青岛微藻产业学会团体标准

螺旋藻藻蓝蛋白制备技术规范

（征求意见稿）

标准编制说明

标准起草工作小组

2023 年 9 月

目　录

一、标准工作概况 1

1.1 标准制定的背景与目的 1

1.2 任务来源 2

1.3 工作过程 2

二、标准制定的依据与指导思想 3

2.1 标准制定的法律依据 4

2.2 标准起草的依据 4

2.3 标准制定的原则 4

三、主要技术内容 4

四、标准中涉及专利的情况 7

五、预期达到的社会效益、对产业发展的作用 7

六、采用国际标准和国外先进标准情况 8

七、在标准体系中的位置，与现行相关法律、法规、规章及相关标准，特别是强制性标准的协调性 8

八、重大分歧意见的处理经过和依据 9

九、标准性质的建议说明 9

十、标准应用的建议 9

十一、废止现行相关标准的建议 9

十二、其他应予以说明的事项 9

团体标准

《螺旋藻藻蓝蛋白制备技术规范》

编制说明

一、标准工作概况

1.1 标准制定的背景与目的

螺旋藻（*Spirulina*），亦称“节旋藻”，是一种光合放氧、呈螺旋形的原核丝状微藻。螺旋藻藻蓝蛋白是一种天然蓝色色素，已作为安全的可食用色素广泛添加在软饮料、口香糖、唇膏和眼线等产品中。高纯度的藻蓝蛋白因具有高效的荧光特性，也已被作为荧光探针应用在免疫分析研究中。此外，藻蓝蛋白具有抗氧化、增强机体免疫力、保肝护肝、抗癌和抗炎等诸多生理活性，具有巨大的潜在药用开发价值。现在国外约有 11 家公司生产和出售藻蓝蛋白及其衍生物或者藻蓝蛋白相关产品。在美国，藻蓝蛋白获得了 FDA 的安全性认可，成为唯一被批准使用的天然蓝色色素。在欧盟，藻蓝蛋白也已经被列为彩色食品原料。且美国和欧盟对于藻蓝蛋白在食品中的使用量不设限制。在日本，日本油墨公司（Dainippon Ink & Chemicals Co.Ltd.）多年前就提取藻蓝蛋白作为食用色素，也用于化妆品生产，商品名为“Lina-blue-A”；中国台湾产业界也已成功地从藻类中提取藻蓝蛋白替代人工合成色素，用于翠绿鲜红凉面、口香糖和藻酱油等食品的着色。

在我国，虽然藻蓝蛋白早就被列在 GB 2760 食品添加剂目录中，也被作为天然着色剂允许使用。但是藻蓝蛋白一直因为缺乏相应的标准和技术规范，导致各生产厂家生产工艺混乱，产品质量参差不齐，产品安全难以保证，严重干扰了市场销售，并限制了其在食品或医药领域中的广泛应用。2020 年食品添加剂“藻蓝国家标准（GB1886.309-2020）”正式发布，虽然对螺旋藻藻蓝蛋白的质量标准进行了规范，但是螺旋藻藻蓝蛋白的制备技术规范仍处于空白状态。因此及时建立藻蓝蛋白相关标准及技术规范，将有助于引领和规范全国藻蓝蛋白产业的有序发展，助推我国微藻产业的转型升级。

经中国科学院烟台海岸带研究所牵头，联合国内主要螺旋藻藻蓝蛋白生产及科研单位共同起草本标准，并申请作为青岛微藻产业学会团体标准进行公开和发布。

1.2 任务来源

本文件由中国科学院烟台海岸带研究所提出并牵头，青岛微藻产业学会归口管理，由中国科学院烟台海岸带研究所、中国石油大学（华东）、青岛市华大基因研究院、福清市新大泽螺旋藻有限公司、浙江宾美生物科技有限公司、滨州医学院、烟台嘉惠海洋生物科技有限公司、南通中科宾美生物技术有限公司、内蒙古藻蓝生物科技有限责任公司、山东中医药大学等负责起草。

