

## 分段盐析联合两步柱层析纯化巢湖蓝藻藻蓝蛋白

苏雨<sup>1</sup>, 张发宇<sup>1</sup>, 余金卫<sup>1</sup>, 汪家权<sup>1</sup>, 许子牧<sup>1,2\*</sup>

(1. 合肥工业大学资源与环境工程学院, 合肥 230009; 2. 合肥市东方美捷分子材料技术有限公司, 合肥 230009)

**摘要:** 以巢湖打捞的新鲜蓝藻藻泥为处理对象, 利用冻融破壁的方式获得藻蓝蛋白 (phycocyanin, PC) 粗提液。采取两步盐析初步纯化粗提液获得 PC, 再用纤维素 (Cellufine A-500) 阴离子交换树脂中度纯化 PC, 最后用羟基磷灰石 (HA) 柱高度纯化 PC。结果表明, 在室温 25℃ 下, 两步盐析 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 的最佳摩尔浓度分别为 1.0 mol·L<sup>-1</sup> 和 1.8 mol·L<sup>-1</sup>, PC 纯度 (A<sub>620</sub>/A<sub>280</sub>) 达到 2.168, PC 回收率可达 37.5%。再经 Cellufine A-500 和 HA 两步柱层析纯化, PC 纯度 (A<sub>620</sub>/A<sub>280</sub>) 分别达到 3.211 和 4.133, 回收率分别为 20.3% 和 7.2%, 纯度达到试剂级纯度要求。

**关键词:** 藻蓝蛋白; 两步盐析; 阴离子交换; 羟基磷灰石

中图分类号: X131.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2018)03-0487-05

### Purification of phycocyanin from Chaohu cyanobacteria by fractional salting out and two steps column chromatography

SU Yu<sup>1</sup>, ZHANG Fayu<sup>1</sup>, YU Jinwei<sup>1</sup>, WANG Jiaquan<sup>1</sup>, XU Zimu<sup>1,2</sup>

(1. School of Resources and Environmental Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009;

2. Hefei Dongfangmeijie Molecular Materials Technology Co.Ltd., Hefei 230009)

**Abstract:** The fresh algae mud from Chaohu was used to obtain the crude extract of phycocyanin (PC) using freezing and thawing. The crude extract was purified by two-step salting-out, and the PC was purified by cellulose (Cellufine A-500) anion exchange resin and finally purified by hydroxyapatite (HA) column. The results showed that At room temperature (25℃), the optimum molar concentrations of two-step salting-out (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> were 1.0 mol·L<sup>-1</sup> and 1.8 mol·L<sup>-1</sup>, respectively. The PC purity (A<sub>620</sub> / A<sub>280</sub>) reached to 2.168 and the PC recovery was 37.5%. The purity of PC (A<sub>620</sub> / A<sub>280</sub>) reached 3.211 and 4.133, respectively, and the recovery was 20.3% and 7.2%, respectively, which reaches the reagent grade purity.

**Key words:** phycocyanin; two-step salt precipitation; anion exchange; hydroxyapatite

自 20 世纪 80 年代以来, 工业化的发展导致巢湖水质和生态环境恶化, 逐渐发展为富营养化的湖泊。专家学者对巢湖富营养化的情况深入的进行了研究<sup>[1-6]</sup>, 结果显示, 目前巢湖的污染物主要是氮、磷和有机物。当今湖泊富营养化导致的蓝藻水华频发不仅是世界各国都将面临的重大考验, 也成为影响我国当前经济可持续发展的主要环境问题。如何应对夏季蓝藻爆发已成为现阶段解决巢湖水华污染的关键性问题。

目前, 巢湖治理蓝藻 (主要是微囊藻、念珠藻和鱼腥藻等几种混合藻) 爆发的重要应急措施依旧

是传统的机械和人工打捞, 而经过不恰当处理打捞上岸的蓝藻会造成二次污染。罗明典<sup>[7]</sup>的调查研究显示水华蓝藻中含有藻蓝蛋白以及丰富的细胞多糖和色素等营养成分。医学、生命保健学和食品工程学等学科的研究和开发热点集中于水华蓝藻生物活性成分的利用方面<sup>[8]</sup>。藻蓝蛋白的提取纯化, 更是研究中的热点。国内外专家对藻蓝蛋白的用途研究表明, 藻蓝蛋白具有提高机体抗辐射、抗氧化<sup>[9]</sup>、抗炎性<sup>[10]</sup>、抗癌性<sup>[11]</sup>、增强机体免疫力<sup>[12]</sup>、保肝护肝和免疫荧光性<sup>[13]</sup>等生理活性, 已被广泛应用于食品<sup>[14]</sup>、化妆品<sup>[15]</sup>、医药<sup>[16]</sup>及生物化学<sup>[17]</sup>等领域。

