

3 种微藻中提取蛋白质的乳化特性

赵 燕, 余慧琳, 邱 阳, 李泓浩, 夏胜瑶, 朱加进*
(浙江大学生物系统工程与食品科学学院 食品生物科学技术研究所 杭州 310058)

摘要 从钝顶螺旋藻(SPP)、小球藻(CPP)和拟微绿球藻(NOP)中分离到 3 种微藻蛋白,研究 pH 值(1,3,5,7,9)对其乳化能力和界面性质的影响,比较并评价用 SPP、CPP、NOP 稳定的 DHA 藻油乳液的稳定性、流变学特性和形貌结构。结果表明,SPP、CPP、NOP 在等电点(pH=3)附近表现出最小的溶解度、乳化活性、乳化稳定性和最大的表面疏水性,NOP 和 SPP 比 CPP 具有更高的溶解度和乳化稳定性,NOP 和 CPP 具有更好的乳化活性,尤其是 NOP。以 pH 值为 7 的微藻蛋白溶液为连续相,以油相比比例为 10%的 DHA 藻油为分散相,经超声乳化制备成纳米乳液,由显微图像和 SEM 图像可观察到明显的水包油结构,通过 XRD 和 FTIR 证实 DHA 藻油在 3 种微藻蛋白中实现成功包埋,DSC 和 TGA 结果证明其热稳定性良好。其中 NOP 稳定的乳液平均粒径最小,分散最均匀,并且体系的流变特性、表观黏度和贮藏稳定性明显优于 CPP 和 SPP,具备作为优质植物蛋白乳化剂的应用潜力。

关键词 微藻蛋白; DHA 藻油; 乳化性质

文章编号 1009-7848(2024)08-0040-13 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.08.004

蛋白质颗粒具有天然两亲性的特点,在食品和制药工业中常用作稳定水包油乳液中的乳化剂,是应用最为广泛的食品级 Pickering 乳化剂^[1]。目前研究较多的用于稳定乳液的蛋白质颗粒有大豆分离蛋白^[2]、玉米醇溶蛋白^[3]、小麦醇溶蛋白^[4]等,其来源均为大豆、玉米、小麦等粮食作物。有研究预测世界人口 2025 年将增长至 90 亿,预计对动物源蛋白质的需求将会进一步扩张,人类可能会面临粮食短缺的危机^[5-6],解决这一危机的关键就是要加速对植物蛋白的开发和利用。

我国海洋藻类资源丰富,一直被认为是微藻的最大生产国,海水养殖面积达 140 km²,估计产量为 35.000 t/年,约占全球产量的三分之二,其中钝顶螺旋藻和普通小球藻是种植最广泛的物种^[7]。藻类富含蛋白质、脂肪和碳水化合物,是人类未来重要的食品及油料资源。然而,目前用于食品目的的微藻开发仍处于初级阶段^[8]。微藻蛋白被联合国粮农组织确定为 21 世纪绿色健康食品。有研究表明,微藻蛋白还具有优良的乳化特性^[9-11]。目前对微藻蛋白乳化能力和界面性质的研究有限,同时缺乏应用探索。

本文从 DHA 藻油乳液制备及应用角度出发,

以钝顶螺旋藻、小球藻、拟微绿球藻为原料提取蛋白质,比较 3 种微藻蛋白作为乳化剂的应用潜力,研究 pH 值对微藻蛋白乳化能力的影响,采用傅里叶变换红外光谱图分析(FTIR)、差式热量扫描法(DSC)、X 射线衍射分析(XRD)等手段筛选适合 DHA 藻油乳液的微藻蛋白颗粒。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

钝顶螺旋藻、小球藻和拟微绿球藻购于无棣绿奇生物工程有限公司;DHA 藻油购于江苏远大仙乐药业有限公司;透析袋购于 Biosharp 公司;其它试剂均为市售分析纯,购于 Sigma 公司。

1.2 仪器与设备

Zetasizer Nano ZS90 纳米粒度及 Zeta 电位分析仪,英国 Malvern 有限公司;ICC50 W 光学显微镜,德国 Leica 公司;SU-8010 冷场发射扫描电子显微镜,日本 HITACHI 公司;MCR302 旋转流变仪,奥地利 Anton Paar 公司;Nicolet iS50 傅里叶红外光谱仪,中国赛默飞世尔科技有限公司;STAReSystem TGA2 热重分析仪,瑞士 Mettler Toledo 公司;STARe System DSC3 差示扫描量热仪,瑞士 Mettler Toledo 公司;Cary Eclipse 荧光分光光度计,美国 Varian 公司;FiveEasy pH 计,瑞士 Meuler Toledo 公司;D8ADVACNCEX 射线衍

收稿日期: 2023-08-18

第一作者: 赵燕,女,硕士生

通信作者: 朱加进 E-mail: jjzhu337@163.com

射仪,德国 Bruker 公司;Infinite M200Pro 多功能酶标仪,瑞士 Tecan 公司;JY92-1DN 超声波细胞破碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司;85-2 控温磁力搅拌器,金坛市医疗仪器厂;DK-8D 电热恒温水槽,上海精宏实验设备有限公司;CR22F 超速冷冻离心机,日本 Hitachi 公司;Ultra-Turrax Digtal T18 高速均质机,德国 IKA 公司;5424R 小型高速冷冻离心机,德国 eppendorf 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 微藻蛋白的提取 根据 Bleakley 等^[12]的方法并稍作改动,将微藻与去离子水按 1:10 的料液比混合均匀,置于-20℃下冷冻 12 h 后室温融化,反复冻融 5 次。于超声波细胞破碎仪中,以 300 W 的功率冰浴处理 10 min,在 4℃下离心(10 000 r/min, 30 min),收集上清液,磁力搅拌的同时缓慢加入饱和硫酸铵溶液,随后在 4℃下继续搅拌 1 h,静置过夜。在 4℃下离心(8 000 r/min, 30 min),收集蛋白质沉淀。在 4℃下将颗粒重悬并透析 48 h,冷冻干燥后于-20℃下储存,以备后续检测。

1.3.2 溶解度的测定 根据 Kaur 等^[13]的方法测定,取 0.2 g 微藻蛋白溶于 20 mL pH 值为 1,3,5,7,9 的 PBS 缓冲液中,在 4℃下磁力搅拌(800 r/min)2 h 后离心(300 r/min, 30 min)。以牛血清白蛋白为标准蛋白,采用 Lowry 法测定各上清液的蛋白质量浓度(mg/mL)和总蛋白质量浓度(mg/mL)。同一样品重复测定 3 次,结果取平均值。溶解度计算公式如下:

$$\text{蛋白质溶解度}(\%) = (\text{上清液蛋白含量} / \text{总清蛋白含量}) \times 100 \quad (1)$$

1.3.3 表面疏水性的测定 根据 Asen 等^[14]描述的方法并一定改动,取 0.2 g 微藻蛋白溶于 20 mL pH 值为 1,3,5,7,9 的 PBS 缓冲液中,在 4℃下磁力搅拌(800 r/min)2 h 后离心(8 000 r/min, 10 min)得到上清液,使用对应 pH 值的 PBS 缓冲液连续稀释,得到质量浓度 0.5~2.5 mg/mL 的稀释液。取 20 μL 浓度为 8 mmol/L ANS 溶液加入 4 mL 样品稀释液中,黑暗中静置 15 min。使用荧光分光光度计在激发波长 390 nm、发射波长 470 nm、狭缝宽度 5 mm 的条件下测量样品的荧光强度(FI),表面疏水性表示为荧光强度与蛋白质浓度的斜率。同一样品重复测定 3 次,结果取平均值。

