

# 裸藻蛋白泡沫分离的工艺优化及功能特性分析

宋林, 张炜\*, 荆永康, 隋成博

(青海师范大学 化学化工学院, 青海 西宁 810008)

**摘要:** 以裸藻蛋白液为原料, 通过泡沫分离法提取裸藻蛋白, 以回收率和富集比为指标, 通过单因素和响应面设计探究 pH、装液量、温度、稀释倍数对裸藻蛋白回收率和富集比的影响。考察了裸藻蛋白的功能特性, 采用 FTIR 和 UV-Vis 光谱对蛋白进行了结构分析, 通过 Peakfit Version 软件对蛋白的二级结构进行鉴定, 并通过全自动氨基酸分析仪测定了裸藻蛋白的氨基酸组成。结果表明, 裸藻蛋白泡沫分离的最佳条件为: pH 5.5、装液量 300 mL、温度 30 °C、稀释倍数 15 倍, 在上述条件下蛋白回收率为 94.27%, 富集比为 4.18。蛋白的持水量在 60 °C 最大, 为 7.27 g/g, 持油量在 40 °C 最大, 为 14.74 g/g。裸藻蛋白的乳化能力、乳化稳定性、起泡性、泡沫稳定性均随着其质量分数的增大大体上呈先增加后减小的趋势。裸藻蛋白具有典型的蛋白峰, 其二级结构代表裸藻蛋白以  $\beta$ -折叠为主。蛋白中必需氨基酸含量和疏水氨基酸含量分别为 35.28% 和 50.80%。

**关键词:** 泡沫分离; 裸藻蛋白; 响应面优化; 功能性质; 二级结构; 分离提纯技术

**中图分类号:** TQ936 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2023) 06-1340-10

## Process optimization and functional characteristics analysis of *Euglena* protein foam separation

SONG Lin, ZHANG Wei\*, JING Yongkang, SUI Chengbo

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Qinghai Normal University, Xining 810008, Qinghai, China)

**Abstract:** *Euglena* protein was extracted from foam separation of its solution, and the effects of pH, liquid volume, temperature and dilution ratio on the recovery and enrichment ratio of *Euglena* protein were investigated by single factor and response surface design. The functional characteristics was analyzed. The structure of protein was analyzed by FTIR and UV-Vis spectroscopies, with the secondary structure identified by Peakfit Version software and the amino acid composition determined by full automatic amino acid analyzer. The results showed that under the optimum separation conditions of pH=5.5, liquid volume 300 mL, temperature 30 °C, and 15 times of dilution, the protein recovery was 94.27% and the enrichment ratio was 4.18. Moreover, the maximum water holding capacity of protein was 7.27 g/g at 60 °C, and the maximum oil holding capacity was 14.74 g/g at 40 °C. On the whole, the emulsifying ability, emulsifying stability, foaming property and foam stability of *Euglena* protein were firstly enhanced and then reduced with the increase of mass fraction. *Euglena* protein displayed a typical protein peak with its secondary structure mainly  $\beta$ -sheets. The content of essential amino acids and hydrophobic amino acids in protein was 35.28% and 50.80%, respectively.

**Key words:** foam separation; *Euglena* protein; response surface optimization; functional characteristics; secondary structure; separation and purification technology

裸藻 (*Euglena*) 是一种单细胞微藻, 具有动植物的特性<sup>[1]</sup>, 所以在植物学中被称作裸藻, 动物学

中称作眼虫。裸藻生长周期很短, 代谢能力较强并且易于养殖<sup>[2]</sup>, 具有多种多样的生长方式, 如自养

收稿日期: 2022-10-01; 定用日期: 2022-12-26; DOI: 10.13550/j.jxhg.20220888

基金项目: 国家自然科学基金 (22268035)

作者简介: 宋林 (1999—), 男, 硕士生, E-mail: 1355627929@qq.com。联系人: 张炜 (1972—), 女, 教授, E-mail: zhangwei@qhnu.edu.cn。

异养<sup>[3]</sup>。裸藻拥有叶绿体、线粒体、细胞核、可收缩的液泡和高尔基体等细胞器<sup>[4]</sup>,并且其叶绿体具有三层质体膜,而不像红藻和植物中的叶绿体那样具有两层膜<sup>[5]</sup>。裸藻具有广泛的药用特性,如抗菌、抗诱变、抗人类免疫缺陷病毒(HIV)和抗肿瘤活性<sup>[6]</sup>,含有大量的蛋白质、碳水化合物、维生素、β-胡萝卜素等其他营养物质<sup>[7-9]</sup>。裸藻干重中蛋白质的质量分数达到50%,其质量优于植物产生的蛋白,其中,含有异亮氨酸等9种人体必需的氨基酸,所以,裸藻比小球藻更适合作为食品。开发利用裸藻蛋白对裸藻的开发具有重要意义。

裸藻蛋白液是提取完裸藻β-1,3-葡聚糖<sup>[10]</sup>剩下的上层液体,通常直接倒掉,造成了资源浪费。目前,对裸藻蛋白提取分离的报道仍很少,主要提取方法有碱溶酸沉法、离子交换色谱法、亲和色谱法、超滤联合离子交换色谱法、酶法等,但均存在成本高、得率低、工艺繁琐等问题<sup>[11]</sup>。泡沫分离是利用泡沫作为分离介质来分离具有表面活性的物质<sup>[12]</sup>,通过向含有表面活性物质的溶液中吹入空气,使溶液产生泡沫<sup>[13]</sup>,在泡沫上升期间,相邻的泡沫之间的间隙水通过重力排走,柱子上方的泡沫床中的含水量就降低<sup>[14]</sup>,从而分离泡沫层和液体,达到提取浓缩的目的<sup>[15]</sup>。泡沫分离具有能耗低、操作简单、设备维护方便等优点,是一种简单、温和、高效的吸附分离技术<sup>[16]</sup>。

本文拟以裸藻蛋白液为原料,通过泡沫分离法提取分离裸藻蛋白,以回收率和富集比为指标,经单因素实验和响应面优化确定最佳实验条件,并对裸藻蛋白进行功能特性测定、结构测定和氨基酸分析,以期裸藻的开发利用提供理论依据。

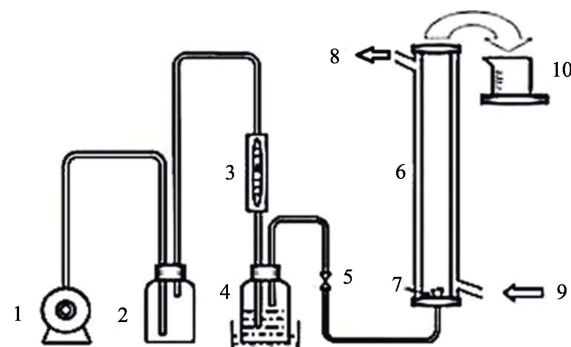
## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

裸藻,青海光子生态有限公司;牛血清白蛋白标准品、考马斯亮蓝G250,上海源叶生物科技发展有限公司;大豆油,益海嘉里武汉粮油工业有限公司;十二烷基硫酸钠(SDS,质量分数>95%)、NaCl(AR),国药集团化学试剂有限公司;无水乙醇、NaOH、H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>、石油醚,AR,天津市凯通化学试剂有限公司;蒸馏水,自制。

RCT 磁力搅拌器, IKA(广州)仪器设备有限公司; PB-10 酸度计, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司; VFD-2000 冷冻干燥机, 北京博医康实验仪器有限公司; IR Spirit 傅里叶变换红外光谱仪, 日本 Shimadzu 公司; TU-1901 双光束紫外-可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; H1850 高速离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;

L-8900 全自动氨基酸分析仪, 日本日立公司; 循环水恒温泡沫分离柱(图1), 实验室自制。



1—空气压缩机; 2—缓冲瓶; 3—转子流量计; 4—恒温水浴锅; 5—阀门; 6—泡沫分离柱(柱高120 cm, 内径20 cm); 7—进气口; 8—出水口; 9—进水口; 10—泡沫收集装置

