

响应面法优化羊肚菌中蛋白质的提取工艺

李 思, 孟 萌, 马彦华, 张舒靖, 燕 婷, 张立洁, 胡 月, 许程剑*

(石河子大学食品学院, 石河子 832000)

摘 要: **目的** 采用响应面法优化羊肚菌蛋白质的提取工艺。**方法** 通过超声波辅助提取羊肚菌蛋白, 以蛋白得率为指标, 考察超声温度、超声时间、料液比和 pH 对羊肚菌蛋白得率的影响。在单因素的基础上通过 Box-Behnken 试验对提取工艺试验进行优化试验。**结果** 超声波辅助提取羊肚菌蛋白的最佳工艺条件为: 料液比 1:50 (g:mL)、超声时间 60 min、提取温度 60 °C、pH 12, 在此条件下蛋白得率为(32.56±0.50)%, 与预测值 32.99%接近。通过响应面分析得到的多元二次回归方程 $Y=32.56+0.97A-1.21B+1.24C-0.2AB-1.07AC-1.45BC-1.86A^2-4.26B^2-1.87C^2$, 该模型可较好地预测羊肚菌蛋白得率, 其中各因素对蛋白质得率影响的大小依次为: pH > 超声温度 > 超声时间。**结论** 本研究为羊肚菌蛋白的提取提供基础。

关键词: 羊肚菌; 蛋白质; 超声波; 响应面法

Optimization of protein extraction from *Morchella* by response surface methodology

LI Si, MENG Meng, MA Yan-Hua, ZHANG Shu-Jing, YAN Ting, ZHANG Li-Jie,
HU Yue, XU Cheng-Jian*

(Food College of Shihezi University, Shihezi 832000, China)

ABSTRACT: Objective To optimize the extraction process of *Morchella* protein by response surface methodology. **Methods** Through the single factor experiment, taking the yield of *Morchella* protein as the index, using the ultrasonic assisted extraction technology, respectively, to investigate the influence of ultrasonic temperature, ultrasonic time, material liquid ratio and pH on the yield of *Morchella* protein. On the basis of the single factor experiment, three kinds of factors, ultrasonic temperature, ultrasonic time and pH, were selected to optimize the experiment through the box Behnken experiment design. **Results** The optimum conditions of ultrasonic assisted extraction of *Morchella* protein were the ratio of material to liquid 1:50 (g:mL) , ultrasonic time 60 min, extraction temperature 60 °C, pH 12. Under the optimum conditions, the actual protein yield was (32.56±0.50)%, which was very close to the predicted value of 32.99%. The multiple quadratic regression equation obtained by response surface analysis showed that the yield of *Morchella* protein was $Y=32.56+0.97A-1.21B+1.24C-0.2AB-1.07AC-1.45BC-1.86A^2-4.26B^2-1.87C^2$, which could better predict the extraction effect of *Morchella* protein. The effects of each factor on protein yield were pH, ultrasound temperature and ultrasound time. **Conclusion** This study can provide the basis for protein extraction and functional study of *Morchella*.

KEY WORDS: *Morchella*; protein; ultrasound; response surface methodology

基金项目: 国家大学生创新创业训练计划项目(201910759049)

Fund: Supported by the National Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students (201910759049)

*通讯作者: 许程剑, 博士, 副教授, 主要研究方向为天然产物制备与功能活性研究。E-mail: helloxj_2000@163.com

*Corresponding author: XU Cheng-Jian, Ph.D, Associate Professor, School of food, Shihezi University, Shihezi 832003, China. E-mail: helloxj_2000@163.com

1 引 言

羊肚菌(*Morchella essulenta*)又名羊肚菜、羊肚蘑等,属盘菌目羊肚菌科羊肚菌属,是一种珍贵的药食兼用大型真菌^[1]。到目前为止,中国已知有大约 20 种羊肚菌,在自然生长下可以长到 200 g。羊肚菌富含蛋白质、多糖、维生素、有机酸、多酚复合物和多种矿物质,具有增强机体免疫力^[2]、抗疲劳^[3]、消炎、抗氧化^[4]、抗病毒和抗肿瘤^[5]等作用,是一味良好的传统中药^[6,7]。