收稿日期: 2017-07-18

基金项目: 国家“十二五”重大科技专项项目 (2012ZX07103-004) 资助。

作者简介: 苏雨, 硕士研究生。E-mail: 1825428749@qq.com

\* 通信作者: 许子牧, 博士, 讲师。E-mail: xzm666@hfut.edu.cn

其中,当藻蓝蛋白的纯度达到 3.0 以上可以作为保健品,当纯度达到 4.0 以上可以用于分子探针等高科技领域。试剂级别的藻蓝蛋白的纯度大于等于 4.0<sup>[18]</sup>,但是目前,试剂级别的藻蓝蛋白的价格相当昂贵且产量不高。

根据相关文献可知,巢湖水华蓝藻中藻蓝蛋白的含量达 5%以上<sup>[19]</sup>,这为巢湖提取纯化藻蓝蛋白提供了可行性。当前,巢湖蓝藻的提取纯化的技术不够高效,一般采用盐析<sup>[20]</sup>、双水相<sup>[21]</sup>和柱层析等技术;盐析方法简单,但是纯化效果不明显,适用于藻蓝蛋白的预处理;双水相技术试验操作效果不好;柱层析方法要多步层析,纯化效果好,但是步骤繁琐。为了获得理想的技术路线。本研究采用蛋白质 3 步纯化策略,对藻蓝蛋白提取纯化工艺进行了试验设计,利用两步盐析法作为藻蓝蛋白提取的捕获阶段,利用 Cellufine A-500 阴离子交换树脂作为藻蓝蛋白提取的中度纯化阶段,利用羟基磷灰石柱层析作为藻蓝蛋白提取的精细纯化阶段,利用 Cellufine A-500 和羟基磷灰石去解决藻蓝蛋白精细纯化所需时间较长的问题,为高效制备高纯度藻蓝蛋白提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试材与试剂

**1.1.1 材料** 新鲜蓝藻藻泥采自于合肥市滨湖区环湖北路无锡德林海藻水分离有限公司的马家渡大桥的藻水分离站。含水率在 96%~97%。蓝藻是在藻水分离站当天分离的新鲜蓝藻收集放在冷库冷冻保存。

**1.1.2 常用试剂**  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、NaCl、盐酸、NaOH、乙醇、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (以上试剂均为分析纯); Cellufine A-500 (GE 公司)、CHT-B 型羟基磷灰石 (Biocal 公司)。

### 1.2 仪器与设备

紫外-可见分光光度仪,UV/VIS-1950 型(北京普析通用公司);恒温搅拌器,85-2A 型(江苏金城国胜仪器厂);低温高速离心机,KDC-160HR 型(安徽中科中佳仪器公司);冷柜,BC/BD-718DTF 型(天长市天一电器有限公司);30kDa 超滤管(美国 Millipore 公司);QuickSep 中高压层析系统(北京慧德易科技有限责任公司);Vantage-L 层析柱(美国 Millipore 公司)。

### 1.3 试验方法

**1.3.1 藻蓝蛋白粗提液制备** 称取一定量的巢湖蓝藻藻泥,按照料液比 1:5 的比例加入 PBS 缓冲液

( $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 值 7.0),搅拌均匀,放于  $-20^\circ\text{C}$  的冰箱冷冻,完全冻结后取出, $25^\circ\text{C}$  解冻,反复冻融 3 次,上清液过 4 层普通纱布,离心( $8000 \text{ g}$ , 20 min)得到藻蓝蛋白粗提液。

