 使得油水界面的蛋白

质吸附增强, 降低了蛋白质的表面张力, 能够增加表面疏水性的同时, 促使可溶性聚集体的形成, 最终提高乳化性能^[38]。同时根据研究结果, 反复冻融提取法所得的C-藻蓝蛋白表现出最高的乳液性能, 其次为高速匀浆提取法、超声提取法和振荡提取法($P<0.05$)。反复冻融提取法所得的C-藻蓝蛋白分子内相互作用较强, 影响了蛋白质的结构, 在二级结构中, 反复冻融提取法所得的 α -螺旋含量最高, α -螺旋比例的增加意味着蛋白质分子的结构更加紧凑, 这有助于在整个乳液形成和储存过程中保持蛋白质的结构完整性^[39], 这与乳化能力趋势保持一致。

2.3.3 发泡性能

图3d和3e为C-藻蓝蛋白发泡性能。C-藻蓝蛋白在pH为4~8时, 发泡能力和泡沫稳定性呈上升趋势。实验表明, 不同的提取方法对C-藻蓝蛋白的发泡能力和泡沫稳定性有着显著的影响。反复冻融提取法所得的C-藻蓝蛋白结果最高, 其次为高速匀浆提取法、超声提取法和振荡提取法($P<0.05$)。不同提取方式和不同pH的变化导致C-藻蓝蛋白表面电荷发生变化, 从而引起强静电斥力和强界面黏弹性, 增强乳液和泡沫的动力学稳定性^[40]。其中反复冻融提取法是一种有效提取C-藻蓝蛋白的方法, 可以得到具有较好发泡性能和泡沫稳定性的产品。蛋白溶解度与其发泡性能密切相关, 溶解度优良的蛋白质往往具有较好的起泡能力^[41], 实验中其溶解度趋势和发泡性能趋势一致。此外表面疏水性和发泡能力也有一定的关系, 表面疏水性的增加降低了表面张力, 从而可以获得更好的发泡能力和泡沫稳定性^[42]。

2.3.4 持油能力和持水能力

C-藻蓝蛋白的持油能力和持水能力如图3f和3g所示。反复冻融提取法获得的C-藻蓝蛋白的持油能力和持水能力最高, 高速匀浆和超声提取法次之, 振荡提取法最低($P<0.05$)。这表明不同的提取方法对C-藻蓝蛋白的持油能力和持水能力有着显著的影响。蛋白的持油能力和持水能力与其溶解度、表面疏水性密切相关^[43-44]。不同处理方式会影响C-藻蓝蛋白的解离程度和疏水基团的暴露程度, 即通过影响溶解度和表面疏水性, 直接影响其持水性和持油性^[45]。反复冻融提取法所得到的C-藻蓝蛋白在水和油中的溶解

和保持能力最好。反复冻融提取法所得的C-藻蓝蛋白的部分解离较多,解离的样品与水分子相互作用,提高蛋白质水合程度,同时反复冻融提取法暴露了较多疏水基团,这增强了油和蛋白质之间的相互作用,因此反复冻融方式所得的C-藻蓝蛋白的持水性、持油性较高。

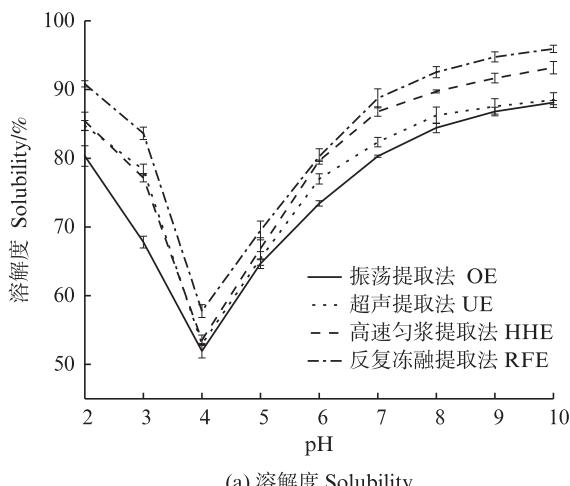
2.3.5 最低凝胶浓度

C-藻蓝蛋白的最低凝胶浓度如图3h所示。最低凝胶浓度的值越低代表蛋白的凝胶能力越好^[46]。4种提取方式中,反复冻融提取法所得的C-藻蓝蛋白的最低凝胶浓度最低,其次为高速匀浆提取法、超声提取法和振荡提取法($P<0.05$)。反复冻融提取法所得的C-藻蓝蛋白的发泡能力更易形成稳定的泡沫,所得结果与最低凝胶浓度保持一致。蛋白最低凝胶浓度和其表面疏水性也有一定关系,表面疏水性是促进凝胶形成的主

