

藻胆蛋白的特性、应用、提取及展望^{*}

贾晓会¹⁾ 甘婉怡¹⁾ 马文煊¹⁾ 王子越¹⁾ 尹训喆²⁾ 梁前进^{1)†} 向本琼^{1,3)} 施定基⁴⁾

(1) 北京师范大学生命科学与技术国家级实验教学中心, 100875, 北京;

2) 山东建筑大学市政与环境工程学院, 250101, 山东济南;

3) 北京师范大学未来教育学院, 519087, 广东珠海;

4) 中国科学院植物研究所, 100093, 北京)

摘要 藻胆蛋白(Phycobiliproteins, PBPs)由藻胆素色基与脱辅基蛋白通过共价键连接而成, 是蓝藻、红藻和部分隐藻中捕光天线复合物的主要成分。与高等植物和绿藻的捕光天线复合物-叶绿素蛋白复合物相似, 藻胆蛋白在光合作用起始阶段担负光能的吸收和传递功能。本文比较了上述 2 类色素-蛋白复合物, 提出藻胆蛋白的特点, 有助于吸引更多学者参与其研究和开发; 在特性、应用和提取部分讨论了一些值得关注的进展和本团队的近期研究; 基于目前生物制药技术的特点, 提出了一个不损伤藻细胞提取藻胆蛋白的技术设想。

关键词 藻胆蛋白; 藻胆体; 蓝藻; 隐藻; 提取

中图分类号 Q949.2

DOI: [10.12202/j.0476-0301.2023122](https://doi.org/10.12202/j.0476-0301.2023122)

0 引言

放氧光合生物如绿藻(*Chlorophyta*)和高等植物中的捕光天线复合物, 绝大多数是叶绿素-蛋白的复合物^[1]。藻胆蛋白(Phycobiliproteins, PBPs)作为捕光天线复合物, 大约在 30 亿年前就出现在原核的蓝藻(又名蓝细菌, *Cyanobacteria*)中, 至今一直存在并延续到部分真核藻中^[2]。这些以藻胆蛋白为捕光天线复合物的藻类进行的光合作用, 从使用的原料、过程和产物, 与用叶绿素-蛋白复合物作捕光天线复合物的光合之间尚未发现有不同之处。然而比较这 2 类捕光天线复合物的特性, 发现它们之间有许多不同。

藻胆蛋白至今只在蓝藻、红藻(*Rhodophyta*)和部分隐藻(*Cryptophyte*)中检测到^[2], 其含量随生育期和生境的变化较大。相比之下, 叶绿素-蛋白复合物也随生育期和生境变化, 但变化不明显。按种群之间比较, 藻胆蛋白含量最高的是蓝藻, 占细胞可溶性蛋白 50% 以上; 红藻次之, 隐藻更少; 甲藻(*Pyrrophyta*)中有些种类检测不到。似乎随着进化藻胆蛋白含量在逐渐减少, 以致在褐藻、绿藻等进化程度较高的藻类中检测不到^[1]。

藻胆蛋白在细胞中的存在形式变化很大。叶绿

素-蛋白复合物通常组装成膜状, 镶嵌在类囊体膜中^[1]; 藻胆蛋白在蓝藻和红藻中先由 α 和 β 2 种亚基形成单体(原聚体, $\alpha\beta$), 然后聚合成三聚体($\alpha\beta$)₃或六聚体($\alpha\beta$)₆, 最终组装成藻胆体(Phycobilisome), 连接在类囊体膜表面^[3]。隐藻的藻胆蛋白多形成异二聚体($\alpha_1\beta$)($\alpha_2\beta$)存在于类囊体腔中, 不形成藻胆体^[4]。

藻胆蛋白主要分为藻蓝蛋白(Phycocyanin, PC)、藻红蛋白(Phycoerythrin, PE)和别藻蓝蛋白(Allophycocyanin, APC)等, 颜色从蓝色到红色, 色泽鲜艳^[2-3], 无毒, 作为天然色素用途较广^[5]。叶绿素蛋白复合物均为绿色, 不同种类间仅略有差异, 开发价值有限。

藻胆蛋白是水溶性物质, 通过比较简易的程序即可提取和检测^[5-6]。相对而言, 叶绿素-蛋白复合物含有脂溶性色素^[1], 处理程序较为复杂, 不利于大规模开发利用。

基础研究和应用实践证明, 在 2 类色素蛋白复合物中, 藻胆蛋白入手较易, 开发技术发展较快。目前, 藻胆蛋白的提取和应用成果已经很多, 形成了较大的规模。

本文的重点在藻胆蛋白的应用, 力图从国内外进展中选取一些值得关注的成果或动向, 并结合本团队多年探索藻胆蛋白的工作成果, 对藻胆蛋白作了综合

* 北京市重点教改资助项目; 北京师范大学教学建设与改革/信息化与教育教学融合资助项目(18-04-05); 北京师范大学十四五高等教育领域教材校级教改项目(2022-46)

