

裸藻蛋白的超声碱提工艺优化、 结构表征及功能特性

丁慧^{1,2}, 李市场^{1,2*}, 宋根娣³, 胡锋阳^{1,2}, 常英杰⁴, 龚明贵¹

(1. 河南科技大学食品与生物工程学院, 河南洛阳 471000) (2. 河南省食品微生物工程技术研究中心, 河南洛阳 471000) (3. 洛阳理工学院环境工程与化学学院, 河南洛阳 471000) (4. 洛阳欧克拜克生物技术股份有限公司, 河南洛阳 471600)

摘要: 新型蛋白资源的挖掘在未来食品开发领域中占有重要的地位。该文以裸藻为原料, 蛋白提取率为指标, 通过单因素、Plackett-Burman 和响应面设计探究超声碱提工艺中各因素对裸藻蛋白提取率的影响。采用紫外吸收光谱 (UV-Vis)、傅里叶变换红外光谱 (FT-IR)、全自动氨基酸分析仪对裸藻蛋白的基团构成、二级结构及氨基酸组成进行分析, 并考察了其吸水性、持油性、乳化性等功能特性。结果表明, 裸藻蛋白最佳工艺参数为料液比 1:20, 超声功率 100 W, 醇碱比 1:3.5, 氢氧化钠浓度 0.35 mol/L, 浸提温度 40 ℃, 浸提时间 120 min, 超声时间 5 min, 在此条件下测得提取率为 93.81%。结构分析表明, 裸藻蛋白的二级结构主要以 β -转角和 β -折叠为主, 占 98.80%, 必需氨基酸含量为 66.09%, 疏水氨基酸含量为 67.81%。功能特性测定结果表明, 当温度为 60 ℃时, 裸藻蛋白的吸水性最大, 为 13.19 g/g, 当温度为 40 ℃时持油性最大, 为 7.33 g/g, 裸藻蛋白的乳化性、乳化稳定性、起泡性、泡沫稳定性均表现良好, 分别为 34%、64.62%、53.90%、81.79%。该研究利用超声碱提工艺, 提高了裸藻蛋白提取率, 为其作为一种新型蛋白原料奠定基础。

关键词: 裸藻蛋白; 超声碱提工艺; 响应面; 结构表征; 功能特性

文章编号: 1673-9078(2025)07-220-230

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.7.0441

Alkaline Ultrasonic Extraction Optimization, Structural Characteristics, and Functional Properties of *Euglena* Protein

DING Hui^{1,2}, LI Shichang^{1,2*}, SONG Gendi³, HU Fengyang^{1,2}, CHANG Yingjie⁴, GONG Minggui¹

(1. College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000, China)
(2. Henan Food Microorganism Engineering Technology Research Center, Luoyang, Luoyang 471000, China)
(3. College of Environmental Engineering and Chemistry, Luoyang Institute of Technology, Luoyang 471000, China)
(4. Luoyang Oakebaik Biotechnology Co. Ltd., Luoyang 471600, China)

引文格式:

丁慧, 李市场, 宋根娣, 等. 裸藻蛋白的超声碱提工艺优化、结构表征及功能特性[J]. 现代食品科技, 2025, 41(7): 220-230.

DING Hui, LI Shichang, SONG Gendi, et al. Alkaline ultrasonic extraction optimization, structural characteristics, and functional properties of *Euglena* protein [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(7): 220-230.

收稿日期: 2024-04-07

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31900005; 31870093); 河南省科技攻关项目 (242102320157)

作者简介: 丁慧 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 功能性食品开发, E-mail: 383575937@qq.com

通讯作者: 李市场 (1978-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 发酵工程, E-mail: lscgam@sina.com

Abstract: The exploration of new protein sources will have a significant impact on future food development. This study examined the effects of various factors involved in alkaline ultrasonic extraction on *Euglena* protein yield by employing the single factor, Plackett-Burman, and response surface methods. UV-Vis spectroscopy, FT-IR spectroscopy, and automated amino acid analysis were adopted to evaluate the functional group composition, secondary structure, and amino acid profile of *Euglena* protein. Additionally, the functional properties, such as water absorption, oil-holding capacity, and emulsification capacity, were studied. The optimal extraction parameters are as follows: a solid-to-liquid ratio of 1:20, an ultrasonic power of 100 W, an alcohol-to-base ratio of 1:3.5, a sodium hydroxide concentration of 0.35 mol/L, an extraction temperature at 40 °C, an extraction time of 120 min, and an ultrasonic treatment time of 5 min. These conditions result in an extraction yield of 93.81%. Structural characterization reveals that the secondary structure of *Euglena* protein primarily consists of β -turns and β -sheets, accounting for 98.80% of the total structure. Essential amino acids account for 66.09% of the total composition, with hydrophobic amino acids constituting 67.81%. At 60 °C, *Euglena* protein exhibits the highest maximum water absorption, reaching up to 13.19 g/g. Meanwhile, the highest oil-holding capacity of 7.33 g/g is observed at 40 °C. *Euglena* protein demonstrates good emulsification capacity, emulsification stability, foaming capacity, and foam stability, with percentages of 34%, 64.62%, 53.90%, and 81.79%, respectively. This study utilized alkaline ultrasonic extraction to enhance the extraction yield of *Euglena* protein, laying the groundwork for its application as a novel protein source.

Key words: *Euglena* protein; alkaline ultrasonic extraction; response surface; structural characteristics; functional properties

蛋白是所有动物包括人类重要的营养素之一。世界卫生组织估计,成年人每天的平均蛋白需要量为 0.66 g/kg,而人群安全水平设定为每天 0.83 g/kg^[1]。在传统食物原料中除了豆类等少量植物的蛋白含量较高以外,大部分蛋白来自于动物性食品^[2]。因此,一直以来畜禽养殖都是食物蛋白原料的主要来源,贡献了全球蛋白摄入量的 25%,对粮食安全具有至关重要的作用^[3]。而由于环保要求和土地转化压力,畜牧业的扩张发展已经呈现不可持续的趋势^[4]。因此,未来食物供给面临的一大难题就是蛋白的供应。

裸藻是一种单细胞真核微生物,其蛋白含量约占细胞干重的 50%,且含有 8 种人体必需的氨基酸。与其他可食用蛋白相比,裸藻蛋白的生物利用率高达 79.9%,与牛奶酪蛋白相近,可以为人体提供全面的营养,增强免疫力和抵抗力等功效^[5,6]。因此,裸藻蛋白在未来食品的蛋白研究领域具有远大前景。虽然裸藻具有适宜异养培养、生长周期短、蛋白积累快、且无细胞壁等特点,便于工业化大规模培养及蛋白产品的获取^[7]。然而,裸藻中除了富含蛋白,还有脂肪酸、多糖等物质,影响裸藻蛋白的分离提取,因此选择合适的提取工艺对裸藻蛋白生产具有非常重要的实际意义^[7,9]。目前常用的藻类蛋白提取方法有水酶法、反复冻融法、高压均质技术等,虽然这些方法能够提取到蛋白,但仍存在蛋白提取不彻底、耗时长等问题^[10]。而超声波辅助提取则利用空化效应,可造成植物细胞壁及整个生物体