图1 泡沫分离装置示意图

Fig. 1 Schematic diagram of foam separation device

### 1.2 裸藻蛋白的收集与泡沫分离

收集提取完β-1,3-葡聚糖后剩余的裸藻蛋白液。打开恒温水浴锅,设置实验所需的温度(如30℃),让循环水从进水口流进,出水口流出,待水温达到设置的温度时,打开空气压缩机和阀门,调节转子流量计调整风速,待风速稳定后,将按照不同稀释倍数稀释过的溶液(如用蒸馏水稀释15倍,上样溶液的装液量为300 mL,其中裸藻蛋白液为20 mL,调节上样溶液pH为5.5)倒入泡沫分离柱中,使溶液中的泡沫层分离出来,并流进泡沫收集装置,待反应结束后,收集泡沫层并将泡沫分离柱中的残余溶液倒出。裸藻蛋白的回收率和富集比按照式(1)和(2)<sup>[17]</sup>计算:

$$R/\% = \frac{\rho_f V_f}{\rho_0 V_0} \times 100 = \frac{\rho_f V_f}{\rho_f V_f + \rho_s V_s} \times 100 \quad (1)$$

$$E = \frac{\rho_f V_0}{\rho_f V_f + \rho_s V_s} \quad (2)$$

式中:  $R$  为裸藻蛋白的回收率,%;  $E$  为裸藻蛋白的富集比;  $\rho_0$ 、 $\rho_f$ 、 $\rho_s$  分别为初始液、泡沫层和残余溶液中蛋白质量浓度, g/L;  $V_0$ 、 $V_f$ 、 $V_s$  分别为上样溶液、泡沫层消除泡沫和残余溶液体积, L。

### 1.3 泡沫分离裸藻蛋白的单因素实验

#### 1.3.1 pH对裸藻蛋白泡沫分离的影响

在装液量为300 mL、温度为30℃、稀释倍数15倍的条件下,探究pH的影响。通过回收率和富集比确定最佳pH。

#### 1.3.2 装液量对裸藻蛋白泡沫分离的影响

在pH为5.5、温度为30℃、稀释倍数15倍的条件下,探究装液量的影响。通过回收率和富集比确定最佳装液量。

### 1.3.3 温度对裸藻蛋白泡沫分离的影响

在 pH 为 5.5、装液量为 300 mL、稀释倍数 15 倍的条件下, 探究温度的影响。通过回收率和富集比确定最佳温度。

### 1.3.4 稀释倍数对裸藻蛋白泡沫分离的影响

在 pH 为 5.5、装液量为 300 mL、温度为 30 °C 的条件下, 探究稀释倍数的影响。通过回收率和富集比确定最佳稀释倍数。

## 1.4 裸藻蛋白泡沫分离工艺优化实验

根据单因素实验结果, 用 Box-Behnken 设计方案<sup>[18]</sup>, 以 *A* (pH)、*B* (装液量)、*C* (温度)、*D* (稀释倍数) 为因素, 以回收率和富集比为指标。响应面因素水平设计及其可行性见表 1。

表 1 响应面因素水平设计  
Table 1 Response surface factor level design

因素	水平		
	-1	0	1
<i>A</i>	5.0	5.5	6.0
<i>B</i> /mL	250	300	350
<i>C</i> /°C	25	30	35
<i>D</i> /倍	10	15	20

## 1.5 裸藻蛋白功能性的测定

### 1.5.1 裸藻蛋白持水量的测定

裸藻蛋白液经泡沫分离后收集, 然后经过冷冻干燥 (冷冻温度为 -35 °C、冷冻时间为 12 h) 制成粉末。在离心管中称取 6 份 0.1 g 裸藻蛋白, 加入 10 mL 蒸馏水, 分别在 20、30、40、50、60、70 °C 下水浴加热 1 h, 然后以  $3 \times 10^3$  r/min 离心 15 min, 倒掉上层清液并称量残渣质量。持水量按式 (3) 测定:

$$h = \frac{m_2 - m_1}{m} \quad (3)$$

式中: *h* 为持水量, g/g; *m*、*m*<sub>1</sub>、*m*<sub>2</sub> 分别为样品质量、离心管和样品的总质量、离心管和残渣的总质量, g。

### 1.5.2 裸藻蛋白持油量的测定

在离心管中准确称量 6 份 0.1 g 裸藻蛋白, 加入 10 mL 大豆油, 然后分别在 20、30、40、50、60、70 °C 下水浴加热 1 h, 以  $3 \times 10^3$  r/min 离心 15 min, 倒掉上层清液并称量残渣质量。持油量按式 (4) 测定:

$$l = \frac{m_2 - m_1}{m} \quad (4)$$

式中: *l* 为持油量, g/g; *m*、*m*<sub>1</sub>、*m*<sub>2</sub> 分别为样品质量、离心管和样品的总质量、离心管和残渣的总质量, g。

### 1.5.3 裸藻蛋白乳化能力和乳化稳定性的测定

分别配制质量分数为 0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0% 的裸藻蛋白溶液 30 mL (如配制 0.4% 的裸藻蛋

白溶液: 称取 0.12 g 裸藻蛋白溶于 30 mL 蒸馏水中), 加入 10 mL 大豆油, 然后以  $1 \times 10^4$  r/min 均质 2 min。在底部吸取乳液 20 μL, 立即加入 5 mL 质量分数为 0.1% 的 SDS 水溶液。以质量分数为 0.1% 的 SDS 水溶液为空白对照, 在 500 nm 波长处测量裸藻蛋白-大豆油乳液的吸光度。乳化能力按式 (5) 测定:

$$a / \% = A_{500} \times 100 \quad (5)$$

式中: *a* 为乳化能力, %; *A*<sub>500</sub> 为裸藻蛋白-大豆油乳液在 500 nm 波长处的吸光度, 下同。

将均质的乳液静置 30 min, 用相同的方法测定静置 30 min 后裸藻蛋白-大豆油乳液的吸光度。乳化稳定性按式 (6) 测定:

$$\alpha_s / \% = (A_{30} / A_{500}) \times 100 \quad (6)$$

式中: *α*<sub>s</sub> 为乳化稳定性, %; *A*<sub>30</sub> 为裸藻蛋白-大豆油乳液静置 30 min 后在 500 nm 波长处的吸光度。

### 1.5.4 裸藻蛋白起泡性和泡沫稳定性的测定

分别配制质量分数为 0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0% 的裸藻蛋白溶液 20 mL, 然后以  $1 \times 10^4$  r/min 的速率均质 2 min。记录均质结束时的泡沫体积, 起泡性按式 (7) 测定:

$$p / \% = (V_1 / V) \times 100 \quad (7)$$

式中: *p* 为起泡性, %; *V*<sub>1</sub>、*V* 分别为均质结束时的泡沫和均质前的溶液体积, mL。

在室温下静置 30 min 后记录泡沫体积, 泡沫稳定性按式 (8) 测定:

$$p_s / \% = (V_2 / V_1) \times 100 \quad (8)$$

式中: *p*<sub>s</sub> 为泡沫稳定性, %; *V*<sub>1</sub>、*V*<sub>2</sub> 分别为均质结束时、静置 30 min 后的泡沫体积, mL。

## 1.6 UV-Vis 光谱测定

用 0.5 mol/L 冰醋酸溶解裸藻蛋白, 配制成浓度为 2 g/L 的溶液, 用紫外-可见分光光度计进行测试, 扫描波长范围 200~400 nm, 同时以 0.5 mol/L 冰醋酸为空白。

## 1.7 FTIR 测定

采用 KBr 压片法通过傅里叶变换红外光谱仪对裸藻蛋白进行测试, 再通过 Peakfit Version 软件分析裸藻蛋白的二级结构, 最后用积分面积计算各二级结构的相对含量。