† 通信作者: 梁前进(1963—), 博士, 教授。研究方向: 分子细胞遗传与功能基因。E-mail: lqj@bnu.edu.cn

收稿日期: 2023-05-05

评述^[7]; 在展望未来的同时, 提出一种既不损伤细胞, 又可连续提取蓝藻藻胆蛋白的技术构想。

1 藻胆蛋白的特性与功能

1.1 藻胆蛋白的结构组成 迄今为止, 在蛋白质数据库(protein data bank, PDB)中已有 61 种藻胆蛋白的结构^[3]. 从这些蛋白质的结构可见, 藻胆蛋白由 α 和 β 2 个亚基组成。 α 和 β 亚基的基本结构相似, 均含 6~8 个由环(loop)分隔的螺旋(helix)区和球蛋白样褶皱(globulin-like fold)^[8]. 不同藻胆蛋白的亚基的相对分子质量为 $(1.6\sim1.8)\times10^4$, pI 接近 6. α 亚基含 161~167 个氨基酸残基, 而 β 亚基含 161~177 个残基^[3], 具体大小取决于藻胆蛋白的类型。

藻胆素是含有共轭双键的开链四吡咯化合物, 负责藻胆蛋白的光谱特性, 是藻类重要的光感受器^[9]. 已知的藻胆素有藻红胆素(Phycoerythrobilin, PEB)、藻蓝胆素(Phycocyanobilin, PCB)、藻尿胆素(Phycourobilin, PUB)和藻紫胆素(Phycoviolobilin, PVB)^[10-11]. 这 4 种藻胆素互为异构体, 含有不同数量的共轭双键. 共轭体系的形成使得光吸收移向长波长(红移), 导致 4 种藻胆素有特定的颜色和吸收波长. 藻胆蛋白分子的每个亚基含有 1~3 个藻胆素分子附着在多肽骨架的高度保守的半胱氨酸残基(Cys-50、60、81 和 150)上, 这些特性共同决定了各种藻胆蛋白的具体光谱特性^[2-3]. 藻胆蛋白的多肽链对藻胆素发色团有保护作用, 任何影响蛋白质稳定性和结构特性的因素都可能阻止或加速藻胆蛋白的降解。

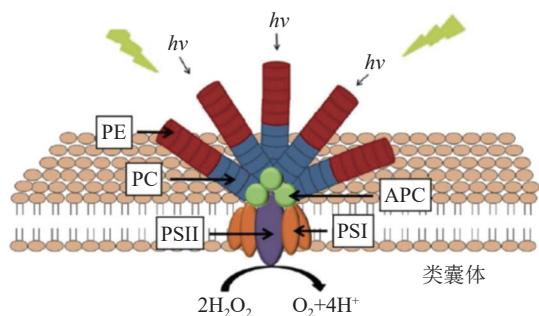
在蓝藻和红藻中, 藻胆蛋白的 α 和 β 亚基先形成稳定的 $\alpha\beta$ 单体, 再由单体聚合为多聚体—— $(\alpha\beta)_n$, 并与连接多肽等组装成藻胆体, 锚定于扁平的类囊体(Thylakoid)单层膜外以行使功能^[3]. 在部分隐藻中, 进化出了位于类囊体腔内的独特藻胆蛋白天线系统(Antenna system), 其基本单元由 2 个拷贝的 $\alpha\beta$ 原聚体组成, 其中 α 和 β 亚基支撑着有限数量的线性四吡咯发色团不同组合. 由单个质体基因编码的 β 亚基高度保守, 而由细胞核基因编码的 α 亚基则演化出了多种多基因家族. 这种独特的天线系统有利于优化藻胆蛋白的吸收光谱覆盖范围, 多个 α 亚基基因的存在可能也有利于适应光的改变^[4].

1.2 藻胆蛋白的特性

1.2.1 藻胆蛋白的光谱特性 藻胆蛋白的光谱特性由藻胆素赋予. 除前述藻蓝蛋白、藻红蛋白和别藻蓝蛋白 3 大主要类别外, 还有藻红蓝蛋白(Phycoerythrocyanin, PEC)^[2, 12]. 藻红蓝蛋白的主要着色成分为 C-藻蓝蛋白、C-藻红蛋白和别藻蓝蛋白, 其中藻蓝蛋

白的含量约为 20%.

藻蓝蛋白是一种鲜艳的蓝色蛋白质, 研究报导其吸收最大值和发射最大值分别在 620 和 640 nm 波长处^[11], 但有不同的数据, 可能与亚类、来源和检测纯度等有关. 藻蓝蛋白存在于藻胆体杆状部的近端(图 1), 根据藻的来源可分为 C-藻蓝蛋白(C-PC, 主要存在于大多数蓝藻中)和 R-藻蓝蛋白(R-PC, 主要存在于红藻中). C-藻蓝蛋白只结合 1 种藻胆素(PCB); R-藻蓝蛋白则可结合不同的藻胆素.



PC. 藻蓝蛋白; PE. 藻红蛋白; APC. 别藻蓝蛋白.

图 1 藻胆蛋白的结构示意^[13]

藻红蛋白是多亚基红色荧光蛋白, 呈鲜明的粉红色, 可从红藻中分离纯化得到. 具体来讲, 藻红蛋白位于藻胆体棒的远端(图 1), 其吸收最大值和发射最大值分别在 542 和 576 nm 波长处. 藻红蛋白具有藻胆蛋白中最多样化的发色团, 这赋予其较高的吸光性能和量子产量^[2].

藻红蓝蛋白是在蛋白质上结合藻红胆素和藻紫胆素形成的分子, 也是迄今为止发现的唯一只存在于蓝藻中的藻胆蛋白, 呈紫蓝色, 其丰度以及生长过程中产生的光强与所在藻类的类型密切相关^[14].