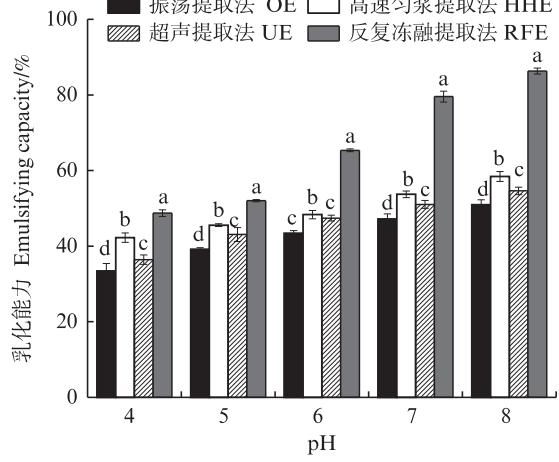
要原因之一^[46]。

2.3.6 表面疏水性

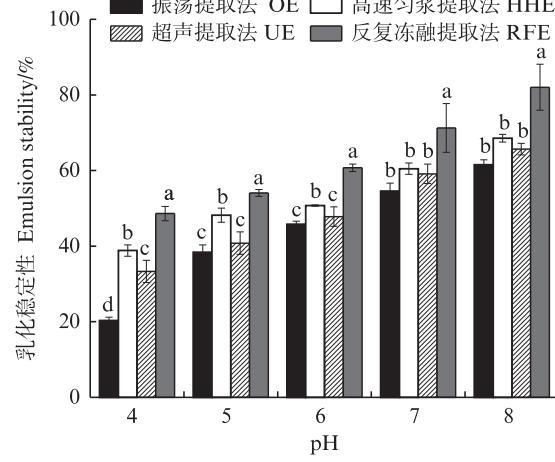
C-藻蓝蛋白的表面疏水性如图3i所示。C-藻蓝蛋白表面疏水性反复冻融提取法最高,高速匀浆提取法次之,最后是超声提取法和振荡提取法($P<0.05$)。蛋白质分子的表面疏水性与其溶解度密切相关,溶解度越高的蛋白质分子通常具有更强的表面疏水性,能够更有效地降低界面的张力^[40]。蛋白质的表面疏水性与发泡行为呈正相关。由于蛋白质分子结构中的疏水区域促进了其在界面上的吸附并引起部分去折叠,未折叠蛋白降低了液体-空气界面处的表面张力并保持了泡沫的稳定性^[23]。反复冻融提取法得到的蛋白具有最强的表面疏水性,二级结构中 α -螺旋含量最高,稳定性最强。表面疏水性是促进凝胶网络形成和稳定的主要分子驱动力^[46]。