## 1.8 氨基酸测定

采用全自动氨基酸分析仪进行测试, 色谱柱为 Na<sup>+</sup>型阳离子交换柱 (色谱柱尺寸 4.6 mm×60 mm, 填料为 3 μm 颗粒); 离子交换脂 2622, 检测器为紫外-可见光检测器; 显色剂为茚三酮/醋酸钠缓冲液; 缓冲液系统为柠檬酸缓冲液 B1 (pH 3.2)、B2 (pH 3.0)、B3 (pH 4.0)、B4 (pH 4.9); 缓冲液流速为 0.4 mL/min; 柱温为 55 °C, 反应温度为 135 °C。

## 2 结果与讨论

### 2.1 单因素对裸藻蛋白回收率和富集比的影响

#### 2.1.1 pH对裸藻蛋白回收率和富集比的影响

按照 1.3.1 节实验方法, 考察了 pH 对裸藻蛋白回收率和富集比的影响, 结果见图 2。

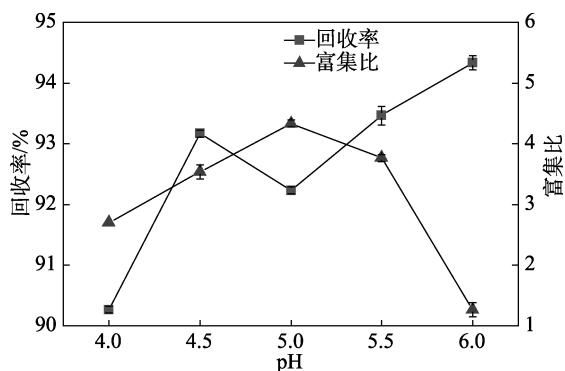


图 2 pH 对裸藻蛋白回收率和富集比的影响

Fig. 2 Effect of pH on recovery and enrichment ratio of *Euglena* protein

如图 2 所示, 随着 pH 从 4.0 增加到 6.0, 裸藻蛋白的回收率大体呈逐渐上升的趋势, 在 pH 为 5.0 时出现了下降, 但在 pH 为 6.0 时上升至 94.0%, 富集比在 pH 为 5.0 时上升至 4.3, 然后逐渐下降。这是因为, 在实验过程中, pH 为 5.5 时, 溶液出现沉淀, 达到了蛋白的等电点, 在等电点时, 蛋白能够表现出良好的发泡能力和泡沫稳定性<sup>[19]</sup>。但当 pH 偏离等电点时, 蛋白分子又带电, 从而使分子之间的斥力和溶解度增加, 此时就会造成其回收率或者富集比发生变化。因此, 选择 pH 为 5.5 作为研究条件。

#### 2.1.2 装液量对裸藻蛋白回收率和富集比的影响

按照 1.3.2 节实验方法, 考察了装液量对裸藻蛋白回收率和富集比的影响, 结果见图 3。

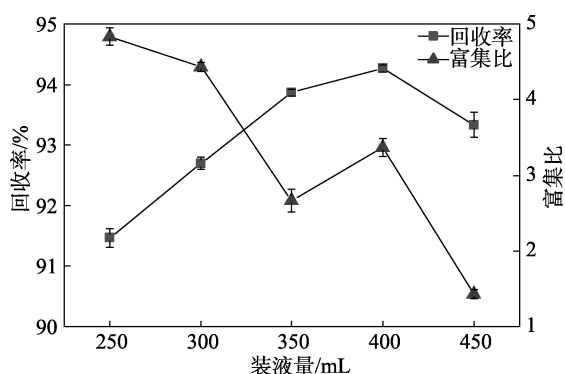


图 3 装液量对裸藻蛋白回收率和富集比的影响

Fig. 3 Effect of liquid loading on recovery and enrichment ratio of *Euglena* protein

如图 3 所示, 随着装液量的增加, 裸藻蛋白的回收率呈先升高后下降的趋势, 当装液量为 400 mL 时, 回收率达到最大, 为 94.0%。这是因为, 装液

量过大时, 气泡停留时间变短, 蛋白在表面上的吸附时间也缩短, 从而提高了裸藻蛋白的回收率, 降低了富集比。相反, 当装液量过少时, 导致气泡停留时间变长, 泡沫层携带的液体增多使裸藻蛋白浓度升高, 从而降低了回收率, 提高了富集比。一般来说, 要选择回收率相对高的, 在图 3 中, 装液量为 300 和 400 mL 时, 回收率相差不大, 仅为 1.3%, 考虑到泡沫分离在保证一定的回收率下尽量提高富集比<sup>[20]</sup>, 并且 300 mL 时, 体积小、泡沫分离易于操作回收。因此, 选择 300 mL 的装液量作为研究条件。

#### 2.1.3 温度对裸藻蛋白回收率和富集比的影响

按照 1.3.3 节实验方法, 考察了温度对裸藻蛋白回收率和富集比的影响, 结果见图 4。

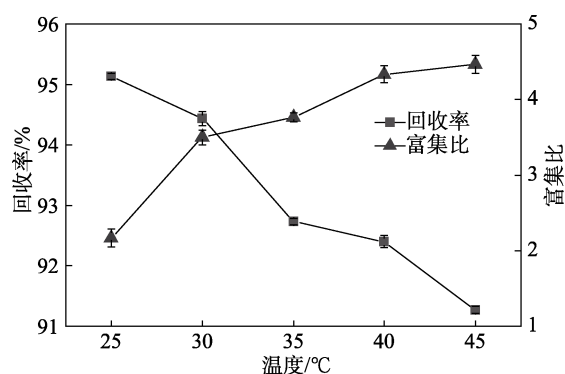


图 4 温度对裸藻蛋白回收率和富集比的影响

Fig. 4 Effect of temperature on recovery and enrichment ratio of *Euglena* protein

如图 4 所示, 随着温度的升高, 裸藻蛋白的回收率逐渐降低, 富集比逐渐增大, 在 45 °C 时富集比达到 4.4。这是因为, 温度的升高降低了溶液的黏度和扩散阻力, 导致了吸附阻力的降低及吸附容量的增大。当温度过高时, 泡沫稳定性下降, 回收率下降, 泡沫层含水量降低, 富集比增加<sup>[21]</sup>。因此, 选择 30 °C 作为研究条件。

#### 2.1.4 稀释倍数对裸藻蛋白回收率和富集比的影响

按照 1.3.4 节实验方法, 考察了稀释倍数对裸藻蛋白回收率和富集比的影响, 结果见图 5。

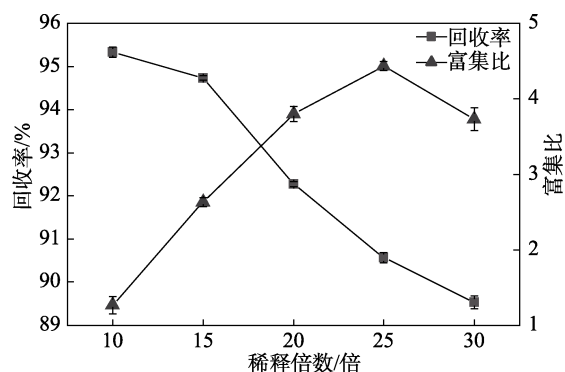


图 5 稀释倍数对裸藻蛋白回收率和富集比的影响

Fig. 5 Effect of dilution ratio on recovery and enrichment ratio of *Euglena* protein

如图 5 所示,随着稀释倍数的增加,裸藻蛋白的回收率降低,富集比先升高后降低。这是由于稀释倍数的增加降低了蛋白浓度,从而降低了溶液的黏度,进而减少了泡沫间的流动阻力,加快了泡沫的排液速率,降低了持液率,所以富集比增大,回收率减少<sup>[22]</sup>。因此,选择稀释倍数 15 倍作为研究条件。

