

文章编号:1674-2869(2015)06-0021-06

金针菇菇脚蛋白质的提取

朱丽萍¹, 陆 瑶¹, 胡国元^{1*}, 刘启燕²

1. 武汉工程大学化工与制药学院, 湖北 武汉 430074;

2. 武汉如意食用菌生物高科技有限公司, 湖北 武汉 430000

摘 要:为了更好地利用金针菇加工副产物, 采用单因素实验法探讨了液料比、氢氧化钠浓度、提取温度、提取时间、提取次数对金针菇菇脚蛋白质提取率的影响, 结果表明, 对金针菇菇脚蛋白质提取率影响较大的三个因子是液料比、提取温度和提取时间. 采用响应面法对这三个因子的三个水平进行分析, 结果显示三因子对金针菇菇脚蛋白质提取率的影响由大到小依次为液料比、提取温度、提取时间, 其中对蛋白质提取率有显著影响的是提取温度和液料比的交互作用, 其他项的交互作用对蛋白质提取率无显著影响. 优化的碱法提取金针菇菇脚蛋白质工艺条件是: 液料比 20:1 mL/g、氢氧化钠质量浓度为 0.5 g 每 100 mL、提取温度 61 ℃、提取时间 2 h、提取次数 2 次, 金针菇菇脚蛋白质碱法提取率最高值达到 12.07%.

关键词: 金针菇菇脚; 蛋白质; 碱提; 响应面

中图分类号: TQ936.1

文献标识码: A

doi: 10. 3969/j. issn. 1674-2869. 2015. 05. 005

0 引 言

现今金针菇工厂化栽培规模逐渐扩大, 如何有效含有多种功能性蛋白的利用金针菇菇脚等副产物成为企业的关注重点. 碱溶酸沉法、酶解法、超声波萃取法^[1]、反胶束法^[2]、盐溶法^[3]和膜分离法^[4]是植物蛋白提取的主要方法. 已有文献报导通过正交实验确定碱法提金针菇菇脚蛋白质的最佳条件^[5]. 但是利用响应面法优化金针菇菇脚蛋白提取工艺的报道少见, 在此背景下, 本实验以金针菇工厂加工剩余的金针菇菇脚作原料, 探讨对金针菇菇脚蛋白提取率有较显著影响的因素, 再利用响应曲面法对提取工艺进行优化, 获得最优的提取参数, 以期能充分利用金针菇的副产物, 降低其对环境的危害的同时, 提高农户和企业的经济效益.

1 实验部分

1.1 材料

1.1.1 原料 金针菇菇脚 (菌柄基部 1~3 cm) 由武汉如意食用菌生物高科技有限公司提供.

1.1.2 试剂 氢氧化钠 (分析纯)、无水乙醇 (分析纯)、考马斯亮蓝 G-250 (分析纯)、磷酸 (分析纯)、盐酸 (分析纯), 皆为市售.

1.2 方法

1.2.1 实验材料的预处理 将新鲜金针菇菇脚晾晒至半干后, 放于烘箱中 60 ℃ 鼓风烘干, 然后经高速万能粉碎机粉碎, $d < 0.15$ mm 筛分, 制得金针菇菇脚粉末, 置于干燥器中保存备用.

1.2.2 菇脚蛋白质的提取 取制备好的金针菇菇脚粉末 1 g 置于锥形瓶中, 加入一定质量浓度的 NaOH 溶液, 于一定温度下水浴浸提一段时间后, 经布氏漏斗加压抽滤, 收集滤液. 将滤渣碱液重复提取 1 次, 合并 2 次提取液即为菇脚蛋白质提取液.

1.2.3 单因素试验设计 分别测定液料比 (1:1、15:1、20:1、25:1、30:1 mL/g)、NaOH 浓度 (0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 g/100 mL)、提取温度 (40、50、60、70、80 ℃)、提取时间 (1、2、3、4、5 h)、提取次数 (1、2、3、4 次) 对金针菇菇脚蛋白质提取率的影响.

1.2.4 响应面优化法 根据单因子试验的结果, 选取对实验有较显著影响的因素和水平, 由 Box-Behnken 设计出分析因素与水平表 (表 1), 再运用 Design Expert 8.0 分析实验结果. 各因素的试验水平及编码列于表 1. 其中 A、B、C 分别表示提取温度 (℃)、提取时间 (min) 及液料比 (mL/g).