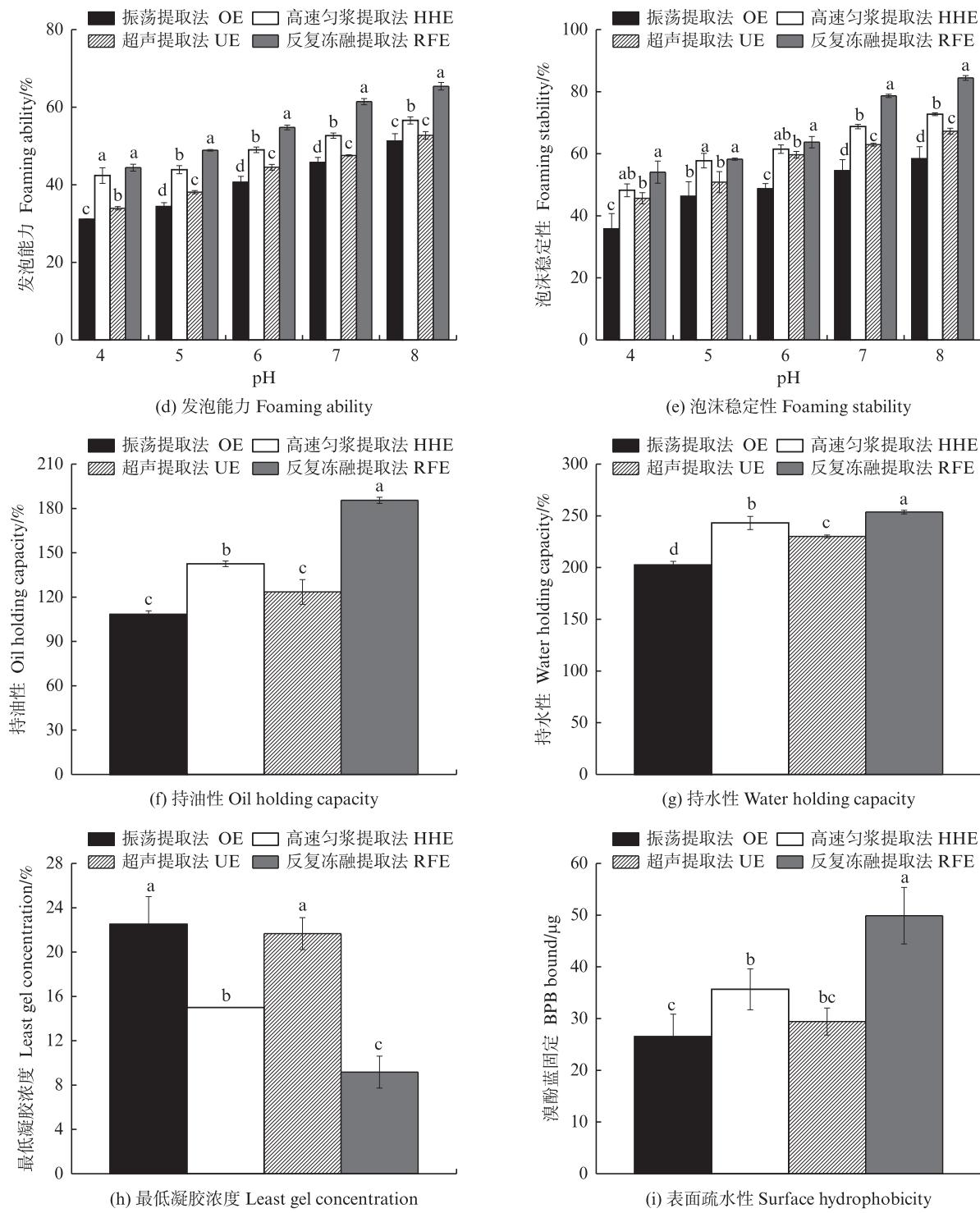
(a) 溶解度 Solubility



(b) 乳化能力 Emulsifying capacity



(c) 乳化稳定性 Emulsion stability



同一列不同字母表示统计学显著差异($P<0.05$)。

Different letters in the same column indicate statistically significant differences ($P<0.05$).