**1.3.2 两步  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  盐析** 分别将粗提液中  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的摩尔浓度调节至 0.8、1.0、1.2、1.4 和  $1.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $4^\circ\text{C}$  静置 30 min 后离心,根据上清液纯度和回收率及沉淀中杂质含量的变化,确定一步盐析时  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的最佳摩尔浓度。向该浓度离心分离得到的上清液中分别追加  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的摩尔浓度至 1.4、1.6、1.8、2.0、2.2 和  $2.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $4^\circ\text{C}$  静置 30 min 后离心。盐析沉淀用  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸盐缓冲液溶解,而后测定藻蓝蛋白纯度和回收率。确定二步盐析  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的最佳摩尔浓度。

**1.3.3 Cellufine A-500 柱层析** Cellufine A-500 充分溶胀脱气后装柱,柱型为  $1.6 \text{ cm} \times 50 \text{ cm}$ 。经上述分离得到的样品溶液透析浓缩后,离心去沉淀。样品经磷酸盐缓冲液 ( $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 值 6.5),预平衡的 Cellufine A-500 层析柱(柱床高度 25 cm)过柱,先以  $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH=6.5 的磷酸盐缓冲液进行无梯度洗脱,再采用  $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH=6.5 的磷酸盐缓冲液溶液分别加入 0.1、0.3 和  $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 进行分级梯度洗脱,洗脱流速为  $6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,利用部分收集器收集洗脱液,采用  $A_{620}$ 、 $A_{280}$  双波长检测藻蓝蛋白的纯度。根据纯度  $A_{620}/A_{280}$  的比值,收洗脱液,作为羟基磷灰石柱层析样品。

**1.3.4 HA 柱层析** 将 HA 置于  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 NaOH 溶液中浸泡 1 h 后装柱,柱型为  $1.6 \text{ cm} \times 50 \text{ cm}$ 。将上述收集得到的 PC 液,透析并用 30 kDa 超滤管适当浓缩,经磷酸盐缓冲液 ( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 值 7.0) 预平衡的 HA 层析柱(柱床高度 25 cm)过柱,使 1/3 柱床着色,先以  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH=7.0 的磷酸盐缓冲液进行无梯度洗脱,再采用 40、100 和  $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH=7.0 的磷酸盐缓冲液溶液,加入  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 进行分级梯度洗脱,洗脱流速为  $6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,利用部分收集器收集洗脱液,收集深蓝色的 PC 组分。

**1.3.5 光谱特征测定** 用紫外-可见分光光度计对纯度  $\geq 4$  的藻蓝蛋白样品进行 200~700 nm 全波长扫描。

**1.3.6 藻蓝蛋白回收率和纯度测定方法** 藻蓝蛋白在 620 nm 处有特征吸收峰,蛋白在 280 nm 处有最大吸收峰,藻蓝蛋白的纯度测量参考 Herrera 等<sup>[20]</sup>推荐的公式。藻蓝蛋白纯度:  $P=A_{620}/A_{280}$ ; 藻蓝蛋白质量浓度、得率参考 Soni 等<sup>[23]</sup>的推荐公式。藻蓝

蛋白质量浓度 ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ):  $[PC]=(A_{620}-0.7\times A_{650})/7.38$ ;  
藻蓝蛋白得率:  $PC\%=( [PC]\times V\times k1)/(m\times k2\times 1000)\times 100$ ; 式中:  $A_{280}$ 、 $A_{620}$  和  $A_{650}$  分别为波长 280、620 和 650 nm 处的吸光度;  $V$  代表藻蓝蛋白体积;  $m$  代表藻泥质量;  $k1$  代表藻蓝蛋白稀释倍数;  $k2$  代表藻泥中蓝藻干物质的质量分数。

## 2 结果与分析

### 2.1 两步盐析提取藻蓝蛋白条件的优化

本试验选取盐析是利用两步盐析将藻蓝蛋白粗提液(含杂有核酸、多糖、脂质之类)中所需要的藻蓝蛋白组份与其他组分和杂蛋白分离开来; 盐析沉淀法也称溶解度法, 根据各种物质结构的差异来改变溶液的某些性质(极性, 离子强度), 就能致使粗提液中的有效成分溶解度的变化, 从而分离出藻蓝蛋白。之所以选用硫酸铵来盐析的原因: 其溶解度大, 对温度不敏感; 分级效果好; 有稳定蛋白质结构的作用; 价格低廉, 废液可以肥田。