1.2.5 蛋白质含量的测定 以牛血清蛋白为标准品, 采用考马斯亮蓝法^[6]测定蛋白质含量.

1.2.6 蛋白提取率的计算 按照 1.2.5 中方法测

收稿日期: 2015-04-09

基金项目: 武汉工程大学第六届研究生教育创新基金 (CX2014016)

作者简介: 朱丽萍 (1990-), 女, 湖北荆州人, 硕士研究生. 研究方向: 微生物发酵. * 通信联系人

表 1 碱提法提取金针菇脚蛋白响应面分析因素与水平表

Table 1 Coded variables and their coded levels in RSM

因素	水平		
	-1	0	1
提取温度/℃	50	60	70
提取时间/h	1	2	3
液料比/(mL/g)	15:1	20:1	25:1

定提取液的吸光度值,并根据标准曲线方程计算出稀释 1 000 倍后提取液中蛋白的质量.金针菇脚蛋白提取率计算公式如下:

$$\text{金针菇脚蛋白提取率/\%} = \frac{\text{稀释后提取液中蛋白质量} \times \text{稀释倍数}}{\text{原料质量}} \times 100\%$$

2 结果和分析

2.1 菇脚蛋白的单因子实验结果

2.1.1 菇脚蛋白质提取率受液料比的影响 确定 NaOH 溶液质量浓度=0.5 g/100 mL,提取温度为 70 ℃,提取时间 2 h,提取次数 2 次,在此条件下测定不同液料比对金针菇脚蛋白质的提取率.由图 1 可以看出,当液料比增加时,蛋白质的提取率呈增加趋势.

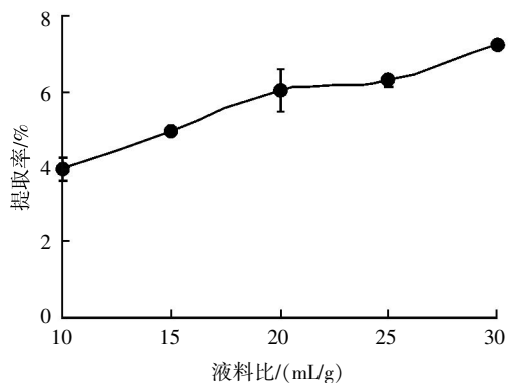


图 1 金针菇脚蛋白质提取率受液料比的影响

Fig.1 Effect of liquid-solid ratio on extracting rate of *F. velutipes*' stipe protein

2.1.2 菇脚蛋白质提取率受 NaOH 浓度的影响 确定液料比为 20:1,提取温度 70 ℃,浸提时间 2 h,提取次数 2 次,在此条件下,测定不同 NaOH 浓度下菇脚蛋白质的提取率.实验结果显示,NaOH 质量浓度为 0.5 g/100 mL 之前,蛋白质的提取率随着 NaOH 浓度的增加而增加;NaOH 质量浓度 0.5 g/100 mL 之后,随着 NaOH 浓度的增加,提取率反而有所下降(图 2).

2.1.3 菇脚蛋白质提取率受温度的影响 在液料比 20:1,NaOH 质量浓度为 0.5 g/100 mL,浸提时

间为 2 h,提取次数 2 次条件下,测定不同提取温度对蛋白提取率的影响试验结果显示,当提取温度增加时,蛋白质的提取率呈上升趋势.在温度为 60 ℃之前,蛋白质的提取率增加的幅度较大;温度为 60 ℃之后,提取率增加的幅度开始降低(图 3).