本文件于 2022 年 7 月 22 日向学会提出申请立项，标准立项号为青岛微藻产业学会团体标准项目号：2022-006，团标名称暂定为《螺旋藻藻蓝蛋白制备技术规范》。本文件于 2022 年 9 月 9 日网上立项公示，正式批准立项。

1.3 工作过程

本文件的工作过程是以国内外现有的相关标准为基础，根据标准涉及范围及内容，确定评价指标及评判要求。

（1）组建起草工作组

在接到本标准的修订任务后，中科院烟台海岸带研究所和中国石油大学（华东）共同牵头组织，联合青岛市华大基因研究院、福清市新大泽螺旋藻有限公司、浙江宾美生物科技有限公司、滨州医学院、烟台嘉惠海洋生物科技有限公司、南通中科宾美生物技术有限公司、内蒙古藻蓝生物科技有限责任公司、山东中医药大学等单位成立了标准制定小组。此标准制定小组由长期从事藻蓝蛋白制备、检验方法研究、标准制定及生产企业质控管理的有关技术人员组成。标准起草小组具有以下优势：1）高等学校和科研院所本身具有非盈利性，具备专业权威性和客观中立的地位；合作企业福清市新大泽螺旋藻有限公司和浙江宾美生物科技有限公司分别是我国最大的螺旋藻及藻蓝蛋白生产加工企业之一，具有丰富的藻蓝蛋白生产和质控经验，这为本标准的制定提供了极大的便利条件；2）中国石油

大学（华东）、中国科学院烟台海岸带研究所、青岛华大基因研究院等均拥有国家级科研平台和雄厚的人力资源，在标准制定和研究方面具有充足的人才储备，在对接产业和科研方面具有天然的优势；3）相关单位前期参与制定了多项微藻产业相关国家或行业标准，在微藻产业标准制定方面积累了较丰富的工作经验和良好的工作基础。

（2）前期调研及资料整理

本标准主要参照了 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》、《食用螺旋藻粉质量通则》和《食品安全国家标准 食品添加剂 藻蓝》等标准，在相关资料收集整理的基础上，明确工作计划和重点关注问题，奠定标准框架基础。

（3）评价指标确定与标准草案编写

标准制定小组先后搜集查阅了国内外有关藻蓝蛋白制备的文献资料及企业标准，比较分析了各文献中对藻蓝蛋白制备质量的要求，同时重点分析了国内授权的 26 种藻蓝蛋白生产制备工艺专利，结合生产企业的相关生产工艺，通过向多个企业多次征求意见，按照 GB/T 1.1-2009 标准化工作导则编写完成标准初稿。2023 年 4 月 23 日，标准制定小组在烟台召开标准制定小组讨论会，就标准制定过程中存在的几个关键问题展开讨论，并在此基础上，进一步修改完善，形成标准征求意见稿和编制说明。2023 年 4 月-8 月标准起草小组将标准征求意见稿和编制说明发送给藻蓝蛋白或螺旋藻生产专家和企业技术人员广泛征求意见。2023 年 9 月 3 日完成标准征集意见及相关修改工作，并组织起草组针对专家提出的一些关键问题，进行了起草小组内部讨论，形成标准送审稿。2023 年 9 月 18 日，起草组邀请相关领域的专家对本标准进行了审查和讨论，对本标准中的关键指标及内容进行了充分讨论和确认，与会专家一致同意通过该标准，建议尽快发布实施。

二、标准制定的依据与指导思想

2.1 标准制定的法律依据

标准依据以下相关政策法规编制：《中华人民共和国标准化法》。

2.2 标准起草的依据

本文件按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》以及 GB/T 20004.1-2016《团体标准化第 1 部分：良好行为指南》的要求进行编制；技术内容参考国内外先进技术和相关标准，并结合国内微藻和藻蓝蛋白相关企业产品的实际情况。