**2.1.1 一步盐析单因素试验** 在室温  $25^{\circ}\text{C}$  下, 依据 1.3.2 步骤进行试验, 试验多次重复。选取平均值。将粗提液中  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的摩尔浓度分别调节至 0.8、1.0、1.2、1.4 和  $1.6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 静置后经离心分离, 测定上清液中藻蓝蛋白纯度和回收率(图 1)。

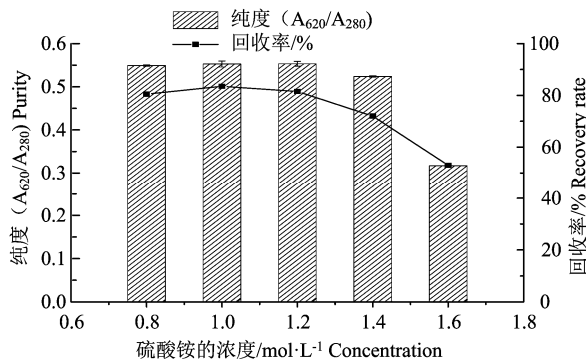


图 1 一步盐析不同摩尔浓度硫酸铵对藻蓝蛋白纯度和回收率的影响 ( $25^{\circ}\text{C}$ )

Figure 1 Effects of different molar concentrations of ammonium sulfate on the purity and recovery of phycocyanin in one step ( $25^{\circ}\text{C}$ )

盐析主要是根据各种物质结构的差异来改变溶液的某些性质(极性, 离子强度), 致使粗提液中的有效成分发生溶解度的变化, 从而有效提取藻蓝蛋白。图 1 表明了一步盐析时, 藻蓝蛋白纯度和回收率在  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的摩尔浓度分别为 0.8、1.0、1.2、1.4 和  $1.6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时的变化情况。当  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  摩尔浓度在  $1.6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 上清液中藻蓝蛋白纯度和回收率均大幅度降低。当  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  摩尔浓度在  $0.8\sim$

$1.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时纯度基本保持不变, 回收率呈缓慢下降趋势, 当  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  摩尔浓度为  $1.4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 纯度和回收率均有所下降。在硫酸铵的摩尔浓度在  $1.0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 藻蓝蛋白纯度和回收率达到最大, 故选用最优硫酸铵的摩尔浓度为  $1.0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

**2.1.2 两步盐析单因素试验** 在室温  $25^{\circ}\text{C}$  下, 依据 1.3.2 步骤进行试验, 选择  $1.0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  作为第一步盐析, 离心分离后向上清液精细追加  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的摩尔浓度分别至 1.4、1.6、1.8、2.0、2.2 和  $2.4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 得到的藻蓝蛋白沉淀经溶解后测藻蓝蛋白纯度和回收率(图 2)。

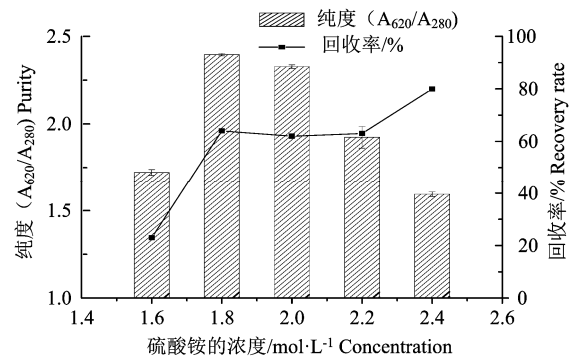


图 2 两步盐析不同摩尔浓度  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  对藻蓝蛋白纯度和回收率的影响 ( $25^{\circ}\text{C}$ )

Figure 2 Effects of different molar concentrations of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  on the purity and recovery of phycocyanin ( $25^{\circ}\text{C}$ )

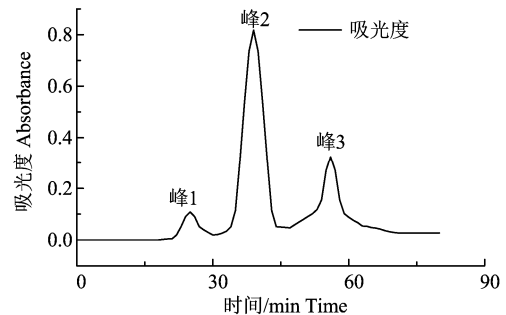


图 3 藻蓝蛋白经 Cellufine A-500 柱层析洗脱谱图

Figure 3 Phycocyanin elution spectrum by Cellufine A-500 column chromatography

图 2 表明了二步盐析时, 当  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  摩尔浓度为  $1.6\sim 2.4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 沉淀中藻蓝蛋白的纯度和回收率均呈先上升后减少趋势, 在  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  摩尔浓度为  $1.8\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 沉淀中藻蓝蛋白的纯度达到最大值 2.395 5, 回收率为 64%。故此, 二步盐析选择  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  摩尔浓度为  $1.8\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