别藻蓝蛋白是藻胆体核心的一部分(图 1), 具有明亮的蓝绿色, 其吸收最大值和发射最大值分别在 650 和 660 nm 波长处. 作为最简单的藻胆蛋白, 别藻蓝蛋白只在 α 亚基的 Cys-81 残基处有 1 个藻蓝胆素分子^[2].

研究表明, 各种藻胆蛋白之间可产生非常精确的光谱耦合效应^[15]. 藻胆蛋白及其光谱耦合效应在藻胆体环境中的存在, 使不同的生物能够应对不利的环境条件, 维持繁殖和生存能力, 从而使拥有它们的物种获得竞争优势^[16].

1.2.2 藻胆蛋白的多种生物活性 近年来, 许多研究报道了藻胆蛋白的生物活性. 其活性可概括为抗氧化、抗炎症、抗代谢性疾病、抗癌、抗神经退行性疾病和抗病原微生物侵染等^[2-3, 5-6]. 此外, 藻胆蛋白还可作为良好的荧光探针^[17], 用作疾病检测和诊断的工具. 这些特性使藻胆蛋白成为基础生命科学、生物医

学和生物能源等领域研究、应用的焦点,促进了生物技术新产品、新工艺的发展。

1.3 藻胆蛋白的功能 不同种类的藻胆蛋白按照一定的次序和比例,自组装成具有特定构象的超分子复合体——藻胆体,构成藻类的捕光天线复合物,它有效捕获的光能以单向传递的方式传递给叶绿素分子。能量在藻胆蛋白之间的传递效率接近 100%^[2, 9]。藻胆蛋白主要吸收蓝光和绿光,对红光吸收较少,这与大多数高等植物的吸光区正好互补,因此,具有藻胆蛋白的生物可填充仅以叶绿素蛋白复合物为主要捕光系统的生物无法定植的生态位^[18]。

需要指出的是,藻胆蛋白可被用作氮剥夺情况下的氮源,满足其他蛋白质的合成^[19]。对集胞藻(*Synechocystis* sp. PCC6803)中的藻胆体进行蛋白截断体(protein truncated body)研究表明,由于铁和碳酸氢盐的利用和调节变化,藻体的蛋白质组学特征和细胞膜相关功能均会受到影响^[20]。相关研究还发现,藻胆蛋白在藻细胞不同生育期的变化与细胞内的基因组拷贝数有关。

2 藻胆蛋白的应用

藻胆蛋白具有多种生物活性(如抗氧化、抗肿瘤等),在功能食品、保健品、药品等生产领域有很高的开发和利用价值,其安全性和生物利用度也很高^[2]。以下将以藻胆蛋白藻胆素的光谱特性和脱辅基蛋白生物活性 2 个方面为基础,着重介绍其应用。

2.1 基于光谱特性的应用

1) 藻胆蛋白可替代人工合成色素制备食品和化妆品。食品色素分为食品合成着色剂和食品天然着色剂。研究表明,有些食品合成着色剂具有细胞毒性或遗传毒性,过量摄入会对人体产生危害^[21]。作为天然色素蛋白,藻胆蛋白无毒且具有多彩的颜色,是乳制品、饮料、糖果等食品的理想天然着色剂。例如,在 2 °C 条件下,添加于酸奶中的藻胆蛋白可保持颜色 4 个月之久^[22]。

藻胆蛋白也是一些化妆品(如口红、眼线笔、眼影和香水等)配方中的着色剂^[23],还可作为染发剂的原料。目前许多染发产品都含有工业合成的化学物质,而这可能会在某些使用者中引起过敏反应等不良症状。有研究表明,作为染发剂配方成分的藻蓝蛋白,在 4 次加热/冷却(45 °C、48 h/4 °C、48 h)循环下尚能表现出良好的物理稳定性,且显色度降低缓慢^[24]。

2) 藻胆蛋白可用以制备新型荧光探针。藻胆蛋白可作为一种新型荧光探针材料。与传统荧光探针相比,藻胆蛋白荧光探针具有许多优点——荧光亮度高,稳定性强,与背景光形成鲜明对比易观察,可减少

对生物样品的伤害,有利于提高检测效率^[25]。目前,藻胆蛋白荧光探针在离子检测、生物检测等方面已经体现了很高的应用价值。

2.2 基于藻胆蛋白生物活性的应用

1) 抗氧化性和抗炎活性。藻胆蛋白可作为抗氧化剂延长食品保质期。研究表明,无论在食品中放入未封装的藻胆蛋白或封装的藻胆蛋白(如放入壳聚糖包被的脂质体中),都可以延长食品的保质期^[20, 26]。近年来抗衰老化妆品越来越受到人们(特别是女性)欢迎。由于其抗氧化活性,藻蓝蛋白也被开发、应用在化妆品行业中^[27]。

在我国,随着社会的老龄化,抗衰老保健品也越来越受关注。近年来的研究表明,别藻蓝蛋白在秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)体内具有抗氧化和抗衰老潜力,并对体内衰老生理标志物的含量有调节作用^[28]。由此可见,藻胆蛋白具有用于抗衰老相关保健品开发的前景。藻蓝蛋白还具有优越的抗炎活性,能有效抑制炎症引起的肺、肝、心血管和脑血管系统疾病(如炎症性肠病、动脉粥样硬化等)^[29]。