1.3.4 乳化活性及乳化稳定性的测定 取微藻蛋白溶于 pH=7 的 PBS 缓冲液中,在 4℃下磁力搅拌(800 r/min)2 h,配成质量分数为 1%的微藻蛋白悬浮液。将 18 mL 蛋白悬浮液与 2 mL DHA 藻油置于 50 mL 离心管中,使用高速机械搅拌器以 10 000 r/min 均质 1 min。初乳制成后,立即从离心管底部取 50 μL 样品转移至 5 mL 质量分数为 0.1%的 SDS 溶液中稀释,涡旋 5 min,使用分光光度计在波长 500 nm 处测定吸光度,记为 A_0 。样品静置 10 min 后,按以上程序再次取样并测定吸光度,记为 A_{10} 。EAI 和 ESI 的计算公式如下:

$$\text{EAI}(\text{m}^2/\text{g}) = (A_0 \times N) / [C \times (1 - \varphi) \times 10^4] \times T \times 2 \quad (2)$$

$$\text{ESI}(\text{min}) = [A_0 / (A_0 - A_{10})] \times 10 \quad (3)$$

式中, A_0 和 A_{10} 分别为 0 min 和 10 min 时乳液的吸光度; T 为常数 2.203; N 为稀释倍数 100; C 为蛋白质溶液的质量浓度(g/mL); φ 为油相比例 10%。

1.3.5 微藻蛋白稳的 DHA 藻油乳液的制备 以蛋白悬浮液为连续相,以 DHA 藻油为分散相制备水包油乳液。取 1 g 微藻蛋白溶于 pH=7 的 PBS 缓冲液中,在 4℃下磁力搅拌(800 r/min)2 h,使蛋白质完全水和,配成质量分数为 1%的微藻蛋白悬浮液。按 10%的油相比例将微藻蛋白悬浮液和 DHA 藻油混合,使用高速机械搅拌器以 12 000 r/min 的转速均质 1 min,得到粗乳液。将粗乳使用超声波细胞破碎仪以功率 300 W、间歇比 2 s:2 s、超声 10 min,进一步均质,超声全程保持冰浴,将新鲜乳液置 4℃冷藏保存,以备后续检测。

1.3.6 微观结构观察

1) 光学显微镜观察 将 20 μL 样品置于玻璃载玻片,小心覆盖盖玻片,选择 40 倍下拍摄的显微照片来观察液滴的微观结构,包括大小、形态、结构及分布。

2) 扫描电镜观察(SEM) 经冻干处理后的样品置于硅片基底上进行喷金处理,然后将样品转移到 SEM 室中,在温度-160℃、加速电压 3 kV 条件下收集样品形貌特征的图像。

1.3.7 乳液粒径的测定 参考 Nesterenko 等^[15]的方法并稍作改动,使用去离子水将乳液样品 4 倍稀释,以避免多重散射效应。在 25℃下测定乳液的液滴尺寸分布,记录平均粒径($Z\text{-Ave}$)和分散

指数(PDI),结果为3次测量的平均值。DHA藻油的折射率取1.43,水的折射率取1.33。

1.3.8 乳液流变特性的测定 在恒定频率10 rad/s下进行0.01%~100%的应变扫描测试,选择最适合的应变值,在频率范围0.1~100 rad/s内进行动态频率扫描,得到储能模量和损耗模量随频率变化的动态力学谱。

再通过稳态剪切扫描测定不同剪切速率下剪切黏度的变化曲线,剪切速率范围为0.1~100 s⁻¹。

1.3.9 傅里叶变换红外吸收光谱(FTIR)的分析 将样品冻干粉与KBr以1:100的质量比混合均匀,然后在4 t的压力下压制,随后在波长400~4 000 cm⁻¹范围扫描。

1.3.10 X射线衍射(XRD)分析 使用CuK α 射线进行XRD衍射,研究3种微藻蛋白及其稳定乳液的晶体结构,测定方法根据Zhong等^[19]的方法并稍作改动。将待测样品的冻干粉末均匀上样,在2 θ 衍射范围10°~70°进行连续扫描,X射线管的电压设为40 kV,电流设为30 mA,扫描速率设为5°/min。

1.3.11 乳液差式扫描量热分析(DSC)及热重分析(TGA) 根据Zhu等^[17]的方法并稍作改动,取SPP、CPP、NOP、Tween 80稳定的乳液5~10 mg放入铝制样品盘中称重、密封。在DSC测定中,样品首先以5 °C/min的速率从室温冷却到-80 °C,退火10 min后,以相同的速率从-80 °C加热到100 °C。使用氮气进行吹扫,流速设为25 mL/min。

使用热重分析仪在氩气中以10 °C/min的加热速率将样品从25 °C加热至600 °C,测定该温度范围的质量损失。

1.3.12 贮藏稳定性的测定 取新鲜制备的乳液10 mL转移至玻璃瓶中,密封,在4 °C下冷藏储存1,7,14,21 d,观察并拍摄样品的分层现象。在每个储存节点测量样品的粒径分布,样品下层乳浊液的高度和样品总高度,使用乳析指数(Creaming index, CI)来表征乳液的贮藏稳定性,计算公式如下:

$$CI(\%)=H_s/H_T \times 100 \quad (4)$$

式中, H_s 为样品下层乳浊液高度,mm; H_T 为样品总高度,mm。

1.3.13 数据处理 数据分析采用Excel 2007和

SPSS.16.0软件,各组数据采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), $P<0.05$ 表示具有显著差异。

2 结果与分析

2.1 pH值对微藻蛋白性质的影响

2.1.1 pH值对微藻蛋白溶解度的影响 3种微藻蛋白在不同pH值下的溶解度如图1所示,当pH=3时溶解度最小,说明等电点均在pH=3附近。在pH 1~9范围,SPP的表面溶解度均高于CPP和NOP,特别是SPP和NOP在中性和碱性条件下表现出优越的溶解性。此外,研究表明大豆蛋白^[18]、豌豆蛋白^[19]等植物蛋白质的等电点在pH=5附近。与之相比,本研究中3种微藻蛋白均表现出低等电点(pH=3)的特点,结合FITR分析原因是由于微藻中含有大量带电多糖(例如糖醛酸),可以和蛋白质的亲水氨基酸发生共价结合,这种高度糖基化会使微藻蛋白即使在低pH值时也带负电荷,从而影响微藻蛋白的溶解度等功能特性,增强蛋白质和水的相互作用,降低蛋白质的等电点^[20-21]。

2.1.2 pH值对微藻蛋白表面疏水性的影响 在pH 1~9范围,NOP和CPP的表面疏水性均显著高于SPP($P<0.05$),当pH=3时,3种微藻蛋白的表面疏水性最大。此时,较多疏水氨基酸残基暴露于蛋白表面,微藻蛋白的净电荷约为0,体系的相互作用力以蛋白质-蛋白质相互作用为主^[22]。当pH值从3增到9时,表面疏水性表现出明显的下降趋势($P<0.05$);pH=9时,SPP、CPP和NOP的表面疏水性最小。这与文献报道的pH值对乳清蛋白^[23]、班巴拉豆蛋白^[24]、豌豆蛋白^[23]的表面疏水性的影响一致,在相同pH值条件下3种微藻蛋白的表面疏水性均优于豌豆蛋白和乳清蛋白。

2.1.3 pH值对微藻蛋白乳化活性(EAI)和乳化稳定性(ESI)的影响 3种微藻蛋白的EAI随pH值的变化如图3a所示。在测定pH值范围,NOP的乳化活性显著高于SPP和CPP($P<0.05$),在pH 5~9时具有优越的乳化活性,最高为30.03 m²/g,表明其形成油-水界面的能力最强。CPP的乳化活性次之,且在中性及碱性环境下受pH值的影响不显著($P>0.05$),最高EAI为25.45 m²/g。此外,三者均在等电点(pH=3)附近表现出最低乳化活性,

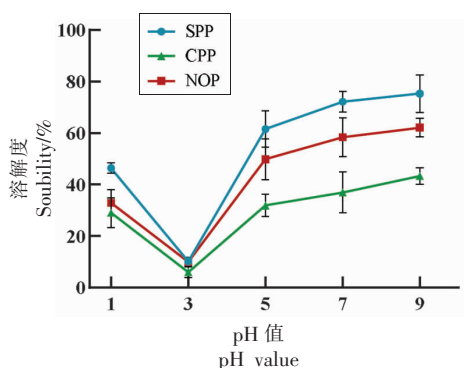


图 1 pH 值对微藻蛋白溶解度的影响

Fig.1 Effect of pH value on solubility of microalgae proteins

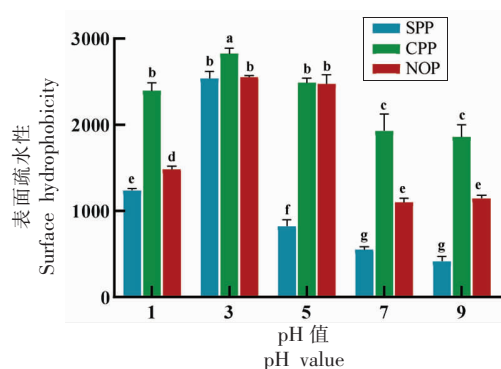


图 2 pH 值对微藻蛋白表面疏水性的影响

Fig.2 Effect of pH value on surface hydrophobicity of microalgae proteins

这与 Benelhadj 等^[1]报道的钝顶节旋藻的蛋白提取物类似。这是因为蛋白质在等电点处缺乏静电斥力,无法形成稳定的界面层。在应用微藻蛋白的乳化特性时应避免 pH 值在等电点附近。经对比, NOP 在 pH=7 时的乳化活性最大,说明 NOP 具有较好的乳化功能。