### 2.2 Cellufine A-500 阴离子交换层析

将二步盐析得到的藻蓝蛋白的液体经过一夜的洗脱, 再对其过 Cellufine A-500 的层析柱, 得到如下洗脱图。

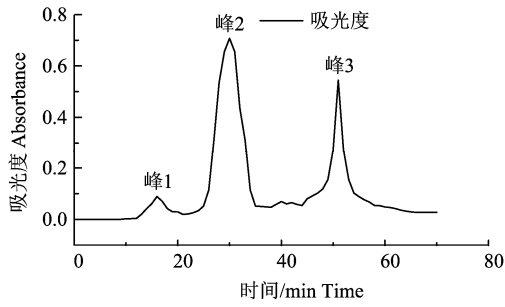


图 4 藻蓝蛋白经 HA 柱层析峰图

Figure 4 Phycocyanin by HA column chromatogram

目前研究报道的藻蓝蛋白等电点尚无一致结论,但都在 3.4~4.8 之间,其中钝顶螺旋藻藻蓝蛋白的等电点为 4.3<sup>[23-24]</sup>。选择 Cellufine A-500 阴离子交换柱,利用蛋白质等电点在不同 pH 缓冲液中蛋白质所带正负电荷的差异,通过改变淋洗液离子强度或 pH 实现不同蛋白质组份的分级分离。主要考

虑纤维素 A-500 可以先去除大量的杂质蛋白,为下一步羟基磷灰石柱层析作铺垫,得到更高纯度的试剂级别的藻蓝蛋白。经 Cellufine A-500 阴离子交换柱纯化结果结果见图 4。两步盐析透析液浓缩后过经 10 mmol·L<sup>-1</sup>, pH=6.5 的磷酸盐缓冲液预平衡的 Cellufine A-500 层析柱,主要分为 4 个颜色条带从上至下依次为黄褐色、深蓝色、蓝绿色和粉红色。试验经过多次重复,依据 1.3.3 步骤进行洗脱,随着洗脱液离子强度的增强,洗脱出 3 条主峰带。峰 1 主要为藻红蛋白,目标组份藻蓝蛋白在峰 2,峰 3 为黄褐色杂质蛋白组份。多次收集峰 2 组分,检测平均纯度 A<sub>620</sub>/A<sub>280</sub>=3.211。

### 2.3 HA 柱层析

将第一步柱层析的提取得到的藻蓝蛋白纯度为 3.28 的液体再经过羟基磷灰石柱,得到的洗脱图谱如图 5。

表 1 藻蓝蛋白的提取纯化过程的纯度与回收率

Table 1 Purity and recovery of phycocyanin extraction and purification process

步骤 Step	体积/mL Volume	浓度/mg·L <sup>-1</sup> Concentration	光谱学纯度(A <sub>620</sub> /A <sub>280</sub> ) Spectroscopic purity	回收率/% Recovery rate
固液分离(粗提液) Solid-liquid separation(crude extract)	600	0.520 0	0.590	100
一步盐析 One-step salting-out	620	0.406 0	0.586	80.7
二步盐析 Two-step salting-out	50	2.028 0	2.168	32.5
Cellufine A-500	45	1.412 0	3.211	20.3
HA	30	0.740 0	4.133	7.2

