

DOI: 10.12161/j.issn.1005-6521.2025.02.016

泡沫分离刚毛藻蛋白工艺优化及其功能特性分析

马琰彬, 张炜*, 隋成博, 荆永康, 赵鹤然, 孙鹏宇
(青海师范大学 化学化工学院, 青海 西宁 810008)

摘要: 为探究泡沫分离刚毛藻蛋白条件, 以回收率和富集比为指标, 单因素试验为基础, 采用响应面法对 pH 值、料液比、温度、载液量 4 个因素进行优化, 得到最佳刚毛藻蛋白泡沫分离工艺优化条件为料液比 5:1 (g/L)、载液量 250 mL、温度 35 °C、pH 4.9, 在此条件下刚毛藻蛋白回收率为 87.74%, 富集比为 1.46。分离出的刚毛藻蛋白持水性和持油量分别在 20 °C 和 50 °C 时最大, 为 3.32 g/g 和 9.27 g/g。刚毛藻蛋白乳化能力和乳化稳定性呈先上升后下降趋势, 在质量分数为 1.0% 时最佳; 起泡性和泡沫稳定性呈先上升后下降趋势, 在质量分数为 0.8% 时最佳。傅里叶变换红外光谱和紫外图谱显示, 刚毛藻蛋白在 230 nm 和 280 nm 处有特征吸收峰, 二级结构 β -转角占比最大, 为 33.48%。蛋白中氨基酸总量可达 422.453 mg/g, 谷氨酸含量最高, 占 15.03%; 必需氨基酸占 31.35%; 疏水氨基酸占 38.98%。
关键词: 泡沫分离; 刚毛藻蛋白; 分离提纯技术; 功能特性; 结构分析

Optimization of Foam Separation Process of *Cladophora* Protein and Analysis of Functional Characteristics

MA Yanbin, ZHANG Wei*, SUI Chengbo, JING Yongkang, ZHAO Heran, SUN Pengyu

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

Abstract: In order to explore the conditions for foam separation of *Cladophora* protein, the recovery rate and enrichment ratio were used as indicators. Based on the single factor experiment, the response surface method was used to optimize the four factors of pH value, solid-to-liquid ratio, temperature, and liquid loading. The optimum conditions for the foam separation process of *Cladophora* protein were obtained as follows: solid-to-liquid ratio of 5:1 (g/L), liquid loading of 250 mL, temperature of 35 °C, and pH of 4.9. Under these conditions, the recovery rate of *Cladophora* protein was 87.74%, and the enrichment ratio was 1.46. The maximum water holding capacity and oil holding capacity of the isolated *Cladophora* protein were 3.32 g/g and 9.27 g/g at 20 °C and 50 °C, respectively. The emulsifying property and emulsion stability of *Cladophora* protein increased first and then decreased, and the best mass fraction was 1.0%. The foaming property and foam stability increased first and then decreased, and the best mass fraction was 0.8%. Fourier transform infrared and ultraviolet spectra showed that the *Cladophora* protein had characteristic absorption peaks at 230 nm and 280 nm, and the secondary structure β -turn accounted for the largest proportion of 33.48%. The total amount of amino acids in the protein was 422.453 mg/g, and the content of glutamic acid was the highest, accounting for 15.03%. The essential amino acids accounted for 31.35%, and hydrophobic amino acids accounted for 38.98%.

Key words: foam separation; *Cladophora* protein; separation and purification technology; functional property; structural analysis

引文格式:

马琰彬, 张炜, 隋成博, 等. 泡沫分离刚毛藻蛋白工艺优化及其功能特性分析[J]. 食品研究与开发, 2025, 46(2): 119-128.

MA Yanbin, ZHANG Wei, SUI Chengbo, et al. Optimization of Foam Separation Process of *Cladophora* Protein and Analysis of Functional Characteristics[J]. Food Research and Development, 2025, 46(2): 119-128.

基金项目: 青海省科技计划项目(2021-SF-139)

作者简介: 马琰彬(1999—), 男(汉), 硕士研究生, 研究方向: 天然产物分离与提取。

*通信作者: 张炜(1972—), 女, 教授, 研究方向: 天然产物分离与提取。

目前,随着世界人口的不断增长,人们对动物源性食物需求量不断增加,传统的饲料已供不应求,所以替代饲料被广泛关注^[1]。而替代饲料想要达到传统饲料的各项要求,其各种生物质成分需达到一定条件,如作为饲料的必要条件是营养丰富,能提供动物所需要的蛋白质、脂肪、碳水化合物、矿物质等同时,还要具有经济适用、易于吸收等特点。因藻类具有生长快、分布广、适应力强等优点,所以其作为饲料的一种替代产品在众多植物中脱颖而出^[2-3]。有超过70%的水覆盖在地球表面,为很多水生植物提供了广泛的栖息地^[4],其中就包括藻类,与很多陆生植物不同,它可大面积生长在河流、湖泊甚至是水坑中,无需额外的水源就可以大面积生长繁殖,这也使其成为一种经济实惠并且来源广泛、可持续的资源,长期以来备受研究者关注。

刚毛藻(*Cladophora*)属刚毛藻科刚毛藻属,广泛分布于亚洲、非洲等地^[5]。它以水华形式成为“生态系统工程师”以及富营养化指标^[6-7],对多种污染物有良好的吸附和降解效果^[8]。刚毛藻为一年或多年生,是一种绿色的丝状、分支状藻类,分支为互生、对生型。细胞壁厚,无黏鞘膜,叶尖窄小,并且质地粗糙^[9];而且细胞较大,呈圆柱体状。刚毛藻一般附着在其他植物上。刚毛藻因其细胞壁厚,提取难度较高,所以对于刚毛藻蛋白提取纯化的研究较少。破壁方法通常分为两种:物理法和化学法。物理方法一般为机械粉碎破壁法、超声破壁法等,其中机械粉碎破壁法使用率较高,但在破碎过程中温度升高,可能会导致提取物活性破坏^[10]。高压细胞破碎机通过泵吸加压且经过特定工作区域后,物料瞬间失压高速喷出,碰撞在碰撞环上,达到破碎效果,适用于细胞壁厚、物料较浓的样品破碎,该方法相较于其他方法可以较好地保留微藻中蛋白质^[11]。泡沫分离法采用界面化学表面吸附,利用泡沫作分离介质分离或富集具有表面活性的物质,向溶液中通入空气产生泡沫,表面活性物质依附在气液界面随泡沫鼓出^[12],然后进行消泡,达到表面活性物质与液相分离的效果,对蛋白质的纯化分离具有显著效果^[13],是一种具有设备简洁、操作简单、耗能低、环保、效率高等优点的分离技术,目前广泛应用于微藻、天然有机产物、矿物等的分离^[14-16]。

本文以分离自青海省海东市柳湾湿地公园的刚毛藻为原料,采用泡沫分离提取,以回收率和富集比为参考指标,单因素试验为基础,经响应面法得优化提取条件,并测定刚毛藻蛋白功能特性、结构等,以期刚毛藻的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

刚毛藻:青海省海东市柳湾湿地公园河道;牛血清

白蛋白标准品、考马斯亮蓝 G250(分析纯):上海源叶生物科技有限公司;十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)(分析纯)、大豆油:武汉皓晟商贸有限公司;石油醚、无水乙醇、氢氧化钠、盐酸、磷酸(均为分析纯):利安隆博华(天津)医药化学有限公司。