的破裂,增加溶质穿透力,产生的热效能增大细胞有效成分的溶解速度,从而提高提取率,缩短提取时间^[11]。为此本文选用超声碱法提取,能够进一步提升蛋白提取率,此方法操作简单,适用于大规模工业化生产。

本文以裸藻为原料,通过超声辅助碱法提取裸藻蛋白,以蛋白提取率为指标,用单因素试验和响应面试验优化提取工艺参数,探究了其参数对蛋白提取率的影响,并测定裸藻蛋白的结构及功能特性,为裸藻蛋白的深度开发利用提供了科学理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

裸藻粉,洛阳欧科拜克生物技术股份有限公司; NaOH,国药集团; HCl,洛阳昊华化学试剂有限公司; 85% 磷酸,天津市风船化学试剂科技有限公司; 考马斯亮蓝 G-250,国药集团; 无水乙醇,国药集团; 压榨葵花籽油,浙江久晟油茶科技有限公司。

UP-250/400 手提式超声波破碎仪,宁波洛尚智能科技有限公司; TGL-15B 离心机,上海安亭科学仪器厂; HH-4B 水浴锅,常州易晨仪器制造有限公司; KND 凯氏定氮仪,杭州绿博仪器有限公司; KNO-04C 消化炉,杭州绿博仪器有限公司; SHA-AB 恒温水浴振荡器,常州天瑞仪器有限公司; 754N 分光光度计,上海仪电分析仪器有限公司;

101-1A 型电热鼓风干燥箱, 北京中兴伟业世纪仪器有限公司; IRSpirit 傅里叶变换红外光谱仪, 日本 Shimadzu 公司; UV-2600 紫外可见分光光度计, 日本岛津。

1.2 试验方法

1.2.1 裸藻蛋白提取工艺流程

准确称取一定量的裸藻粉置于离心管中, 超声处理一段时间后, 加入适量的乙醇和氢氧化钠提取剂恒温水浴处理, 8 000 r/min 离心 10 min 后, 取上清即为裸藻蛋白溶液, 稀释一定倍数后采用考马斯亮蓝染色法测定蛋白浓度, 并根据公式计算出蛋白提取率^[12]。

1.2.2 单因素试验

以氢氧化钠浓度 0.15 mol/L, 醇碱比 1:5, 浸提时间 30 min, 浸提温度 30 ℃, 料液比 1:10, 超声功率 100 W, 超声时间 3 min, 为初始提取条件。考察氢氧化钠浓度 (0.05、0.20、0.35、0.50、0.65、1 mol/L), 醇碱比 (1:1、1:2、1:3、1:4、1:5), 浸提温度 (25、30、35、40、45、50、55 ℃), 浸提时间 (60、90、120、150、180 min), 料液比 (1:1、1:10、1:20、1:30、1:40), 超声功率 (40、80、120、160、200、240 W), 超声时间 (1、3、5、7、9、11 min)。

1.2.3 Plackett-Burman试验设计

根据提取工艺对氢氧化钠浓度、醇碱比、浸提温度、浸提时间、料液比、超声功率及超声时间 7 个因素进行 Plackett-Burman 试验设计。每个因素取高低两种水平, 每组试验设置 3 个平行, 因素和水平见表 1。

表 1 Plackett-Burman设计的因素和水平
Table 1 Factors and levels of Plackett-Burman design

因素	水平	
	-1	+1
A 氢氧化钠浓度/(mol/L)	0.15	0.55
B 醇碱比	3	5
C 浸提温度/℃	30	50
D 浸提时间/min	90	150
E 料液比	10	30
F 超声功率/W	80	150
G 超声时间/min	3	7

1.2.4 Box-Behnken试验设计

根据 Plackett-Burman 试验筛选出对裸藻蛋白提取率影响显著的因素, 设计响应面试验, 各因素及

水平如表 2 所示。

表 2 裸藻蛋白提取的响应面分析因素及水平
Table 2 Factors and levels for response surface analysis of
Euglena protein extraction

因素	水平		
	-1	0	1
A 料液比	1:10	1:20	1:30
B 超声功率/W	80	120	160
C 醇碱比	1:3	1:4	1:5

1.2.5 裸藻中蛋白总含量的测定

采用微量凯氏定氮法, 参照 GB 5009.5-2016 《食品安全国家标准食品中蛋白的测定》。

1.2.6 裸藻提取液中蛋白含量的测定

(1) 蛋白标准曲线的绘制: 根据裸藻蛋白特性选择了考马斯亮蓝染色法对蛋白含量进行测定; 回归方程为 $y=0.006x+0.0145$, 相关系数 $R^2=0.9973$ 。

(2) 裸藻蛋白提取率测定: 将上清液稀释到适当浓度后, 吸取 1 mL 稀释液于离心管中, 加入 5 mL 考马斯亮蓝 G-250 溶液, 在 595 nm 处测定吸光值。根据标准曲线计算裸藻蛋白浓度, 然后计算蛋白提取率。计算如公式 (1) 和公式 (2) 所示:

$$T=B\times D\times V\times 10^3$$
 (1)

式中:

B——蛋白质量浓度, μg/mL;
D——稀释倍数;
V——总体积, mL。

$$W=\frac{n}{A}\times 100\%$$
 (2)

式中:

W——蛋白提取率, %;
n——提取液中蛋白含量;
A——蛋白总含量。

1.2.7 裸藻蛋白UV-Vis吸收光谱测定

配置 0.5 mol/L 的冰醋酸溶液, 将蛋白质溶解成质量浓度为 0.01 g/mL 的溶液, 用紫外-可见分光光度计进行扫描, 扫描波长范围 200~600 nm, 以 0.5 mol/L 冰醋酸作空白^[13]。

1.2.8 裸藻蛋白的氨基酸测定

采用全自动氨基酸分析仪对裸藻蛋白进行测试^[14]。

1.2.9 FT-IR测定

参考厉荣玉等^[15]的方法, 采用 KBr 压片法, 再

通过 Peakfit Version 软件对裸藻蛋白二级结构进行分析。

1.2.10 裸藻蛋白功能特性的测定

1.2.10.1 吸水性 (WHC) 的测定

取 0.1 g 裸藻蛋白粉于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 去离子水混合均匀, 分别在 20、30、40、50、60、70 °C 下水浴 30 min, 8 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清, 称重记录数据^[16]。吸水性 (WHC) 计算如公式 (3) 所示:

$$E_1 = \frac{m_2 - m_1 - m_0}{m_0} \quad (3)$$

式中:

E_1 ——吸水性 (WHC), g/g;

m_2 ——总质量, g;

m_1 ——试管质量, g;

m_0 ——裸藻蛋白粉质量, g。

1.2.10.2 持油性 (OAC) 的测定

取 0.1 g 裸藻蛋白粉于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 葵花籽油混合均匀, 分别在 20、30、40、50、60、70 °C 下水浴 30 min, 8 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清, 称重记录数据。