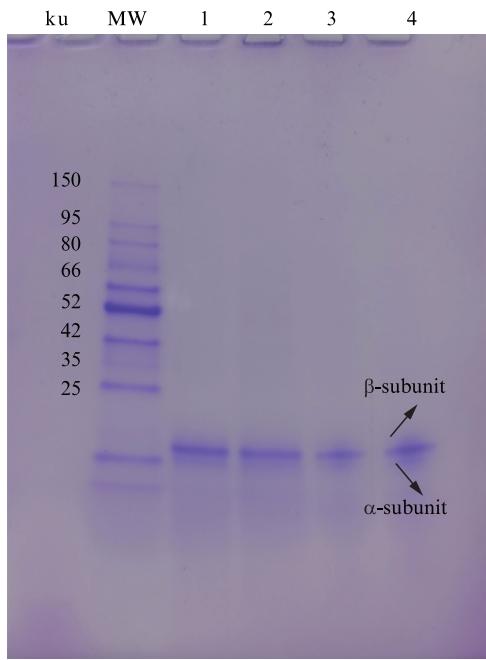
图3 藻蓝蛋白的功能特性

Fig. 3 Functional properties of phycocyanin

2.4 SDS-PAGE

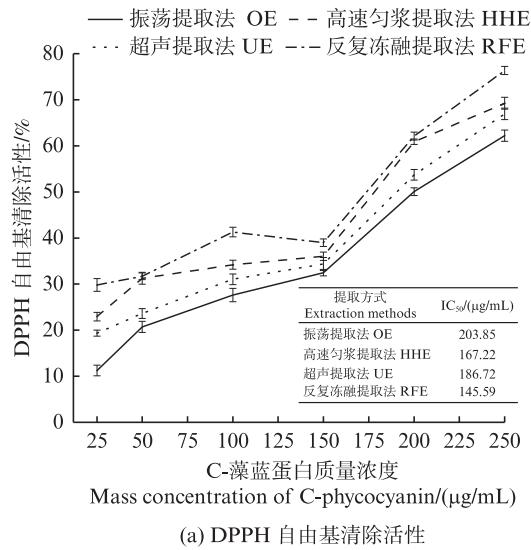
C-藻蓝蛋白的SDS-PAGE分析如图4所示。4种处理方法纯化的凝胶过滤提取物电泳条带较少且清晰,显示出2个小于20 ku的特征亚单位。

这与KATARI等^[47]的研究一致,C-藻蓝蛋白包含2个分子量较小的亚基,包括 α -亚基和 β -亚基,分别在10~19和14~21 ku。



1-4 分别为振荡提取法、高速匀浆提取法、超声提取法和反复冻融提取法4种处理方式所得的C-藻蓝蛋白电泳条带。
Lane 1-4 was C-phycocyanin from OE, HHE, UE, and RFE.

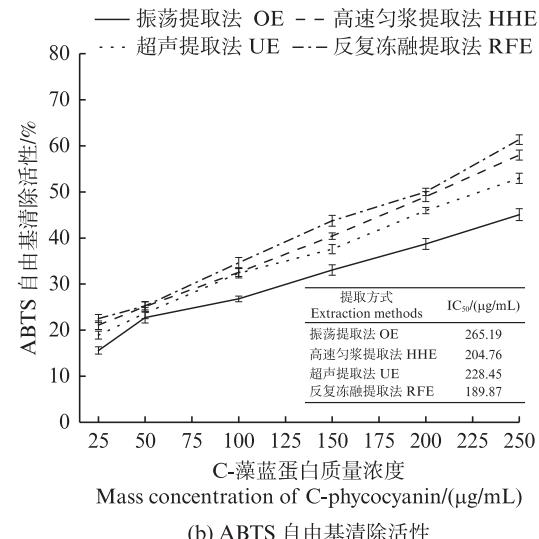
图4 C-藻蓝蛋白的SDS-PAGE
Fig. 4 SDS-PAGE of C-phycocyanin



(a) DPPH自由基清除活性

2.5 C-藻蓝蛋白的抗氧化特性

图5显示不同浓度的C-藻蓝蛋白的清除DPPH和ABTS自由基能力。实验表明,随着C-藻蓝蛋白质量浓度由25 μg/mL逐渐增加至250 μg/mL,其清除DPPH和ABTS自由基的能力逐渐增加,即质量浓度越高对自由基的清除活性越强。此外,不同提取方式也会影响藻蓝蛋白的清除活性,4种提取方式中,反复冻融提取法所得的C-藻蓝蛋白清除DPPH和ABTS自由基能力最强,其次是高速匀浆提取法,之后是超声提取法和振荡提取法($P<0.05$)。其中反复冻融提取法所得的C-藻蓝蛋白在250 μg/mL时清除DPPH和ABTS自由基能力最强,分别为76.35%和61.36%,与RENUGADEVI等^[48]的实验中藻蓝蛋白DPPH清除率(78.75%)比较数值相近。反复冻融提取法所得的C-藻蓝蛋白IC₅₀值最低($P<0.05$),C-藻蓝蛋白在250 μg/mL时其IC₅₀值为145.59和189.87 μg/mL。有害活性氧产生与身体修复机制之间的不平衡是造成许多疾病和衰老的主要原因^[49],而C-藻蓝蛋白可用于清除DPPH和ABTS自由基,从而减少对身体的损害。