1.2 仪器与设备

TUBE-MILL 100 粉碎机、RCT 磁力搅拌器:IKA(广州)仪器设备有限公司;SYN THWARE E104524 索氏提取器、UH-24 高压细胞破碎机:永联生物科技(上海)有限公司;PB-10 酸度计:赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;H1850 高速离心机:湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;VFD-2000 冷冻干燥机:北京博医康实验仪器有限公司;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;IRSpirit 傅里叶变换红外光谱仪:日本 Shimadzu 公司;Biochrom30+ 氨基酸分析仪:英国百康公司。

泡沫分离装置由青海师范大学天然产物化学研究实验室自制,结构见图1。

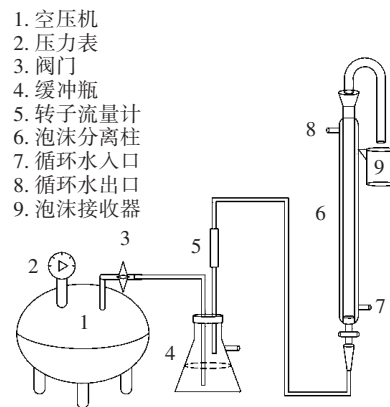


图1 泡沫分离装置

Fig.1 Foam separation device

1.3 刚毛藻蛋白泡沫分离

刚毛藻经过清洗、分离、冷冻干燥等处理,采用索氏提取法除去刚毛藻中的脂质,然后对除脂后的刚毛藻进行过筛处理得到刚毛藻粉,再配制不同料液比的刚毛藻液利用高压细胞破碎机(4×10^7 Pa, 2 min)对刚毛藻进行破壁处理,然后碱溶(pH10.0,温度为 50°C ,时间为2 h),离心(8×10^3 r/min, 10 min),调节pH值后进行泡沫分离,得到刚毛藻蛋白液,冷冻干燥得刚毛藻蛋白粉。刚毛藻蛋白的回收率和富集比计算公式如下。

$$R = \frac{C_f V_f}{C_0 V_0} \times 100 = \frac{C_f V_f}{C_f V_f + C_s V_s} \times 100$$

$$E = \frac{C_f V_0}{C_f V_f + C_s V_s}$$

式中: R 为回收率,%; E 为富集比; V_0 为初始蛋白液体积,mL; V_f 为泡沫层蛋白液体积,mL; V_s 为残留蛋

白液体积, mL; C_0 为初始蛋白液中蛋白质量浓度, g/L; C_f 为泡沫层蛋白液中蛋白质量浓度, g/L; C_s 为残留蛋白液中蛋白质量浓度, g/L。

1.4 单因素试验

1.4.1 pH 值对刚毛藻蛋白泡沫分离的影响

在料液比为 10.0:1 (g/L)、温度为 30 °C、载液量为 200 mL 的条件下, 以回收率和富集比为指标, 探究 pH 值 (4.5、5.0、5.5、6.0、6.5) 对刚毛藻蛋白泡沫分离的影响。

1.4.2 料液比对刚毛藻蛋白泡沫分离的影响

在 pH 值为 5.0、温度为 30 °C、载液量为 200 mL 的条件下, 以回收率和富集比为指标, 探究料液比 [5.0:1、7.5:1、10.0:1、12.5:1、15.0:1 (g/L)] 对刚毛藻蛋白泡沫分离的影响。

1.4.3 温度对刚毛藻蛋白泡沫分离的影响

在 pH 值为 5.0、料液比为 10.0:1 (g/L)、载液量为 200 mL 的条件下, 以回收率和富集比为指标, 探究温度 (25、30、35、40、45 °C) 对刚毛藻蛋白泡沫分离的影响。

1.4.4 载液量对刚毛藻蛋白泡沫分离的影响

在 pH 值为 5.0、料液比为 10.0:1 (g/L)、温度为 30 °C 的条件下, 以回收率和富集比为指标, 探究载液量 (200、225、250、275、300 mL) 对刚毛藻蛋白泡沫分离的影响。

1.5 响应面试验设计

根据单因素试验结果, 设计响应面 Box-Behnken 优化试验, 以回收率和富集比为响应值。试验设计见表 1。

表 1 响应面因素水平设计

Table 1 Response surface factor level design

水平	因素			
	A pH 值	B 料液比/(g/L)	C 温度/°C	D 载液量/mL
-1	4.5	5.0:1	25	200
0	5.0	7.5:1	30	225
1	5.5	10.0:1	35	250

1.6 刚毛藻蛋白功能性测定

1.6.1 刚毛藻蛋白持水量

在离心管中分别准确称量 6 份 0.05 g 刚毛藻蛋白粉, 加 5 mL 蒸馏水, 在不同温度 (20、30、40、50、60、70 °C) 下水浴加热 1 h, 3 000 r/min 离心 15 min, 除上清液后称沉淀质量。持水量计算公式如下。

$$w = \frac{m_2 - m_1}{m}$$

式中: w 为持水量, g/g; m 为样品质量, g; m_1 为样品和离心管的总质量, g; m_2 为沉淀和离心管的总质量, g。

1.6.2 刚毛藻蛋白持油量

在离心管中分别准确称量 6 份 0.05 g 刚毛藻蛋白粉, 加 5 mL 豆油, 在不同温度 (20、30、40、50、60、

70 °C) 下水浴加热 1 h, 3 000 r/min 离心 15 min, 除上清液后称沉淀质量。持油量计算公式如下。

$$O = \frac{m_2 - m_1}{m}$$

式中: O 持油量, g/g; m 样品质量, g; m_1 样品和离心管的总质量, g; m_2 沉淀和离心管的总质量, g。

1.6.3 刚毛藻蛋白起泡性和泡沫稳定性

准确称量 0.04、0.08、0.12、0.16、0.20 g 刚毛藻蛋白粉并分别加 20 mL 蒸馏水, 配制成不同质量分数的刚毛藻蛋白溶液, 10 000 r/min 均质 2 min, 均质结束立即测量泡沫体积, 起泡性计算公式如下。

$$t = \frac{V_1}{V} \times 100$$

式中: t 为起泡性, %; V 为均质前的溶液体积, mL; V_1 为均质结束时的泡沫体积, mL。

均质结束后静置 30 min 测量泡沫体积, 测定泡沫稳定性, 计算公式如下。

$$t_s = \frac{V_2}{V_1} \times 100$$

式中: t_s 为泡沫稳定性, %; V_1 均质结束时泡沫体积, mL; V_2 均质结束静置 30 min 后的泡沫体积, mL。

1.6.4 刚毛藻蛋白乳化能力和乳化稳定性

准确称量 0.08、0.12、0.16、0.20、0.24 g 刚毛藻蛋白粉并分别加 20 mL 蒸馏水, 配制成不同质量分数的刚毛藻蛋白溶液, 再分别加入 10 mL 大豆油, 10 000 r/min 均质 2 min。均质结束立即吸取底部乳液 20 μ L, 加 5 mL SDS 水溶液 (质量分数 0.1%)。以质量分数为 0.1% 的 SDS 水溶液为空白对照, 测其在 500 nm 处吸光度。乳化能力计算公式如下。

$$e = A_{500} \times 100$$

式中: e 为乳化能力, %; A_{500} 为乳液在 500 nm 波长处吸光度。

均质后的乳液静置 30 min, 测定静置 30 min 后的乳液在 500 nm 处吸光度。乳化稳定性计算公式如下。

$$e_s = \frac{A_{30}}{A_{500}} \times 100$$

式中: e_s 为乳化稳定性, %; A_{30} 为乳液在静置 30 min 后在 500 nm 波长处吸光度; A_{500} 为乳液在 500 nm 波长处吸光度。