2) 抗癌特性。在癌症治疗中,有一种新兴的无创、高选择性手段——光动力疗法(photo dynamic therapy, PDT)^[30]。该疗法以一个特定波长的光来激活光敏剂(photosensitizer)产生活性氧(reactive oxygen species, ROS),从而氧化损伤肿瘤细胞,对皮肤癌、肺癌、胃癌等疾病有很好的治疗效果。在光动力疗法中,光敏剂是最关键的物质。作为光敏剂,藻胆蛋白具有安全、环保特性,并且能减少光动力疗法对人体的副作用^[23]。

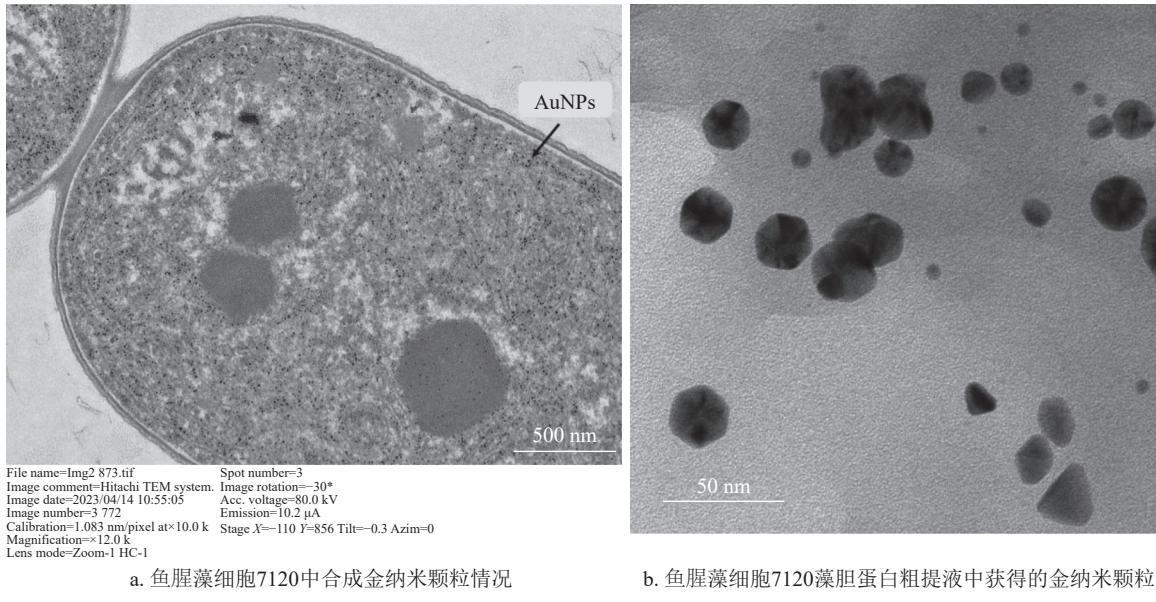
藻胆蛋白在抗肿瘤方面的关注度很高^[17]。研究表明:R-藻蓝蛋白能够明显抑制人急性早幼粒白血病细胞株 HL-60 的生长,而且其抑制效应具有明显的浓度-时间动力学效应;R-藻红蛋白作用于人类宫颈癌细胞株(HeLa 细胞),可将细胞阻滞在有丝分裂人口处(G2/M 期),使细胞周期停滞并走向凋亡(apoptosis)。在肿瘤临床实践中,藻胆蛋白中的藻蓝蛋白被认为是抑制肿瘤细胞生长的安全药物,与其他抗癌药物、放射疗法联合使用将可能大幅度减少与剂量相关的副作用,并改善治疗结果^[31]。其药理学机制包括抑制癌细胞增殖、转移^[32],并促进癌细胞凋亡^[33]。

3) 在金、银纳米颗粒合成中的应用潜力。金纳米颗粒(AuNPs)因具有优异的光学特性、生物相容性和可调稳定性,而被广泛应用于生物成像、医学诊断和治疗等领域^[34]。近来,用绿色生物(尤其是藻类)合成金纳米颗粒成为一种既经济又环保的方法。Kalabegishvili 等^[35]介绍了利用钝顶螺旋藻(*Spirulina*

platensis)在细胞外合成 AuNPs 的方法。Uma Suganya 等^[36]研究了钝顶螺旋藻介导的 AuNPs 合成及其对革兰氏阳性菌的抗菌活性。然而, 微藻(包括蓝藻、绿藻、金藻和红藻)合成金纳米颗粒的具体机制还不清楚。

本团队在用蓝藻合成 AuNPs 时发现, 用突变体比用野生型藻体所获生产量高约 2 倍。与合成 AuNPs

相关, 突变体细胞中的藻胆蛋白相较于野生型减少了 33.96%, 推测藻胆蛋白参与了金纳米颗粒的形成。接着, 提取突变体细胞的藻胆蛋白, 加入金离子溶液, 产生了金纳米颗粒的颜色反应和局部表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)特征峰, 证明藻胆蛋白粗提液可收获到金纳米颗粒合成产物(图 2)。



a. 鱼腥藻细胞7120中合成金纳米颗粒情况

b. 鱼腥藻细胞7120藻胆蛋白粗提液中获得的金纳米颗粒

图 2 鱼腥藻 7120 细胞藻胆蛋白粗提液中金纳米颗粒合成情况(透射电镜照片)