羊肚菌被国际公认为是蛋白质的极佳来源^[8],其粗蛋白含量超过 20%,并含有顺-3-氨基-L-脯氨酸、2,4-二氨基异丁酸和 α-氨基异丁酸等具有独特风味的稀有氨基酸,氨基酸含量在所有食用菌中位列第一。羊肚菌蛋白具有脂氧合酶和葡萄糖裂解酶活性及抑制血小板聚集等多种作用^[9],是营养和功能性食品开发的良好原料,但目前国内外关于羊肚菌子实体蛋白的分离提取研究较少。

蛋白质的提取方法主要有酶法、水提法、碱提酸沉法等。其中碱提酸沉法因其操作简单、产量高,应用非常广泛。徐玥等^[10]采用碱提酸沉法,确定了牡丹籽饼中蛋白质的最佳提取条件。宁伟伟^[11]以奇亚籽饼为原料,采用碱提酸沉法提取奇亚籽蛋白,并对其营养价值和功能特性进行了研究。

本研究以羊肚菌子实体为研究对象,采用超声辅助碱提酸沉法提取羊肚菌子实体蛋白,通过单因素试验和响应面法得到最佳提取工艺,为羊肚菌蛋白功能性研究及保健食品的开发提供理论基础。

2 材料与方法

2.1 试剂与仪器

2.1.1 试 剂

羊肚菌购于石河子农科院;亚硫酸氢钠(NaHSO_3)、氢氧化钠(NaOH)、盐酸(HCl)、酪蛋白、硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)、酒石酸钾钠、苯酚、正丁醇、氯化钠(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。

2.1.2 仪 器

HD-500A 高速多功能破碎机(诸暨市海道机械有限公司);XB-220A 分析天平(瑞士普利赛斯有限公司);DK-8D 数字式恒温水浴锅(江苏金怡仪器科技有限公司);KQ-250B 超声波清洗器(昆山市超声波仪器有限公司);CR21G 高速冷冻离心机(日本日立公司);EONC 多功能酶标仪(美国伯腾仪器有限公司)。

2.2 试验方法

2.2.1 羊肚菌蛋白质提取方法

参考相关文献^[12],利用碱提酸沉法提取羊肚菌蛋白:将羊肚菌干制品用粉碎机粉碎,过 60 目筛,按照一定的料

液比加入蒸馏水,调节 pH 值,在一定温度下超声浸提一段时间。然后以 8000 r/min 的转速,离心 10 min,取上清液,用双缩脲法测羊肚菌的蛋白含量。

2.2.2 双缩脲法测羊肚菌蛋白质

采用双缩脲法^[13]测定羊肚菌蛋白质得率。

标准曲线的绘制:分别吸取 5 mg/mL 的标准酪蛋白溶液 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 于试管中,再用去离子水补齐至 1 mL。向每个试管中加入 4 mL 双缩脲试剂,摇匀后静置 30 min,测其在 540 nm 处的吸光度。最后以标准蛋白含量(mg/mL)为横坐标,吸光度 A 为纵坐标,绘制标准曲线。

蛋白质得率的计算:得率($\%$)= $(\rho_i V/1000m) \times 100$

式中: ρ_i —样品上清液中蛋白质的含量,mg/mL; V —上清液的体积,mL; m —羊肚菌样品的质量,g。

2.2.3 单因素试验

(1)料液比

50 °C, pH11 条件下,设置料液比为 1:20、1:30、1:40、1:50、1:60 (g/mL),超声 60 min,离心分离后测上清液中蛋白质的含量。