2.3 标准制定的原则

本标准的主要编制原则如下：

1）面向实际生产需要，对藻蓝蛋白各生产环节进行规范，在保证产品质量的前提下，保留生产工艺的多样性，为各企业因地制宜，根据企业实际需要选择生产工艺，提供了便利。

2）以保证产品质量和安全为核心，既对生产原料和工艺过程进行规范，同时对藻蓝蛋白终端产品的质量进行严格限定，有效保证了产品质量和安全性。

三、主要技术内容

本标准根据螺旋藻藻蓝蛋白的生产流程，依次规定如下：

1）原料选择：本标准规定藻蓝蛋白生产所使用的螺旋藻原料必须符合 GB/T 16919 的有关规定。藻蓝蛋白含量较低以及受到重金属或微生物污染的螺旋藻，会导致藻蓝蛋白提取率和纯度较低或受到某种程度的污染，因此，不建议用做提取藻蓝蛋白的生产原料。

根据以下公式计算藻蓝蛋白浓度：

$$PC=0.162\times A_{620}-0.098\times A_{652}$$

PC，藻蓝蛋白浓度（mg/mL）；A_{620}，样品在 620 nm 处的吸光度；A_{652}，样品在 652 nm 处的吸光度。

根据以下公示计算藻蓝蛋白的得率

$$Y=\frac{PC\times V\times n}{DB\times 1000}\times 100$$

Y，藻蓝蛋白得率；PC，藻蓝蛋白浓度（mg/mL）；V，磷酸盐缓冲液梯级（mL）；n，稀释倍数；DB，螺旋藻粉重量（g）。

2）破壁：螺旋藻细胞破壁是藻蓝蛋白生产的关键步骤。选择合适的破壁条件，不仅节约能耗，还能够充分析出细胞的内溶物。常用的破壁方法有反复冻融破壁、机械破壁、压力破壁和酶解破壁等。其中，反复冻融破壁和机械破壁的效率高，在工业上应用较多，不仅能将螺旋藻壁破碎，使藻蓝蛋白释放出来，而且能够减少过程中对藻蓝蛋白结构的破坏，保证蛋白质活性。考虑到不同破壁方法具有各自的优缺点，本标准推荐了四种破壁方法，以方便不同企业因地制宜，根据企业自身情况，选择某一种，或多种方法联用，从而确定合适的破壁方法。

例如，分别称取 300 g、475 g、650 g、825 g、1000 g 螺旋藻粉溶于 10 L 水中，搅拌均匀，放于 -20 ℃ 冷库中，冷冻 32 h，解冻 12 h，反复冻融三次，离心取上清液，测定在 652 nm 和 620 nm 处的吸光度，计算藻蓝蛋白得率。结果表明，随着螺旋藻粉质量浓度的逐渐增大，藻蓝蛋白得率先升高后下降（图 1）。当螺旋藻粉质量浓度为 475 g/(10L)，即料液比为 1:21.05 时，藻蓝蛋白得率最大，为 7.13%。综合考虑制备效率，可以选定料液比为 1:10~1:20 进行生产。

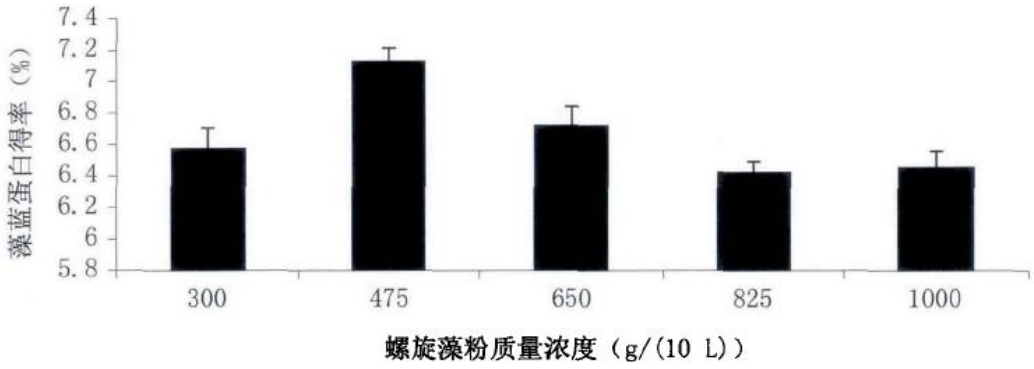

图 1　不同质量浓度对藻蓝蛋白得率的影响

称取 10 kg 螺旋藻粉置于不锈钢桶内，加入 50 L 水，搅拌后经胶体磨循环研磨。调节胶体磨的转动调节手柄，将定磨盘与动磨盘的间距分别设置为 0.825 mm、0.495 mm、0.165 mm，循环研磨 20 min，在生物显微镜下观察螺旋藻形态。设置定磨盘与动磨盘之间的间距，对样品进行处理，在生物显微镜下观测螺旋藻体的形态，结果表明随着定、动磨盘间距的减小，螺旋藻丝体变得短而密，有利于增大藻丝体与水的接触面积，结合反复冻融，能够有效促进细胞壁破裂，析出细胞内溶物。