1.7 傅里叶变换红外光谱 (Fourier transform-infrared spectroscopy, FT-IR) 测定

通过傅里叶变换红外光谱仪 (KBr 压片法) 测定刚毛藻蛋白结构, 用 Peakfit Version 软件对其进行二级结构分析, 然后采用积分面积计算各二级结构的相对含量。

1.8 紫外可见分光光度 (ultraviolet-visible spectroscopy, UV-Vis) 分析

用 0.5 mol/L 醋酸水溶液配制 2 g/L 刚毛藻蛋白溶

液,以 0.5 mol/L 冰醋酸为空白,通过双光束紫外-可见分光光度计在波长为 200~400 nm 进行扫描。

1.9 氨基酸测定

采用氨基酸分析仪对刚毛藻蛋白进行测定。缓冲液流速 20 mL/h,反应流速 10 mL/h,分离柱 Na 型阳离子树脂层析柱,长度直径 200 mm×4.6 mm,紫外检测波长 570、440 nm;柱温:55~65~77 °C 程序升温,反应槽温度 138 °C,进样量 50 μL;以柠檬酸钠缓冲液作缓冲体系(pH 值为 3.20、4.25、6.45);0.04 mol/L 氢氧化钠作再生溶液。氨基酸在分离柱分离后与茚三酮反应,生成物可被分光光度计检出,从而得到氨基酸浓度。

1.10 数据处理

试验数据用 Office Excel2010 整理分析;采用 Design Expert 13 进行响应面设计与回归分析;Origin 2010. Peakfit Version 等软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 不同 pH 值的影响

pH 值对刚毛藻蛋白回收率和富集比的影响见图 2。

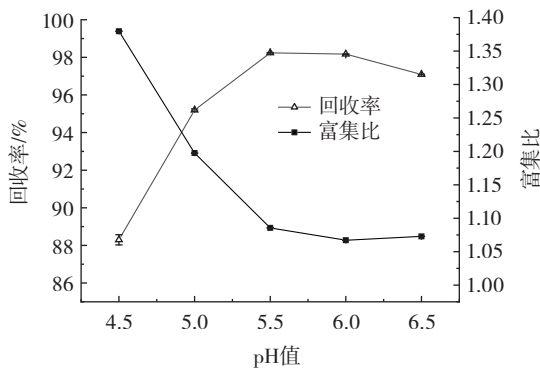


图2 pH 值对刚毛藻蛋白回收率和富集比的影响

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

如图 2 所示,随着 pH 值的升高,回收率先升高后下降,富集比先下降后升高。这是因为在蛋白质达到等电点时,蛋白质分子会展现出良好的起泡性和泡沫稳定性,增加了其吸附能力;而当 pH 值偏离等电点时,蛋白质分子带电,使蛋白质分子间静电荷和排斥力增加,溶解度升高,进而造成回收率和富集比的变化^[17]。因此,综合考虑选择 pH 值为 4.5、5.0、5.5 进行下一步研究。

2.1.2 不同料液比的影响

料液比对刚毛藻蛋白回收率和富集比的影响见图 3。

如图 3 所示,随着蛋白添加的增加,回收率升高,富集比下降。这是因为蛋白溶液浓度越高,越容易产

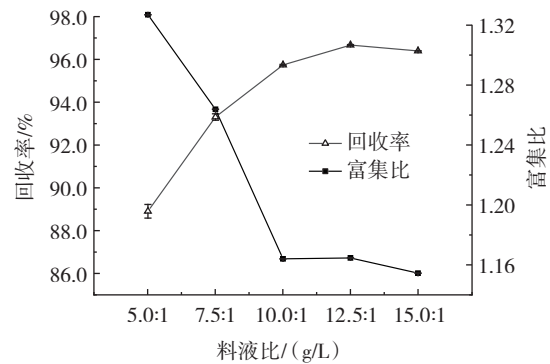


图3 料液比对刚毛藻蛋白回收率和富集比的影响

Fig.3 Effect of solid-to-liquid ratio on recovery rate and enrichment ratio of *Cladophora* protein

生大量稳定泡沫,泡沫聚并现象弱,泡沫附带了较多的蛋白溶液,且泡沫上升过程变快,导致蛋白液不易回流,在提升回收率的同时,降低了富集比^[18]。因此,综合考虑选择料液比 5.0:1、7.5:1、10.0:1 (g/L) 进行下一步研究。

2.1.3 不同温度的影响

温度对刚毛藻蛋白回收率和富集比的影响见图 4。

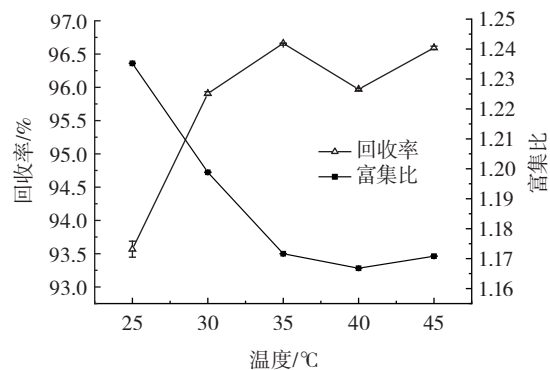


图4 温度对刚毛藻蛋白回收率和富集比的影响

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

如图 4 所示,随着温度升高,回收率先升高后降低再上升,富集比先降低后升高。这是因为温度在 35 °C 以下,溶液的黏度和表面张力极强,回流速度慢,泡沫稳定性不高,但在 35 °C 以上,会使泡沫回流加快,泡沫强度降低,进而使泡沫稳定性变差^[19]。因此,综合考虑选择温度 25、30、35 °C 进行下一步研究。

2.1.4 不同载液量的影响

载液量对刚毛藻蛋白回收率和富集比影响见图 5。

如图 5 所示,随着载液量增加,回收率和富集比先升高后降低。这是因为载液量低时,泡沫稳定性好,停留时间长,泡沫表面附着了较多的蛋白溶液,导致回收率低富集比高;而载液量逐渐增大泡沫稳定性下降,停留时间缩短,回流速度增加,使回收率升高富集比降低。一般选择回收率较高的,载液量为 225 mL 和 250 mL 回收率变化较小,富集比变化较为明显^[20]。因

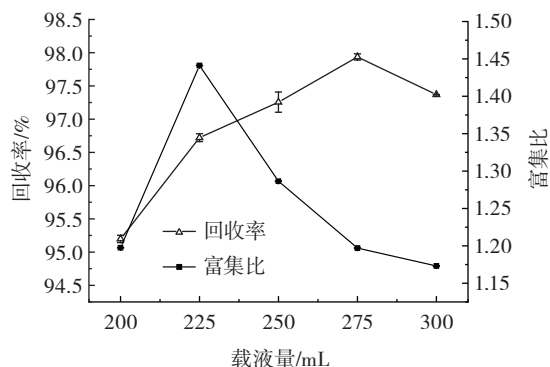


图5 载液量对刚毛藻蛋白回收率和富集比的影响

Fig.5 Effect of liquid loading on recovery rate and enrichment ratio of *Cladophora* protein