持油性 (OAC) 计算如公式 (4) 所示:

$$E_2 = \frac{m_2 - m_1 - m_0}{m_0} \quad (4)$$

式中:

E_2 ——持油性 (OAC), g/g;

m_2 ——总质量, g;

m_1 ——试管质量, g;

m_0 ——裸藻蛋白粉质量, g。

1.2.10.3 裸藻蛋白起泡性 (FC) 和泡沫稳定性 (FS) 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 20 mL, 然后以 1×10^4 r/min 的速度均质 2 min。记录均质结束时的泡沫体积, 起泡性和泡沫稳定性计算如公式 (5) 和公式 (6) 所示:

$$G_1 = \frac{V_1}{V} \times 100\% \quad (5)$$

$$G_2 = \frac{V_2}{V_1} \times 100\% \quad (6)$$

式中:

G_1 ——起泡性 (FC), %;

G_2 ——泡沫稳定性 (FS), %;

V_1 ——均质结束时的泡沫体积, mL;

V ——均质前的溶液体积, mL;

V_2 ——为静置 30min 后的泡沫体积, mL。

1.2.10.4 乳化性 (EAI) 及其稳定性 (ESI) 的测定

分别配置质量分数为 0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1% 的裸藻蛋白溶液, 与葵花籽油按 3:1 的体积比混合, 在 10 000 r/min 速度下均质 2 min。在 0 min 和 30 min 时从溶液底部抽取 50 μ L 乳化液, 然后加入 5 mL 质量分数为 0.1% 的 SDS 溶液, 使其混合均匀, 在 500 nm 波长下测得 0 min (A_{500}) 和 30 min (A_{30}) 时的吸光度值^[17]。乳化性和乳化稳定性的计算如公式 (7) 和公式 (8) 所示:

$$H_1 = A_{500} \times 100\% \quad (7)$$

$$H_2 = \frac{A_{30}}{A_{50}} \times 100\% \quad (8)$$

式中:

H_1 ——乳化性 (EAI), %;

H_2 ——乳化稳定性 (ESI), %;

A_{500} ——裸藻蛋白-葵花籽油乳液在 500 nm 波长处的吸光度;

A_{30} ——裸藻蛋白-葵花籽油乳液静置 30 min 后在 500 nm 波长处的吸光度。

1.3 数据处理及分析

每次试验做三个重复, 采用 Origin 2022、Design Expert 8.0.6 软件分析处理数据及绘制图表。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果与分析

氢氧化钠溶液对蛋白提取率的影响如图 1a 所示, 随着氢氧化钠溶液浓度的升高, 裸藻蛋白的提取率呈现先升高再下降的趋势, 当氢氧化钠溶液浓度为 0.35 mol/L 时, 裸藻蛋白提取率最高为 71.82%。当氢氧化钠溶液浓度高于 0.35 mol/L 时, 蛋白的提取率降低, 可能是较高浓度的氢氧化钠使得蛋白发生变性。当氢氧化钠溶液低于 0.35 mol/L 时, 蛋白的提取率降低, 可能是因为较低浓度的氢氧化钠对蛋白分子次级键尤其是氢键破坏力低, 导致蛋白溶出量少^[18]。醇碱比对裸藻蛋白提取率影响如图 1b 所示, 随着醇碱比例的增加, 蛋白的提取率呈现先增加后降低的趋势, 当醇碱比为 1:4 时, 裸藻蛋白提取率最高, 为 81%。当醇碱比例超过 1:4 时, 裸藻蛋白提取率显著降低, 可能是提取剂中碱浓度过高使得蛋白分子之间肽键断裂, 导致蛋白提取率下降^[19]。

由图 1c 可知,随着浸提温度的升高,蛋白提取率呈现先增加后降低的趋势。当浸提温度为 40 ℃ 时,蛋白提取率最高,为 83.2%。当浸提温度高于 40 ℃ 时,蛋白的提取率降低,可能是部分易受温度影响的蛋白已经变性,也可能是浸提温度过高加速了蛋白与其他物质反应^[20]。由图 1d 可知,当浸提时间为 120 min 时,蛋白的提取率最高,为 83.75%。随着浸提时间的增加,蛋白的提取率先增加后降低,造成这种现象的原因可能是浸提时间较短会导致蛋白不能完全溶出,浸提时间过长,又会导致部分的蛋白产生溶胀或者水解,使得裸藻蛋白提取率下降^[21]。

料液比对裸藻蛋白提取率的影响如图 1e 所示,当料液比为 1:20 时,蛋白提取率最高,为 94.04%。当料液比低于 1:20 时,可能是裸藻粉末与碱液接触面少,蛋白的溶出不充分,导致蛋白的提取率较低;当料液比高于 1:20 时,蛋白的提取率不会随着料液比的增加而无限提高,造成这种现象的原因可能是蛋白溶解量达到了一定平衡,料液比过高影响了蛋白沉淀的获取,从而导致蛋白提取率降低。

由图 1f 可知,当超声功率为 120 W 时,蛋白的提取率最高,为 88.88%,随着超声功率增加裸藻蛋白的提取率总体呈现先增加后降低的趋势。当超声功率低于 120 W 时,超声波产生的机械效应较低,会使细胞破碎不完全,导致蛋白溶出率较低。当超声功率超过 120 W 时,提取率小幅度降低,超过 200 W 时,提取率会迅速降低,这可能是超声波产生的空化作用达到一定的限度后,空化作用力会使蛋白分子粘性过强,导致蛋白不能溶出;也有可能是功率过大空化效应强,导致部分蛋白变性沉淀,最终导致提取率变低^[22,23]。由图 1g 可知,随着超声时间的增加,蛋白提取率呈现先增加后降低的趋势,当超声时间为 5 min 时,蛋白的提取率达到最高,为 90.62%。当超声时间低于 5 min 时,可能是超声时间过短,蛋白溶出率较低,不利于蛋白的提取。当超声时间超过 5 min 时,可能细胞中能够降解蛋白的酶也会溶出,部分蛋白会水解,从而影响蛋白的提取,超声时间过长也会导致局部过热,使部分蛋白变性,因此选择合适的超声功率和超声时间对优化工艺至关重要^[24]。