3）固液分离：设置合适的固液分离条件，能够有效去除叶绿素等杂质。螺旋藻细胞破壁后，通常使用离心机或过滤等方式进行固液分离获得粗提液。由于叶绿素在 677 nm 有特征吸收峰，通常在固液分离时，以 677 nm 处的吸光度变化为判断依据，通常选择的离心力要大于 4000 g，从而确保离心机能够有效去除含有叶绿素的杂质。同时，兼顾考虑设备选用成本以及规模制备的效率，最终推荐固液分离的条件为 4000 g~6000 g，离心后上清液无肉眼可见的杂质，去除固体残渣。此外，企业可根据自身情况选择使用，本标准不做固定限制。

4）藻蓝蛋白的分离纯化：实验室中，藻蓝蛋白分离纯化往往涉及到多种色谱层析方法的综合利用，包括疏水层析、离子交换层析、凝胶过滤层析。这些方法的一大弊端在于步骤繁琐、目的产物损失较大、成本较高、耗时长，很难规模化操作。近几年膜分离技术的不断发展给藻蓝蛋白规模化制备工艺的提升提供了新机遇。所以在标准制定过程中，最终采用了先粗滤然后超滤浓缩的两步法。上清液分别经孔径为 25 μm 滤布和 0.45 μm 滤膜过滤，即可除去大部分的杂质，得到藻蓝蛋白粗提液。藻蓝蛋白由α和β两个亚基构成，在溶液中通常以三聚体$(\alpha\beta)_3$或六聚体$(\alpha\beta)_6$的形式存在，分子量分别约为 108 kDa 和 216 kDa。因此建议选择截留分子量介于 5 kDa~10 kDa 的超滤膜，可以有效去除外源无机盐等小分子杂质。

5）喷雾干燥：藻蓝蛋白容易变性，失去颜色和生物活性。由于藻蓝蛋白所含有的发色团在 620 nm 处有特征吸收峰（图 2），当藻蓝蛋白变性时，发色团

受到破坏，导致 620 nm 吸收峰会大幅度下降，而 280 nm 处附近芳香族氨基酸所产生的吸收光值通常不变，因此通常用 A_{620}/A_{280}（A_{620}，样品在 620 nm 处的吸光度； A_{280}，样品在 280 nm 处的吸光度）对藻蓝蛋白的活性进行判断。A_{620}/A_{280} 的值越大，则表明藻蓝蛋白的活性保持的越好。具有瞬时干燥特性的喷雾干燥将会保持藻蓝蛋白的活性。对浓缩液喷雾干燥，当进风温度为 190±10 ℃，出风温度为 80±5 ℃时，制得的藻蓝蛋白粉剂活性保持较好，A_{620}/A_{280} 可以达到 3 以上。有条件的企业也可以采用冷冻干燥方式进行，冷冻干燥的藻蓝蛋白 A_{620}/A_{280} 可以达到 4 以上。不论使用何种干燥方法，制得的藻蓝蛋白应为宝石蓝色的水溶性干粉剂，并且达到藻蓝蛋白国家标准（GB 1886.309）的要求。