此,综合考虑选择载液量 200、225、250 mL 进行下一步研究。

2.2 响应面试验结果优化分析

2.2.1 响应面试验结果与方差分析

根据 Box-Behnken 析因设计和回归分析的原理,以表 1 为基础设计中心组合试验,共进行 29 组重复试验,结果如表 2 所示。

表2 响应面设计和结果

Table 2 Response surface design and results

序号	A pH 值	B 料液比/(g/L)	C 温度/°C	D 载液量/mL	回收率/%	富集比
1	4.5	5.0:1	30	225	71.32	1.81
2	5.5	5.0:1	30	225	93.86	1.25
3	4.5	10.0:1	30	225	89.20	1.38
4	5.5	10.0:1	30	225	98.62	1.16
5	5.0	7.5:1	25	200	93.93	1.30
6	5.0	7.5:1	35	200	94.51	1.28
7	5.0	7.5:1	25	250	95.37	1.20
8	5.0	7.5:1	35	250	96.33	1.26
9	4.5	7.5:1	30	200	83.36	1.48
10	5.5	7.5:1	30	200	97.20	1.19
11	4.5	7.5:1	30	250	87.75	1.40
12	5.5	7.5:1	30	250	97.83	1.17
13	5.0	5.0:1	25	225	83.15	1.55
14	5.0	10.0:1	25	225	96.22	1.21
15	5.0	5.0:1	35	225	86.76	1.40
16	5.0	10.0:1	35	225	96.99	1.21
17	4.5	7.5:1	25	225	82.97	1.40
18	5.5	7.5:1	25	225	96.11	1.16
19	4.5	7.5:1	35	225	84.18	1.54
20	5.5	7.5:1	35	225	97.45	1.22
21	5.0	5.0:1	30	200	89.48	1.40
22	5.0	10.0:1	30	200	96.76	1.21
23	5.0	5.0:1	30	250	86.90	1.50
24	5.0	10.0:1	30	250	97.17	1.26
25	5.0	7.5:1	30	225	91.94	1.29
26	5.0	7.5:1	30	225	92.37	1.25
27	5.0	7.5:1	30	225	93.56	1.31
28	5.0	7.5:1	30	225	92.85	1.30
29	5.0	7.5:1	30	225	92.98	1.23

利用 Design-Expert 13 软件对表 2 数据拟合,得二项式拟合方程:回收率=92.74+6.86A+5.29B+0.705 8C+0.509 2D-3.28AB+0.032 5AC-0.940 0AD-0.710 0BC+0.747 5BD+0.095 0CD-2.78A²-1.96B²+0.233 7C²+1.81D² (P<0.000 1, R²=0.978 2);富集比=1.28-0.155 0A-0.123 3B+0.007 5-0.005 8D+0.085 0AB-0.020 0AC+0.015 0AD+0.037 5BC-0.012 5BD+0.020 0CD+0.051 2A²+0.073 7B²-0.002 6C²-0.012 6D² (P<0.000 1, R²=0.929 1)。

表 3 和表 4 为回收率和富集比方差分析。

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	1 072.41	14	76.60	44.79	<0.000 1	**
A pH 值	564.30	1	564.30	329.96	<0.000 1	**
B 料液比	335.92	1	335.92	196.42	<0.000 1	**
C 温度	5.98	1	5.98	3.50	0.082 6	
D 载液量	3.11	1	3.11	1.82	0.198 8	
AB	43.03	1	43.03	25.16	0.000 2	*
AC	0.004 2	1	0.004 2	0.002 5	0.961 1	
AD	3.53	1	3.53	2.07	0.172 5	
BC	2.02	1	2.02	1.18	0.295 9	
BD	2.24	1	2.24	1.31	0.272 1	
CD	0.036 1	1	0.036 1	0.021 1	0.886 6	
A ²	50.18	1	50.18	29.34	<0.000 1	**
B ²	24.89	1	24.89	14.55	0.001 9	*
C ²	0.354 4	1	0.354 4	0.207 2	0.655 9	
D ²	21.28	1	21.28	12.44	0.003 3	*
残差	23.94	14	1.71			
失误项	22.42	10	2.24	5.90	0.050 9	
纯误差	1.52	4	0.379 8			
总和	1 096.36	28				

注:*表示影响显著,P<0.05 ;**表示影响极显著,P<0.01。

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	0.565 2	14	0.040 4	13.11	<0.000 1	**
A pH 值	0.288 3	1	0.288 3	93.62	<0.000 1	**
B 料液比	0.182 5	1	0.182 5	59.28	<0.000 1	**
C 温度	0.000 7	1	0.000 7	0.219 2	0.646 9	
D 载液量	0.000 4	1	0.000 4	0.132 6	0.721 2	
AB	0.028 9	1	0.028 9	9.38	0.008 4	*
AC	0.001 6	1	0.001 6	0.519 6	0.482 9	
AD	0.000 9	1	0.000 9	0.292 3	0.597 3	
BC	0.005 6	1	0.005 6	1.83	0.198 0	
BD	0.000 6	1	0.000 6	0.203 0	0.659 2	
CD	0.001 6	1	0.001 6	0.519 6	0.482 9	
A ²	0.017 0	1	0.017 0	5.51	0.034 1	*
B ²	0.035 2	1	0.035 2	11.43	0.004 5	*
C ²	0.000 0	1	0.000 0	0.014 1	0.907 3	
D ²	0.001 0	1	0.001 0	0.335 5	0.572 8	
残差	0.043 1	14	0.003 1			
失误项	0.038 4	10	0.003 8	3.25	0.133 4	
纯误差	0.004 7	4	0.001 2			
总和	0.608 3	28				

注:*表示影响显著,P<0.05 ;**表示影响极显著,P<0.01。

由表3、表4可知,两个模型 P 值均小于0.0001, F 值均大于0.05,代表此回归模型可行性强,可用于模型内预测^[21]。对于回收率模型,其相关系数 $R^2=0.9782$,代表响应值变化为97.82%,调整后相关系数 $R^2_{Adj}=0.9563$,此数据表明该模型拟合度较好,误差较小,并由表3进一步可知,影响因素大小顺序为pH值>料液比>温度>载液量。对于富集比模型,其相关系

数 $R^2=0.9291$,代表响应值变化为92.91%,调整后相关系数 $R^2_{Adj}=0.8583$,此数据表明该模型拟合度较好,误差较小,并由表4进一步可知,影响因素大小顺序为pH值>料液比>温度>载液量。