(b) ABTS自由基清除活性

图5 不同处理方式对藻蓝蛋白清除自由基能力
Fig. 5 Effects of different extraction methods on the ability of phycocyanin to scavenge

3 讨论

本研究通过4种不同的提取方法(振荡提取法、高速匀浆提取法、超声提取法和反复冻融提取法)从螺旋藻中提取C-藻蓝蛋白,并对其理化性质、功能特性和抗氧化活性进行了详细的分析比较。结果表明,反复冻融提取法和高速匀浆提

取法得到的C-藻蓝蛋白纯度最高。在理化性质方面,扫描电子显微镜观察结果显示螺旋藻蛋白粗提物具有特定的形态特征,FTIR分析揭示了不同提取方法所得C-藻蓝蛋白二级结构的差异,其中反复冻融提取法得到的蛋白质α-螺旋含量最高,表明其具有更稳定的结构。这些结果为理解C-藻蓝蛋白的性质提供了重要依据。

在功能特性方面,反复冻融提取法所得的C-藻蓝蛋白表现出最佳的溶解度、乳化性能、发泡性能、最低凝胶浓度、持油能力和持水能力,以及最高的表面疏水性,这可能与其特殊的提取过程导致蛋白质结构变化有关,这些特性使其在食品工业中具有潜在的应用价值。此外,SDS-PAGE分析确认了C-藻蓝蛋白的2个特征亚单位,进一步验证了提取过程的有效性和所获得蛋白的纯度。

此外,本研究还考察了C-藻蓝蛋白的抗氧化特性,发现其具有良好的自由基清除能力。反复冻融提取法所得的C-藻蓝蛋白在250 μg/mL时展现出最强的清除能力,其DPPH和ABTS的IC₅₀值最小且分别为145.59和189.87 μg/mL,表明其在抗氧化方面的潜力。综上所述,反复冻融提取法是一种有效提取C-藻蓝蛋白的方法,能够得到具有优良理化性质和功能特性的C-藻蓝蛋白产品,为深入理解和优化C-藻蓝蛋白的提取工艺及其功能特性的开发提供了重要的理论依据和实践指导。

作者声明本文无利益冲突。

参考文献:

- [1] 郭雯竹,张艳春,李金哥,等.不同培养条件对螺旋藻生长的影响[J].中国果菜,2024,44(6): 54-58, 84.
GUO W Z, ZHANG Y C, LI J G, et al. Effects of different culture conditions on the growth of spirulina[J]. China Fruit & Vegetable, 2024, 44(6): 54-58, 84.
- [2] KUMAR A, RAMAMOORTHY D, VERMA D K, et al. Antioxidant and phytonutrient activities of *Spirulina platensis*[J]. Energy Nexus, 2022, 6: 100070.
- [3] 王玉.螺旋藻的绿色高效循环培养关键技术及其胞内外多糖的制备与表征[D].南昌:南昌大学,2023.
WANG Y. Key techniques of green and efficient cycle culture of Spirulina and preparation and characterization of polysaccharide in and out of cell [D]. Nanchang: Nanchang University, 2023.
- [4] BORTOLINI D G, MACIEL G M, DE ANDRADE ARRUDA FERNANDES I, et al. Functional properties of bioactive compounds from *Spirulina* spp.: current status and future trends[J]. Food Chemistry: Molecular Sciences, 2022, 5: 100134.
- [5] CHRISTODOULOU C, KOTSAMPASI B, DOTAS V, et al. The effect of Spirulina supplementation in ewes' oxidative status and milk quality [J]. Animal Feed Science and Technology, 2023, 295: 115544.
- [6] MALAU-ADULI A E O, HOLMAN B W B. Effect of Spirulina supplementation on plasma metabolites in crossbred and purebred Australian Merino lambs [J]. International Journal of Veterinary Science and Medicine, 2015, 3(1/2): 13-20.
- [7] 李凡念,张文静,郝帅,等.藻蓝色素对胰岛素抵抗HepG2细胞糖代谢的影响[J].食品科学技术学报,2023,41(3): 54-63, 84.
LI F N, ZHANG W J, HAO S, et al. Effects of phycocyanin on glucose metabolism in insulin-resistant HepG2 cells [J]. Journal of Food Science and Technology, 2023, 41(3): 54-63, 84.
- [8] HE X Y, WANG C E, ZHU Y X, et al. *Spirulina* compounds show hypoglycemic activity and intestinal flora regulation in type 2 diabetes mellitus mice[J]. Algal Research, 2022, 66: 102791.
- [9] MARLES R J, BARRETT M L, BARNES J, et al. United States pharmacopeia safety evaluation of spirulina [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2011, 51(7): 593-604.
- [10] PARK W S, KIM H J, LI M, et al. Two classes of pigments, carotenoids and C-phycocyanin, in *Spirulina* powder and their antioxidant activities [J]. Molecules, 2018, 23(8): 2065.
- [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] 李曼,刘立增,刘爱国,等.蛋白质对冰淇淋品质影响及其在冰淇淋中应用的研究进展[J/OL].食品工业科技,2024: 1-28[2024-06-27]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024020252>.
LI M, LIU L Z, LIU A G, et al. Research progress on the influence of protein on ice cream quality and its application in ice cream [J/OL]. Science and Technology of Food Industry, 2024: 1-28[2024-06-27]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024020252>.
- [13] 陈东,钱为强,林凤娟.微藻主要营养成分及其在食品中的应用研究进展[J].南方农业,2023,17(5): 44-47, 53.
CHEN D, QIAN W Q, LIN F J. Research progress on main nutrients of microalgae and its application in food [J]. South China Agriculture, 2023, 17(5): 44-47, 53.
- [14] HAO S, LI F N, LIU Y P, et al. Phycocyanin diminishes the viability of non-small cell lung cancer cells via induction of autophagy[J]. Journal of Functional Foods, 2022, 94: 105145.
- [15] MAITY S, MALLICK N. Unraveling C-phycocyanin extraction by dark incubation from marine cyanobacterium *Leptolyngbya valderiana* [J]. Sustainable Chemistry and