图 3b 显示 pH 值对微藻蛋白乳化稳定性的影响,可以看出,3 种微藻蛋白的乳化稳定性差异不大,其中 SPP 和 NOP 的乳化稳定性没有显著性差异 ($P>0.05$),且明显高于 CPP ($P<0.05$)。3 种微藻蛋白均在 pH 5~9 时具有较高的乳化稳定性,并且在此范围其受 pH 值的影响不显著。

整体看来,NOP 和 CPP 在各 pH 值下的乳化活性均优于同等条件下油菜籽蛋白^[26]、大豆蛋白^[27]和乳清蛋白^[28],并且乳化稳定性表现良好,具备开发为新型植物蛋白乳化剂的潜力。其中 NOP 在 pH=7 时的乳化特性相对其它 2 种微藻蛋白更好。EAI 和 ESI 为表征乳化特性的参数,仅为优质蛋白乳化剂的选择提供一定参考。本文接下来探究 pH=7 时,以 3 种微藻蛋白为乳化剂制备的 DHA 藻油 Pickering 乳液体系在粒径分布、流变特性、稳定性等方面的表现,以评价 3 种微藻蛋白作为乳化剂的应用潜力。

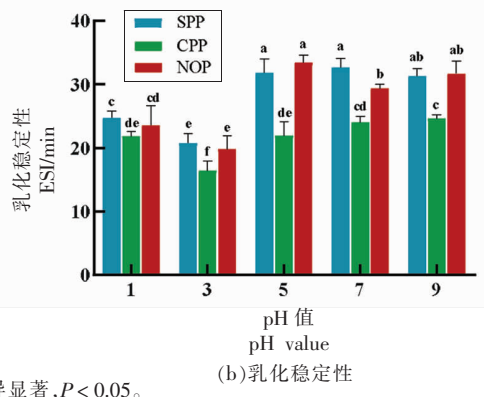
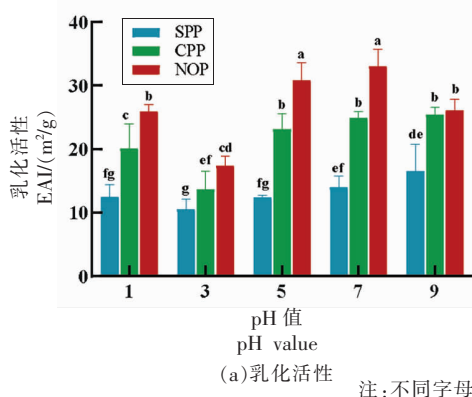


图 3 不同 pH 值下微藻蛋白的乳化特性

Fig.3 Emulsifying properties of microalgae proteins at different pH value

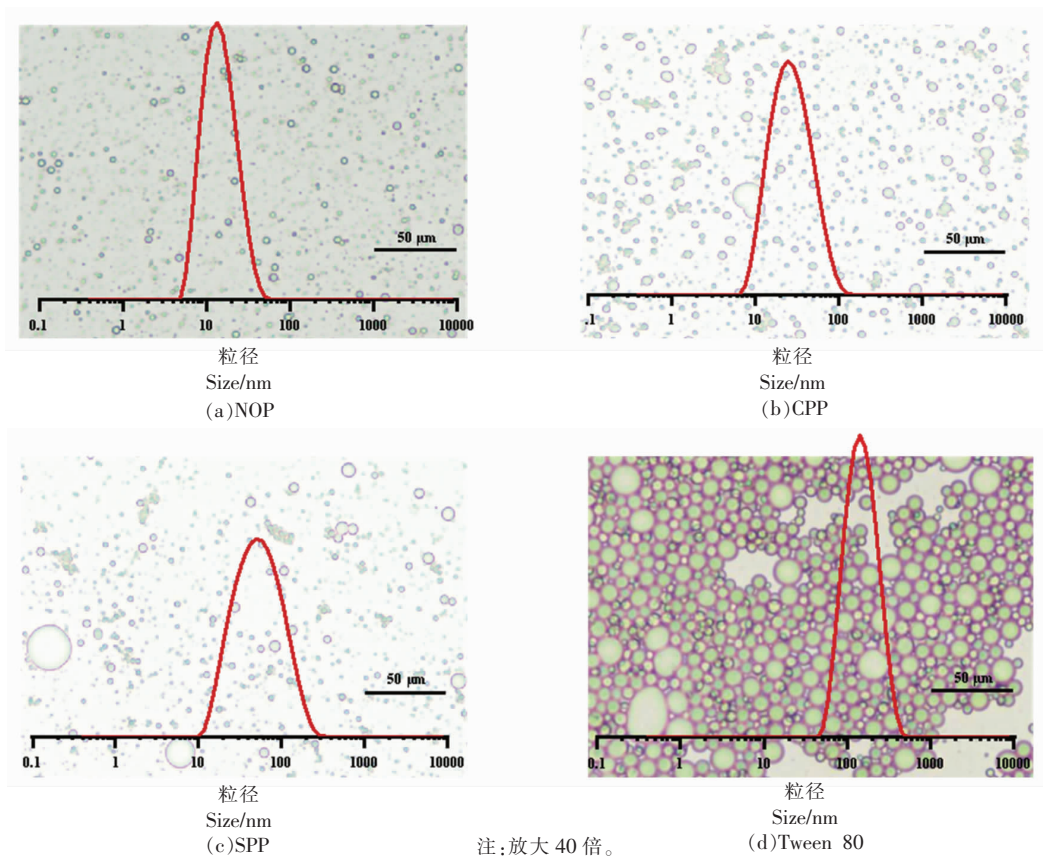
2.2 3 种微藻蛋白稳定的 DHA 藻油乳液表征

2.2.1 不同微藻蛋白稳定的 DHA 藻油乳液的微观结构 如图 4 所示,视野内的乳液液滴清晰可见。NOP 稳定乳液的液滴尺寸最小,分布均一,边

缘整齐清晰,几乎不存在絮凝现象,说明 NOP 产生厚实而紧密的界面层,为体系提供了较强的空间稳定性。比较而言,视野内 CPP 和 SPP 的液滴尺寸大,主要呈球形外观,存在部分破裂或不规则

形状液滴,絮凝严重。尤其是 CPP 稳定的乳液中絮凝体较多且大,然而,相较于 SPP,尺寸分布更均匀,以液滴团簇的形式均匀分散。此外,可以观察到 Tween 80 对照组中液滴尺寸最大,液滴形状

呈规则球形且排列最为紧密,表明发生严重絮凝,这归因于小分子表面活性剂在乳化过程中覆盖的液滴表面积不足。



注:放大40倍。

图4 不同微藻蛋白稳定的DHA藻油乳液的显微镜图像

Fig.4 Microscopic images of the DHA algae oil emulsions stabilized by different microalgae proteins

从 SEM 图像(图 5)上观察到 NOP 稳定的乳液冻干物的电镜视野最为清晰,颗粒尺寸最小,聚集体排列有序且表面光滑,表明冻干过程中液滴未发生大量破裂。尽管颗粒间结构紧凑,有明显的聚集现象,但是仍能观察到由尺寸较为均一的颗粒聚集而成。比较而言,SPP 和 CPP 稳定乳液的视野较为模糊,颗粒尺寸较大且分布不均匀,液滴彼此紧密挤压,其轮廓呈不规则的多边形。尤其是 SPP 的视野内最为模糊,“油糊”现象最为明显,表明在冻干过程中发生乳液液滴破裂,油相覆盖到冻干物表面,从而影响电镜观察。这可能是由于 SPP 和 CPP 在低温条件下稳定性较差,无法稳定吸附在油-水界面,体系结构发生部分崩塌,导致