2.2.2 响应面分析

图6反映了各因素相互作用对泡沫分离刚毛藻蛋白回收率的影响。

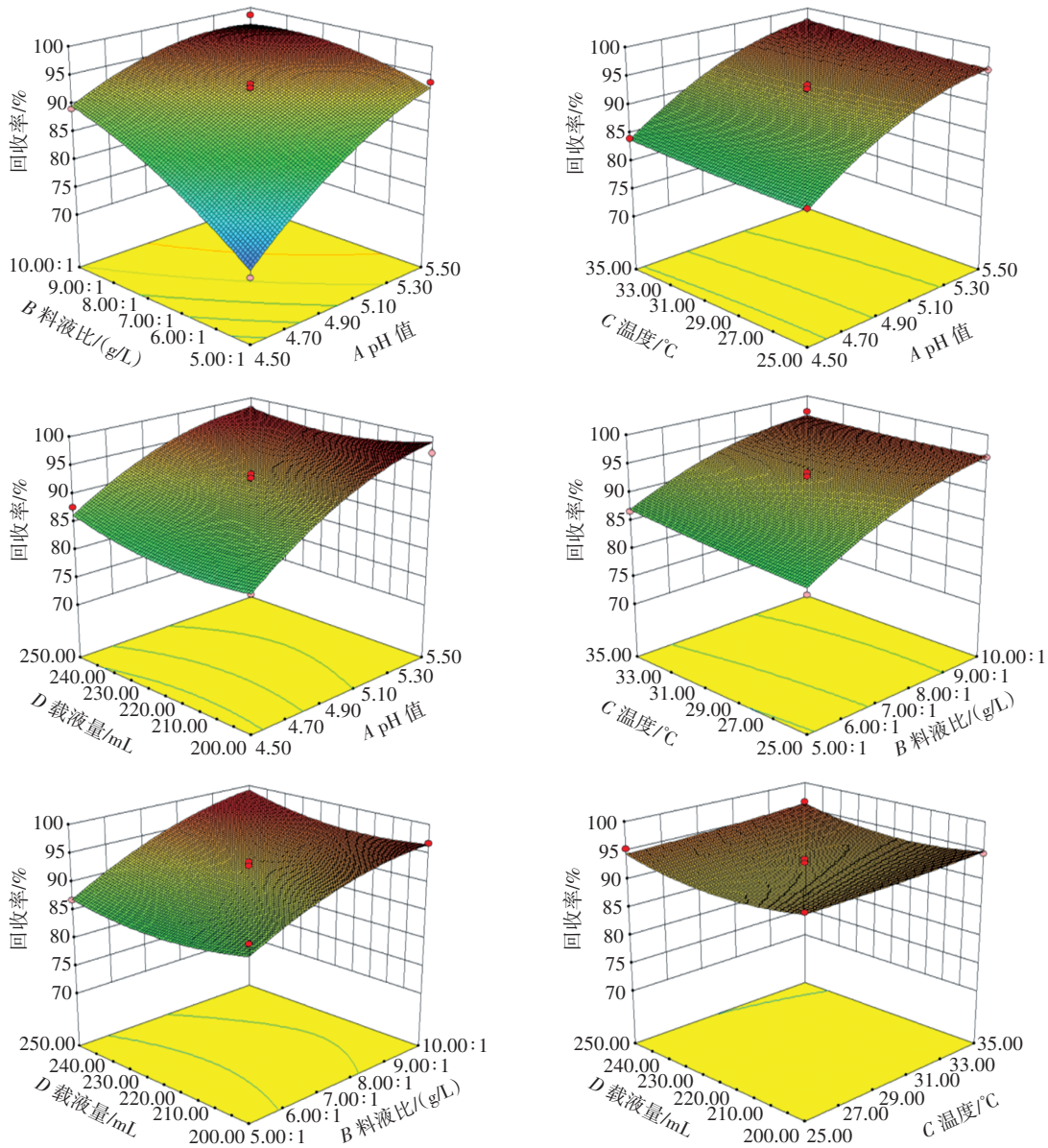


图6 各因素对刚毛藻蛋白回收率影响响应曲面

Fig.6 Response surface of effect of experimental factors on recovery rate of *Cladophora* protein

由图6可知,刚毛藻蛋白回收率随pH值与料液比的变化而发生显著变化,pH值、料液比越大刚毛藻蛋白回收率越大,其相互作用较强;而刚毛藻蛋白回收率随着温度与载液量变化其变化幅度小,并且其相互作用不大。

图7反映了各因素相互作用对泡沫分离刚毛藻蛋白富集比的影响。

由图7可知,刚毛藻蛋白富集比随pH值与料液

比的变化而发生较大变化,pH值、料液比越小刚毛藻蛋白富集比越大,其相互作用较强;而刚毛藻蛋白回收率随着温度与载液量变化其变化幅度小,并且其相互作用不大^[22]。

综合分析以上结果并结合回归模型,以回收率和富集比为指标,得到最佳优化条件:pH值为4.88、料液比为5:1(g/L)、温度为35℃、载液量为249.9mL,在

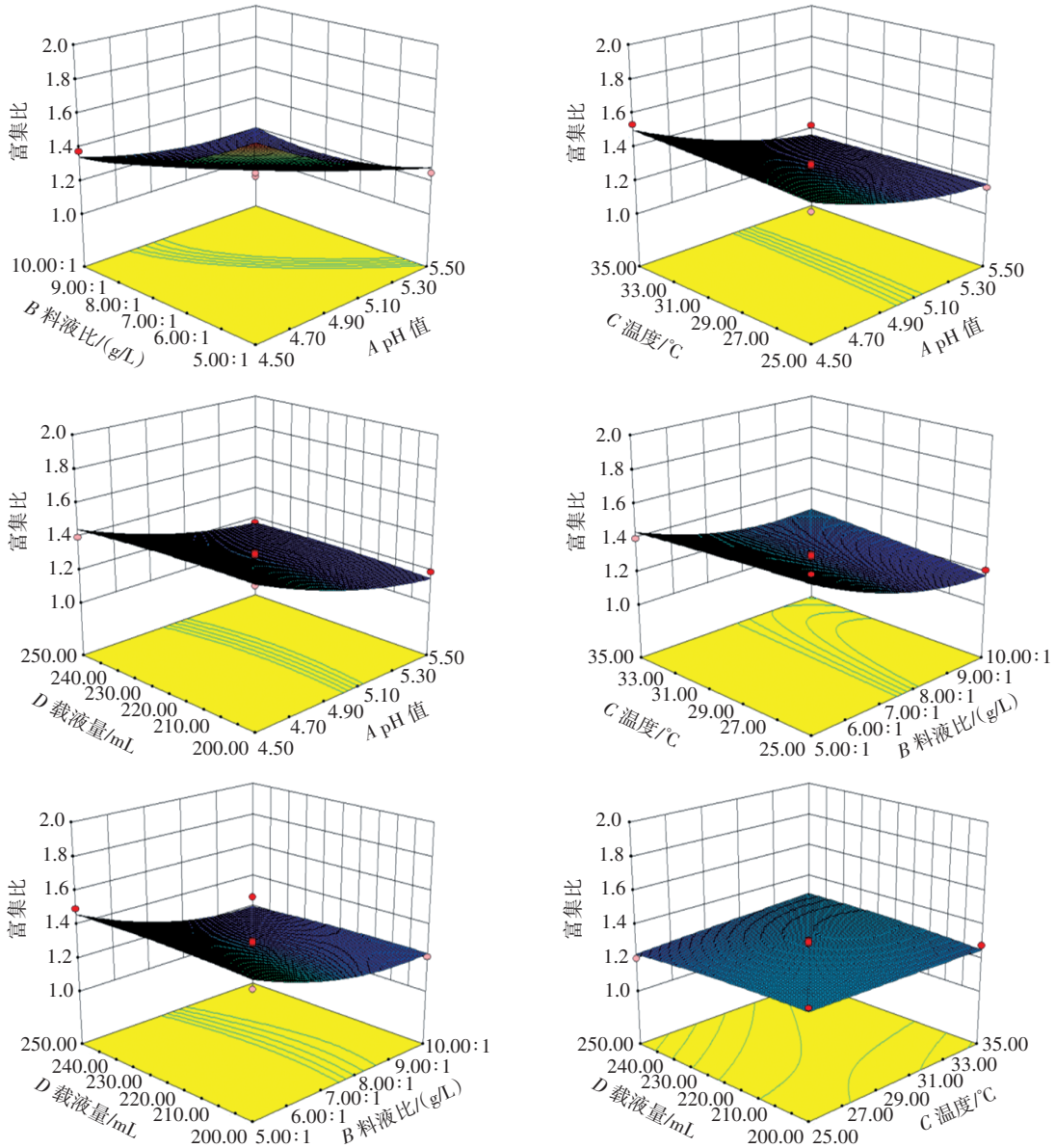


图7 各因素对刚毛藻蛋白富集比影响响应曲面

Fig.7 Response surface of effect of experimental factors on enrichment ratio of *Cladophora* protein