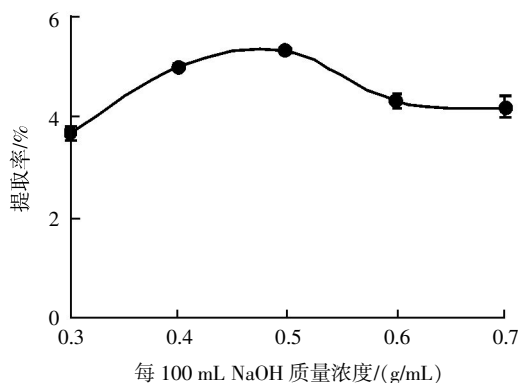


图 2 金针菇脚蛋白质提取率受 NaOH 质量浓度的影响

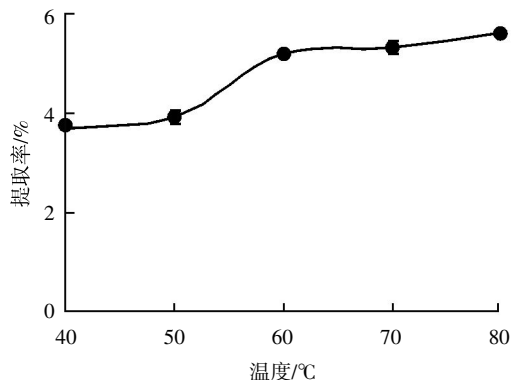
Fig.2 Effect of NaOH concentration on extracting rate of *F. velutipes*' stipe protein

图 3 金针菇脚蛋白质提取率受温度的影响

Fig.3 Effect of extracting temperature on extracting rate of *F. velutipes*' stipe protein

2.1.4 菇脚蛋白质提取率受时间的影响 在液料比 20:1,每 100 mL 为 NaOH 质量为 0.5 g,提取温度为 70 ℃,提取次数 2 次条件下,测定不同提取时间下菇脚蛋白提取率的变化.结果显示,提取时间越长,蛋白质提取率增长趋势越缓慢(图 4).

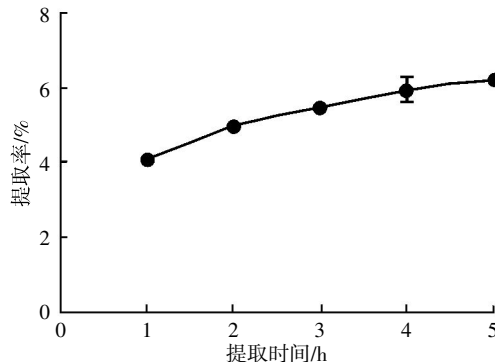


图 4 金针菇脚蛋白质提取率受时间的影响

Fig.4 Effect of time on extracting rate of *F. velutipes*' stipe protein

2.1.5 菇脚蛋白质提取率受次数的影响 在液料比 20 mL/g,NaOH 质量浓度为每 100 mL 0.5 g,提取温度为 70 ℃,浸提时间为 2 h 条件下,测定不同提取次数下菇脚蛋白提取率的变化.结果表明,当提取次数增加,蛋白质的提取率呈先增加后趋于平缓的趋势(图 5).

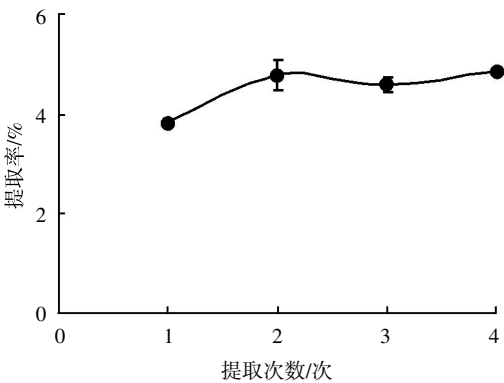


图 5 金针菇菇脚蛋白质提取率受次数的影响

Fig.5 Effect of extracting times on extraction rate of *F. velutipes*' stipe protein

2.2 响应面实验结果

根据单因素实验结果不显著因素条件确定提取液 NaOH 质量浓度、提取次数分别为,NaOH 为 0.5 g 每 100 mL、提取次数 2 次.选取有显著影响的液料比、提取温度、提取时间 3 个因素为响应面优化法的因素水平,金针菇菇脚蛋白质提取率为因变响应值(y),响应曲面实验设计及其结果见下表 2.