(2)pH 值

50 °C, 料液比为 1:40 条件下,调节 pH 值分别为 8、9、10、11、12、13,超声处理 60 min,离心后确定上清液中蛋白质含量。

(3)超声温度

pH11, 料液比为 1: 40 条件下,设置超声温度分别为 30、40、50、60、70、80 °C,超声处理 60 min,离心分离后测蛋白质含量。

(4)超声时间

50 °C, pH 11, 料液比为 1:40 条件下,分别超声提取 40、50、60、70、80 min,离心后测定蛋白质的含量。

2.2.4 Box-Behnken 试验设计

基于单因素试验结果,选取超声温度、pH 值和超声时间 3 个因素为响应因子,以蛋白质得率为响应值,进行 3 因素 3 水平的响应面试验,因子水平设计如表 1 所示。

表 1 响应面设计的因素和水平			
Table 1 Factors and levels of response surface design			
水平	因素		
	A 超声时间/min	B 超声温度/°C	C 碱提 pH
-1	50	50	11
0	60	60	12
1	70	70	13

3 结果与分析

3.1 双缩脲标准曲线

由图 1 可知双缩脲标准曲线方程为： $Y=0.059957X+0.02038$, $r^2=0.9956$, 经显著性检验, 回归关系达到显著水平。

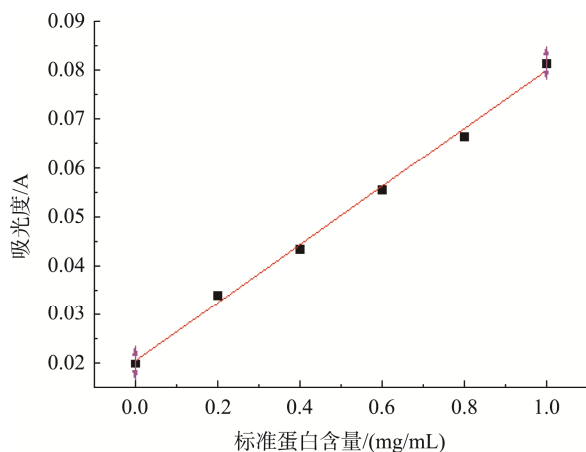


图 1 酪蛋白标准曲线
Fig.1 Standard curve of casein

3.2 单因素试验结果

3.2.1 料液比的影响

如图 2 所示, 料液比较低时其蛋白质得率较低, 这是因为羊肚菌粉末较细, 提取体系黏度较大, 物料扩散速度慢, 不利于蛋白质的溶出, 使提取不完全^[14]。随着料液比逐渐增加, 羊肚菌粉充分溶解, 蛋白质溶出渐多, 得率不断增大, 在 1:50(g:mL)时得率最高随着蛋白被充分提取, 其得率不断降低并趋于平稳。

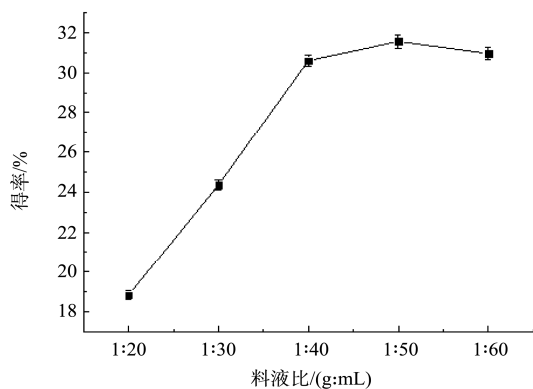


图 2 料液比对蛋白得率的影响($n=3$)
Fig.2 Effect of feed liquid ratio on protein yield ($n=3$)

3.2.2 pH 的影响

如图 3 所示, 随着溶液 pH 的增大, 蛋白质得率升高, 当 pH 为 12 时, 蛋白质的得率最大, 当 pH 继续增大时, 蛋白质发生变性, 得率下降。

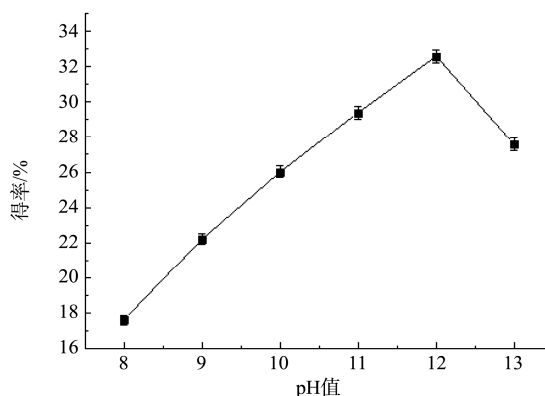


图 3 pH 对蛋白得率的影响($n=3$)
Fig.3 Effect of pH on protein yield ($n=3$)