连续性被破坏。对比来看,NOP 低温条件下表现出更好的稳定性。

2.2.2 不同微藻蛋白稳定的 DHA 藻油乳液的粒径分布 如图 6 所示。基于 3 种微藻蛋白制备的乳液粒径均呈单峰分布,NOP 的分布较 SOP 和 CPP 更宽,液滴尺寸更均一,集中分布在 5.61~50.7 d.nm 范围。与 Tween 80 乳液相比,SPP、CPP 和 NOP 3 种蛋白颗粒稳定乳液的单峰分布虽宽,但平均粒径显著低 1 个数量级,分别为 43.85,23.23,13.64 d.nm,表明 3 种微藻蛋白的乳化能力显著优于小分子表面活性剂。一般来说,PDI 越大,粒径分布范围越宽,越不利于体系稳定^[29]。由表 1 可知,3 种微藻蛋白的 PDI 均小于 0.3,能形成均一

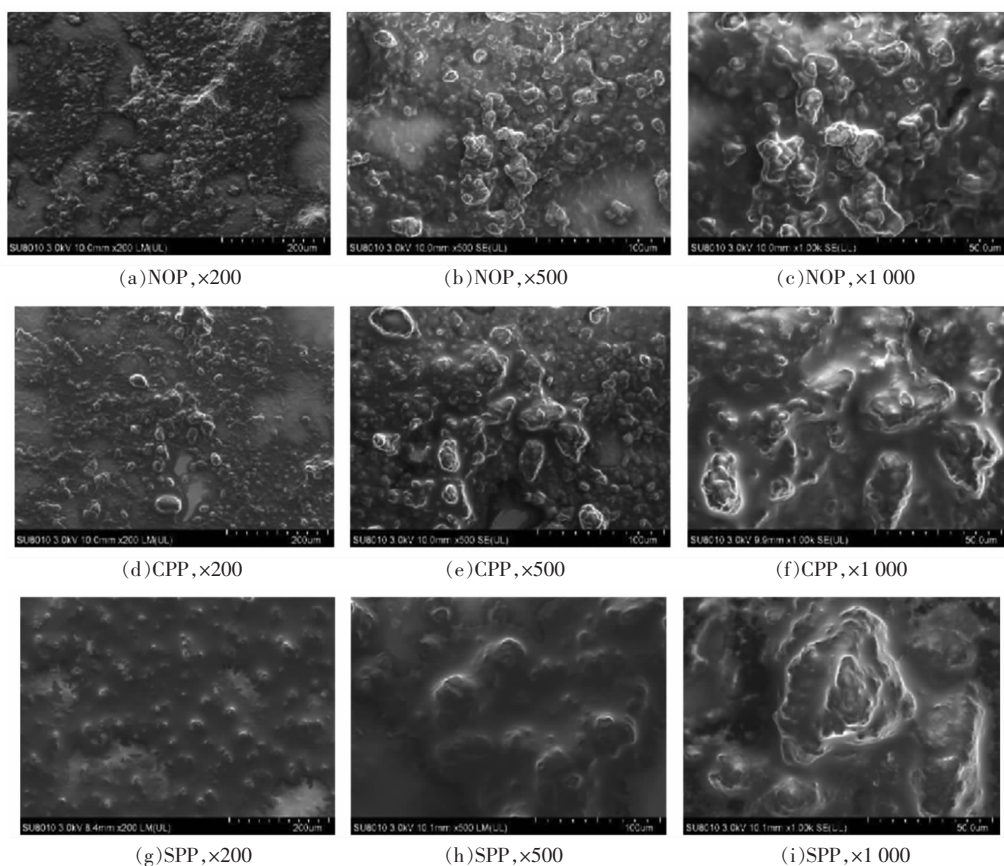


图 5 不同微藻蛋白稳定的 DHA 藻油乳液的扫描电镜图

Fig.5 Scanning electron microscopy micrographs of the DHA algae oil emulsions stabilized by different microalgae proteins

表 1 不同微藻蛋白稳定的 DHA 藻油乳液的平均粒径及多分散指数

Table 1 Z-Average size of DHA algae oil emulsions droplets stabilized by different microalgae proteins.

	Z-Average/d.nm	PDI
SPP-E	43.85 ^b	0.249 ^a
CPP-E	23.23 ^d	0.196 ^b
NOP-E	13.64 ^e	0.179 ^b
Tween 80-E	143.00 ^a	0.157 ^c

注:同一列不同字母表示差异显著, $P < 0.05$ 。

稳定的纳米乳液, 乳化性能依次是 $NOP > CPP > SPP$ 。

2.2.3 不同微藻蛋白稳定的 DHA 藻油乳液的流变特性 对 SPP、CPP、NOP、Tween 80 稳定的乳液进行频率扫描测试, 结果如图 7a 所示。整体来看, 当频率小于 10 rad/s 时, 4 种乳液的储能模量 (G') 和损耗模量 (G'') 随频率的增加而平缓上升, 在频率大于 10 rad/s 后, 观察到 G' 和 G'' 快速上升

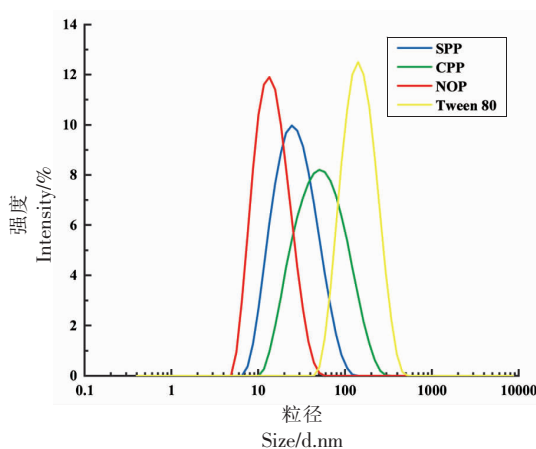


图 6 不同微藻蛋白稳定的 DHA 藻油乳液的粒径分布

Fig.6 Size distribution of DHA algae oil emulsions droplets stabilized by different microalgae proteins

且逐渐接近, 这可以解释为在高频扫描中界面层的蛋白质发生聚集, 乳液结构发生局部坍塌, 网络结构强度减弱。此外, 在全频率 0.1~100 rad/s 范围, 4 种乳液的储能模量 G' 均大于损耗模量 G'' 且

未发生交叉,表明扫描过程中发生弹性形变,乳液内部是以弹性为主的凝胶网状结构^[30]。在该频率范围,NOP稳定乳液的储能模量最大, CPP次之, SPP最小,这3种微藻蛋白均高于 Tween 80。一般来说,储能模量越大,乳液界面的刚性越强,体系越稳定^[31],这和乳化性能的研究结果一致。其中只有 SPP 稳定乳液的储能模量 G' 比损耗模量 G'' 大 1 个对数循环,而 CPP 稳定乳液的 G'' 接近 G' 且平行,这可能是由于前者具有更小的液滴尺寸,更大的相互作用以及更强的界面刚性,后者是典型的弱凝胶结构^[32]。

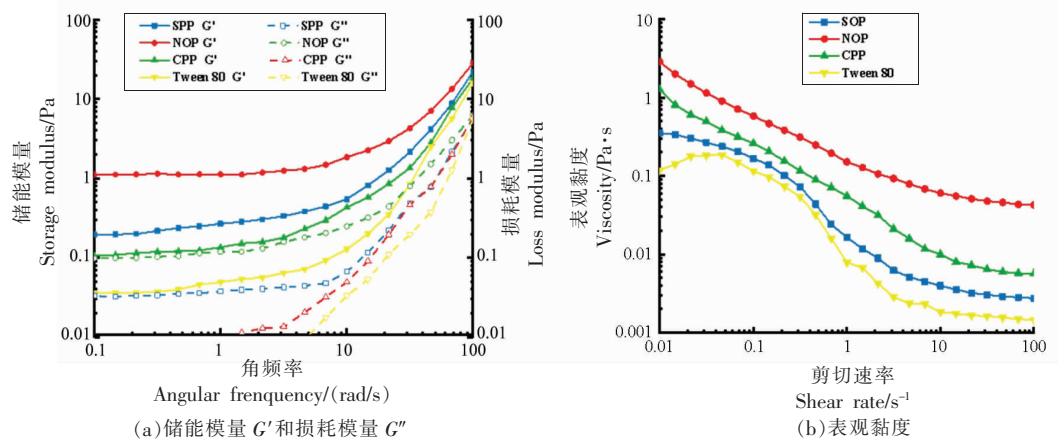


图7 不同微藻蛋白稳定的 DHA 藻油乳液的流变学特性

Fig.7 Rheological properties of DHA algae oil emulsions stabilized by different microalgae proteins