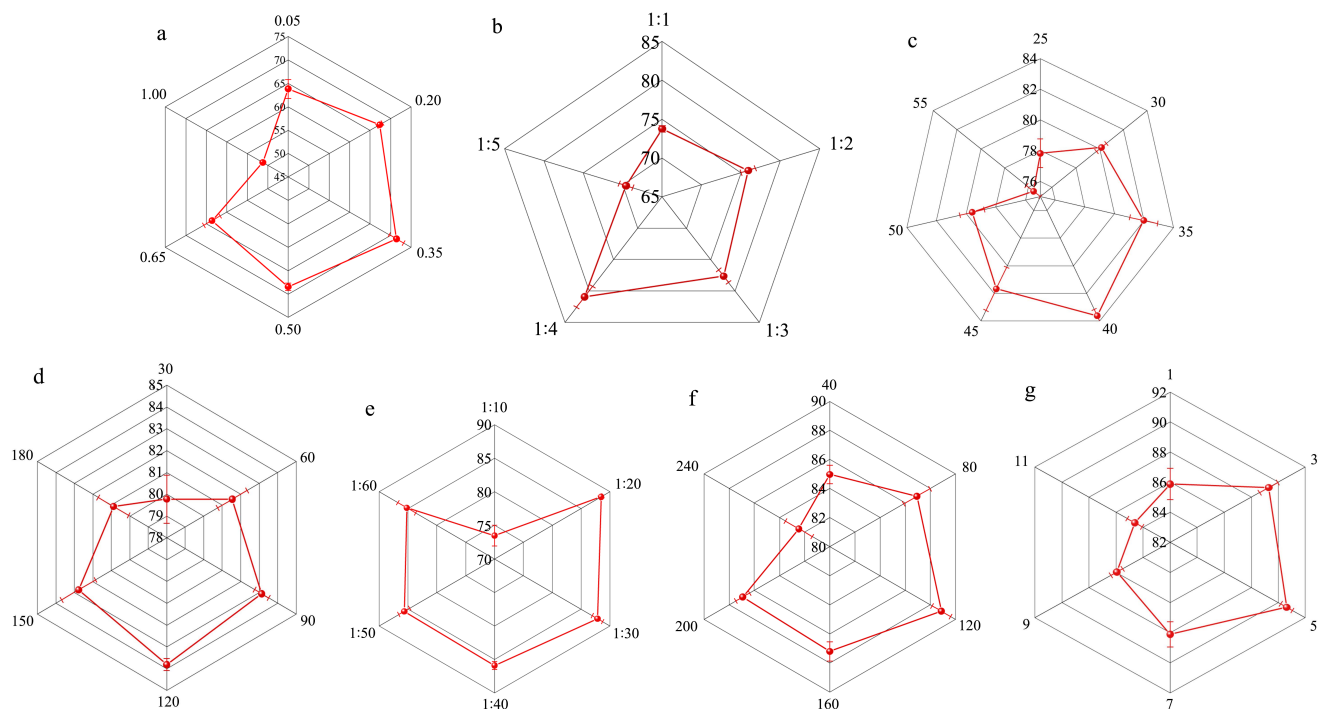


图 1 单因素对蛋白提取率的影响

Fig.1 The impact of single factors on protein extraction efficiency

注:(a) 碱浓度对裸藻蛋白提取率的影响;(b) 醇碱比对裸藻蛋白提取率的影响;(c) 浸提温度对裸藻蛋白提取率的影响;(d) 浸提时间对裸藻蛋白提取率的影响;(e) 料液比对裸藻蛋白提取率的影响;(f) 超声功率对裸藻蛋白提取率的影响;(g) 超声时间对裸藻蛋白提取率的影响。

2.2 Plackett-Burman试验结果与分析

Plackett-Burman 试验结果如表 3 所示，方差分析见表 4。

表 3 Plackett-Burman试验结果

Table 3 Plackett-Burman experimental results								
编号	A 氢氧化钠浓度/(mol/L)	B 醇碱比	C 浸提温度/℃	D 浸提时间/min	E 料液比	F 超声功率/W	G 超声时间/min	提取率/%
1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	72.10
2	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	76.41
3	-1	-1	1	-1	1	1	-1	77.73
4	1	1	-1	1	1	1	-1	78.07
5	-1	1	1	-1	1	1	1	68.12
6	-1	1	1	1	-1	-1	-1	72.10
7	1	-1	-1	-1	1	-1	1	94.64
8	1	1	1	-1	-1	-1	1	72.87
9	1	-1	1	1	1	-1	-1	95.64
10	-1	1	-1	1	1	-1	1	90.66
11	1	-1	1	1	-1	1	1	75.19
12	-1	-1	-1	1	-1	1	1	73.20

表 4 Plackett-Burman模型方差分析

Table 4 Plackett-Burman model variance analysis					
项目	平方和	df	均方	F 值	P 值
模型	894.58	7	127.80	7.33	0.036 4*
A	68.25	1	68.25	3.91	0.119 0
B	137.04	1	137.04	7.86	0.048 6*
C	39.50	1	39.49	2.26	0.206 8
D	37.90	1	37.90	2.17	0.214 4
E	348.20	1	348.20	20.00	0.011 1*
F	263.61	1	263.61	15.12	0.017 7*
G	0.08	1	0.08	0.01	0.948 5
残差	69.75	4	17.44		
总和	946.32	11			

注: *表示 $P \leq 0.01$ 显著。

由表 4 可知，7 个因素对裸藻蛋白提取率的回归方程系数显现显著性检验结果。醇碱比、料液比、超声功率对蛋白提取影响显著 ($P < 0.05$)，显著性大小依次为料液比 > 超声功率 > 醇碱比。因此选择具有显著影响的 3 个因素，醇碱比 (B)、料液比 (E)、超声功率 (F) 作为下一步响应面模型优化的研究。

2.3 Box-Behnken试验结果与分析

2.3.1 Box-Behnken试验结果与方差分析

在 Plackett-Burman 试验结果的基础上，选取料液比 (A)、超声功率 (B)、醇碱比 (C) 三个因素为自变量，以裸藻蛋白提取率为响应值，运用 Design-Expert 8.0.6 软件进行 Box-Behnken 试验设计，试验结果如表 5 所示。

表 5 裸藻蛋白提取率的响应

Table 5 Response of <i>Euglena</i> protein extraction yield					
试验号	A 料液比	B 超声功率/W	C 醇碱比	Y 蛋白提取率/%	
				Y ₁ 实际值	Y ₂ 预测值
1	0	0	0	95.51±0.71	93.59
2	0	1	-1	77.53 ± 2.36	74.20
3	-1	0	-1	76.85 ± 0.66	80.32
4	-1	-1	0	76.85 ± 2.90	76.25
5	-1	1	0	67.53 ± 1.60	67.39
6	0	0	0	92.41 ± 5.52	93.59
7	1	0	1	66.80 ± 1.64	63.32
8	0	1	1	66.11 ± 4.97	68.98
9	-1	0	1	68.20 ± 0.46	65.47
10	0	-1	1	62.50 ± 5.75	65.83
11	1	1	0	67.02 ± 4.09	67.62
12	0	0	0	90.50 ± 2.21	93.59
13	0	0	0	95.51 ± 0.84	93.59
14	0	0	0	94.03 ± 3.13	93.59
15	0	-1	-1	95.80 ± 2.31	92.93
16	1	0	-1	78.07 ± 2.89	80.79
17	1	-1	0	74.20 ± 1.07	74.34

由表 5 可知，响应值 (Y) 为 3 次试验的平均值，预测的响应值根据数学模型计算获得。通过试验设计软件确定的二次方程为： $Y=93.59-0.42A-3.90B-8.08C+0.53AB-0.65AC+5.47BC-12.60A^2-9.59B^2-8.51C^2$ 其中，Y 为裸藻蛋白的提取率，A、B 和 C 和分别为料液比、超声功率、醇碱比。回归模型中不同变量对响应值的影响变化通过 F 检验来确定。