3.2.3 超声温度的影响

如图 4 所示, 蛋白质得率随温度的升高先增大后减小。当温度为 60 °C 时, 蛋白质的得率达到最大, 随着温度的继续提高, 蛋白质发生热变性, 蛋白质的粘度增大, 溶出困难, 蛋白质得率不断下降。

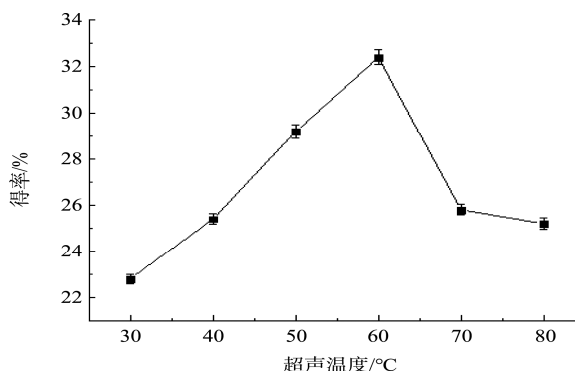


图 4 超声温度对蛋白得率的影响($n=3$)
Fig.4 Effect of ultrasound temperature on protein yield ($n=3$)

3.2.4 超声时间的影响

如图 5 所示, 超声时间在 60 min 时, 羊肚菌蛋白得率达到最高水平。超声时间小, 超声波空化作用强, 随着超声时间的延长, 细胞破碎程度增大, 加速了羊肚菌细胞内蛋白质的溶出。但超声时间过长, 可能使部分蛋白质发生变性与水解释^[15], 从而使蛋白质的得率下降。

3.3 响应面试验优化分析

3.3.1 响应面试验设计结果及方差分析

Box-Behnken 试验设计及结果如表 2, 利用 Design-Expert 8.0 进行二次多元回归拟合, 得到超声时间(A)、超声温度(B)和 pH(C)与响应值提取率(Y)的关系。其多元二次回归方程为： $Y=32.56+0.97A-1.21B$

+1.24C-0.24AB-1.07AC-1.45BC-1.86A²-4.26B²-1.87C²。

根据表 3 的方差分析结果可知, 方程模型的 $P<0.0001$, 说明该方程模型非常显著。模型失拟项 $P=0.7068>0.05$, 不显著。方程模型的确定系数 $r^2=0.9830$, 模型拟合良好, 模型成立。由 F 值可知各因素对蛋白得率影响的大小为 $C(\text{pH})>B(\text{超声温度})>A(\text{超声时间})$ 。由 P 值可知一次项 A 、 B 、 C 和二次项 A^2 、 B^2 和 C^2 对蛋白得率影响极显著; 交互项 BC 、 AC 的 P 值均小于 0.05, 交互作用显著, 交互项 AB 的 P 值大于 0.05, 交互作用不显著。由此可知, 各因素对蛋白得率的影响不是简单的线性关系。

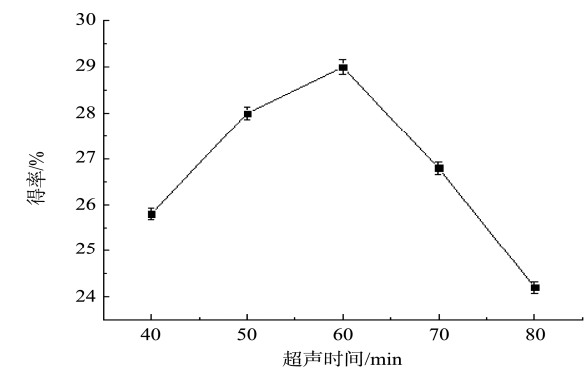


图 5 超声时间对蛋白得率的影响($n=3$)
Fig.5 Effect of ultrasound time on protein yield ($n=3$)