2.2.4 不同微藻蛋白稳定的 DHA 藻油乳液的 FTIR 光谱图 通过 FTIR 对乳液的化学成分进行定性和半定量分析,以确定分子水平上的官能团和结构基团,这有助于研究乳液内分子的包封以及不同微藻蛋白和 DHA 藻油之间的相互作用^[34]。如图 8 所示,从 7 条曲线上均可以观察到 DHA 藻油的特征峰,分别出现在 927 cm^{-1} (C=C 伸缩振动), $1\ 150\text{ cm}^{-1}$ ($-\text{CO}$ 伸缩振动), $1\ 366\text{ cm}^{-1}$ ($-\text{CH}_3$ 弯曲振动), $1\ 456\text{ cm}^{-1}$ ($-\text{CH}_2$ 弯曲振动), $1\ 747\text{ cm}^{-1}$ (C=O 伸缩振动), $3\ 000\sim 2\ 800\text{ cm}^{-1}$ (C-H 伸缩振动), $3\ 013\text{ cm}^{-1}$ (C=C-H 伸缩振动), $3\ 472\text{ cm}^{-1}$ (O-H 伸缩振动),这与 Karunathilaka 等^[35]对海藻油 FTIR 光谱的研究结果一致。此外,通过分析 3 种微藻蛋白稳定的乳液和 DHA 藻油的光谱,发现两者均显示相同的特征峰,证实了 DHA 藻油在微藻蛋白中成功被包封。同时,可以观察到微藻蛋白

如图 7b 所示,3 种微藻蛋白稳定乳液的表观黏度均随剪切速率的增大而降低,表现出“剪切变稀”的现象,类似于非牛顿假塑性流体。这是因为随着剪切速率的增加,剪切力破坏了聚集的脂肪球,导致乳液液滴絮凝并相互分离,流体中的微观结构发生重排,液滴定向排列阻力和乳液表观黏度降低^[33]。其中 NOP 稳定的乳液黏度最大, CPP 次之, SPP 的黏度最小,且都高于 Tween 80 对照组,这表明 3 种大分子微藻蛋白形成的连续相内的分子聚合作用显著优于小分子表面活性剂的。

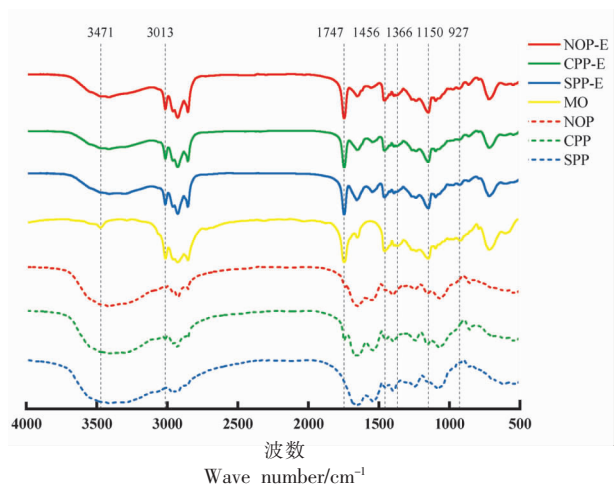


图8 不同微藻蛋白稳定的 DHA 藻油乳液的傅里叶变换红外光谱图

Fig.8 FTIR spectra of DHA algae oil emulsions stabilized by different microalgae proteins

和 DHA 藻油的所有特征峰都出现在乳液的 FTIR 光谱中,没有出现新的特征峰,表明微藻蛋白和藻油之间没有形成新的化学键,因此不存在修饰或相互作用^[36]。

2.2.5 不同微藻蛋白稳定的 DHA 藻油乳液的 XRD 图谱 图 9 显示 3 种微藻蛋白及其稳定乳液的 XRD 结果,可以观察到 SPP、CPP 和 NOP 的晶体结构极为相似,均在 2θ 为 26° , 32° , 45° , 54° 出现彼此独立且形状尖锐的衍射峰,表明三者是以良好的晶体结构为主的特性。其中 $2\theta=32^\circ$ 处衍射峰的高度最高,这是蛋白质材料的特征峰,在豌豆蛋白^[37]和乳清蛋白提取物^[38]中也观察到类似的特征衍射峰。比较来看,COP 的峰面积较其它两种微藻蛋白更大,表明 COP 的晶相含量最高。分析基于微藻蛋白稳定的 DHA 藻油乳液的 XRD 谱图可知,超声乳化后蛋白质原有的 4 个尖锐的衍射峰仍存在,这说明超声乳化未对蛋白质的晶体结构造成破坏,且其它组分和蛋白质之间没有发生新的化学相互作用,DHA 藻油在微藻蛋白稳定的乳液中成功实现包封^[39]。同时,在 2θ 为 32° 和 45° 处的衍射峰峰宽变窄且面积显著增大,说明超声乳化使蛋白质原有的晶体尺寸变大,含量增加。比较来看,NOP 稳定乳液在 $2\theta=32^\circ$ 时的衍射峰面积显著大于其它两种微藻蛋白,一般来说,峰面积越大,材料的结晶度越高^[40]。由于结晶区结构致密,密度大,分子间有较多坚固连接点,因此 NOP 稳定乳液的结晶度越高,其储藏稳定性越好,这也再次印证了前文^[41]有关稳定性的讨论。此外,超声乳化得到的乳液在 $2\theta=20^\circ$ 处增加了一个鼓包型的宽峰。据文献报道,衍射图谱中蛋白质的 β -折叠结构的峰角 $2\theta=20^\circ$ ^[42]。由此推测超声乳化使微藻蛋白的二级结构发生变化,反映了乳化剂与油相间的相互作用可以激发晶格中分子重新排列,这与先前有关大豆蛋白^[42]、酪蛋白^[43]晶体结构的研究报道相同。

2.2.6 不同微藻蛋白稳定的 DHA 藻油乳液的 FTIR 光谱图 图 10 显示 4 种乳液的 DSC 扫描图,可以观察到冷却过程出现明显的放热峰,加热过程中出现明显的吸热峰。对峰段进行适当放大,以进行进一步分析比较。DSC 降温段如图 10b 所示,可以观察到 4 种乳液均形成性状较为尖锐的

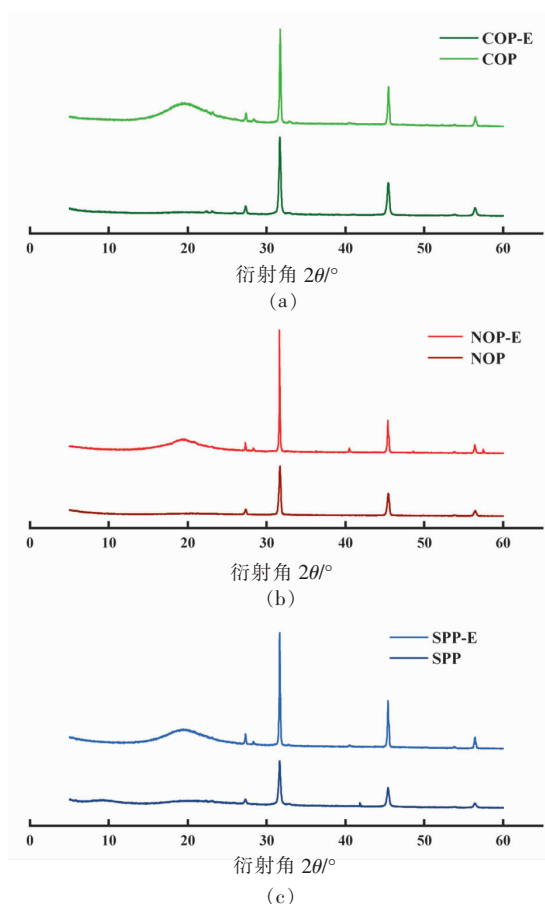


图 9 不同微藻蛋白及其稳定的 DHA 藻油乳液的 X-射线衍射图谱

Fig.9 XRD patterns of different microalgae proteins and emulsions stabilized by them