## 2.2 响应面优化实验结果分析

### 2.2.1 响应面实验结果与方差分析

采用泡沫分离法收集裸藻蛋白,在单因素实验基础上,以 pH、装液量、温度、稀释倍数 4 个因素为自变量,裸藻蛋白回收率和富集比为响应值,设计中心组合实验。根据 Box-Behnken 析因设计和回归分析的原理,共进行 29 次重复实验,结果如表 2 所示。

表 2 响应面设计和实验结果

Table 2 Response surface design and experimental results

序号	pH	装液量/mL	温度/°C	稀释倍数/倍	R/%	E
1	5.5	350	30	10	92.0	2.9
2	5.5	300	25	10	91.8	2.7
3	5.5	300	35	10	93.5	1.2
4	5.5	250	30	20	91.6	3.1
5	6.0	300	25	15	91.8	1.9
6	6.0	300	30	20	91.7	1.8
7	5.5	300	30	15	94.5	4.2
8	6.0	350	30	15	90.6	2.5
9	5.5	300	35	20	91.4	5.3
10	5.0	300	25	15	92.9	1.5
11	5.5	350	30	20	92.7	4.4
12	5.0	350	30	15	91.3	2.9
13	5.5	250	30	10	91.8	2.1
14	5.5	300	30	15	93.5	4.8
15	5.5	300	30	15	94.3	4.4
16	5.0	250	30	15	92.1	3.2
17	5.0	300	30	10	93.1	2.1
18	6.0	250	30	15	90.4	1.6
19	5.0	300	35	15	92.2	3.1
20	5.5	300	30	15	94.1	3.4
21	5.5	250	35	15	91.7	3.3
22	6.0	300	30	10	91.1	1.3
23	5.5	300	25	20	95.3	2.5
24	5.5	300	30	15	93.8	3.9
25	5.5	350	25	15	93.1	2.6
26	5.0	300	30	20	92.8	3.0
27	5.5	250	25	15	92.6	3.6
28	5.5	350	35	15	92.5	4.5
29	6.0	300	35	15	90.7	2.1

采用 Design-Expert V8.0.6 软件对表 2 中的数据进行二项式拟合,得到二项式拟合方程为:

$$R=94.04-0.67A+0.17B-0.46C+0.18D+0.25AB-0.100AC+0.23AD+0.075BC+0.23BD-1.40CD-1.55A^2-1.33B^2-0.44C^2-0.53D^2 (P<0.0001, R^2=0.9501)$$

$$E=4.14-0.38A+0.24B+0.39C+0.65D+0.30AB-0.35AC-0.10AD+0.55BC+0.13BD+1.08CD-1.41A^2-0.20B^2-0.50C^2-0.74D^2 (P<0.0001, R^2=0.9160)$$

并对回归方程进行了分析,得出各系数的绝对值越高,各因素对响应值的影响越大,正负系数反映了影响的方向。表 3、4 分别为回收率和富集比的方差分析。

表 3 回收率的方差分析

Table 3 Variance analysis of recovery rate

来源	平方和	自由度	均方值	F 值	P 值	显著性
模型	40.09	14	2.86	19.05	<0.0001	**
A (pH)	5.47	1	5.47	36.37	<0.0001	**
B (装液量)	0.33	1	0.33	2.22	0.1586	
C (温度)	2.52	1	2.52	16.77	0.0011	**
D (稀释倍数)	0.40	1	0.40	2.68	0.1237	
AB	0.25	1	0.25	1.66	0.2181	
AC	0.04	1	0.04	0.27	0.6140	
AD	0.20	1	0.20	1.35	0.2652	
BC	0	1	0	0.15	0.7047	
BD	0.20	1	0.20	1.35	0.2652	
CD	7.84	1	7.84	52.15	<0.0001	**
A <sup>2</sup>	15.48	1	15.48	103.00	<0.0001	**
B <sup>2</sup>	11.52	1	11.52	76.62	<0.0001	**
C <sup>2</sup>	1.28	1	1.28	8.54	0.0111	*
D <sup>2</sup>	1.84	1	1.84	12.24	0.0035	**
残差	2.10	14	0.15			
失误项	1.47	10	0.15	0.93	0.5805	
纯误差	0.63	4	0.16			
总和	42.19	28				

注: \*表示差异显著 (P<0.05); \*\*表示差异极显著 (P<0.01)。

如表 3 和表 4 所示,两个模型的 P 值均<0.0001,两个模型的 F 值均>0.05,表明回归模型高度显著。对于回收率,该模型相关系数 R<sup>2</sup>=0.9501,表示可以解释 95.01% 响应值的变化,调整后相关系数 R<sub>Adj</sub><sup>2</sup>=0.9002,表明模型拟合度较好,实验误差较小,可用于设计内预测。A、C、CD、A<sup>2</sup>、B<sup>2</sup>、C<sup>2</sup>、D<sup>2</sup> 对模型有显著影响,影响因素大小顺序为 pH>温度>稀释倍数>装液量。对于富集比,该模型相关系数 R<sup>2</sup>=0.9160 表示可以解释 91.60% 响应值的变化,调整后 R<sub>Adj</sub><sup>2</sup>=0.8319,表明模型的拟合度较好,实验误差较小,可用于设计内预测。A、B、C、D、BC、CD、A<sup>2</sup>、C<sup>2</sup>、D<sup>2</sup> 对模型有显著影响,影响因素大小顺序为稀释倍数>温度>pH>装液量<sup>[23]</sup>。

表 4 富集比的方差分析  
Table 4 Variance analysis of enrichment ratio

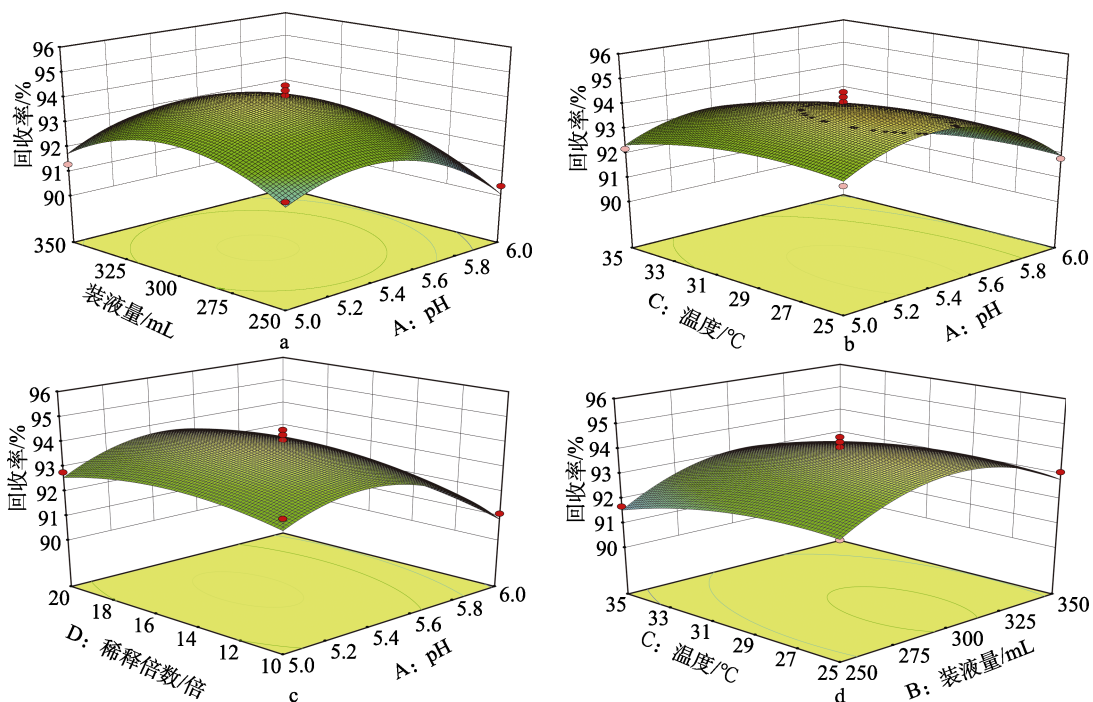
来源	平方和	自由度	均方值	F 值	P 值	显著性
模型	30.93	14	2.21	10.90	< 0.0001	**
A (pH)	1.76	1	1.76	8.70	0.0106	*
B (装液量)	0.70	1	0.70	3.46	0.0841	**
C (温度)	1.84	1	1.84	9.08	0.0093	**
D (稀释倍数)	5.07	1	5.07	25.01	0.0002	**
AB	0.36	1	0.36	1.78	0.2039	
AC	0.49	1	0.49	2.42	0.1423	
AD	0.04	1	0.04	0.20	0.6637	
BC	1.21	1	1.21	5.97	0.0284	*
BD	0.06	1	0.06	0.31	0.5875	
CD	4.62	1	4.62	22.80	0.0003	**
A <sup>2</sup>	12.93	1	12.93	63.77	< 0.0001	**
B <sup>2</sup>	0.26	1	0.26	1.27	0.2788	
C <sup>2</sup>	1.62	1	1.62	7.97	0.0135	*
D <sup>2</sup>	3.52	1	3.52	17.37	0.0009	**
残差	2.84	14	0.20			
失余项	1.73	10	0.17	0.62	0.7538	
纯误差	1.11	4	0.28			
总和	33.77	28				