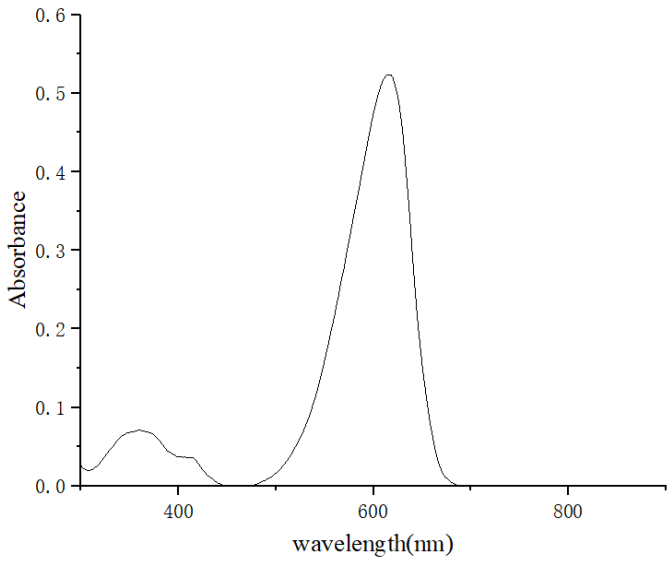

图 2　螺旋藻藻蓝蛋白紫外吸收光谱

四、标准中涉及专利的情况

无涉及国内外专利问题。

五、预期达到的社会效益、对产业发展的作用

根据各项数据总结，2018 年底，全球天然食用色素的市场为 38.8 亿美元，预计到 2023 年将以 5.7%的年增长率增长至 51.2 亿美元（来源于网络）。与合成食用色素相比，食品加工商更青睐于选择天然色素，许多人造色素供应商已转向

开发天然色素。藻胆蛋白作为一类天然色素蛋白，不仅能够达到增色的目的，也可以作为营养素，这使其广泛应用于食品、软饮料、化妆品和纺织等行业中。在21 世纪初，藻蓝蛋白已经是美国食品与药品管理局（The US Food and Drug Administration，FDA）认可使用的天然蓝色素，也被欧盟国家列入彩色食品原料，目前未限制其使用量。藻蓝蛋白也是被中国列入 GB2760 食品添加剂目录中的天然着色剂，可以添加至糖果、果汁、风味饮料和果冻等产品中。此外，藻胆蛋白有良好保健功能，具有抗氧化、免疫调节、抗癌、抗病毒、抗炎和保肝等作用，这使其在功能性食品领域也具有良好的应用前景。

中国是螺旋藻第一生产大国，国内螺旋藻年总产量约 9000-11000 吨（出口占比约 70%）。螺旋藻是蛋白质含量最高的物种之一，螺旋藻中的蛋白质占其干重的 60%-70%，藻胆蛋白含量约占总蛋白的 40%，而藻胆蛋白中含量最高的为C-藻蓝蛋白，因此其是生产藻蓝蛋白的理想原料。目前，国内外藻蓝蛋白市场正在快速发展，但还未就藻蓝蛋白产品形成一套严格的生产制备技术质量标准。

本标准的实施，将可以有效控制螺旋藻藻蓝蛋白纯化过程，保证螺旋藻藻蓝蛋白产品质量安全并节约生产成本。同时本标准还能够将藻蓝蛋白的纯度标准推广到全国，这将对规范全国藻蓝蛋白市场价格及产品质量起到极大的促进作用。

六、采用国际标准和国外先进标准情况

《食品安全国家标准 食品添加剂 藻蓝》已于 2020 年 9 月发布，2021 年 3 月正式实施。国内外暂时未发现有藻蓝蛋白制备技术规范公开执行。此外，与藻蓝蛋白相关的标准还有《进出口螺旋藻粉中藻蓝蛋白、叶绿素含量的测定方法》（中华人民共和国出入境检验检疫行业标准），该方法于 2002 年 5 月 20 日发布，2002 年 11 月 1 日实行。

七、在标准体系中的位置，与现行相关法律、法规、规章及相关标准，特别是强制性标准的协调性

本文件属于团体标准，符合现行法律、法规、规章和政策，且与有关基础和相关标准不矛盾。

八、重大分歧意见的处理经过和依据

在标准编制过程中，未收到重大分歧意见。

九、标准性质的建议说明

本文件为青岛微藻产业学会标准，属团体标准，供学会会员和社会自愿使用。

十、标准应用的建议

正常情况下，建议每三年由标准起草工作组对标准内容进行评估，如有必要，开展标准的修订工作。

十一、废止现行相关标准的建议

无。

十二、其他应予以说明的事项

无。