放热峰,峰值温度分别为 -9.11 , -11.79 , -12.73 , -15.6 $^\circ\text{C}$ (分别对应 SPP、CPP、NOP、Tween 80),焓值见表 2。这说明在降温过程中乳液发生冷结晶现象,尖锐型冻结峰是水包油型乳液的典型特征,钟型冻结峰是油包水型乳液的表现^[44],这证实了 4 种乳液均为水包油型乳液。此外,冰晶的形成和融化与蛋白质颗粒的性质密切相关,NOP 稳定乳液的冰晶形成温度显著低于 SPP 和 CPP,表明 NOP 稳定乳液的冰晶形成速度较慢,具有最高的冻融稳定性。这与 Zhong 等^[10]的报道是一致的,致密、稳定的凝胶状网络结构可以抑制结晶冰的形成,乳液的微观结构与其冻融稳定性密切相关。由表 2 可知,NOP 稳定乳液的焓变显著高于其它两种微藻蛋白,由图 10b 也可以观察到前者的放热峰面积更大,说明 NOP 稳定乳液的结晶度更高,稳定

性也更好。如图 10c 所示,4 种乳液在 $-5\sim 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 之间显示出明显的吸收峰,具体的峰值温度和焓变见表 2。峰值温度接近于冰和水的热力学平衡温度,表明乳液体系内的连续相主要以自由水的形式存在。其中 SPP、CPP 和 NOP 3 种微藻蛋白的峰值温度无显著差异,均低于 Tween 80 对照组,推测是因为后者在冷却过程中形成了更多的脂肪晶体,这会导致体系稳定性降低^[45]。

热重分析图如图 10d 所示,4 种乳液均在 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右发生最大减重,此时大部分自由水蒸发,样品质量由大到小依次是 $\text{NOP}>\text{CPP}>\text{SPP}>\text{Tween 80}$ 。随着温度的升高,样品几乎保持恒重,这归因于蛋白质颗粒在 DHA 藻油液滴外部形成的致密保护层,避免了油相挥发逸出。当温度继续攀高,Tween 80 稳定乳液在 $270\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右,3 种微藻蛋白稳定乳液在 $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ 开始二次减重,此时蛋白质发生变性、分解,样品质量由大到小依次是 $\text{CPP}>\text{NOP}>\text{SPP}>\text{Tween 80}$ 。此前也报道关于大分子蛋白质乳化剂(豌豆蛋白、大豆蛋白、玉米醇溶蛋白、乳清分离蛋白)对南极磷虾油有类似的保护作用,其

热重分析结果显示:以上 4 种蛋白均在 $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右即发生变性、碳化^[46]。与之相比,3 种微藻蛋白的变性温度更高,说明蛋白质颗粒对水包油型乳液热稳定性的保护,微藻蛋白表现更佳,优于传统的蛋白质乳化剂。

表 2 不同颗粒稳定的 DHA 藻油乳液的 DSC 图谱中的峰值温度和焓值

Table 2 Peak temperature and enthalpy in DSC spectra of DHA algae oil emulsions stabilized by different microalgae proteins.

	颗粒类型	峰值温度/ $^{\circ}\text{C}$	$\Delta H/(\text{J/g})$
降温段	SPP	-9.11	256.76
	CPP	-11.79	260.95
	NOP	-12.73	253.00
	Tween 80	-15.6	299.80
升温段	SPP	0.23	-250.58
	CPP	0.11	-263.30
	NOP	0.13	-249.62
	Tween 80	1.23	-317.66

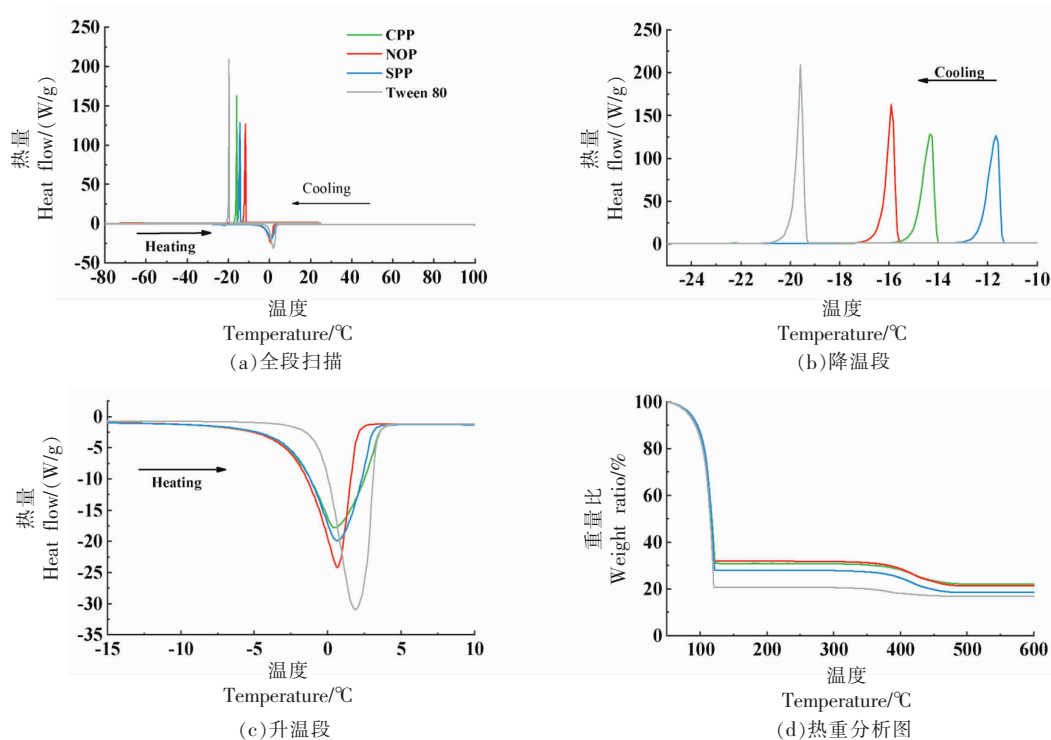


图 10 不同微藻蛋白稳定的 DHA 藻油乳液的 DSC 扫描图及热重分析图像

Fig.10 DSC spectra of of DHA algae oil emulsions stabilized by different microalgae proteins

2.2.7 不同微藻蛋白稳定的 DHA 藻油乳液的贮存稳定性 将样品置于冷藏温度 4 °C 下保存 0, 1, 7, 14 d 和 21 d, 考察 3 种微藻蛋白稳定乳液的粒径和外观变化, 分析其贮存稳定性, 如图 11 所示。整体来看, 3 种微藻蛋白稳定乳液的粒径水显著低于 Tween 80 对照组。其中 SPP 稳定的乳液粒径在储存 14 d 后显著增大, 之后呈明显上升趋势。储存 21 d 时粒径为 53.05 d.nm, 比新鲜制备时增大了 24%。CPP 稳定的乳液在储存 7 d 后粒径显著增大, 储存 21 d 后粒径为 40.95 d.nm, 较初始值翻倍。两者相比, 虽然 CPP 稳定乳液的贮存稳定性相对较差, 但是整体粒径水平始终低于 SPP。NOP 稳定的乳液不仅整体粒径尺寸最小, 而且在储存期间变化不明显, 表明 NOP 具有优越的贮存稳定性。

图 12 显示 3 种微藻蛋白稳定乳液在贮存期间的视觉外观。SPP 稳定的乳液在 24 h 即表现出相边界, 第 7 天开始边界逐渐清晰, 储存 21 d 后乳析指数达到 17.14%。CPP 稳定的乳液在制备初期(24 h)较 SPP 稳定, 乳析指数仅 5.35%, 储存 7 d 后出现边界清晰的分层现象, 之后乳脂层析出速率显著加快, 储存 21 d 后乳析指数高达 22.86%。NOP 稳定的乳液在储存 14 d 内一直保持