- Pharmacy, 2023, 31: 100929.
- [16] GORGICH M, PASSOS M L C, MATA T M, et al. Enhancing extraction and purification of phycocyanin from *Arthospira* sp. with lower energy consumption [J]. Energy Reports, 2020, 6 Suppl 8: 312-318.
- [17] 关瑞. 螺旋藻粉储藏过程中分析级藻蓝蛋白功能特性变化及去除Pb(Ⅱ)材料的研发[D]. 南昌: 南昌大学, 2023.
- GUAN R. Change of functional properties of analytical grade C-phycocyanin during the storage of *Spirulina platensis* powder and development of Pb(Ⅱ) removal materials [D]. Nanchang: Nanchang University, 2023.
- [18] 张雨, 李歲, 王丽娟, 等. 螺旋藻肽亚铁螯合物的制备及结构表征[J]. 食品工业科技, 2024, 45(10): 165-175.
- ZHANG Y, LI W, WANG L J, et al. Preparation and structural characterization of ferrous chelates of *Spirulina platensis* peptides [J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(10): 165-175.
- [19] GROSSMANN L, HINRICHES J, WEISS J. Solubility of extracted proteins from *Chlorella sorokiniana*, *Phaeodactylum tricornutum*, and *Nannochloropsis oceanica*: impact of pH-value [J]. LWT, 2019, 105: 408-416.
- [20] DU Y Y, ZHANG S K, SUN-WATERHOUSE D, et al. Physicochemical, structural and emulsifying properties of RG-I enriched pectin extracted from unfermented or fermented cherry pomace [J]. Food Chemistry, 2023, 405: 134985.
- [21] ZHENG J X, YIN H, SHEN C C, et al. Functional and structural properties of spirulina phycocyanin modified by ultra-high-pressure composite glycation [J]. Food Chemistry, 2020, 306: 125615.
- [22] OMURA M H, DE OLIVEIRA A P H, DE SOUZA SOARES L, et al. Effects of protein concentration during ultrasonic processing on physicochemical properties and techno-functionality of plant food proteins [J]. Food Hydrocolloids, 2021, 113: 106457.
- [23] DENG Y J, HUANG L X, ZHANG C H, et al. Physicochemical and functional properties of Chinese quince seed protein isolate [J]. Food Chemistry, 2019, 283: 539-548.
- [24] BENELHADJ S, DOUIRI S, GHOUILLI A, et al. Extraction of *Arthospira platensis* (Spirulina) proteins via Osborne sequential procedure: structural and functional characterizations [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2023, 115: 104984.
- [25] 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.
- [26] DE AMARANTE M C A, BRAGA A R C, SALA L, et al. Design strategies for C-phycocyanin purification: process influence on purity grade [J]. Separation and Purification Technology, 2020, 252: 117453.
- [27] 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.
- [28] YANG R, MA T H, SHI L N, et al. The formation of phycocyanin-EGCG complex for improving the color protection stability exposing to light [J]. Food Chemistry, 2022, 370: 130985.
- [29] 朱林清, 曾名湧. 聚球藻PCC7002藻蓝蛋白提取纯化及热致褪色机理研究[J]. 食品工业科技, 2022, 43(16): 32-40.
- ZHU L Q, ZENG M Y. Extraction and purification and heat-induced fading mechanism of *Synechococcus* sp. PCC7002 phycocyanin [J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(16): 32-40.
- [30] MOHSIN G F, SCHMITT F J, KANZLER C, et al. Structural characterization of melanoidin formed from D-glucose and L-alanine at different temperatures applying FTIR, NMR, EPR, and MALDI-ToF-MS [J]. Food Chemistry, 2018, 245: 761-767.
- [31] LEMOS P V F, OPRETZKA L C F, ALMEIDA L S, et al. Preparation and characterization of C-phycocyanin coated with STMP/STPP cross-linked starches from different botanical sources [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 159: 739-750.
- [32] 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, 2023, 188: 115390.
- [33] LIMA R R, STEPHANI R, PERRONE Í T, et al. Plant-based proteins: a review of factors modifying the protein structure and affecting emulsifying properties [J]. Food Chemistry Advances, 2023, 3: 100397.
- [34] 李晶晶, 罗婷婷, 胡海玥, 等. 不同提取方法对杏仁蛋白结构和功能特性的影响[J/OL]. 食品工业科技, 2024: 1-16 [2024-06-27]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024030197>.
- LI J J, LUO T T, HU H Y, et al. Effects of different extraction methods on structure and functional characteristics of almond protein [J/OL]. Science and Technology of Food Industry, 2024: 1-16 [2024-06-27]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024030197>.
- [35] SUN P, ZHANG Q, ZHAO Y, et al. Improving gel properties of soy protein isolate through alkaline pH-shifting, mild heat treatment, and TGase cross-linking [J]. Food Hydrocolloids, 2023, 144: 108924.
- [36] LI Y, ZHANG Z, ABBASPOURRAD A. Improved pH