方差分析结果如表 6 所示，此模型 $P < 0.01$ 有统计学意义，决定系数 $R^2=0.959 3$ ，说明该模型可以较为准确的反应各因素对裸藻蛋白提取率的影响。失拟项 $P=0.063 9 > 0.05$ ，表示失拟项不显著，说明该模型拟合度良好，试验方法设计合理，对响应面的变化具有较好的反映。变异系数 $4.7\% < 10\%$ ，说明所得模型与实际试验拟合程度高。通过比较各

因素的 F 值, 可依次得出对试验指标影响程度的大小, 依次排序为醇碱比 (C) > 超声功率 (B) > 料液比 (A)。根据 P 值大小, 可知模型中一次项 B 显著、C 极显著, 二次项 BC 显著, 交互项 A^2 、 B^2 、 C^2 极显著, 表明各因素之间交互效应较弱, 各因素与裸藻蛋白提取率之间不是简单的线性关系。

表 6 藻蛋白提取率的方差分析

Table 6 Variance analysis of <i>Euglena</i> protein extraction yield					
来源	平方和	自由度	均方	F 值	Prob> F
模型	2 282.35	9	253.59	18.33	0.000 5**
A-料液比	1.40	1	1.40	0.10	0.759 6
B-超声功率	121.37	1	121.37	8.77	0.021 0*
C-醇碱比	522.36	1	522.36	37.77	0.000 5**
AB	1.14	1	1.14	0.08	0.782 3
AC	1.71	1	1.71	0.12	0.735 2
BC	119.67	1	119.67	8.65	0.021 7*
A^2	668.54	1	668.54	48.33	0.000 2**
B^2	387.29	1	387.29	28.00	0.000 2**
C^2	305.10	1	305.10	22.06	0.002 2**
残差	96.82	7	13.83		
失拟	78.33	3	26.11	5.65	0.063 9
纯误差	18.50	4	4.62		
总误差	2 379.17	16			

注: * 表示 $P \leq 0.01$ 显著, ** $P \leq 0.001$ 极显著。

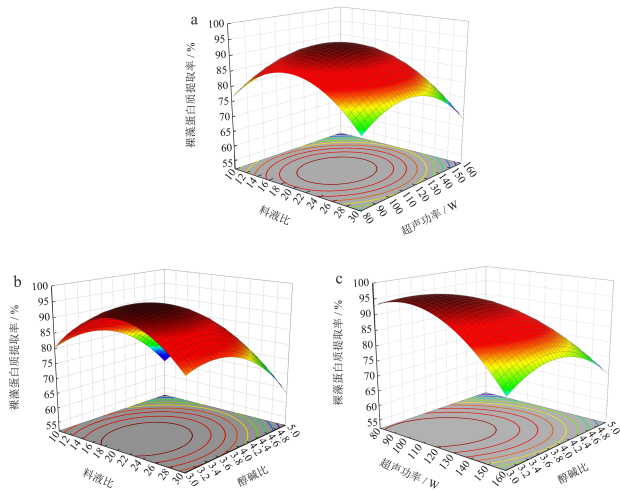


图 2 两两因素交互作用对蛋白提取率影响的响应曲面图
Fig.2 A response surface diagram was created to show how two factors interact to affect the extraction rate of *Euglena* protein

注: (a) 料液比和超声功率对蛋白提取率影响的响应曲面图; (b) 料液比和醇碱比对蛋白提取率影响的响应曲面图; (c) 超声功率和醇碱比对蛋白提取率影响的响应曲面图。

用 Box-Behnken 软件进行分析, 得到响应曲面图和等高线图。从蛋白提取工艺中通过 Plackett-Burman 试验筛选出 3 个对蛋白提取影响最大的因素, 分别为料液比、超声功率和醇碱比。通过对裸藻蛋白提取率影响的等高线和响应曲面可以看出, 三维响应曲面越陡, 说明该因素对 Y 值的影响越明显, 二维等高线越扁平, 说明该因素的交互作用越明显。由图 2 可知, 3 种因素对裸藻蛋白提取率的影响大小为醇碱比 (C) > 超声功率 (B) > 料液比 (A)。

2.3.2 验证试验

综合分析以上结果并结合回归模型, 确定蛋白提取的最佳提取工艺参数为料液比 1:21.41、超声功率 100.24 W、醇碱比 1:3.37、氢氧化钠浓度 0.35 mol/L、超声时间 5 min、浸提温度 40 ℃、浸提时间 120 min, 预测理论提取率为 96.30%。根据实际情况, 将料液比调整为 1:20, 超声功率 100 W, 醇碱比为 1:3.5, 进行验证试验。结果显示: 裸藻蛋白提取率为 93.81%, 与模型预测值相近, 说明该模型可以模拟和预测裸藻蛋白提取率的变化, 经响应面优化过后的提取条件, 与本文仅用超声提取法提取相比, 提取率提升了 45.84%。

2.4 裸藻蛋白 UV-Vis 吸收光谱分析

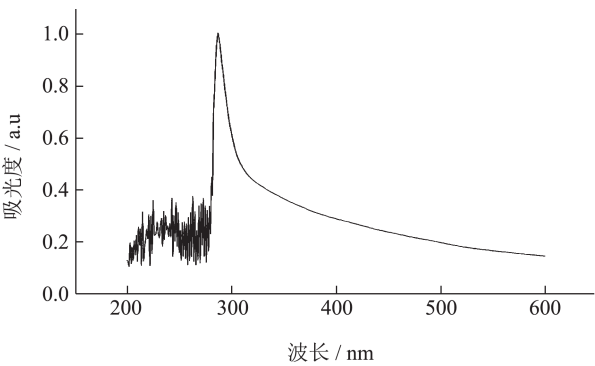


图 3 裸藻蛋白 UV-Vis 吸收光谱分析
Fig.3 Absorption spectroscopy analysis of *Euglena* proteins UV-Vis

由图 3 可知, 本研究提取到的裸藻蛋白在 287 nm 达到最大吸收峰。研究表明, 蛋白在 280 nm 处出现峰值, 是因为蛋白中含有酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸^[25]。宋林等^[26]采用泡沫分离法提取裸藻蛋白, 通过 UV-Vis 测定后, 裸藻蛋白在 230 nm 和 280 nm 处均有峰值, 蛋白在 230 nm 出现峰值是由于肽键 -C=O 的 $n-\pi^*$ 的跃迁。而本研究利用碱提超声法提取到的裸藻蛋白发现, 仅在 280 nm 处出