此条件下刚毛藻蛋白回收率为 86.37%，富集比为 1.518。为验证此优化结果，并考虑到实际情况，选用 pH 值为 4.9、料液比为 5:1 (g/L)、温度为 35 °C、载液量为 250 mL，结果为回收率 87.74%，富集比 1.46。接近预测值，证明此工艺可行，该模型可用于泡沫分离刚毛藻蛋白。

2.3 刚毛藻蛋白功能分析

2.3.1 刚毛藻蛋白持水性分析

温度对刚毛藻蛋白持水性影响见图 8。

由图 8 可知，刚毛藻蛋白持水量整体随温度升高而降低，在 20 °C 时其持水性最强，为 3.32 g/g。产生这种情况的原因可能是，适当的温度会引起蛋白质一定的热变性，更有利于蛋白质分子的伸展，增强了蛋白质分子与水的作用力，而随温度升高，则增加了蛋白质分子间的作用力，附着水的能力下降，导致持水性下降^[23]。

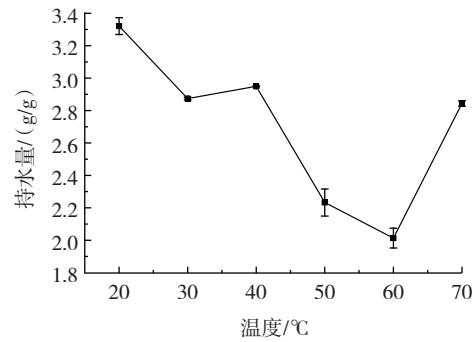


图8 温度对刚毛藻蛋白持水性影响

Fig.8 Effect of temperature on water holding capacity of *Cladophora* protein

2.3.2 刚毛藻蛋白持油性分析

温度对刚毛藻蛋白持油性影响见图 9。

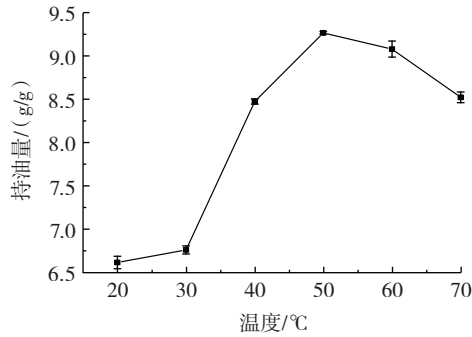


图9 温度对刚毛藻蛋白持油性影响

Fig.9 Effect of temperature on oil holding capacity of *Cladophora* protein

由图9可知,刚毛藻蛋白持油量随温度升高先升高后降低,在50℃时其持油量最高,为9.27 g/g。产生这种情况的原因可能是,随着温度升高,蛋白质分子空间结构不断伸展,疏水基团部分暴露,使其持油性增强,而当温度超过50℃后,油的流动性不断增加,持油性降低^[24]。

2.3.3 刚毛藻蛋白乳化能力和乳化稳定性分析

刚毛藻蛋白质量分数对乳化能力和乳化稳定性影响见图10。

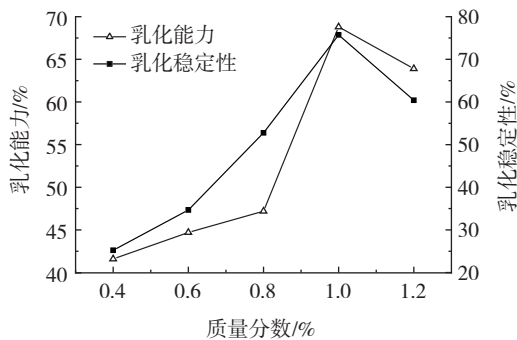


图10 刚毛藻蛋白质量分数对乳化能力和乳化稳定性影响

Fig.10 Effect of mass fraction on emulsifying property and emulsion stability of *Cladophora* protein

由图10可知,当刚毛藻蛋白质量分数为1.0%时,乳化能力和乳化稳定性达到最高,分别为68.8%和75.73%,说明刚毛藻蛋白具有良好的乳化能力和乳化稳定性,且在质量分数为1.0%时最优。刚毛藻蛋白乳化能力和乳化稳定性随蛋白质质量分数的增加先升高后降低,产生这种情况的原因可能是,当蛋白质在一定范围浓度时,浓度越高,大豆油分布越广泛,并且在一定程度上黏性增强,而超过这个范围后,黏性的增强破坏了乳化能力和乳化稳定性的平衡,导致其开始降低^[25]。

2.3.4 刚毛藻蛋白起泡性和起泡稳定性分析

刚毛藻蛋白质量分数对起泡性和泡沫稳定性影响见图11。

由图11可知,起泡性和泡沫稳定性随质量分数增加呈先上升后下降的趋势,且在蛋白质量分数为0.8%时起泡性和泡沫稳定性达到最高。产生这种情况的原

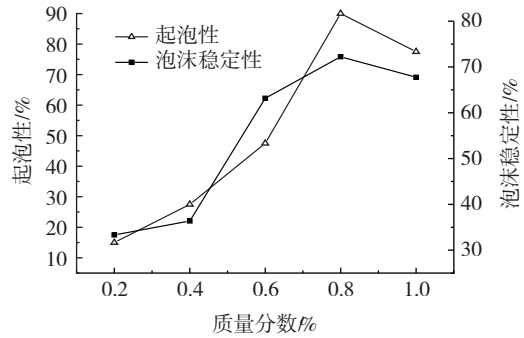


图11 刚毛藻蛋白质量分数对起泡性和泡沫稳定性影响

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

因可能是蛋白质在一定的浓度范围时,随蛋白浓度的增加,蛋白溶液黏性增加,泡沫容易形成且稳定;而当超过此浓度范围,黏度过大破坏其平衡,导致泡沫不易形成且不稳定^[26]。