相似地, 藻胆蛋白在银纳米颗粒的制备中也颇有潜力, 且已被证明其可以降低银纳米颗粒的毒性^[37]。

3 藻胆蛋白的获取

在以往数十年中, 藻胆蛋白因其绿色可持续生产性、可安全应用和功能多样性而备受瞩目。诱变和筛选更高藻胆蛋白生产力的藻株, 增强藻胆蛋白的稳定性, 以及利用合成生物学和异源表达系统更方便地分离藻胆蛋白, 是未来藻胆蛋白生产和市场关注的重要方面^[38]。然而, 目前可参与藻胆蛋白的大规模生产的蓝藻和红藻藻株尚有限。由于生产过程中提取方法不稳定、提取产率低、易损失等, 它们的商业化应用和规模化生产受到限制。

藻胆蛋白的制备主要包括天然藻胆蛋白的制备和藻胆蛋白的生物合成。

3.1 天然藻胆蛋白的制备

3.1.1 提取原料 自 1909 年首次报道藻胆蛋白以来, 已有 38 个微藻属用于藻胆蛋白的富集和提取研究, 其中前 10 个属中, 蓝藻占 80%, 红藻占 20%。螺旋藻属是研究最多的, 其次是聚球藻(*Synechococcus*)、集胞藻(*Synechocystis*)、念珠藻(*Nostoc*)、微囊藻(*Microcystis*)和鱼腥藻(*Anabaena*)^[39]。蓝藻的生长、培养和藻胆蛋

白的生产既受生物因素又受非生物因素(光、温度、营养物含量、pH、盐质量分数和培养基化学成分等)的影响。因此, 优化培养条件, 以提高不同微藻(如螺旋藻)生物量产量是实验和工业上积累藻胆蛋白的有效手段。许多研究涉及光谱组成、异养和混合营养等条件对微藻合成藻胆蛋白的影响^[2]。光生物反应器、培养基组成和培养环境的优化, 也是用于快速积累生物量和高效生产藻胆蛋白的研究重点^[3]。

3.1.2 提取方法 近年来文献中关于藻胆蛋白的提取方式有 12 种, 在提取方式上呈现出将 2 种基本方法结合的趋势。但由于藻胆蛋白藻胆体的存在和藻胆蛋白本身的不稳定特性, 加之细胞破碎方法的限制, 高纯度、高稳定性的藻胆蛋白大规模工业提取受限, 藻胆蛋白利用率低。

藻胆蛋白的提取与藻细胞的破碎直接相关, 以下将着重介绍目前应用于蓝藻藻胆蛋白提取的细胞破碎方法和本课题组的一些进展。

目前提取藻胆蛋白的技术, 主要分物理法和非物理法 2 类。

物理法中最常用的是超声波破碎法(ultrasonic crushing method)、反复冻融法(freeze-thaw method)和珠磨法(bead grinding method)等^[16]。实验室较为常用

的是反复冻融法,其优点是简单易操作。但该方法需要长时间的低温冷冻,功耗大、处理时间长,且提取效果不稳定。此方法提取螺旋藻藻胆蛋白粗提液的纯度为 $0.66\sim0.87^{[16]}$,粗提后需进一步纯化才能达到试剂级,且纯化时损耗也较大。其他破碎方法,如超声波法提取藻胆蛋白较为快速,但是破碎藻细胞过程中产生的热能可能会使释放出的藻胆蛋白受热而不稳定,遭到降解。因此,超声波破碎藻胆蛋白需引入低温或者散热系统,此方法得到螺旋藻藻胆蛋白的纯度为0.62。珠磨法破碎细胞也较为快速,相较于超声波破碎输入的能量更低^[40],细胞破碎率可达95%,但所用设备和耗材较贵,难以大规模提取,且经该方法粗提的藻胆蛋白中往往含有高浓度的被磨碎的细胞碎片,不利于后续的纯化步骤^[41]。

非物理法包含化学破碎和生物破壁法^[9, 16]。化学法需加入其他化学试剂来破碎,容易造成藻胆蛋白失活和污染,且一些表面活性剂需要的条件严苛。而生物破壁多采用酶制剂,虽然作用条件温和,胞内活性物质不易破坏(例如,用溶菌酶破碎眉藻,藻胆蛋白的纯度可达食品级和化妆品级),但是酶对反应的温度、pH、离子等条件要求高,时间长,在大批量制备时不好控制。此外,还有利用非致病性固氮菌破壁的^[9],但这种菌只对钝顶螺旋藻特异,得到的蓝藻藻胆蛋白纯度为1.09。

藻胆蛋白是光敏性蛋白,在光、高温和极端pH下不能稳定存在,因此提取过程需要在温和的条件下进行,尽量减少蛋白的损失。比较不同的破碎方法,机械方法没有选择性,需消耗相当大的能量,然而,它是无毒且快速的,适合大型的规模生产。相比之下,因为成本高、稳定性低、耗时和毒性问题,化学和酶处理方法被认为不太适合扩大规模。除了提到的优缺点外,通过上述方法获取的藻胆蛋白粗提液,产率和纯度还有待于提高。