- stability, heat stability, and functionality of phycocyanin after PEGylation [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 222: 1758-1767.
- [37] PÉREZ-VILA S, FENELON M A, O'MAHONY J A, et al. The emulsifying properties of protein extracts from perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) depend on the extraction method [J]. Food Hydrocolloids, 2024, 152: 109917.
- [38] 陈旭辉. pH对藻蓝蛋白乳化性质的影响[J]. 现代食品科技, 2020, 36(9): 117-125.
- CHEN X H. Effect of pH on the emulsifying activity of C-phycocyanin [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(9): 117-125.
- [39] LIU Q Q, LIU Y T, HUANG H, et al. Improvement of the emulsifying properties of *Zanthoxylum* seed protein by ultrasonic modification [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2023, 100: 106638.
- [40] BERTSCH P, BÖCKER L, MATHYS A, et al. Proteins from microalgae for the stabilization of fluid interfaces, emulsions, and foams [J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 108: 326-342.
- [41] 关薇, 王颖. 超声处理对藜麦蛋白功能特性和抗氧化能力的影响[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2024, 36(3): 58-64.
- GUAN W, WANG Y. Effects of ultrasonic treatment on functional properties and antioxidant capacity of quinoa protein [J]. Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2024, 36(3): 58-64.
- [42] CHEN X Q, ZHU W S, CHU X Y, et al. Effect of *Xanthoceras sorbifolium* bunge leaves saponins on the foaming properties of whey protein isolate at varying pHs: correlation between interface, rheology, and foaming characteristics [J]. LWT, 2023, 187: 115316.
- [43] BENELHADJ S, GHARSALLAOUI A, DEGRAEVE P, et al. Effect of pH on the functional properties of *Arthrosphaera (Spirulina) platensis* protein isolate [J]. Food Chemistry, 2016, 194: 1056-1063.
- [44] PÉREZ-GRAMATGES A, MATHEUS C R V, LOPES G, et al. Surface and interfacial tension study of interactions between water-soluble cationic and hydrophobically modified chitosans and nonylphenol ethoxylate [J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2013, 418: 124-130.
- [45] DU J J, ZHU Q, GUO J G, et al. Effects of ultrasonic and steam-cooking treatments on the physicochemical properties of bamboo shoots protein and the stability of O/W emulsion [J]. Heliyon, 2023, 9(9): e19825.
- [46] 郑雁, 林江涛, 岳清华. 鹰嘴豆和鹰嘴豆蛋白的特性及应用研究进展[J]. 中国油脂, 2024, 49(4): 20-27.
- ZHENG Y, LIN J T, YUE Q H. Research progress on characteristics and application of chickpea and chickpea protein [J]. China Oils and Fats, 2024, 49(4): 20-27.
- [47] KATARI J K, UZ ZAMA KHAN M R, TRIVEDI V, et al. Extraction, purification, characterization and bioactivity evaluation of high purity C-phycocyanin from *Spirulina* sp. NCIM 5143 [J]. Process Biochemistry, 2023, 130: 322-333.
- [48] RENUGADEVI K, VALLI NACHIYAR C, SOWMIYA P, et al. Antioxidant activity of phycocyanin pigment extracted from marine filamentous cyanobacteria *Geitlerinema* sp TRV57 [J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2018, 16: 237-242.
- [49] PARAMANYA A, OYESIJI ABIODUN A, SHAMSUL OLA M, et al. Enhancing the quality and antioxidant capacity of phycocyanin extracted from *Spirulina platensis* PCC 7345: a quality-by-design approach [J]. Arabian Journal of Chemistry, 2024, 17(3): 105653.