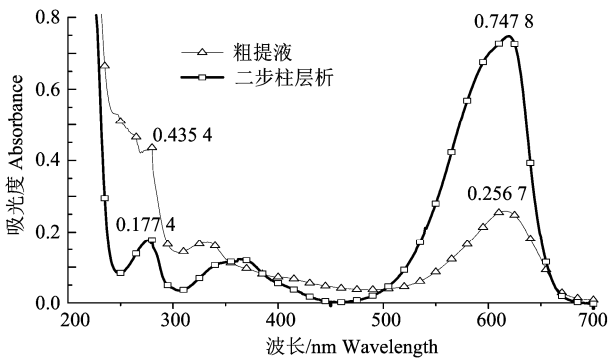


图 5 藻蓝蛋白粗提液和提取纯化后的液体光谱扫描图谱

Figure 5 Phycocyanin crude extract and extract the purified liquid spectrum scan

试验之所以选择羟基磷灰石作为二步填料,是因为磷酸根离子与带正电荷的蛋白质以离子键方式结合,具有阳离子交换特性,可由 NaCl 浓度梯度或磷酸盐浓度梯度洗脱,其中 Ca<sup>2+</sup>离子与带负电蛋白质以金属螯合方式结合,该结合方式对 NaCl 浓度梯度洗脱不敏感,可由磷酸盐浓度梯度洗脱,也可采用 NaCl 梯度洗脱后以低浓度磷酸盐缓冲液平

衡,再以磷酸盐浓度梯度洗脱的双梯度洗脱模型,以达到更高的分辨率。图 4 就是在羟基磷灰石柱层析的洗脱图。收集经纤维素 A-500 纯化得到的纯度为 3.28 的蛋白组份,透析浓缩后过经 10 mmol·L<sup>-1</sup>, pH7.0 磷酸盐缓冲液预平衡的 HA 层析柱。深蓝色组份被吸附在顶端。依据 1.3.4 步骤进行洗脱,随着洗脱液离子强度的增强,洗脱出 3 条峰带。试验多次重复,得出峰 1 为穿过组分,深蓝色组份在峰 2,峰 3 为别藻蓝蛋白组份。收集峰 2 组分检测纯度 A<sub>620</sub>/A<sub>280</sub>=4.133。

### 2.4 藻蓝蛋白的回收率与藻蓝蛋白纯度变化分析

**2.4.1 纯度与回收率计算** 对藻蓝蛋白的提取纯化过程的纯度与回收率进行计算,试验多次重复,选取的平均值,结果(表 1)显示,对巢湖藻蓝蛋白的纯度与回收率的全过程纯度与回收率计算,从初始的藻蓝蛋白纯度为 0.590 到 4.133。纯度达到试剂级的纯度。藻蓝蛋白的回收率达到 7.2%。

**2.4.2 藻蓝蛋白提取纯化后的光谱变化** 藻蓝蛋白初始过程与最终达到试剂级别藻蓝蛋白纯度的光谱

图(图 5)。分别将粗提液和纤维素 A-500 纯化后的液体进行光谱扫描, 结果(图 5)显示, 藻蓝蛋白的特征吸收峰在 620 nm, 280 nm 为杂质和藻蓝蛋白混合的吸收峰。可以明显的从图中看出, 粗提液 620 nm 的吸收峰为 0.265 0, 明显低于离子交换柱层析此处的峰值 0.733 1。粗提液 280 nm 处峰值 0.384 5, 明显高于离子交换层析此处的值 0.177 4。说明此时的大部分杂质被去除, 保存下来更多的藻蓝蛋白。粗提液的纯度由( $A_{620}/A_{280}$ )0.690 提高到 4.133, 纯度得到明显的提升。

### 3 结论

目前提取和纯化藻蓝蛋白的方法有很多, 大部分主要对钝顶螺旋藻进行提取, 利用巢湖蓝藻的资源的不多。由于巢湖藻蓝蛋白的含量明显低于钝顶螺旋藻, 急需一种高效的制备巢湖藻蓝蛋白的方法。

本研究主要参考了目前的对于钝顶螺旋藻的提取纯化藻蓝蛋白的方法。由于巢湖蓝藻的特殊性, 故先对巢湖蓝藻进行盐析提取处理, 再结合目前的热点柱层析方法进行纯化。在使用纤维素 A-500 和羟基磷灰石二种层析后, 制备得到试剂级别的藻蓝蛋白且得率较高, 为下一步单独使用柱层析技术改进提供了思路。