实验数据运用 Design Expert 8.0 软件分析,建立金针菇菇脚蛋白提取率与提取温度(A)、提取时间(B)、液料比(C) 3 个因素的数学回归模型:

表 2 Box-Behnken 试验设计及结果

Table.2 Experimental designs and results of Box-Behnken

试验号	A	B	C	实际值/%	预测值/%
1	-1	-1	0	8.02	7.93
2	1	-1	0	8.54	8.66
3	-1	1	0	8.05	7.92
4	1	1	0	8.70	8.80
5	-1	0	-1	6.42	6.65
6	1	0	-1	8.05	8.05
7	-1	0	1	8.13	8.12
8	1	0	1	8.57	8.33
9	0	-1	-1	6.57	6.43
10	0	1	-1	6.64	6.53
11	0	-1	1	7.24	7.34
12	0	1	1	7.24	7.37
13	0	0	0	12.29	12.16
14	0	0	0	12.06	12.16
15	0	0	0	12.13	12.16

$$Y=+2.160+0.400A+0.033B+0.440C+0.035AB-0.300AC-0.017BC-14.80A^2-2.350B^2-2.800C^2$$

该方程中的系数表示各个因素对实验结果的影响程度,由此方程可以预测得到各个不同条件组合下金针菇菇脚蛋白的提取率.

2.3 回归模型的方差分析

对所得回归模型进行方差分析,结果如下表 3 所示.

2.3.1 单因素对实验结果的影响 通过方差分析表,由 F 检验,可以得出 A -提取温度、 C -液料比对金针菇菇脚蛋白提取率的影响均为极显著,而 B -提取时间对金针菇菇脚蛋白提取率的影响不那么

表 3 回归模型的方差分析

Table3 ANOVA for Response Surface Quadratic Model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	55.44	9	6.16	125.55	< 0.000 1	**
A -提取温度	1.30	1	1.30	26.57	0.003 6	**
B -提取时间	8.563E-003	1	8.563E-003	0.17	0.693 5	
C -液料比	1.53	1	1.53	31.23	0.002 5	**
AB	4.780E-003	1	4.780E-003	0.097	0.767 5	
AC	0.35	1	0.35	7.22	0.043 5	*
BC	1.195E-003	1	1.195E-003	0.024	0.882 1	
A^2	8.12	1	8.12	165.39	< 0.000 1	**
B^2	20.42	1	20.42	416.17	< 0.000 1	**
C^2	30.81	1	30.81	627.95	< 0.000 1	**
残差	0.25	5	0.049			
失拟项	0.22	3	0.072	4.99	0.171 4	
纯误差	0.029	2	0.014			
总和	55.69	14				

注:* 显著($P<0.05$);** 极显著($P<0.01$)

显著. 三个因素对提取质量的影响的显著性依次是: $C>A>B$, 即液料比>提取温度>提取时间.

2.3.2 交互项对实验结果的影响 在响应面的分析中, 由等高线的图形和颜色可以看出交互作用的显著与否. 图形愈椭圆体现出交互作用愈强, 愈趋向圆形就愈弱. 再来分析图的颜色, 由蓝变红则提取率从小变大, 变的愈快显示坡度愈大, 表示影响实验结果更显著, 等高线代表的是在一条线上所有的组合方案得到的蛋白质提取率都一样.

图 6~8 表明, 提取温度(A)和液料比(C)之间的交互作用显著 ($p<0.05$), 表现为等高线呈椭圆形, 颜色变化更为分明. 提取温度(A)和提取时间(B)、提取时间(B)和液料比(C)相对而言交互作用不显著.

图 7 是在提取时间为 2 h 时, 提取温度(A)和液料比(C)交互作用对菇脚蛋白提取率影响的曲面图和等高线图. 由图可知, 随提取温度的增加, 菇脚蛋白质的提取率变化为先增加后降低. 当液料比较低时, 得率变化很小, 表现为响应曲面平滑, 说明提取温度对菇脚蛋白提取率影响不显著; 而当液料比逐渐增加这种变化趋势较为明显, 表现为响应曲面变陡, 说明提取时间对菇脚蛋白提取率影响显著. 在液料比为 20:1 时提取率达到最高; 当液料