现了峰值，表明此方法提取到的蛋白不会出现肽键 -C=O 的 $n-\pi^*$ 的跃迁。因此，不同处理得的蛋白 UV-Vis 吸收光谱，一般不会改变其峰值位置。

2.5 裸藻蛋白的氨基酸分析

由表 7 可知，裸藻蛋白中含有人体所需要的 8 种必需氨基酸，其中缬氨酸的含量最高，为 22.14%，其具有调节血糖、修补组织、促进脑细胞代谢等功能^[27]。此外，裸藻蛋白中还含有婴儿所需的必需氨基酸组氨酸，研究表明组氨酸也能够起到改善消化吸收能力、维持酸碱平衡、提高免疫的作用^[28]。由于裸藻蛋白中氨基酸种类丰富、营养价值高，所以裸藻蛋白是一种具有巨大潜力的新型蛋白原料。

表 7 裸藻蛋白的氨基酸分析
Table 7 Amino acid analysis of *Euglena* protein

氨基酸名称	含量/(mg/kg)	占比/%
丙氨酸	42.73	3.20
半胱氨酸	0.01	0.00
精氨酸	37.25	2.79
天冬酰胺	0.56	0.04
谷氨酸	74.44	5.58
谷氨酰胺	0.30	0.02
甘氨酸	99.45	7.45
组氨酸*	31.93	2.39
异亮氨酸*	133.07	9.97
天冬氨酸	36.02	2.70
亮氨酸*	175.30	13.13
赖氨酸*	86.31	6.47
甲硫氨酸*	13.27	0.99
苯丙氨酸*	106.97	8.01
脯氨酸	58.50	4.382
丝氨酸	23.74	1.78
苏氨酸*	39.43	2.95
色氨酸*	0.31	0.02
酪氨酸	79.64	5.97
缬氨酸*	295.57	22.14
必需氨基酸*	882.17	66.09
疏水氨基酸	905.06	67.81
总氨基酸	1 334.79	100.00

2.6 FT-IR分析

由图 4 可知，裸藻蛋白有许多特殊的吸收峰，在 $1\,651\text{ cm}^{-1}$ 处酰胺 I 带位置，出现了蛋白典型肽键 ($\text{O}=\text{C}-\text{N}-\text{C}$) 的伸缩振动峰，在酰胺 II 带位置出

现了 N-H 键的弯曲构像，在酰胺 III 带和酰胺 A 带出现了 N-H 的伸缩振动峰，在 $1\,080\text{ cm}^{-1}$ 和 804 cm^{-1} 出现了 C-H 面外弯曲振动，在酰胺 B 带出现了 -NH 和 -OH 伸缩振动，其中酰胺 I 带 ($\text{Amide I } 1\,700\sim 1\,600\text{ cm}^{-1}$) 主要伴随着蛋白二级结构的改变^[29,30]。运用 Peakfit Version 软件进行分析，得到了酰胺 I 带拟合图谱，如图 5 所示，每个峰代表了 FR-IT 谱图在 $1\,700\sim 1\,600\text{ cm}^{-1}$ 的二阶导数拟合，通过此图计算裸藻蛋白的二级结构含量。

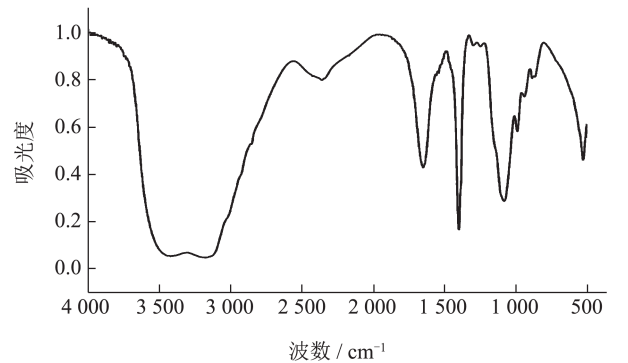


图 4 裸藻蛋白的 FT-IR 谱图
Fig.4 FT-IR spectra of *Euglena* protein

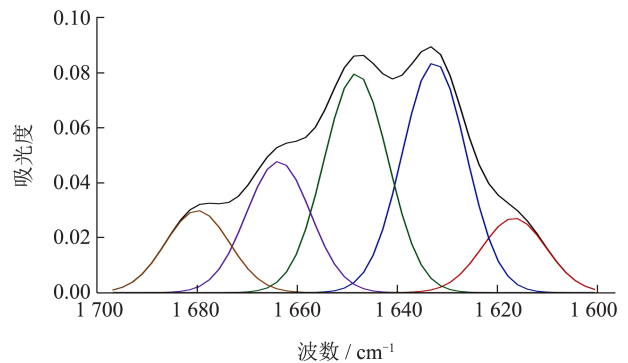


图 5 裸藻蛋白的酰胺 I 带的拟合谱图
Fig.5 Fitting map of amide I of *Euglena* protein

裸藻蛋白二级结构相对含量由表 8 可知，主要以 β -转角和 β -折叠为主，占 98.80%，仅有少数的 α -螺旋。研究表明，二级结构的变化易受到氢键的影响，其中 α -螺旋的稳定性主要是受到羰基氧和亚氨基酸之间的分子内氢键的影响， β -折叠的稳定性主要是受到多肽链间的氢键的影响， β -转角是由伸展的肽链经 180°U 型回折形成的，无规则卷曲则是未折叠的构像^[31]。Minjian 等^[32]通过超声提取茶蛋白研究发现，与传统的碱法提取相比，经过超声后蛋白的 β -转角和 β -折叠结构增加，可能是因为超声产生的空化和机械作用破坏了多肽链上 α -螺旋结构中糖基和氨基之间的氢键，最终导致 α -螺旋结构含量降低，

β -结构含量增加^[33]。本文 FT-IR 结果与 Qu 等^[34]选用超声提取蛋白的研究结论一致,表明超声波可能会降低蛋白的分子间和分子内氢键结合,从而影响蛋白的结构。

表 8 裸藻蛋白二级结构的相对含量
Table 8 Relative content of secondary structure of *Euglena* protein

二级结构	β -折叠	α -螺旋	β -转角	无规则卷曲
相对含量/%	41.90±0.03	1.20±0.02	56.90±0.05	0.00

2.7 裸藻蛋白功能特性测定

本文测定了温度对裸藻蛋白吸水性的影响,结果如图 6a 所示,裸藻蛋白的吸水性随着温度升高呈先增加后降低的趋势,当温度为 60 ℃时,蛋白的吸水能力最大,为 13.19 g/g。随着温度的升高,可能会导致分子间隙被延长拉伸,使吸水能力变强。当温度超过 60 ℃,部分蛋白可能发生了变性,也有可能是温度过高导致一些亲水基团断裂造成的,最终导致吸水能力下降^[35]。温度对裸藻蛋白持油性的影响如图 6b 所示,随着温度逐渐升高,裸藻蛋白的持油性先增加后降低。当温度为 40 ℃时,裸藻蛋白持油性最大,为 7.33 g/g。随着温度的升高,可能会导致粘性降低,更有利于蛋白对油的吸收,从而增加裸藻蛋白的持油性。当温度高于 60 ℃时,可能导致部分蛋白会变性,使一些能够吸附油的基团发生断裂或者水解,最终导致裸藻的持油性降低^[35]。蛋白的溶解性是指蛋白表面极性基团与水分子相互作用后,蛋白在水中分散的程度^[36]。为了进一步探明裸藻蛋白作为新型蛋白原料的应用潜力,对蛋白功能特性进行研究,结果表明,裸藻蛋白最大的吸水性为 13.19 g/g,最大的持油性为 7.33 g/g,且吸水性和持油性在不同的温度下有变化,吴萍等^[37]研究表明,合适的吸水性和持油性可以在食品加工中用于改善产品的口感与风味。