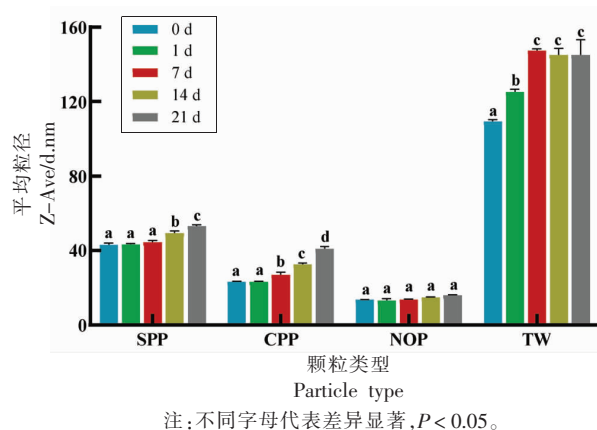


图 11 不同颗粒稳定的 DHA 藻油乳液的平均粒径及 21 d 内的变化

Fig.11 Average size of DHA algae oil emulsions droplets stabilized by different microalgae proteins during a storage period of 21 days

稳定状态, 无可可视化的相分离现象, 当储存 21 d 时可以观察到边界清晰的乳析层, 此时的乳析指数为 10.50%。不同微藻蛋白乳化剂的贮存稳定性归因于乳液的液滴尺寸和黏度, 其中较小的液滴尺寸和较高的连续相黏度可以改善乳析现象, 这同前文讨论的 NOP 稳定的乳液具有更小且均一的粒径和更优的流变性能是一致的。

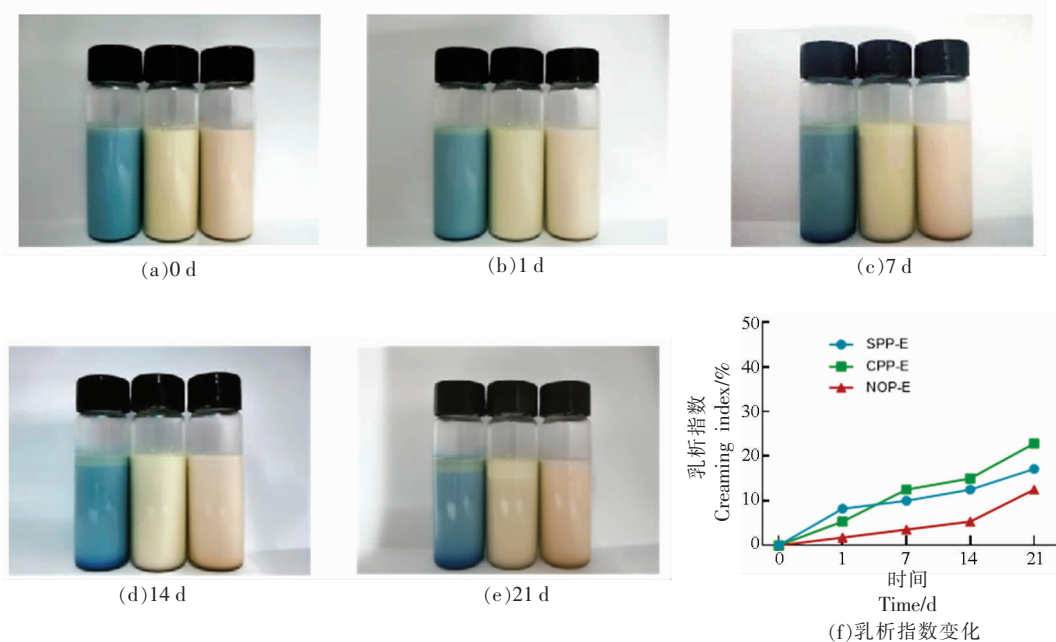


图 12 不同颗粒稳定的 DHA 藻油乳液贮藏 21 d 的外观及乳析指数变化

Fig.12 Visual appearance and creaming index changes of DHA algae oil emulsions stabilized by different microalgae proteins during a storage period of 21 days

3 结论

综合以上分析,从钝顶螺旋藻、蛋白核小球藻、拟微绿球藻3种微藻中分离的蛋白质乳化性质存在差异,这主要是受pH值和结构构象的影响。pH值为中性和碱性时,蛋白质的溶解度、表面疏水性、乳化活性、乳化稳定性较高,其中NOP和SPP受pH值的影响最大,其乳化特性在很大程度上依赖于结构构象和可溶性条件,在应用为乳化剂时应选择pH 7~9的加工条件。NOP、CPP、SPP均具有良好的乳化性,超声乳化可制得水包油型DHA藻油乳液,尤其是NOP稳定的乳液平均粒径仅为13.64 d.nm,体系均一,贮藏稳定性、热稳定性及体系的表观黏度也明显优于其它颗粒,具有作为植物蛋白乳化剂的应用潜力。

参 考 文 献

- [1] YAN X, MA C, CUI F, et al. Protein-stabilized Pickering emulsions: Formation, stability, properties, and applications in foods[J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 103: 293-303.
- [2] CUI Z, CHEN Y, KONG X, et al. Emulsifying properties and oil/water (O/W) interface adsorption behavior of heated soy proteins: effects of heating concentration, homogenizer rotating speed, and salt addition level[J]. J Agric Food Chem, 2014, 62(7): 1634-1642.
- [3] JULIUS W, MARJOLEIN W, KRASSIMIR P. Oil-in-water Pickering emulsions stabilized by colloidal particles from the water-insoluble protein zein[J]. Soft Matter, 2012, 8(25): 6807-6815.
- [4] ARNO G B, JOYE I J, DELCOUR J A. Understanding the air-water interfacial behavior of suspensions of wheat gliadin nanoparticles[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 102: 105638.
- [5] HENCHION M, HAYES M, MULLEN A M, et al. Future protein supply and demand: Strategies and factors influencing a sustainable equilibrium[J]. Foods, 2017, 6(7): 1-21.
- [6] RITALA A, HAKKINEN S T, TOIVARI M, et al. Single cell protein-state-of-the-art, industrial landscape and patents 2001-2016[J]. Front Microbiol, 2017, 8: 2009.
- [7] MUYS M, SUI Y, SCHWAIGER B, et al. High variability in nutritional value and safety of commercially available *Chlorella* and *Spirulina* biomass indicates the need for smart production strategies[J]. Bioresour Technol, 2019, 275: 247-257.
- [8] LAGRANGE V, WHITSETT D, BURRIS C. Global market for dairy proteins[J]. J Food Sci, 2015, 80(1): 16-22.
- [9] DAI L, HINRICHS J, WEISS J. Emulsifying properties of acid-hydrolyzed insoluble protein fraction from *Chlorella protothecoides*: Formation and storage stability of emulsions[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 108: 105954.
- [10] SCHWENZFEIER A, HELBIG A, WIERENGA P A, et al. Emulsion properties of algae soluble protein isolate from *Tetraselmis* sp.[J]. Food Hydrocolloids, 2013, 30(1): 258-263.
- [11] BENELHADJ S, GHARSALLAOUI A, DEGRAEVE P, et al. Effect of pH on the functional properties of *Arthrospira* (*Spirulina*) platensis protein isolate[J]. Food Chem, 2016, 194: 1056-1063.
- [12] BLEAKLEY S, HAYES M. Functional and bioactive properties of protein extracts generated from *Spirulina platensis* and *Isochrysis galbana* T-Iso[J]. Applied Sciences, 2021, 11(9): 3694.
- [13] KAUR M, SINGH N. Characterization of protein isolates from different Indian chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars[J]. Food Chemistry, 2007, 102(1): 366-374.
- [14] ASEN N D, ALUKO R E. Physicochemical and functional properties of membrane-fractionated heat-induced pea protein aggregates[J]. Front Nutr, 2022, 9: 852225.
- [15] NESTERENKO A, ALRIC I, VIOLLEAU F, et al. A new way of valorizing biomaterials: The use of sunflower protein for α -tocopherol microencapsulation[J]. Food Research International, 2013, 53(1): 115-124.
- [16] ZHONG M, SUN Y, SUN Y, et al. Determination of the pH- and thermal stability mechanism of lipophilic protein-hydroxypropyl methylcellulose oil-in-water emulsion[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 155: 112969.
- [17] ZHU X F, ZHENG J, LIU F, et al. The influence of ionic strength on the characteristics of heat-induced soy protein aggregate nanoparticles and the freeze-thaw stability of the resultant Pickering emul-