注: \*表示差异显著 ( $P < 0.05$ ); \*\*表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

### 2.2.2 响应面分析

使用 Design-Expert V8.0.6 进行统计分析, 得到 pH、装液量、温度、稀释倍数 4 个因素对裸藻蛋白泡沫分离影响的三维曲面图, 结果如图 6、7 所示。

各因素的影响大小主要通过曲面的弧度进行体现。曲面图的倾斜程度越大, 表示这两因素的交互作用对裸藻蛋白回收率和富集比的影响越显著, 反之则越不显著。响应值有一个极大值, 各参数之间的等高线呈椭圆形, 交互作用显著, 最高点清晰可见, 说明 4 个因素交互作用显著<sup>[24]</sup>。对回收率来说, 由图 6a 可知, 根据响应面图陡峭程度判断,  $A > B$ , 即 pH 的影响大于装液量的影响; 在图 6b 中, 曲面的陡峭程度  $A > C$ , 即 pH 对回收率的影响比温度大; 在图 6c 中, 曲面的陡峭程度  $A > D$ , 即 pH 对回收率的影响比稀释倍数大; 由图 6d 可知, 根据响应面图陡峭程度判断,  $C > B$ , 即温度的影响大于装液量的影响; 在图 6e 中, 曲面的陡峭程度  $D > B$ , 即稀释倍数对回收率的影响比装液量大; 在图 6f 中, 曲面的陡峭程度  $C > D$ , 即温度对回收率的影响比稀释倍数大; 综上所述, 该结果与方差分析结果相同, 即,  $pH > 温度 > 稀释倍数 > 装液量$ 。对富集比来说, 由图 7a 可知, 根据响应面图陡峭程度判断,  $A > B$ , 即 pH 的影响大于装液量的影响; 在图 7b 中, 曲面的陡峭程度  $C > A$ , 即温度对富集比的影响比 pH 大; 在图 7c 中, 曲面的陡峭程度  $D > A$ , 即稀释倍数对富集比的影响比 pH 大; 由图 7d 可知, 根据响应面图陡峭程度判断,  $C > B$ , 即温度的影响大于装液量的影响; 在图 7e 中, 曲面的陡峭程度  $D > B$ , 即稀释倍数对富集比的影响比装液量大; 在图 7f 中, 曲面的陡峭程度  $D > C$ , 即稀释倍数对富集比的影响比温度大; 综上所述, 该结果与方差分析结果相同, 即  $稀释倍数 > 温度 > pH > 装液量$ 。



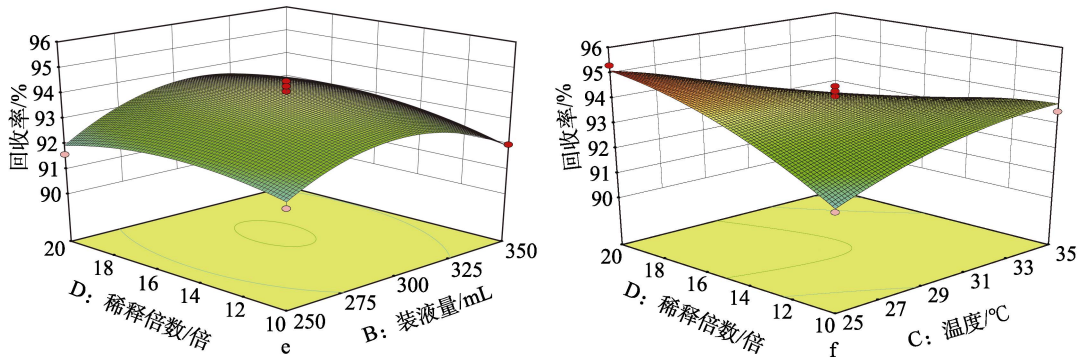


图 6 实验因素对裸藻蛋白回收率影响的响应曲面

Fig. 6 Response surface for the effect of experimental factors on recovery of *Euglena* protein