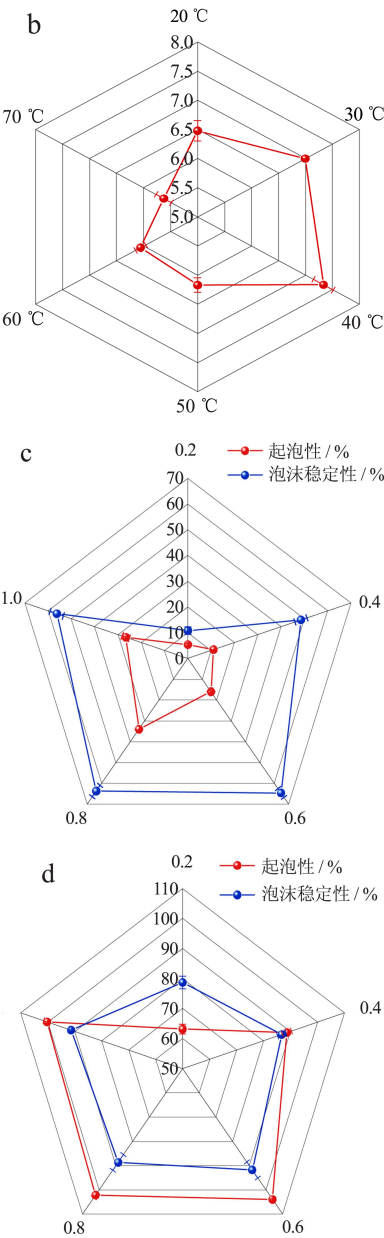
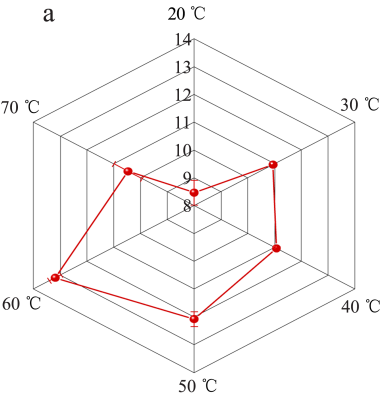


图 6 蛋白功能特性

Fig.6 Protein functional characteristics

注:(a)不同温度对裸藻蛋白吸水性的影响;(b)不同温度对裸藻蛋白持油性的影响;(c)不同浓度裸藻蛋白的起泡性及泡沫稳定性;(d)不同浓度裸藻蛋白的乳化性及乳化稳定性。

本文测定了不同质量浓度下裸藻蛋白的起泡性及泡沫稳定性,结果如图 6c 所示,裸藻蛋白质量分数为 0.8% 时,起泡性达到最高,为 34%。裸藻蛋白质量分数在 0.6% 时,泡沫稳定性最高为 64.62%。随着裸藻蛋白量浓度的增加,裸藻蛋白的起泡性和泡沫稳定性都呈现先增后降的趋势,可能是因为高浓度液体,在高速搅拌的情况下分子间的作用力增强,导致表面张力降低,与更多气体形成了稳定

的起泡^[38]。如图 6d 所示,裸藻蛋白的乳化性随着裸藻蛋白质量分数的增加呈现先增加后降低的趋势。随着蛋白质量分数的增加,可能会导致界面厚度膜增加,从而增强了乳化性能^[39]。当蛋白质量分数逐渐升高,乳化能力不再持续的上升,可能是因为参与界面相互作用的蛋白数量达到饱和。对裸藻蛋白乳化性及乳化稳定性研究发现,当裸藻蛋白质量分数为 0.6% 时,其乳化性及乳化稳定性分别为 53.90% 和 81.79%,比菜籽粕贮藏蛋白高出 11.90% 和 31.79%,具有良好的乳化性及乳化稳定^[40]。Li 等^[41]研究表明,良好的乳化性及乳化稳定性,能够增加产品的细腻度,也可做乳化剂助剂。

3 结论

本文采用响应面法对裸藻提取工艺的优化,以蛋白提取率为指标,得到最佳的提取条件为:料液比 1:20、超声功率 100 W、醇碱比 1:3.5、氢氧化钠浓度 0.35 mol/L、超声时间 5 min、浸提温度 40 °C、浸提时间 120 min,在此条件下得到的提取率为 93.81%,实际提取率与预测值接近,且与单纯超声提取法相比,提升了 45.84%,表明响应面法可以有效用于优化蛋白提取条件,从而提高裸藻蛋白的产率。制备的裸藻蛋白二级结构主要以 β -转角和 β -折叠为主,必需氨基酸含量为 66.09%,最大吸水力为 13.19 g/g,最大持油力为 7.33 g/g,乳化性、乳化稳定性、起泡性、泡沫稳定性分别为 34%、64.62%、53.90%、81.79%。以上结果均表明裸藻蛋白具有良好的功能性质及稳定蛋白结构。本研究的开展为裸藻蛋白作为一种新型蛋白原料提供数据支持与科学依据,有望缓解蛋白资源短缺问题。