表 2 Box-Behnken 试验设计及结果				
Table 2 Box Behnken test design results				
试验号	A-超声时间/min	B-超声温度/°C	C-pH	得率/%
1	60	70	13	24.65
2	60	60	12	31.56
3	70	70	12	26.13
4	60	60	12	32.56
5	60	60	12	32.56
6	50	50	12	26.35
7	60	60	12	33.57
8	50	60	11	25.29
9	50	60	13	30.16
10	70	60	11	29.63
11	60	50	11	25.32
12	70	50	12	28.45
13	60	70	11	25.3
14	60	60	12	32.56
15	50	70	12	24.84
16	60	50	13	30.46
17	70	60	13	30.22

表 3 回归方程方差分析						
Table 3 Analysis of variance of regression equation						
方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
模型	160.17	9	17.80	45.04	<0.0001	**
A-超声时间	7.59	1	7.95	19.20	0.0032	**
B-超声温度	11.66	1	11.66	29.53	0.0010	**
C-pH	12.38	1	12.38	31.33	0.0008	**
AB	0.16	1	0.16	0.42	0.5399	
AC	4.58	1	4.58	11.59	0.0114	*
BC	8.38	1	8.38	21.22	0.0025	**
A ²	14.62	1	14.62	37.01	0.0005	**
B ²	76.27	1	76.27	193.07	< 0.0001	**
C ²	14.78	1	14.78	37.41	0.0005	**
残差	2.77	7	0.40			
失拟项	0.75	3	0.25	0.49	0.7068	
净误差	2.02	4	0.51			
总误差	162.93	16				

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

3.3.2 交互作用对蛋白得率影响的响应面分析

等高线图和响应面图可以反映出两因素的相互作用对蛋白得率的影响。等高线图变得越圆,影响越小,越扁,影响越大;响应面的曲面越陡,影响越大^[11]。各因素两两交互作用的等高线和响应面图如图 6~8 所示。从等高线图中可以看出,交互作用 BC 的等高线图最扁,交互作用 AC 的次之,交互作用 AB 的等高线图最趋于圆形。从响应面图可以看出交互作用 BC 的曲面最陡,交互作用 AC 的次之,交互作用 AB 的曲面陡峭程度最小。等高线图和响应面图的分析结果与表 3 中的方差分析结

果一致。

3.3.3 提取工艺最佳条件的确定验证

由 Design-Expert 8.0.6 软件进行数据分析可得羊肚菌蛋白最佳提取条件为:超声时间 61.68 min、超声温度 57.92 °C、pH 12.37,羊肚菌蛋白得率为 32.99%。考虑到实际操作过程的方便性与可行性,修正提取条件为超声时间 60 min、超声温度 60 °C、pH 值 12,在此优化条件下进行 3 次平行验证试验,测得蛋白得率为(32.56±0.50)%,与预测值非常接近,说明该试验模型可以较好地预测羊肚菌蛋白的实际提取效果。

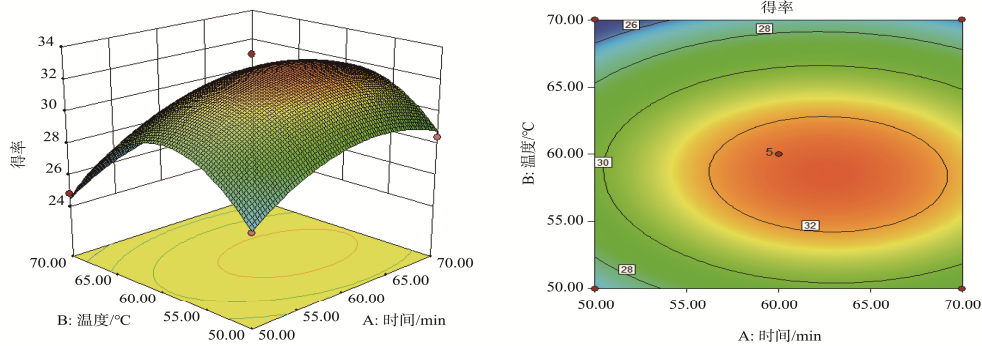


图 6 时间和温度对羊肚菌得率的等高线与响应面
Fig.6 Contour and response surface of time and temperature to *Morchella* yield