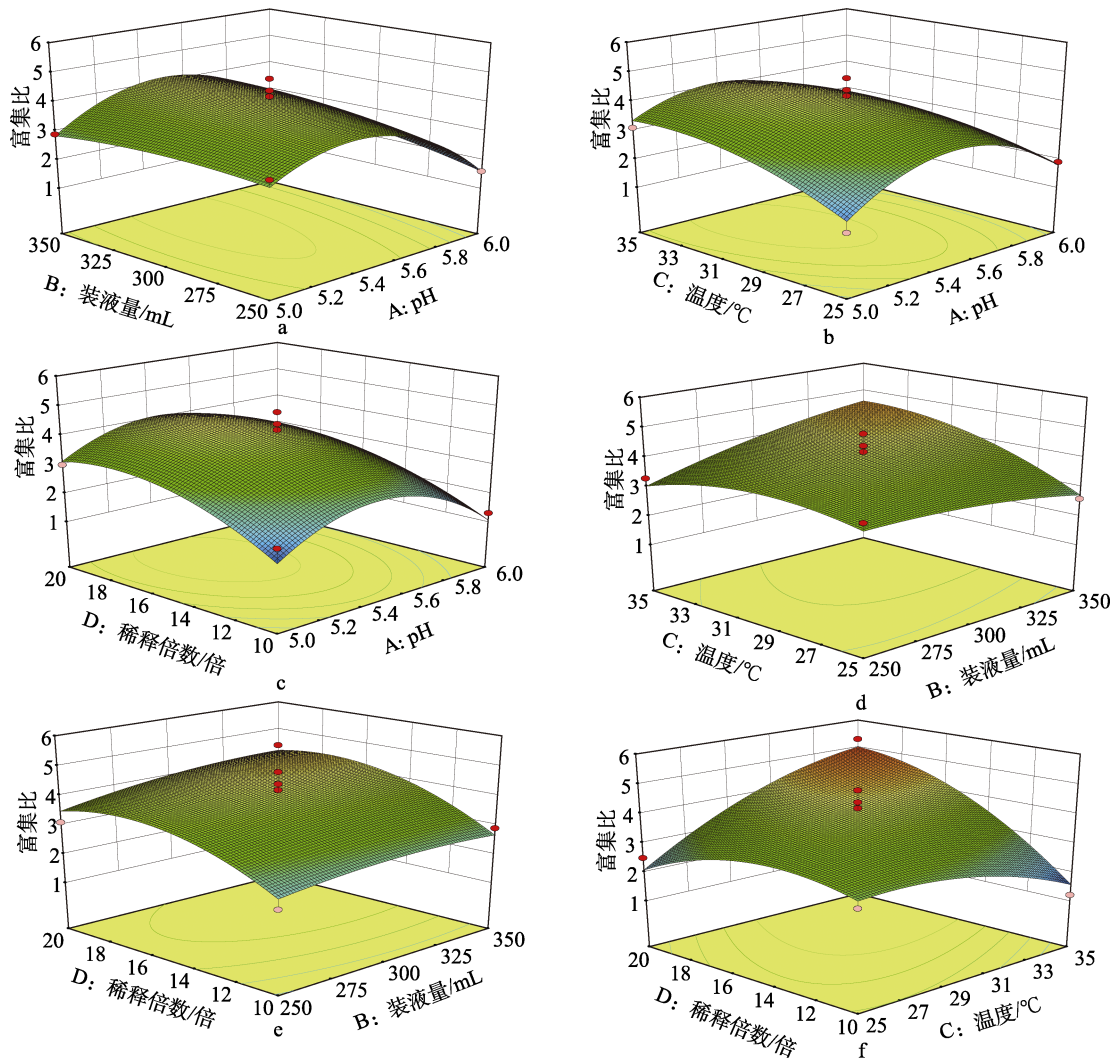


图 7 实验因素对裸藻蛋白富集比影响的响应曲面

Fig. 7 Response surface plots for the effect of experimental factors on enrichment ratio of *Euglena* protein

2.2.3 模型优化及验证

使用 Design-Expert V8.0.6 软件进行分析,以回收率和富集比为指标,可得到最佳优化条件为 pH 5.42,装液量 308.26 mL,温度 30.30 °C,稀释倍数 16.74 倍,在此条件下,裸藻蛋白的回收率为 94.03%,富集比为 4.39。为了验证此最佳优化工艺和条件,

考虑到实际情况,选用 pH 为 5.5,装液量为 300 mL,温度为 30 °C,稀释倍数为 15 倍,在此条件下,裸藻蛋白的回收率为 94.27%,富集比为 4.18。实验结果与预测值非常接近,得到用响应面法来优化泡沫分离裸藻蛋白的提取工艺是可行的,该拟合模型适用于裸藻蛋白的提取。

## 2.3 裸藻蛋白的功能特性分析

### 2.3.1 裸藻蛋白持水性

按照 1.5.1 节实验方法,对裸藻蛋白的持水性能进行了测定,结果见图 8。

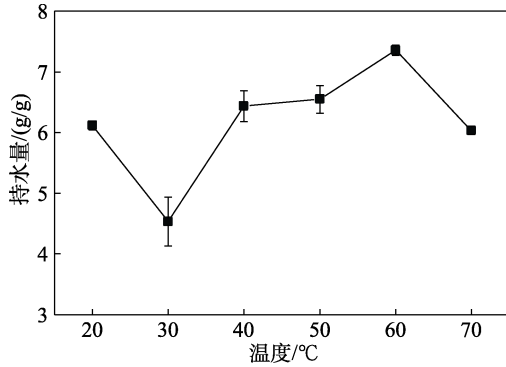


图 8 温度对持水量的影响

Fig. 8 Effect of temperature on water holding capacity

如图 8 所示,随着温度的升高,裸藻蛋白的持水量在 30 °C 后先增大后减小,在 60 °C 时可达 7.27 g/g。这可能是因为低温状态下,随着温度的升高,蛋白质会被适当地拉伸,亲水基团会与水合氢离子结合,从而提高了裸藻蛋白的持水性能。然而,当温度升高时,蛋白发生变性,持水能力就会下降<sup>[25]</sup>。

### 2.3.2 裸藻蛋白持油能力分析

按照 1.5.2 节实验方法,对裸藻蛋白的持油能力进行了测定,结果见图 9。

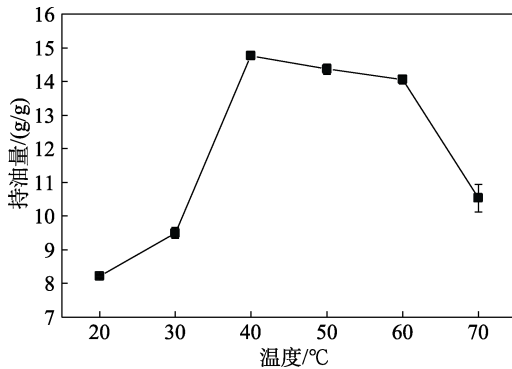


图 9 温度对持油能力的影响

Fig. 9 Effect of temperature on oil holding capacity

如图 9 所示,随着温度的升高,裸藻蛋白的持油能力出现先增加后减少的趋势,在 40 °C 时达到最大,为 14.74 g/g。下降的原因归因于随着温度的升高,油的黏度会变低,从而增大其流动性<sup>[26]</sup>。同时,由于蛋白变性,它们之间的相互作用减弱,持油量降低。

### 2.3.3 裸藻蛋白乳化能力和乳化稳定性分析

按照 1.5.3 节实验方法,对裸藻蛋白的乳化能力和乳化稳定性进行了测定,结果见图 10。

如图 10 所示,在裸藻蛋白质量分数为 0.8% 时,裸藻蛋白的乳化能力达到了 134%;裸藻蛋白质量分数为 0.6% 时,其乳化稳定性达到了 80%,说明裸藻蛋白具有良好的乳化能力和乳化稳定性。其乳化能力和乳化稳定性随着裸藻蛋白质量分数的增大大大体上呈现先增加后降低的趋势,这是因为,质量分数越大,其界面膜越厚,从而提高了膜强度,乳化能力提高。然而,当质量分数继续增加时,参与界面相互作用的蛋白数量不再增加且达到饱和,乳化能力不再增加<sup>[27]</sup>。

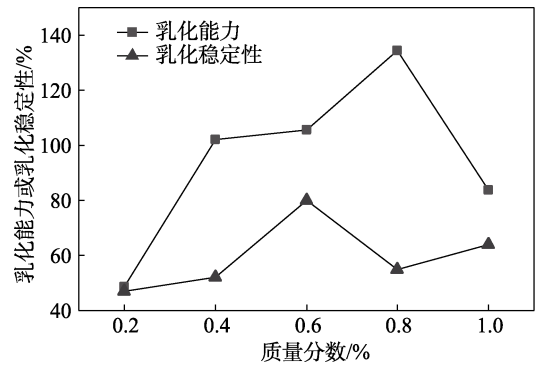


图 10 裸藻蛋白质量分数对乳化能力和乳化稳定性的影响

Fig. 10 Effect of mass fraction on emulsifying ability and emulsifying stability

### 2.3.4 裸藻蛋白起泡性和泡沫稳定性分析

按照 1.5.4 节实验方法,对裸藻蛋白的起泡性和泡沫稳定性进行了测定,结果见图 11。

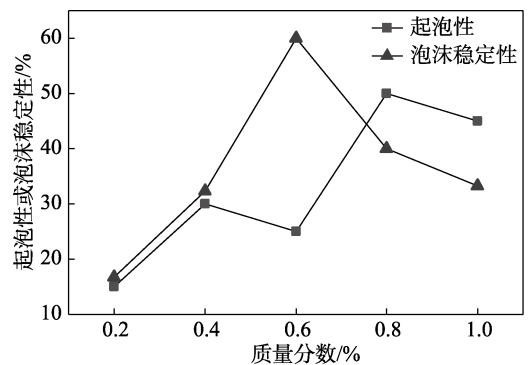


图 11 裸藻蛋白质量分数对起泡性和泡沫稳定性的影响

Fig. 11 Effect of mass fraction on foaming property and foam stability

起泡性是指蛋白质在气液界面形成坚韧薄膜的性能,泡沫稳定性是指维持泡沫的能力。如图 11 所示,起泡性在裸藻蛋白质量分数为 0.8% 时达到了 50%;泡沫稳定性在裸藻蛋白质量分数为 0.6% 时达到了 60%,说明裸藻蛋白的起泡性和泡沫稳定性均表现良好。随着裸藻蛋白质量分数的增加,起泡性大体上先增大后减小。这是因为,高浓度液体在高速搅拌时会增强分子间的作用力,降低表面张力,