### 参考文献:

- [1] 屠清琪, 顾丁锡, 徐卓然, 等. 巢湖富营养化的研究[M]. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 1991.
- [2] 张之源, 王培华. 巢湖营养化状况评价及水质恢复探讨[J]. 环境科学研究, 1999, 12(5): 45-48.
- [3] 殷福才, 张之源. 巢湖富营养化研究进展[J]. 湖泊科学, 2003, 15(4): 377-384.
- [4] 姚书春, 李世杰. 巢湖富营养化过程的沉积记录[J]. 沉积学报, 2004, 22(2): 343-347.
- [5] 王成贵, 曹勇, 汪海波. 巢湖西半湖水体富营养化污染状况及防治对策[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(8): 1475-1476.
- [6] SHANG G P, SHANG J C. Causes and control countermeasures of eutrophication in Chaohu Lake, China[J]. Chinese Geogr Sci, 2005, 15(4): 348-354.
- [7] 罗明典. 微生物生产海藻糖及其应用前景[J]. 微生物学通报, 1996, 23(4): 252-254.
- [8] KIRPENKO Y A, KIRPENKO N I. Biological activity of the algal toxin of blue-green algae responsible for algal bloom[J]. Hydrobiol J, 1980, 16(6): 41-45.
- [9] BHAT V B, MADYASTHA K M. Scavenging of peroxynitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: protection against oxidative damage to DNA[J]. Biochem Bioph Res Co, 2001, 285(2): 262-266.
- [10] BHAT V B, MADYASTHA K M. C-phycocyanin: a potent peroxy radical scavenger in vivo and in vitro[J]. Biochem Bioph Res Co, 2000, 275(1): 20-25.
- [11] OU Y, ZHENG S, LIN L, et al. Protective effect of C-phycocyanin against carbon tetrachloride-induced hepatocyte damage in vitro and in vivo[J]. Chem-Biol Interact, 2010, 185(2): 94-100.
- [12] COOKE M S, EVANS M D, DIZDAROGLU M, et al. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease[J]. FASEB J, 2003, 17(10): 1195-1214.
- [13] MINKOVA K M, TCHERNOV A A, TCHORBADJIEVA M I, et al. Purification of C-phycocyanin from *Spirulina (Arthrospira) fusiformis*[J]. J Biotechnol, 2003, 102(1): 55-59.
- [14] RICHMOND A. CRC handbook of microalgal mass culture[M]. Boca Raton: CRC Press, 1986.
- [15] YOSHIDA A, TAKAGAKI Y, NISHIMUNE T. Enzyme immunoassay for phycocyanin as the main component of *Spirulina color* in foods[J]. Biosci Biotech Bioc, 1996, 60(1): 57-60.
- [16] ERIKSEN N T. Production of phycocyanin: a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine[J]. Appl Microbiol Biot, 2008, 80(1): 1-14.
- [17] 李辉东. 太湖蓝藻藻蓝蛋白提取纯化工艺研究[D]. 南京: 南京理工大学, 2012.
- [18] 张发宇, 赵冰冰, 陈裕, 等. 两步盐析联合双水相萃取提取纯化蓝藻中藻蓝蛋白[J]. 食品科学, 2015, 36(22): 6-10.
- [19] 张发宇, 赵冰冰, 蔡静, 等. 盐析法纯化新鲜蓝藻中藻蓝蛋白工艺条件的研究[J]. 环境工程技术学报, 2015, 5(6): 499-503.
- [20] HERRERA A, BOUSSIBA S, NAPOLEONE V, et al. Recovery of c-phycocyanin from the cyanobacterium *Spirulina maxima*[J]. J Appl Phycol, 1989, 1(4): 325-331.
- [21] MINKOVA K M, TCHERNOV A A, TCHORBADJIEVA M I, et al. Purification of C-phycocyanin from *Spirulina (Arthrospira) fusiformis*[J]. J Biotechnol, 2003, 102(1): 55-59.
- [22] HERRERA A, BOUSSIBA S, NAPOLEONE V, et al. Recovery of c-phycocyanin from the cyanobacterium *Spirulina maxima*[J]. J Appl Phycol, 1989, 1(4): 325-331.
- [23] 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 Biochem, 2006, 41(9): 2017-2023.
- [24] KAO O H, EDWARDS M R, BERNIS D S. Physical-chemical properties of C-phycocyanin isolated from an acido-thermophilic eukaryote, *Cyanidium caldarium*[J]. Biochem J, 1975, 147(1): 63-70.