参考文献

- [1] WOLFE R R, CIFELLI A M, KOSTAS G, et al. Optimizing protein intake in adults: interpretation and application of the recommended dietary allowance compared with the acceptable macronutrient distribution range [J]. *Advances in Nutrition*, 2017, 8(2): 266-275.
- [2] ELMADFA I, MEYER L A. Animal proteins as important contributors to a healthy human diet [J]. *Annual Review of Animal Biosciences*, 2017, 5(1): 111-131.
- [3] HUA K, COBCROFT J M, COLE A, et al. The Future of aquatic protein: implications for protein sources in aquaculture diets [J]. *One Earth*, 2019, 1(3): 316-329.
- [4] PHILIP T, HELEN G, EVA W. Alternative sources of protein for food and feed [J]. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 2023, 62: 101277.
- [5] KADAM S U, ÁLVAREZ C, TIWARI B K, et al. Extraction and characterization of protein from Irish brown seaweed *ascophyllum nodosum* [J]. *Food Research International*, 2017, 99: 1021-1027.
- [6] MATSUMOTO T, INUI H, MIYATAKE K, et al. Comparison of nutrients in euglena with those in other representative food sources [J]. *Eco-Engineering*, 2009, 21(2): 81-86.
- [7] INWONGWAN S, KRUGER J N, RATCLIFFE G R, et al. Euglena central metabolic pathways and their subcellular locations [J]. *Metabolites*, 2019, 9(6): 115-139.
- [8] JOHANAN R E, ALICIA C P M, JOSE A R, et al. Algae as a potential source of protein meat alternatives#13 [J]. *Frontiers in Nutrition*, 2023, 10: 1254300.
- [9] CALLONI R D, MUCHUT R J, GARAY S E, et al. Functional and structural characterization of an endo- β -1,3-glucanase from *Euglena gracilis* [J]. *Biochimie*, 2022, 208: 117-128.
- [10] 孟丹阳,杜艳,陈复生.微藻中蛋白的提取方法研究进展 [J]. *食品与发酵工业*, 2023, 49(21): 346-357.
- [11] 冯拓,李超,单培,等.超声波辅助碱提香菇柄中水溶性蛋白的工艺 [J]. *食品工业*, 2019, 40(7): 16-20.
- [12] 樊世萌,刘浩,欧阳敬禹,等.青稞酒糟中蛋白的提取工艺 [J]. *湖北农业科学*, 2022, 61(18): 169-172.
- [13] 孙乾,张爱琴,薛雨菲,等.化学改性对核桃谷蛋白结构表征及功能特性的影响 [J]. *食品科学*, 2019, 40(20): 87-93.
- [14] 帕尔哈提·柔孜,古丽米热·阿巴拜克日,刘源,等.牛骨髓蛋白及其碱性蛋白酶解物的功能特性比较 [J]. *现代食品科技*, 2024, 40(5): 43-52.
- [15] 厉荣玉,厉红,郑鹏,等.酪蛋白 GYLEQ 抗氧化肽——钙螯合物的制备、表征及功能特性 [J]. *食品与机械*, 2023, 39(2): 37-44.
- [16] 曹天丽,郝巨辉,李卫东.蛋白桑叶中蛋白提取工艺优化及 6 种蛋白酶酶解物体外降血糖活性分析 [J]. *食品工业科技*, 2023, 44(12): 232-241.
- [17] 李舒婷,齐薇燕,白鹏丽,等.吊干杏杏仁蛋白功能特性和结构特性 [J]. *食品研究与开发*, 2024, 45(2): 87-95, 102.
- [18] 杨文清,罗凯,陈耀兵.山桐子蛋白提取工艺优化及功能特性研究 [J]. *中国粮油学报*, 2024, 39(3): 89-97.
- [19] 林彬彬,唐旭,汪少芸.龙须菜蛋白的提取及其功能性质研究 [J]. *中国食品学报*, 2018, 18(12): 137-143.
- [20] 贾润红.油牡丹籽粕蛋白提取工艺优化及其抗氧化活性研究 [J]. *中国食品添加剂*, 2023, 34(12): 42-50.
- [21] 梁杰,汪秀妹,杨艺伟,等.茶渣蛋白的提取及酶解产物抗氧化性质研究 [J]. *食品科技*, 2020, 45(9): 214-220.
- [22] 芦江会,陈跃文,付晶晶,等.超声辅助酶解对龙头鱼蛋白肽理化性质及风味特性的影响 [J]. *食品与机械*, 2023, 39(11): 38-44.
- [23] 毕雅雯,刘晶,蒋艳,等.超声处理辅助大豆分离蛋白改善

- 蛋黄乳化性[J].食品与生物技术学报,2022,41(1):60-67.
- [24] 张昊伟,伍娟,辛孟瑶,等.超声协同TG酶处理乳清蛋白/马铃薯蛋白水解物复合凝胶的特性[J].现代食品科技,2023,39(8):148-155.
- [25] LAVRINENKO A I, HOLYAVKA G M, CHERNOV E V, et al. Second derivative analysis of synthesized spectra for resolution and identification of overlapped absorption bands of amino acid residues in proteins: Bromelain and ficin spectra in the 240-320 nm range [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2020, 227(C): 117722.
- [26] 宋林,张炜,荆永康,等.裸藻蛋白泡沫分离的工艺优化及功能特性分析[J].精细化工,2023,40(6):1340-1349.
- [27] 夏春秋,万发春,刘磊,等.缬氨酸的生物学功能及其在畜禽日粮中的应用[J].畜牧兽医学报,2023,54(11):4502-4513.
- [28] 赵波.组氨酸对幼建鲤消化吸收功能、抗氧化能力和免疫功能的影响[D].雅安:四川农业大学,2011.
- [29] ORHAN-YANIKAN E, GÜLSEREN G, AYHAN K. Protein profile of bacterial extracellular polymeric substance by Fourier transform infrared spectroscopy [J]. Microchemical Journal, 2020, 156: 104831.
- [30] WOJNAROWSKA-NOWAK R, POLIT J, SHEREGII M E. Interaction of gold nanoparticles with cholesterol oxidase enzyme in bionanocomplex-determination of the protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy [J]. Journal of Nanoparticle Research: An Interdisciplinary Forum for Nanoscale Science and Technology, 2020, 22(4): 1374-1791.
- [31] 薛艾莲,李春翼,王启明,等.超声处理对麦醇溶蛋白/芦丁相互作用及结构特性的影响[J].食品科学,2022,43(7):45-51.
- [32] MINJIAN Q, NANNAN W, JIAMIN P, et al. Ultrasound-assisted reverse micelles extraction extraction and characterization of tea protein from tea residue [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2022, 103(8): 1-9.
- [33] SHIHUA K, JIAN Z, XIAOBING G, et al. Effects of ultrasonic treatment on the structure, functional properties of chickpea protein isolate and its digestibility *in vitro* [J]. Foods, 2022, 11(6): 880-893.
- [34] QU W, FAN W, FENG Y, et al. Preparation of heat-sensitivity proteins from walnut meal by sweep frequency ultrasound-assisted alkali extraction [J]. Journal of Food Quality, 2021, 1: 9478133-9478145.
- [35] RESENDIZ-Vazquez J, ULLOA J, URÍAS-Silvas J, et al. Effect of high-intensity ultrasound on the technofunctional properties and structure of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed protein isolate [J]. Ultrasonics-Sonochemistry, 2017, 37: 436-444.
- [36] 李闪闪,刘哲,职兰懿,等.新型物理改性技术改善植物蛋白加工特性研究进展[J].中国食品学报,2023,23(11):413-422.
- [37] 吴萍,周际松,邓乾春,等.核桃蛋白的结构、营养价值、制备、功能特性及在食品中的应用[J].食品科学,2024,45(15):329-337.
- [38] 张燕鹏,张曼君,刁云春,等.复合米糠蛋白-卵白蛋白的起泡特性及相关机理分析[J].食品科学,2022,43(12):81-86.
- [39] 李艳,李啸天,郭文渊,等.椰麸组分蛋白的氨基酸组成、结构与乳化性分析[J].热带作物学报,2022,43(3):644-652.
- [40] 姜绍通,潘牧,郑志,等.菜籽粕贮藏蛋白制备及功能性质研究[J].食品科学,2009,30(8):29-32.
- [41] LI W Y, YANG H R, COLDEAT E, et al. Modification of structural and functional characteristics of brewer's spent grain protein by ultrasound assisted extraction [J]. Food Science and Technology, 2021, 139: 110582-110591.