2.4 FT-IR 光谱结果

刚毛藻蛋白 FT-IR 谱图见图12。使用 Peakfit Version 软件对 FT-IR 谱图中酰胺 I 带分析并得出拟合图谱,结果见图13。

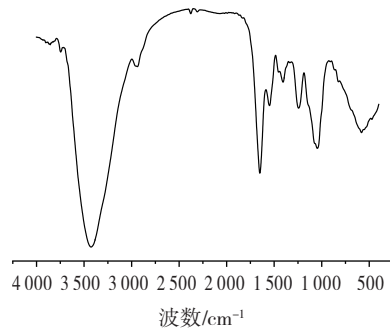


图12 刚毛藻蛋白 FT-IR 谱图

Fig.12 FT-IR spectrum of *Cladophora* protein

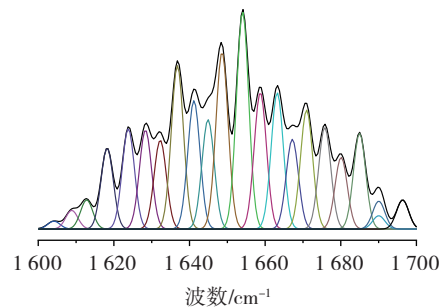


图13 刚毛藻蛋白的酰胺 I 带拟合谱图

Fig.13 Fitting spectrum of amide I band of *Cladophora* protein

如图12所示,刚毛藻蛋白有许多特征峰,2980~2850 cm⁻¹为饱和碳 C—H 伸缩振动,1700~1600 cm⁻¹为酰胺 I 带(C=O 伸缩振动),1600~1500 cm⁻¹为酰胺 II 带(C—N 伸缩振动和 N—H 变形振动),1420~1350 cm⁻¹为 C—OH 振动,1350~1200 cm⁻¹为酰胺 III 带(C—O 和 C—O—C 振动),1100~1060 cm⁻¹为 P=O

或 P—O—C 对称伸缩振动^[27]。如图 13 所示,每个峰代表 FT-IR 谱图中 1 700~1 600 cm^{-1} 的二阶导数拟合,积分面积计算各二级结构的相对含量,结果如表 5 所示。

表 5 刚毛藻蛋白二级结构相对含量

protein				%
β -折叠	无规则卷曲	α -螺旋	β -转角	
28.92	20.30	17.30	33.48	

由表 5 可知,刚毛藻蛋白二级结构以 β -转角为主,可达 33.48%, β -折叠可达 28.92%,无规则卷曲可达 20.30%, α -螺旋可达 17.30%, β -折叠和 α -螺旋是较为有序的蛋白二级结构,有较高稳定性, β -转角和无规则卷曲是无序结构^[28]。

2.5 UV-Vis 光谱测定

刚毛藻蛋白 UV-Vis 吸收光谱见图 14。

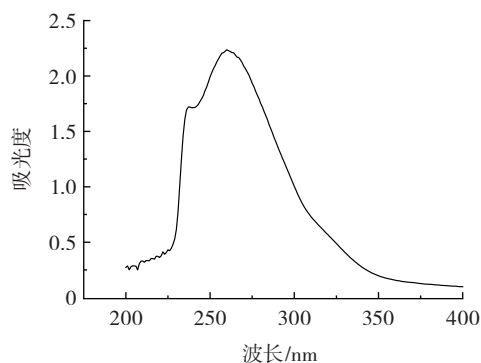


图 14 刚毛藻蛋白 UV-Vis 吸收光谱

Fig.14 UV-Vis absorption spectra of *Cladophora* protein

如图 14 所示,刚毛藻蛋白在 280 nm 左右达到最大吸收,这是因为蛋白中含有具有共轭双键的芳香族氨基酸(如色氨酸、酪氨酸等)。由于肽键中的羰基电子跃迁,在 230 nm 处有吸收峰,符合 I 型胶原蛋白三股螺旋结构的紫外吸收特征^[29]。

2.6 氨基酸测定

刚毛藻蛋白氨基酸组成见表 6。

表 6 刚毛藻蛋白氨基酸组成

Table 6 Amino acid composition of *Cladophora* 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	49.734	11.77	亮氨酸*	29.158	6.90
苏氨酸*	21.546	5.10	酪氨酸	21.837	5.17
丝氨酸	20.193	4.78	苯丙氨酸*	22.084	5.23
谷氨酸	63.479	15.03	组氨酸*	10.568	2.50
甘氨酸	20.966	4.96	赖氨酸	32.816	7.77
丙氨酸	22.422	5.31	精氨酸	30.281	7.17
胱氨酸	8.194	1.94	脯氨酸	20.112	4.76
缬氨酸*	22.526	5.33	必需氨基酸	132.419	31.35
蛋氨酸*	10.671	2.53	疏水氨基酸	164.680	38.98
异亮氨酸*	15.866	3.76	总氨基酸	422.453	100

注:*为必需氨基酸;疏水氨基酸有丙氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸。

如表 6 所示,刚毛藻蛋白中氨基酸总量可达 422.453 mg/g,其中谷氨酸含量最高,可达 63.479 mg/g,占总氨基酸含量的 15.03%;必需氨基酸为 132.419 mg/g,占总氨基酸含量的 31.35%;疏水氨基酸为 164.680 mg/g,占总氨基酸含量的 38.98%^[30]。

3 结论

通过泡沫分离法对刚毛藻蛋白进行提取,以回收率和富集比作为指标,通过单因素试验确定了料液比、载液量、温度、pH 值的最佳条件,并通过响应面法对提取工艺进行优化,同时对刚毛藻蛋白的理化性质进行了分析,采用傅里叶变换红外光谱仪、双光束紫外分光光度计对蛋白结构进行分析,并对其氨基酸测定。结果表明,泡沫分离法提取刚毛藻蛋白最佳条件为料液比 5:1 (g/L)、载液量 250 mL、温度 35 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 4.9,在此条件下刚毛藻蛋白回收率为 87.74%,富集比为 1.46。刚毛藻蛋白持水性和持油量分别在 20 $^{\circ}\text{C}$ 和 50 $^{\circ}\text{C}$ 时最大,为 3.32 g/g 和 9.27 g/g。刚毛藻蛋白乳化和乳化稳定性呈先上升后下降趋势,在质量分数为 1.0 % 时最佳;起泡性和泡沫稳定性呈先上升后下降趋势,在质量分数为 0.8 % 时最佳。FT-IR 和 UV-Vis 图谱显示,刚毛藻蛋白在 230 nm 和 280 nm 处有蛋白特征峰,二级结构 β -转角相对含量最大,可达 33.48%。蛋白中氨基酸总量可达 422.453 mg/g,谷氨酸含量最高,可达 63.479 mg/g,占 15.03%;必需氨基酸占 31.35%;疏水氨基酸占 38.98%。研究表明泡沫分离是一种操作简单、可行性强的方法,此工艺优化为刚毛藻蛋白的后续研究提供依据。

参考文献:

- [1] SİRAKAYA S. Pros and cons of *Ulva lactuca* and *Cladophora glomerata* grown in freshwater as feed[J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2023, 30(12): 33446-33454.
- [2] DAS J, GHOSH K. Nutrient profiling of five freshwater algae for their prospective use as fish feed ingredients[J]. Algal Research, 2023, 74: 103173.
- [3] NUTAUTAITĖ M, RACEVIČIŪTĖ - STUPELIENĖ A, POCKEVIČIUS A, et al. Sensory evaluation of rabbit meat from individuals fed functional and more sustainable diets enriched with freshwater *Cladophora glomerata* macroalgal biomass[J]. Animals: an Open Access Journal from MDPI, 2023, 13(13): 2179.
- [4] MUNIR M, QURESHI R, BIBI M, et al. Pharmaceutical aptitude of *Cladophora*: A comprehensive review[J]. Algal Research, 2019, 39: 101476.
- [5] HUANG X P, LI M, XU B, et al. Proteasome and NF- κ B inhibiting phaeophytins from the green Alga *Cladophora fascicularis*[J]. Molecules, 2007, 12(3): 582-592.
- [6] ZULKIFLY S B, GRAHAM J M, YOUNG E B, et al. The genus *Cladophora* Kützting (Ulvophyceae) as a globally distributed ecological engineer[J]. Journal of Phycology, 2013, 49(1): 1-17.
- [7] ZHAO C C, LI W Y, SHANG D W, et al. Influence of nitrogen