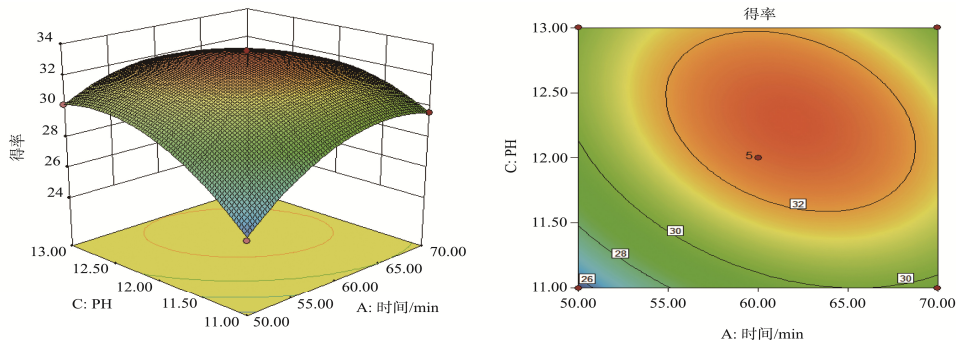


图 7 时间和 pH 对羊肚菌得率的等高线与响应面
Fig.7 Contour and response surface of time and pH to *Morchella* yield

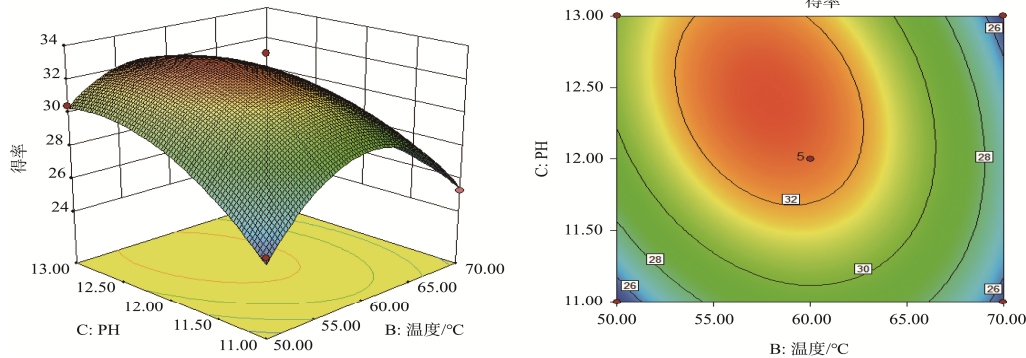


图 8 温度和 pH 对羊肚菌蛋白质得率的等高线与响应面
Fig.8 Contour and response surface of temperature and pH on protein yield of *Morchella*

4 结 论

本研究采用超声辅助碱提酸沉法对羊肚菌蛋白提取工艺进行优化, 得到最佳工艺条件: 料液比 1:50(g:mL)、超声时间 60 min、提取温度 60 °C、pH 为 12。在此条件下羊肚菌蛋白得率为 32.56%。因超声波辅助提取方法条件较为温和, 通过本方法可以在保护羊肚菌蛋白结构不受破坏的同时较大程度地提高其提取效率, 为羊肚菌蛋白的工业化生产提供理论支持。