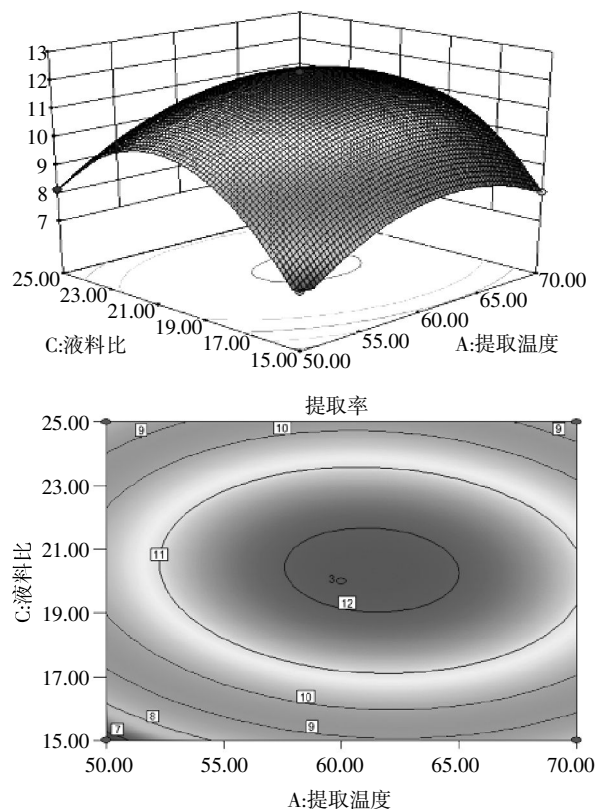


图 7 蛋白提取率受温度和液料比交互作用的影响

Fig.7 The impact of temperature and liquid-solid ratio on extraction rate of protein

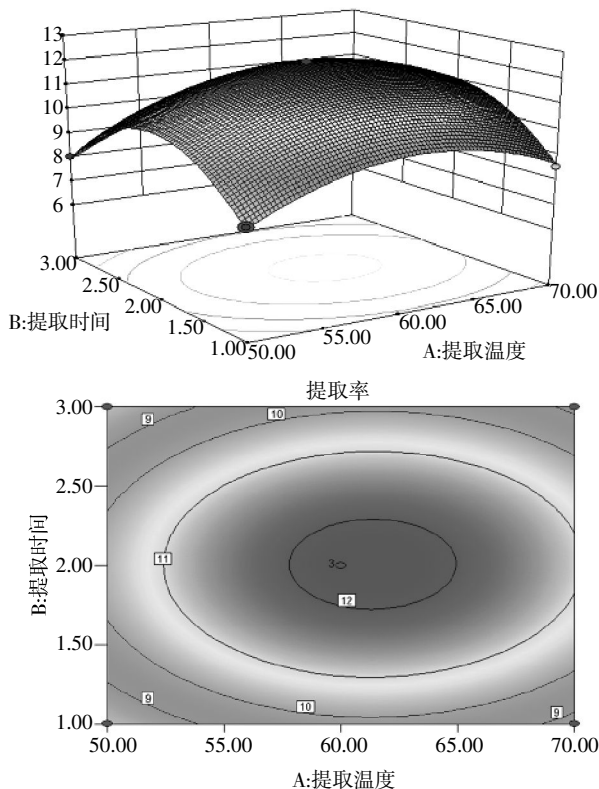


图 6 对蛋白提取率受时间和温度交互作用的影响

Fig.6 The impact of temperature and time on extraction rate of protein

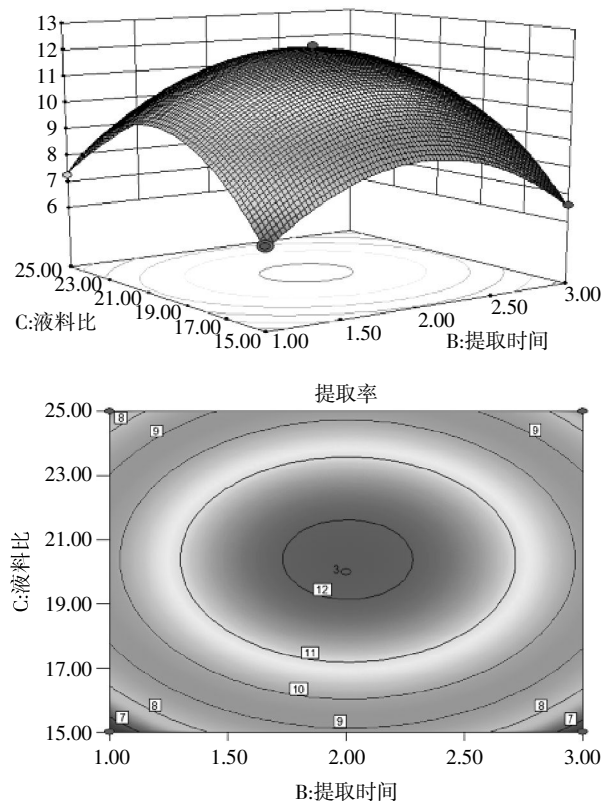


图 8 蛋白提取率受时间和液料比交互作用的影响

Fig.8 The impact of time and liquid-solid ratio on extraction rate of protein

比进一步增加,这种变化趋势开始减缓,响应曲面表现为平滑.当提取温度渐渐上升,液料比对提取率的影响呈现相似的效应.等高图的中心位置即提取温度 60 ℃、液料比 20:1 是提取率的较高点.