- sources on wastewater treatment performance by filamentous algae in constructed wetland system[J]. *Environmental Research*, 2023, 235: 116638.
- [8] 石瑛, 李砧, 李艳晖. 环保好伙伴——刚毛藻[J]. *生命世界*, 2021(4): 6-7.
SHI Ying, LI Zhen, LI Yanhui. Environmental good partner - Cladophora[J]. *Life World*, 2021(4): 6-7.
- [9] LELIAERT F, BOEDEKER C, PEÑA V, et al. *Cladophora rhodolithicola* sp. nov. (Cladophorales, Chlorophyta), a diminutive species from European maerl beds[J]. *European Journal of Phycology*, 2009, 44(2): 155-169.
- [10] 唐维, 张星海. 花粉破壁方法的研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2003, 29(2): 86-92.
TANG Wei, ZHANG Xinghai. Research progress on the methods of pollen-wall broken[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2003, 29(2): 86-92.
- [11] SAFI C, URSU A V, LAROCHE C, et al. Aqueous extraction of proteins from microalgae: Effect of different cell disruption methods[J]. *Algal Research*, 2014, 3: 61-65
- [12] LIMA F V, VARLEY J. Foam fractionation of proteins[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1996, 782(1): 375-390
- [13] LOCKWOOD C E, BUMMER P M, JAY M. Purification of proteins using foam fractionation[J]. *Pharmaceutical Research*, 1997, 14(11): 1511-1515.
- [14] 韩娟, 方思含, 黄文睿, 等. 泡沫分离设备的研究进展[J]. *过程工程学报*, 2022, 22(7): 839-852.
HAN Juan, FANG Sihan, HUANG Wenrui, et al. Research progress of foam separation equipment[J]. *The Chinese Journal of Process Engineering*, 2022, 22(7): 839-852.
- [15] 李东炎, 张永民. 泡沫浮选在植物提取中的应用[J]. *中国洗涤用品工业*, 2020(5): 91-95.
LI Dongyan, ZHANG Yongmin. The application of froth flotation to plant extraction[J]. *China Cleaning Industry*, 2020(5): 91-95.
- [16] CHEN Y C, PARLAR H. Enrichment behavior of immunoglobulin by foam fractionation using response surface methodology[J]. *Separation and Purification Technology*, 2013, 107: 102-108.
- [17] 刘龙, 张炜, 陈元涛, 等. 菠菜叶蛋白泡沫法分离工艺的优化[J]. *食品与机械*, 2017, 33(6): 169-175.
LIU Long, ZHANG Wei, CHEN Yuantao, et al. Optimization on foam separation process for spinach leaf protein[J]. *Food & Machinery*, 2017, 33(6): 169-175.
- [18] 王创业. 泡沫分离法分离蛋白质的研究[D]. 天津: 天津大学, 2004.
WANG Chuangye. Study on separation of protein by foam separation method[D]. Tianjin: Tianjin University, 2004.
- [19] 刘龙. 牦牛乳清蛋白泡沫分离及功能特性改善研究[D]. 西宁: 青海师范大学, 2018.
LIU Long. Study on separation of yak whey protein foam and improvement of its functional characteristics[D]. Xining: Qinghai Normal University, 2018.
- [20] 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.
SONG Lin, ZHANG Wei, JING Yongkang, et al. Process optimization and functional characteristics analysis of *Euglena* protein foam separation[J]. *Fine Chemicals*, 2023, 40(6): 1340-1349
- [21] 吴兰兰, 吴伟菁, 王立博, 等. 响应面法优化苦荞麸皮粉蛋白质提取工艺[J]. *中国食物与营养*, 2022, 28(3): 39-44.
WU Lanlan, WU Weijing, WANG Libo, et al. Optimization of protein extraction process from Tartary buckwheat bran by response surface methodology[J]. *Food and Nutrition in China*, 2022, 28(3): 39-44.
- [22] 刘海彬, 张炜, 陈元涛, 等. 泡沫法分离苜蓿叶蛋白工艺优化[J]. *农业工程学报*, 2016, 32(9): 271-276.
LIU Haibin, ZHANG Wei, CHEN Yuantao, et al. Technology optimization of *Medicago sativa* leaf protein separation with foam fractionation[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2016, 32(9): 271-276.
- [23] 蔡金星, 刘秀凤, 常学东, 等. 蚕豆蛋白质提取分离及其物化性质研究[J]. *食品工业科技*, 2007, 28(10): 142-144.
CAI Jinxing, LIU Xiufeng, CHANG Xuedong, et al. Study on extraction and physicochemical properties of horsebean protein[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2007, 28(10): 142-144.
- [24] 邓芝串, 张晖, 张超, 等. 籽瓜种子蛋白质的持水及持油性研究[J]. *中国粮油学报*, 2015, 30(9): 49-54.
DENG Zhichuan, ZHANG Hui, ZHANG Chao, et al. Study on water and fat absorption of seed-watermelon's seeds protein[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2015, 30(9): 49-54.
- [25] 戴媛, 冷进松, 陆红佳. 豌豆蛋白质提取工艺优化及其乳化性和起泡性研究[J]. *湖北农业科学*, 2021, 60(8): 134-140.
DAI Yuan, LENG Jinsong, LU Hongjia. Study on process optimization for the extraction of pea protein and its emulsification and foaming activity[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2021, 60(8): 134-140.
- [26] GEERTS M E J, NIKIFORIDIS C V, VAN DER GOOT A J, et al. Protein nativity explains emulsifying properties of aqueous extracted protein components from yellow pea[J]. *Food Structure*, 2017, 14: 104-111.
- [27] YAO G L, HE W, WU Y G, et al. Structure and functional properties of protein from defatted *Camellia oleifera* seed cake: Effect of hydrogen peroxide decolorization[J]. *International Journal of Food Properties*, 2019, 22(1): 1283-1295.
- [28] NGUI S P, NYOBE C E, BAKWO BASSOGOG C B, et al. Influence of pH and temperature on the physicochemical and functional properties of Bambara bean protein isolate[J]. *Heliyon*, 2021, 7(8): e07824.
- [29] 刘彦秋, 都日玛, 白杨, 等. 超高压处理对羊骨胶原蛋白三级结构的影响[J]. *中国食品学报*, 2022, 22(8): 207-213.
LIU Yanqiu, DURIMA, BAI Yang, et al. Effect of ultra-high pressure treatment on tertiary structure of sheep bone collagen[J]. *Journal of Chinese Journal of Food Science and Technology*, 2022, 22(8): 207-213.
- [30] 王华芬, 王强, 刘双燕, 等. 不同品种山药粉中游离氨基酸和水解氨基酸含量分析[J]. *安徽农业科学*, 2022, 50(14): 164-166, 173.
WANG Huafen, WANG Qiang, LIU Shuangyan, et al. Analysis of free amino acids and hydrolyzed amino acids in different varieties of yam powder[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2022, 50(14): 164-166, 173.