参考文献

- [1] 熊亚, 李敏杰. 羊肚菌菌丝体基础培养基的优化[J]. 中国酿造, 2013, 32(5): 114–118.
Xiong Y, Li MJ. Optimization of the basic culture medium of *Morchella mycelium* [J]. Brew Chin, 2013, 32(5): 114–118.
- [2] J GDC, Nirmal P, David SP, *et al.* Isolation of a galactomannan that enhances macrophage activation from the edible fungus *Morchella esculenta* [J]. J Agric Food Chem, 2002, 50(20): 5683–5685.
- [3] 熊正英, 张海信. 羊肚菌与运动能力的关系[J]. 安徽体育科技, 2004, 25(3): 46–48.
Xiong ZY, Zhang HX. Relationship between *Morchella* and sports ability [J]. Anhui Sport Sci Technol, 2004, 25(3): 46–48.
- [4] Fu LH. Evaluation of antioxidant activity of the extrapopolysaccharides from *Morchella esculenta* [J]. Food Funct, 2013, 10(4): 1–28.
- [5] Hu ML, Chen Y, Wang C, *et al.* Induction of apoptosis in Hep G2 cells by polysaccharide MEP-II from the fermentation broth of *Morchella esculenta* [J]. Biotechnol Lett, 2013, (35): 1–10.
- [6] Heleno SA, Stojković D, Barros L, *et al.* A comparative study of chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of *Morchella esculenta* (L.) Pers. from Portugal and Serbia [J]. Food Res Internat, 2013, 51(1): 236–243.
- [7] Meng FY, Zhou B, Lin RS, *et al.* Extraction optimization and in vivo antioxidant activities of exopolysaccharide by *Morchella esculenta* SO-01 [J]. Bioresour Technol, 2010, 101(12): 4564–4569.
- [8] 付天宇. 基于深层发酵的羊肚菌功能性食品研究[D]. 长春: 吉林大学, 2013.
Fu TY. Functional food research of *Morchella* based on deep fermentation [D]. Changchun: Jilin University, 2013.
- [9] 李春红. 三种真菌类中药材的蛋白质凝胶电泳分析[D]. 重庆: 重庆大学, 2016.
Li CH. Protein gel electrophoresis analysis of three kinds of fungi Chinese

herbal medicine [D]. Chongqing: Chongqing University, 2016.

- [10] 徐玥, 张存芳, 杨耿, 等. 碱提酸沉法提取牡丹籽饼中蛋白质的研究[J]. 中国油脂, 2019, 44(8): 28–30, 40.
Xu Y, Zhang CL, Yang G, *et al.* Extraction of protein from peony seed cake by alkali extraction and acid precipitation [J]. Chin Oils Fats, 2019, 44(8): 28–30, 40.
- [11] 宁伟伟. 奇亚籽蛋白的提取及其功能特性研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2017.
Ning WW. Extraction and functional characteristics of Chia seed protein [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2017.
- [12] 涂清波, 孙振翰, 徐晓芳, 等. 四种芦丁提取方法的比较研究[J]. 海峡药学, 2019, 31(1): 28–29.
Tu QB, Sun ZH, Xu XF, *et al.* Comparative study on four extraction methods of rutin [J]. Channel Pharm, 2019, 31(1): 28–29.
- [13] 何亚. 羊肚菌的蛋白提取及其抗氧化性研究[D]. 太原: 山西大学, 2015.
He Y. Study on protein extraction and antioxidation of *Morchella* [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2015.
- [14] 崔晓瑞, 王丽, 石菲菲, 等. 大球盖菇蛋白提取及抗氧化性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(22): 5949–5956.
Cui XR, Wang L, Shi FF, *et al.* Study on protein extraction and antioxidation of *Pleurotus macrocephalus* [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(22): 5949–5956.
- [15] 李彩霞, 郑雪, 高海宁, 等. 国槐种子蛋白质提取工艺优化及其抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2017, 38(24): 165–171.
Li CX, Zheng X, Gao HN, *et al.* Optimization of protein extraction process and antioxidant activity of *Sophora japonica* seeds [J]. Sci Technol Food Ind, 2017, 38(24): 165–171.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



李 思, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: 2459470707@qq.com



许程剑, 博士, 副教授, 主要研究方向为天然产物制备与功能活性研究。

E-mail: helloxj_2000@163.com