2.3.3 响应面模型评估 从表 4 可信度分析结果可知, R^2 (Pred R-Square)达到 0.936 7,表明新观测值的好坏可以较好地被此模型所预测.

R^2 (R-Square)达到 0.995 6,表明实验所试验点的适配度为 99.56%,模型拟合度很高,实验误差较小.

修正 R^2 (Adj R-Square)为 0.987 7,表明 98.77% 的试验数据变异性可以被解释.

同时 R^2 (R-Square)与修正 R^2 (Adj R-Square)两值接近,更说明建立的模型拟合性好、可靠.

Adeq Precision > 4 表明该模型具有足够分辨力,这个模型可以用于实践.

以上几个重要的评估模型好坏的参数均说明本模型拟合较好,适合对金针菇菇脚蛋白提取工艺进行分析和预测.

表 4 回归模型的评估

Table 4 The assessment of the regression model

项目	数值	项目	数值
Std.Dev	0.22	R^2	0.995 6
Mean	8.58	修正 R^2	0.987 7
C.V.%	2.58	预测 R^2	0.936 7
PRESS	3.53	Adeq Precision	31.67 1

2.3.4 响应面验证试验 根据回归方程:

$$Y = +2.160 + 0.400A + 0.033B + 0.440C + 0.035AB - 0.300AC - 0.017BC - 14.80A^2 - 2.350B^2 - 2.800C^2$$

可以得到提取的最优条件.由回归方程可得:

$$0.040 - 2.960A + 0.035B - 0.300C = 0 \quad (1)$$

$$0.033 + 0.035A - 4.700B - 0.017C = 0 \quad (2)$$

$$0.440 - 0.300A - 0.017B - 5.780C = 0 \quad (3)$$

将式(1)、(2)、(3)联立方程组,解得 $A=0.130$, $B=0.008$, $C=0.068$,将编码值转换成实际条件得到提取温度=61.30 ℃,提取时间=2.01 h,液料比为 20.34 mL/g.将上述优化的提取条件进行菇脚蛋白质的提取实验,来验证响应面模型所得数据的可靠性.但为实际操作方便,将提取金针菇菇脚蛋白的最佳工艺条件修正为:提取温度 61 ℃,提取时间 2 h,液料比 20 mL/g.在此条件下蛋白质实测提取率为 12.07%,而由回归模型所预测的理论提取率为 12.20%,理论预测值比实际测定值高 1.07%.显示各个因素同菇脚蛋白质提取率之间的关系可以很

好的被该模型所预测.以上可以说明,由响应曲面分析法优化得到了确信可靠的菇脚提取参数,且得到了适配性良好的回归模型.

3 结 语

本研究的目的是对金针菇菇脚蛋白的提取工艺进行优化,通过单因素实验对液料比、NaOH 浓度、浸提温度、浸提时间和浸提次数进行分析,得到单因素实验下菇脚蛋白提取率的变化趋势图.在此结果上选择有显著影响的三个因素提取温度、提取时间和液料比,运用响应面分析法进行进一步研究.

通过以提取温度(50~70 ℃)、提取时间(1~3 h)、液料比(15~25 mL/g)作为提取的因素和水平,用响应面法进行三因素三水平的优化设计实验.通过借助 Design Expert 8.0 的分析我们可以得到以下结论:

a.各个因素对菇脚蛋白提取率的影响为:液料比>提取温度>提取时间.

b.提取温度和液料比的交互作用对菇脚蛋白质提取率有显著影响,其他任意两项的交互作用对菇脚蛋白质提取率无明显影响.

c.实验优化的提取菇脚蛋白的提取工艺条件是:液料比 20:1 mL/g、NaOH 质量浓度为 0.5 g/100 mL、提取温度 61 ℃、提取时间 2 h、提取次数为 2 次,理论上最佳提取率为 12.20%.在此条件下菇脚蛋白的实测提取率为 12.07%,误差在可接受范围内.说明本模型拟合很好,为分析和预测金针菇菇脚蛋白质的提取工艺提供了理论依据.