蓝藻藻胆蛋白的纯度是决定其应用范围的重要因素,通常以光谱学纯度衡量,用在最大吸收波长处吸光值与在280 nm处吸光值的比值(A_{max}/A_{280})表示^[16]:当 $A_{615}/A_{280} > 0.7$ 时,藻胆蛋白为食品级; A_{615}/A_{280} 为 $0.7\sim3.9$ 时,藻胆蛋白为试剂等级; $A_{615}/A_{280} \geq 4$ 时藻胆蛋白为分析级。因此,要求获得藻胆蛋白粗提液浓度越大,纯度越高,才能满足高纯度藻胆蛋白的需求。然而,用于分离纯化藻胆蛋白的材料很多,它们在细胞结构、藻胆蛋白种类和含量等方面差别很大,用相同方法提取多种藻类的藻胆蛋白,产率不高。因此,迫切需要针对特定的藻类研发破碎细胞的技术,从细胞抽提率、粗提液产率和纯度方面进行探索,以增加

高纯度藻胆蛋白的生产率,为其进一步应用提供技术支持。

渗透法是一种操作简便、低成本且较为温和的破碎方法^[42-43]。这种方法主要通过渗透剂改变细胞内外的渗透压来破碎藻细胞。本课题组采用改进的渗透法粗提的藻胆蛋白产率可达每g(干质量)鱼腥藻7120收获239.23 mg藻胆蛋白,抽提率达99%,纯度最大为 4.59 ± 0.62 ;而反复冻融法提取的产率为每g(干质量)鱼腥藻7120收获150.92 mg藻胆蛋白,抽提率为68%,纯度为 2.76 ± 0.54 。电泳分析显示,渗透法提取的藻胆蛋白只有2个分子质量的条带,表明纯度很高^[44]。目前本课题组正以鱼腥藻7120的渗透提取法为基础,继续进行螺旋藻、集胞藻6803和聚球藻7942藻胆蛋白提取的研究,并已取得初步成果。

3.2 基因重组技术实现的藻胆蛋白生物合成 利用基因工程技术,可以实现重组藻胆蛋白的大规模、低成本生产。

藻胆蛋白的生物合成涉及2个过程:1)载脂蛋白和藻胆素的合成;2)藻胆素通过酶催化与载脂蛋白结合^[45]。在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中合成后,藻胆素与载脂蛋白受裂解酶的催化在正确位点结合。藻胆蛋白裂解酶的利用是体外高效合成重组藻胆蛋白的关键^[46]。

天然藻胆蛋白由于多以三聚体或六聚体等聚合物形式存在,其组装过程很难准确研究。不过,通过基因工程技术即可以获得单体或亚基,这将有助于藻胆蛋白的组装及其过程的分析。通过分子设计,具有多种功能、多种用途的藻胆蛋白组装改进方式已得到公认,并已在大肠杆菌中引入了藻胆蛋白裂解酶基因 *cpcS* 与 *cpcT*、藻蓝蛋白β亚基基因 *cpcB*、血红素加氧酶-1基因 *Hol* 和藻红蛋白还原酶基因 *pebS*。该方法构建了藻胆蛋白荧光蛋白的合成途径,获得了具有大幅度斯托克斯位移(Stokes shift, 荧光光谱较相应的吸收光谱红移)的重组荧光蛋白^[47]。这种新产品具有广泛的吸收光谱,这是光敏剂的一大特点,被用作太阳能电池板中的天然染料。因此,通过基因重组技术,可以在低成本条件下实现藻胆蛋白的大规模生物合成;还可以进行结构改造,大大拓宽藻胆蛋白的应用领域。

4 藻胆蛋白研发的展望

4.1 涉及基础研究的一些问题 从1909年开始报道关于藻胆蛋白的研究进展起,100多年来藻胆蛋白方面的科学实验一直在不断开拓新领域,取得了许多重大的突破,为其广泛、深入应用奠定了基础^[39]。这里

列出一些至今尚不清楚的问题,与大家作些交流:

- 1) 蓝藻作为最早的放氧光合生物为何选择藻胆蛋白(藻胆体)作为主要的捕光天线复合物,而它们又在以后的进化中是否被叶绿素蛋白复合体取代?
- 2) 藻胆蛋白的编码基因为何表达效率很高,使其能在蓝藻细胞内积累如此多的藻胆蛋白?
- 3) 原核生物蓝藻和真核生物红藻都能合成多种藻胆蛋白并形成藻胆体,为什么隐藻和甲藻合成的藻胆蛋白种类却较少,并且还未报道它们能形成藻胆体?

“最基础”的问题常带来“非常”的研究成果,以上这些问题值得深入探讨。

4.2 应用研究 近20年来,藻胆蛋白研发领域发展很快,其中大家最关心、发表成果最多的是关于藻胆蛋白的提取。

我们基于相关理论基础和实践经验,构想了一种连续提取蓝藻藻胆蛋白的技术。具体想法是:通过编辑连接蛋白基因等分子遗传学技术,创建一种新型的蓝藻突变株,使这种蓝藻突变体只合成藻胆蛋白而不形成藻胆体;这种藻胆蛋白呈可溶状态,可被分泌出细胞,进入培养液;然后,使培养液流经一个吸附装置,吸附饱和后经洗脱、浓缩,分离纯化,获得较高品质的蓝藻藻胆蛋白。

这样的技术流程可以一直连续培养藻细胞,使其处于不断生长的状态,持续合成和分泌藻胆蛋白,而无需人工破碎细胞。如果培养条件得到改善,这种突变型藻细胞可连续工作数日再换新培养基。