Extraction and characterization of C-phycocyanin from *Spirulina platensis*

LI Xianghe¹, XU Jingwen¹, ZHAO Yong^{1,2,3}

(1. College of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China; 3. Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Aquatic Product on Storage and Preservation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 201306, China)

Abstract: The objective of this study is to extract C-phycocyanin from *Spirulina platensis* using four different extraction methods and to investigate its structural, physicochemical, functional properties, and antioxidant activity. The four extraction methods include oscillatory extraction (OE), high-speed homogenate extraction (HHE), ultrasonic extraction (UE), and repeated freeze-thaw extraction (RFE). The results showed that the purity of C-phycocyanin obtained by the four extraction methods reached the standard of reagent grade. The purity of C-phycocyanin obtained by repeated freeze-thawing and high-speed homogenization methods reached 2.68 and 2.37, respectively. FTIR analysis showed that C-phycocyanin α -helix obtained by repeated freezing and thawing had the highest content, indicating that its secondary structure was the most stable. The physicochemical and functional properties of C-phycocyanin showed that its solubility, emulsification ability, foaming ability, water holding capacity, oil holding capacity, minimum gel concentration and surface hydrophobicity all showed the following characteristics: repeated freeze-thaw extraction > high-speed homogenate extraction > ultrasonic extraction > oscillating extraction ($P<0.05$). As shown by SDS-PAGE profiles, C-phycocyanin obtained by all extraction methods contained two helical subunits, α and β . The results of antioxidant experiments showed that C-phycocyanin had strong antioxidant properties. The ability of C-phycocyanin to scour DPPH and ABTS free radicals obtained by the four extraction methods was shown as repeated freeze-thaw extraction, high-speed homogenate extraction, ultrasonic extraction, oscillation extraction. In conclusion, C-phycocyanin extracted by repeated freezing and thawing has the highest purity, the most stable secondary structure, the best solubility, emulsification ability, foamability, water holding capacity, oil holding capacity, minimum gel concentration and surface hydrophobicity, and strong antioxidant ability. These results provide theoretical support and research basis for expanding the application of C-phycocyanin in food, medicine and cosmetics.

Key words: *Spirulina platensis*; C-phycocyanin; extract; physical and chemical properties; functional characteristics; resistance to oxidation