致 谢

感谢武汉工程大学研究生处对本研究提供的资助!

参考文献:

- [1] 郝建勋,李萍,李学,等.生药蛋白质提取方法的研究进展[J].时珍国医国药,2012,23(3):737-738. HAO Jian-xun, LI ping, LI xue, et al. The research progress of the protein extraction method [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2012, 23 (3): 737-738. (in Chinese)
- [2] 郭珍,陈复生,李彦磊,等.反胶束萃取技术及其在植物蛋白质提取中的应用研究进展[J].食品与机械,2013,29(1):240-242. GUO zhen, CHEN Fu-sheng, LI Yan-lei, et al. Reverse micelle extraction technology and its application

- in plant protein extraction [J]. Food and Machinery, 2013, 29(1): 240–242. (in Chinese)
- [3] 于安芬, 李瑞琴, 水蓉, 等. 功能性植物蛋白源——苜蓿叶蛋白加热盐溶法浸提正交试验研究 [J]. 中国农学通报, 2011, 27(5): 457–461.
- YU An-fen, LI Rui-qin, SHUI Rong, et al. Study of orthogonal experiment of the functional protein resource-alfalfa leaf protein extraction[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2011, 27(5): 457–461. (in Chinese)
- [4] 张玉忠, 李泓, 张京健, 等. 膜技术在大豆蛋白制备中的应用[C]//第二届全国膜分离技术在食品工业中应用研讨会论文集, 北京: 中国蓝星(集团)总公司膜科学与技术编辑部, 2006: 67–69.
- ZHANG Yu-zhong, LI hong, ZHANG Ji-jian, et al. Application of membrane technology in the preparation of soybean protein. The symposium proceedings of the 2nd national membrane separation technology' application in food industry [C]. Beijing: Membrane Science and Technology, 2006: 67–69. (in Chinese)
- [5] 郑淑彦, 侯波, 桑兰, 等. 金针菇脚蛋白质提取工艺研究[J]. 食品科技, 2012, 37(7): 209–212, 217.
- ZHENG Shu-yan, HOU Bo, SANG Lan, et al. Research on extraction technology of protein from base of *Flammulina velutipes* [J]. Food Science and Technology, 2012, 37(7): 209–212, 217. (in Chinese)
- [6] 陈毓荃. 生物化学实验方法和技术[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 895–897.
- CHEN Yu-quan. Biochemistry experiment methods and techniques [M]. Beijing: Science Press, 2002: 895–897. (in Chinese)

Extraction technology of protein from base of *Flammulina velutipes*

ZHU Li-ping¹, LU Yao¹, HU Guo-yuan¹, LIU Qi-yan²

1. School of Chemical Engineering & Pharmacy, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430074, China;

2. Wuhan Wishful Edible Fungi Bio-Tech Co., Ltd., Wuhan 430000, China

Abstract: To use the processing byproducts of *Flammulina velutipes* better, the effects of the ratio of water to material, the extraction temperature, the extraction time, the extraction times on the extraction ratio of protein from the base of *F. velutipes*' stipe were studied by single factor experiment. The result shows that the ratio of water to material, the extraction temperature and the extraction time have impacts on the extraction ratio of protein. Then three levels of the three factors were analyzed by response surface method. The result show that the size order of factors' influence on the extraction ratio of the protein from the base of *F. velutipes*' stipe is: the ratio of water to material > the extraction temperature > the extraction time, in which the interaction of the extraction temperature and the ratio of water to material has a significant effect on the extraction ratio of the protein and the interaction of the other factors has little impact. The optimal conditions of extracting protein from the base of *F. velutipes*' stipe are the ratio of water to material of 20:1 mL/g, the sodium hydrate concentration of 0.5 g/100 mL, the extraction temperature of 61 °C, the extraction time of 2 h, and the extraction times of 2 times; the extraction ratio of the protein reaches 12.07% under the condition.

Keywords: Keywords: the base of *Flammulina velutipes*' stipe; protein; NaOH extraction; the response surface

本文编辑: 张 瑞