在过去的提取方法中,投入时间、物力和财力最多的是破碎细胞这一环节。希望这种新技术可在这方面有所改善。除了要保证突变藻能正常生长外,这种技术的难点在于要改变合成藻胆蛋白步骤中的基因,干预合成藻胆体中的基因,并提高藻细胞透性相关基因的表达等。为了突破蓝藻藻胆蛋白高品质规模生产的瓶颈,这样的技术革新值得探究。

5 参考文献

- [1] MA C B, QIN S, LI W J, et al. Progress in biosynthesis of phycobiliprotein[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2019, 64 (1): 49
- [2] PAGELS F, GUEDES A C, AMARO H M, et al. Phycobiliproteins from cyanobacteria: chemistry and biotechnological applications [J]. *Biotechnology Advances*, 2019, 37 (3): 422
- [3] DAGNINO-LEONE J, FIGUEROA C P, CASTANEDA M L, et al. Phycobiliproteins: structural aspects, functional characteristics, and biotechnological perspectives[J]. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2022, 20: 1506
- [4] MICHIE K A, HARROP S J, RATHBONE H W, et al. Molecular structures reveal the origin of spectral variation in cryptophyte light harvesting antenna proteins[J]. *Protein Science*, 2023, 32(3): e4586
- [5] MA J R, HU J N, SHA X M, et al. Phycobiliproteins, the pigment-protein complex form of natural food colorants and bioactive ingredients [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022, <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2128714>
- [6] SINGH K B, KAUSHALENDRA, RAJAN J P. Therapeutic and nutraceutical roles of cyanobacterial tetrapyrrole chromophore: recent advances and future implications [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 932459
- [7] TANG P S, SHI D J, HU C Z, et al. Regulation of energy metabolism (photosynthesis and nitrogen) in blue-green algae [C]// Proceedings of the Joint China-U. S. Phycology Symposium, 1981: 15
- [8] APT K E, COLLIER J L, GROSSMAN A R. Evolution of the phycobiliproteins [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1995, 248(1): 79
- [9] 颜世敢, 朱丽萍, 陈蕾蕾. 生物大分子藻胆蛋白的高效制备、活性构象及应用研究 [M]. 北京: 中国水利水电出版社, 2019
- [10] GLAZER A N. Light guides: directional energy transfer in a photosynthetic antenna [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264(1): 1
- [11] ALVEY R M, BISWAS A, SCHLUCHTER W M, et al. Attachment of noncognate chromophores to CpcA of *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Synechococcus* sp. PCC 7002 by heterologous expression in *Escherichia coli*[J]. *Biochemistry*, 2011, 50(22): 4890
- [12] CHEN H X, QI H T, XIONG P. Phycobiliproteins: a family of algae-derived biliproteins: productions, characterization and pharmaceutical potentials [J]. *Marine Drugs*, 2022, 20(7): 450
- [13] PEZ JAESCHKE D, TEIXEIRA I R, MARCZAK L D F, et al. Phycocyanin from *Spirulina*: a review of extraction methods and stability [J]. *Food Research International*, 2021, 143: 110314
- [14] BRYANT D A. Phycoerythrocyanin and phycoerythrin: properties and occurrence in cyanobacteria [J]. *Microbiology*, 1982, 128 (4): 835
- [15] PALENIK B. Chromatic adaptation in marine *Synechococcus* strains [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67 (2): 991
- [16] 缪丹. 红移藻胆蛋白和光敏色素的研究及分子进化 [D].