与更多的气体结合形成了稳定的气泡<sup>[28]</sup>。

### 2.4 UV-Vis 吸收光谱分析

按照 1.6 节实验方法, 对裸藻蛋白进行了 UV-Vis 吸收光谱测定, 结果见图 12。

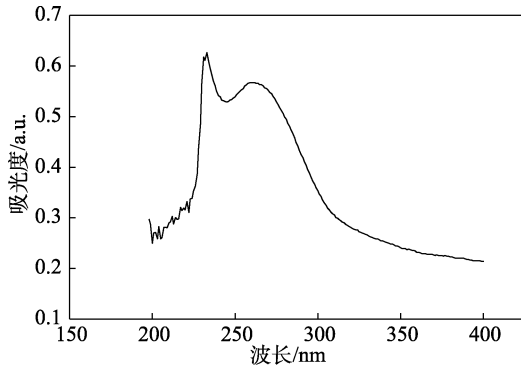


图 12 裸藻蛋白的 UV-Vis 吸收光谱

Fig. 12 UV-Vis adsorption spectrum of *Euglena* protein

如图 12 所示, 裸藻蛋白在 230 nm 左右达到最大吸收, 这是由于肽键—C=O 的  $n-\pi^*$  的跃迁所产生<sup>[29]</sup>, 符合蛋白三螺旋结构的紫外吸收特征; 而在波长 280 nm 左右也出现了吸收峰, 这是由于含有酪氨酸、苯丙氨酸等芳香族氨基酸<sup>[30]</sup>。

### 2.5 FTIR 分析

按照 1.7 节实验方法, 对裸藻蛋白进行了 FTIR 和二级结构测定, 结果见图 13、14。

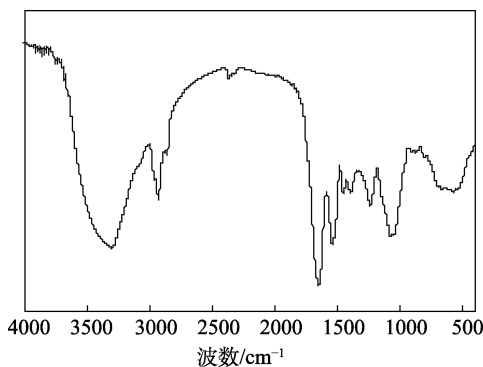


图 13 裸藻蛋白的 FTIR 谱图

Fig. 13 FTIR spectrum of *Euglena* protein

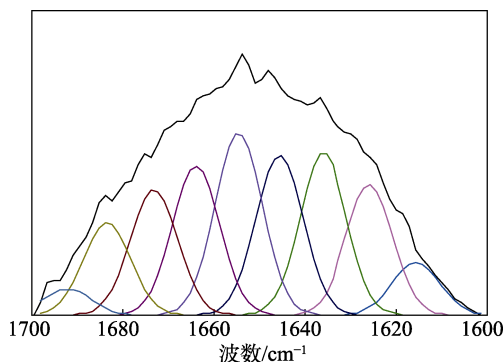


图 14 裸藻蛋白的酰胺 I 带的拟合谱图

Fig. 14 Fitting map of amide I band of *Euglena* protein

如图 13 所示, 蛋白有许多特征吸收峰, 1300~1200  $\text{cm}^{-1}$  处为酰胺 II 带的 C—O 和 C—O—C 键的伸缩振动; 1400  $\text{cm}^{-1}$  处为酰胺 II 带 N—H 键的弯曲的顺式构象; 1600  $\text{cm}^{-1}$  处为酰胺 I 带, 是蛋白质典型肽键 (O=C—N—H) 的伸缩振动峰; 2850~2980  $\text{cm}^{-1}$  处为酰胺 B 带 (—NH 和—OH 的伸缩振动峰); 3400~3300  $\text{cm}^{-1}$  处为酰胺 A 带的吸收峰 (N—H 伸缩振动)<sup>[31]</sup>。运用 Peakfit Version 软件对 FTIR 谱图中酰胺 I 带进行了分析, 得出裸藻蛋白酰胺 I 带的拟合谱图, 如图 14 所示。每个峰代表 FTIR 谱图在 1700~1600  $\text{cm}^{-1}$  的二阶导数拟合, 然后根据图 14 来计算蛋白的二级结构含量, 结果如表 5 所示。从表 5 可知, 裸藻蛋白的二级结构以  $\beta$ -折叠为主, 占 32.12%, 少数为  $\beta$ -反向和无规卷曲结构。 $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠是比较有序蛋白二级结构, 具有较高的稳定性,  $\beta$ -转角和无规卷曲是无序结构。

表 5 裸藻蛋白二级结构的相对含量

Table 5 Relative content of secondary structure of *Euglena* protein

二级结构	$\beta$ -反向	$\beta$ -转角	无规卷曲	$\alpha$ -螺旋	$\beta$ -折叠
相对含量/%	10.73	25.43	14.83	16.89	32.12

### 2.6 氨基酸分析

根据 1.8 节实验方法采用全自动氨基酸分析仪对裸藻蛋白进行了氨基酸组成测定, 分析结果如表 6 所示。由表 6 可见, 脯氨酸的含量最多, 为 34.546 mg/g, 占比达到了 12.80%; 必需氨基酸占比达到了 35.28%, 疏水氨基酸占比达到了 50.80%<sup>[32]</sup>。

表 6 裸藻蛋白的氨基酸分析

Table 6 Amino acid analysis of *Euglena* protein

氨基酸名称	含量/(mg/g)	占比/%	氨基酸名称	含量/(mg/g)	占比/%
天冬氨酸	20.245	7.50	酪氨酸	14.654	5.43
苏氨酸*	14.662	5.43	苯丙氨酸*	15.016	5.56
丝氨酸	12.490	4.63	组氨酸*	9.190	3.41
谷氨酸	28.644	10.61	赖氨酸	15.465	5.73
甘氨酸	12.550	4.65	精氨酸	18.952	7.02
丙氨酸	16.556	6.13	脯氨酸	34.546	12.80
胱氨酸	0.576	0.21	亮氨酸*	19.664	7.29
缬氨酸*	12.430	4.61	必需氨基酸	95.218	35.28
蛋氨酸*	9.588	3.55	疏水氨基酸	137.122	50.80
异亮氨酸*	14.668	5.43	总氨基酸	269.896	100

注: \*为必需氨基酸; 疏水氨基酸包括脯氨酸、丙氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸。

## 3 结论

通过泡沫分离法提取裸藻蛋白, 以回收率和富集比指标, 确定了泡沫分离的最佳 pH、装液量、

温度和稀释倍数。同时对裸藻蛋白的功能特性进行了考察,又采用 FTIR、UV-Vis 光谱和 Peakfit Version 分析了蛋白的结构,并测定了裸藻蛋白的氨基酸组成。结果表明,裸藻蛋白泡沫分离的最佳条件为 pH=5.5、装液量 300 mL、温度 30 °C、稀释倍数 15 倍,此时回收率和富集比为 94.27%和 4.18。裸藻蛋白在 60 °C 时持水量最大,为 7.27 g/g,在 40 °C 时持油量最大,为 14.74 g/g。裸藻蛋白的乳化能力、乳化稳定性、起泡性、泡沫稳定性大体上均随着裸藻蛋白质量分数的增大呈先增加后减小的趋势。FTIR 和 UV-Vis 吸收光谱显示,裸藻蛋白有典型的蛋白峰,其二级结构代表裸藻蛋白以  $\beta$ -折叠为主。蛋白中必需氨基酸含量和疏水氨基酸含量为 35.28%和 50.80%。说明泡沫分离是一种可行且操作简便的方法,本文为裸藻的研究开发提供了实验依据。