- sions[J]. *Food Funct*, 2017, 8(8): 2974–2981.
- [18] DING Y, CHEN L, SHI Y, et al. Emulsifying and emulsion stabilizing properties of soy protein hydrolysates, covalently bonded to polysaccharides: The impact of enzyme choice and the degree of hydrolysis[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 113: 106519.
- [19] ZHANG S, HOLMES M, ETTELAIE R, et al. Pea protein microgel particles as Pickering stabilisers of oil-in-water emulsions: Responsiveness to pH and ionic strength[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 102: 105583.
- [20] GROSSMANN L, HINRICHS J, WEISS J. Cultivation and downstream processing of microalgae and cyanobacteria to generate protein-based technofunctional food ingredients[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2020, 60(17): 2961–2989.
- [21] LUPATINI A L, COLLA L M, CANAN C, et al. Potential application of microalga *Spirulina platensis* as a protein source[J]. *J Sci Food Agric*, 2017, 97(3): 724–732.
- [22] JOSHI M, ADHIKARI B, ALDRED P, et al. Interfacial and emulsifying properties of lentil protein isolate[J]. *Food Chem*, 2012, 134(3): 1343–1353.
- [23] MANTOVANI R A, FURTADO G F, NETTO F M, et al. Assessing the potential of whey protein fibril as emulsifier[J]. *Journal of Food Engineering*, 2018, 223: 99–108.
- [24] 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.
- [25] CHALAMAIAH M, ESPARZA Y, TEMELLI F, et al. Physicochemical and functional properties of livetins fraction from hen egg yolk[J]. *Food Bioscience*, 2017, 18: 38–45.
- [26] CHEUNG L, WANASUNDARA J, NICKERSON M T. Effect of pH and NaCl on the emulsifying properties of a napin protein isolate[J]. *Food Biophysics*, 2014, 10(1): 30–38.
- [27] ACHOURI A, BOYE J I, YAYLAYAN V A, et al. Functional properties of glycosylated soy 11S glycinin[J]. *Journal of Food Science*, 2006, 70(4): C269–C274.
- [28] LAJNAF R, GHARSALLAH H, JRIDI M, et al. Antioxidant and antibacterial activities, interfacial and emulsifying properties of the apo and holo forms of purified camel and bovine alpha-lactalbumin[J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 165 (Pt A): 205–213.
- [29] PONGSUMPUN P, IWAMOTO S, SIRIPATRAWAN U. Response surface methodology for optimization of cinnamon essential oil nanoemulsion with improved stability and antifungal activity[J]. *Ultrason Sonochem*, 2020, 60: 104604.
- [30] RAFE A, MOUSAVI S S, SHAHIDI S A. Dynamic rheological behavior of rice bran protein (RBP): Effects of concentration and temperature [J]. *Journal of Cereal Science*, 2014, 60(3): 514–519.
- [31] NIU F, NIU D, ZHANG H, et al. Ovalbumin/gum arabic-stabilized emulsion: Rheology, emulsion characteristics, and Raman spectroscopic study [J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 52: 607–614.
- [32] JAIN S, WINUPRASITH T, SUPHANTHARIKA M. Design and synthesis of modified and resistant starch-based oil-in-water emulsions[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 89: 153–162.
- [33] LIU Z, SHEN R, YANG X, et al. Characterization of a novel konjac glucomannan film incorporated with Pickering emulsions: Effect of the emulsion particle sizes[J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 179: 377–387.
- [34] HEIDARI F, JAFARI S M, ZIAIFAR A M, et al. Preparation of Pickering emulsions stabilized by modified silica nanoparticles via the Taguchi approach[J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(8): 1561.
- [35] KARUNATHILAKA S R, CHOI S H, MOSSOBA M M, et al. Rapid classification and quantification of marine oil omega-3 supplements using ATR-FTIR, FT-NIR and chemometrics[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2019, 77: 9–19.
- [36] HOSSEINI S F, ZANDI M, REZAEI M, et al. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and *in vitro* release study[J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 95 (1): 50–56.
- [37] LAN Y, XU M, OHM J B, et al. Solid dispersion-based spray-drying improves solubility and mitigates beany flavour of pea protein isolate[J]. *Food Chem*, 2019, 278: 665–673.
- [38] FARROKHI F, EHSANI M R, BADI F, et al. Structural and thermal properties of nanofibrillated whey protein isolate in the glassy state[J]. *LWT*, 2018, 95: 274–281.
- [39] RASUL N H, ASDAGH A, PIRSA S, et al. Devel-

- opment of antimicrobial/antioxidant nanocomposite film based on fish skin gelatin and chickpea protein isolated containing microencapsulated *Nigella sativa* essential oil and copper sulfide nanoparticles for extending minced meat shelf life[J]. *Materials Research Express*, 2022, 9(2): 025306.
- [40] 李杨, 刘墨, 胡森, 等. 不同结晶度几丁质纳米晶体制备皮克林乳液稳定性研究[J]. *农业机械学报*, 2020, 51(3): 334–340.
LI Y, LIU Z, HU M, et al. Stability of Pickering emulsions prepared by different crystallinity index values chitin nanocrystals [J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2020, 51(3): 334–340.
- [41] NEVARA G A, SYED MUHAMMAD S K, ZAWAWI N, et al. Physicochemical and functional properties of carbohydrate–protein gum extracted from kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) seed[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2021, 57(1): 258–267.
- [42] ZHAO X, ZHU H, ZHANG B, et al. XRD, SEM, and XPS analysis of soybean protein powders obtained through extraction involving reverse micelles [J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2015, 92(7): 975–983.
- [43] BENSALAH B. Spectroscopy characterization of acid and rennet camel milk caseins using XRD, XPS, and SEM and effects on their emulsifying properties [J]. *Mljekarstvo*, 2022, 72 (3): 161–171.
- [44] DALMAZZONE C, NOÏK C, CLAUSSE D. Application of DSC for emulsified system characterization[J]. *Oil & Gas Science and Technology–Revue de l'IFP*, 2008, 64(5): 543–555.
- [45] LI C, MEI Z, LIU Q, et al. Formation and properties of paraffin wax submicron emulsions prepared by the emulsion inversion point method[J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2010, 356 (1/2/3): 71–77.
- [46] 赵嘉雯. 基于南极磷虾油的新型乳液的制备、特性表征及其水凝胶系统的性质研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2021.
ZHAO J W. Preparation and characterization of a novel emulsion based on Antarctic Krill oil and the properties of its hydrogel system [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2021.

Emulsifying Properties of Proteins Extracted from Three Microalgal Species

Zhao Yan, Yu Huilin, Qiu Yang, Li Honghao, Xia Shengyao, Zhu Jiajin*

(*Institute of Food Science, School of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058*)

Abstract The three microalgal proteins – *Spirulina platensis* protein (SPP), *Chlorella pyrenoidosa* protein (CPP), and *Nannochloropsis oculata* protein (NOP) were isolated, and their emulsifying properties and interfacial characteristics were examined across pH values of 1, 3, 5, 7, and 9. Emphasis was placed on comparing and evaluating the stability, rheology, and morphology of DHA algal oil emulsions that were stabilized by SPP, CPP, and NOP. Results indicated that near their respective isoelectric points (pH 3), minimal solubility, emulsifying activity, emulsion stability, and maximal hydrophobicity were exhibited by SPP, CPP, and NOP. Higher solubility and emulsion stability were shown by NOP and SPP compared to CPP, whereas superior emulsifying activity, especially for NOP, was exhibited by NOP and CPP. Nanoemulsions were prepared by sonication, using pH 7 microalgal protein solutions as the continuous phase and 10% DHA algal oil as the dispersed phase, revealing a distinct water-in-oil structure observed via microscopic and SEM imaging. Successful encapsulation of DHA algal oil within all three microalgal proteins was confirmed by XRD and FTIR, with DSC and TGA results demonstrating good thermal stability. Among them, NOP-stabilized emulsions exhibited the smallest average particle size, most uniform dispersion, superior rheological properties, apparent viscosity, and storage stability compared to CPP and SPP, indicating potential applications as high-quality plant protein emulsifiers.

Keywords microalgae protein; DHA algae oil; emulsifying property