- 武汉:华中农业大学,2017
- [17] 李冠武,吴健谊,陈爱云,等.藻胆蛋白与血卟啉衍生物光敏剂的光毒性比较[J].汕头大学医学院学报,2005,18(4):193
- [18] DAVID L, PRADO M, ARTENI A A, et al. Structural studies show energy transfer within stabilized phycobilisomes independent of the mode of rod-core assembly[J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 2014, 1837(3): 385
- [19] 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
- [20] LIBERTON M, CHRISLER W B, NICORA C D, et al. Phycobilisome truncation causes widespread proteome changes in *Synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. *PLoS One*, 2017, 12 (3): e0173251
- [21] AMCHOVA P, KOTOLOVA H, RUDA-KUCEROVA J. Health safety issues of synthetic food colorants[J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2015, 73 (3): 914
- [22] PEREIRA T, BARROSO S, MENDES S, et al. Stability, kinetics, and application study of phycobiliprotein pigments extracted from red algae *Gracilaria gracilis* [J]. *Journal of Food Science*, 2020, 85(10): 3400
- [23] SEKAR S, CHANDRAMOHAN M. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2008, 20 (2): 113
- [24] KRASEASINTRAO 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
- [25] QIANG X, WANG L J, NIU J F, et al. Phycobiliprotein as fluorescent probe and photosensitizer: a systematic review [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 193: 1910
- [26] HAGHDOOST A, GOLESTAN L, HASANI M, et al. Assessment of the potential of algae phycobiliprotein nanoliposome for extending the shelf life of common carp Burgers during refrigerated storage[J]. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 2022, 25 (5): 276
- [27] MOROCHO-JÁCOME A L, RUSCINC N, MARTINEZ R M, et al. Technological aspects of microalgae pigments for cosmetics [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104 (22): 9513
- [28] CHAUBEY M G, PATEL S N, RASTOGI R P, et al. Cyanobacterial pigment protein allophycocyanin exhibits longevity and reduces A β -mediated paralysis in *C. elegans*: complicity of FOXO and NRF2 ortholog DAF-16 and SKN-1[J]. *3 Biotech*, 2020, 10 (8): 332
- [29] LIU R, QIN S, LI W J. Phycocyanin: anti-inflammatory effect and mechanism [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2022, 153: 113362
- [30] ZHANG Q Y, LI L B. Photodynamic combinational therapy in cancer treatment [J]. *J B U ON*, 2018, 23 (3): 561
- [31] BRAUNE S, KRÜGER-GENGE A, KAMMERER S, et al. Phycocyanin from *arthrospira platensis* as potential anti-cancer drug: review of in vitro and in vivo studies [J]. *Life (Basel)*, 2021, 11 (2): 91
- [32] HUANG R R, LIAO G Y, GAO M F, et al. Phycocyanin inhibits pancreatic cancer metastasis via suppressing epithelial-mesenchymal transition and targeting Akt/ β -catenin pathway [J]. *Neoplasma*, 2023, 70 (2): 294
- [33] CHAOWEN H, DONGXUAN H, DONGSHENG H, et al. C-phycocyanin suppresses cell proliferation and promotes apoptosis by regulating the AMPK pathway in NCL-H292 non-small cell lung cancer cells [J]. *Folia Biologica*, 2022, 68 (1): 16
- [34] FAN J N, CHENG Y Q, SUN M T. Functionalized gold nanoparticles: synthesis, properties and biomedical applications [J]. *The Chemical Record*, 2020, 20 (12): 1474
- [35] KALABEGISHVILI T, MURUSIDZE I, KIRKESALI E, et al. Gold and silver nanoparticles in *spirulina platensis* biomass for medical application [J]. *Ecological Chemistry and Engineering S*, 2013, 20(4): 621
- [36] UMA SUGANYA K S, GOVINDARAJU K, KUMAR V G, et al. Blue green alga mediated synthesis of gold nanoparticles and its antibacterial efficacy against Gram positive organisms [J]. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 2015, 47: 351
- [37] MADHYASTHA H, MADHYASTHA R, THAKUR A, et al. c-Phycocyanin primed silver nano conjugates: studies on red blood cell stress resilience mechanism [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2020, 194: 111211
- [38] JI L, QIU S, WANG Z H, et al. Phycobiliproteins from algae: current updates in sustainable production and applications in food and health [J]. *Food Research International*, 2023, 167: 112737
- [39] TAN H T, YUSOFF F M, KHAW Y S, et al. Uncovering research trends of phycobiliproteins using bibliometric approach [J]. *Plants*, 2021, 10 (11): 2358
- [40] SOTO-SIERRA L, STOYKOVA P, NIKOLOV Z L. Extraction and fractionation of microalgae-based protein products [J]. *Algal Research*, 2018, 36: 175
- [41] GÜNERKEN E, D'HONDT E, EPPINK M H M, et al.

- Cell disruption for microalgae biorefineries [J]. *Biotechnology Advances*, 2015, 33 (2): 243
- [42] WYMAN M, FAY P. Underwater light climate and the growth and pigmentation of planktonic blue-green algae (*Cyanobacteria*) I. The influence of light quantity [J]. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, 1986, 227 (1248): 367
- [43] DRZYZGA D, FORLANI G, NIEMCZYK E, et al. The aminophosphonate glycosine enhances phycobiliprotein yields from selected cyanobacterial cultures [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2018, 30 (1): 311
- [44] 程佳丽. 用渗透法提取蓝藻藻胆蛋白 [D]. 北京: 北京师范大学, 2021
- [45] GAMBETTA G A, LAGARIAS J C. Genetic engineering of phytochrome biosynthesis in bacteria [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98 (19): 10566
- [46] LI W J, SU H N, PU Y, et al. Phycobiliproteins: molecular structure, production, applications, and prospects [J]. *Biotechnology Advances*, 2019, 37 (2): 340
- [47] CHEN H X, JIANG P. Recombinant phycobiliprotein fluorescent protein with large stokes shift and preparation method: CN108841846 B[P]. 2021-08-06

Characteristics, applications, extraction , and research prospect of phycobiliprotein

JIA Xiaohui¹⁾ GAN Wanyi¹⁾ MA Wenxuan¹⁾ WANG Ziyue¹⁾ YIN Xunzhe²⁾
LIANG Qianjin¹⁾ XIANG Benqiong^{1, 3)} SHI Dingji⁴⁾

(1)National Demonstration Center for Experimental Life Sciences & Biotechnology Education, Beijing Normal University, 100875, Beijing, China;

2)School of Municipal and Environmental Engineering, Shandong Jianzhu University, 250101, Jinan, Shandong, China;

3)School of Future Education, Beijing Normal University, 519087, Zhuhai, Guangdong, China;

4)Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, 100093, Beijing, China)

Abstract Phycobiliproteins, with phycobilin chromophores covalently linked to apoprotein, are main components of light-harvesting antenna complexes in cyanobacteria, red algae and some cryptophyte algae. Similar to chlorophyll protein complexes, phycobiliproteins are responsible for absorption and transfer of light energy in the initial stage of photosynthesis. Pigment-protein complexes are compared, and characterized in this review. Noteworthy developments and our recent works are discussed. A protocol for extracting phycobiliproteins without damaging algal cells is proposed.

Keywords phycobiliprotein; phycobilisome; cyanobacteria; cryptophyte; extraction

【责任编辑: 刘先勤】