#### 参考文献:

- [1] LI Y, TANG X L, SONG W S, *et al.* Biosynthesis of silver nanoparticles using *Euglena gracilis*, *Euglena intermedia* and their extract[J]. IET Nanobiotechnology, 2015, 9(1): 19-26.
- [2] O'NEILL E C, KUHAUDOMLARP S, REJZEK M, *et al.* Exploring the glycans of *Euglena gracilis*[J]. Biology, 2017, 6(4): 45-59.
- [3] CHEN Z F, ZHU J Y, DU M, *et al.* A synthetic biology perspective on the bioengineering tools for an industrial microalga: *Euglena gracilis*[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 10: 1-7.
- [4] KHATTIWADA B, SUNNA A, NEVALAINEN H. Molecular tools and applications of *Euglena gracilis*: From biorefineries to bioremediation[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2020, 117(12): 3952-3967.
- [5] DURNFORD D G, SCHWARTZBACH S D. Protein targeting to the plastid of *Euglena*[J]. *Euglena: Biochemistry, Cell and Molecular Biology*, 2017, 979: 183-205.
- [6] PANJA S, GHATE N B, MANDAL N. A microalga, *Euglena tuba* induces apoptosis and suppresses metastasis in human lung and breast carcinoma cells through ROS-mediated regulation of MAPKs[J]. Cancer Cell International, 2016, 16(1): 1-13.
- [7] IVANOVA I M, NEPOGODIEV S A, SAALBACH G, *et al.* Fluorescent mannosides serve as acceptor substrates for glycosyltransferase and sugar-1-phosphate transferase activities in *euglena gracilis* membranes[J]. Carbohydrate Research, 2017, 438: 26-28.
- [8] AEMIRO A, KIIRU P, WATANABE S, *et al.* The effect of *euglena (Euglena gracilis)* supplementation on nutrient intake, digestibility, nitrogen balance and rumen fermentation in sheep[J]. Animal Feed Science and Technology, 2017, 225: 123-133.
- [9] NAGAO R, YOKONO M, KATO K H, *et al.* High-light modification of excitation-energy-relaxation processes in the green flagellate *Euglena gracilis*[J]. Photosynthesis Research, 2021, 149(3): 303-311.
- [10] NIE S C (乜世成), ZHANG W (张炜), GAO H (高红), *et al.* Effect of ultra-high pressure micro-jet technology extraction on structure and antioxidant activity of  $\beta$ -glucan from *Euglena gracilis*[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2022, 39(8): 1633-1640, 1661.
- [11] LIU L (刘龙). Foam separation of whey protein, preparation of antioxidant products and improvement of functional properties[D]. Xining: Qinghai Normal University (青海师范大学), 2018.
- [12] SHAO W Y, ZHANG J Y, LIN Y, *et al.* The selection of a surfactant for freshwater *Microalgae* harvesting and separation by the foam separation method[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2019, 42(11): 1721-1730.
- [13] MATSUOKA K, MIURA H, KARIMA S, *et al.* Removal of alkali metal ions from aqueous solution by foam separation method[J]. Journal of Molecular Liquids, 2018, 263: 89-95.
- [14] KINOSHITA T, ISHIGAKI Y, YAMAGUCHI K, *et al.* Novel operational method of continuous foam separation of gold-injection of metal and/or surfactant solutions into rising foam bed[J]. Separation and Purification Technology, 2006, 52(2): 357-362.
- [15] SUZUKI Y, IMAFUKU Y, NISHIYAMA M, *et al.* A highly efficient method for concentrating DNA from river water by combined coagulation and foam separation[J]. Separation Science and Technology, 2019, 54(18): 3128-3134.
- [16] SHAO W Y, ZHANG J Y, WANG K, *et al.* Cocamidopropyl betaine-assisted foam separation of freshwater *Microalgae desmodesmus brasiliensis*[J]. Biochemical Engineering Journal, 2018, 140: 38-46.
- [17] YU X D (于小栋), ZHANG W (张炜), LIU L (刘龙), *et al.* Optimization of separation of gelatin solution using response surface methodology[J]. Chemical World (化学世界), 2018, 59(7): 412-419.
- [18] YAZDAN-BAKHSI M, NASR-ESFAHANI M, ESMAILZADEH-KENARI R, *et al.* Optimizing nanoencapsulation of heracleum lasiopetalum by response surface methodology[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2022, 99(5): 421-431.
- [19] JEONG G T, PARK E S, WAHLIG V L, *et al.* Effect of pH on the foam fractionation of *Mimosa pudica* L. seed proteins[J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2004, 43(2): 422-427.
- [20] LIU L (刘龙), ZHANG W (张炜), CHEN Y T (陈元涛), *et al.* Optimization on foam separation process for *Spinachleaf* protein[J]. Food & Machinery (食品与机械), 2017, 33(6): 169-175.
- [21] LIU H B, ZHANG W, CHEN Y T, *et al.* Optimization of foam separation of mulberry leaf protein by response surface methodology[J]. Food Science, 2015, 36(8): 97-102.
- [22] WANG Z J (王志娟), ZHANG W (张炜), GAN W M (甘文梅), *et al.* Foam fractionation optimization and antioxidant activity studies of dioscin from *Trigonella foenum-graecum*[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association (中国粮油学报), 2021, 36(11): 144-150, 161.
- [23] GUO J J (郭京京), LI Y X (李雅轩), FAN Z Y (樊子怡), *et al.* Extraction technology optimization of dietary fiber from *Hippophae rhamnoides* pomace by response surface methodology and the evaluation of its application properties[J]. Natural Product Research and Development (天然产物研究与开发), 2022, 34(7): 1181-1188.
- [24] SUI C B (隋成博), ZHANG W (张炜), NIE S C (乜世成), *et al.* Optimization and function characteristics analysis of foam fractionation of *Quinoa* protein[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2022, 39(11): 2312-2320.
- [25] CHEN M J, LIN C W. Factors affecting the water-holding capacity of fibrinogen/plasma protein gels optimized by response surface methodology[J]. Journal of Food Science, 2010, 67(7): 2579-2582.
- [26] ASSADPOUR E, JAFARI S M, MAHOONAK A S, *et al.* Evaluation of protein solubility and water and oil holding capacity of the legume flours[J]. Iranian Food Science & Technology Research Journal, 2010, 6(3): 184-192.
- [27] LI Y (李艳), LI X T (李啸天), GUO W Y (郭文渊), *et al.* Analysis of amino acid composition, structure and emulsion properties of *Cocunut* cake protein fractions[J]. Chinese Journal of Tropical Crops (热带作物学报), 2022, 43(3): 644-652.
- [28] ZHANG Y P (张燕鹏), ZHANG M J (张曼君), DIAO Y C (刁云春), *et al.* Foaming characteristics and underlying mechanism of rice bran protein-ovalbumin mixtures[J]. Food Science (食品科学), 2022, 43(12): 81-86.
- [29] ZHANG J X, SHARMAN E, JIANG J. Two-dimensional ultraviolet spectroscopy of proteins[J]. Science China Chemistry, 2018, 61(9): 1099-1109.
- [30] LIU Y Q (刘彦秋), DU R M (都日玛), BAI Y (白杨), *et al.* Effect of ultra-high pressure treatment on tertiary structure of sheep bone collagen[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology (中国食品学报), 2022, 22(8): 207-213.
- [31] LAN W Q (蓝蔚青), HU X Y (胡潇予), RUAN D N (阮东娜), *et al.* Effects of carrageenan oligosaccharides on the protein structure of *Litopenaeus vannamei* by Fourier transform infrared and micro-Raman spectroscopy[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2019, 39(8): 2507-2514.
- [32] LIU J (刘晶), HU X (胡晓), YANG X Q (杨贤庆), *et al.* Extraction and antioxidant activity of enzymolysis products of *Gracilaria lemaneiformis* protein[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis (浙江农业学报), 2022, 34(5): 1061-1072.