

# 响应面优化超声波辅助复合酶法提取杏鲍菇黄酮

王广慧, 李士慧, 梁婷, 寇送波, 信悦, 张诺

(绥化学院食品与制药工程学院, 黑龙江 绥化 152061)

**摘要:**研究了利用超声波辅助复合酶法提取杏鲍菇黄酮的最优条件。在单因素试验的基础上, 固定其他影响因素, 选择料液比、超声时间和酶解 pH 进行三因素三水平的 Box-Behnken 试验, 利用 Design-expert 8.0.6 软件进行响应面分析。结果表明, 在料液比为 1:50(g:mL), 超声时间为 6 min, 酶解 pH 为 5.4 条件下获得的黄酮提取率最高, 可达 3.352%。

**关键词:**响应面; 超声波; 复合酶; 杏鲍菇; 黄酮

中图分类号: S646

文献标识码: A

文章编号: 1003-8701(2018)01-0045-06

## Optimization of Ultrasonic Assisted Compound Enzyme Extraction of Flavonoids from *Pleurotus eryngii* by Response Surface

WANG Guanghui, LI Shihui, LIANG Ting, KOU Songbo, XIN Yue, ZHANG Nuo

(College of Food and Pharmaceutical Engineering, Suihua University, Suihua 152061, China)

**Abstract:** The optimum conditions of extraction of flavonoids from *Pleurotus eryngii* were studied by ultrasonic assisted complex enzyme method. Box-Behnken test of three factors and three levels was performed based on single factor test. Other factors fixed, the ratio of solid to liquid, ultrasonic time and enzymolysis pH were selected. Response surface analysis was performed by Design-expert 8.0.6. The results showed that the highest extraction rate was 3.352%, the ratio of material to liquid was 1:50 (g/mL), the ultrasonic time was 6 min and the pH value was 5.4.

**Key words:** Response surface; Ultrasound; Compound enzyme; *Pleurotus eryngii*; Flavone

杏鲍菇(*Pleurotus eryngii*)是兼具有食用及药用价值的珍稀食用菌, 由于其既具有蘑菇的香气又有如鲍鱼般的口感而广受人们喜爱。杏鲍菇中富含多糖、蛋白质、氨基酸、维生素、矿物质及黄酮类化合物, 其中的黄酮类物质具有广泛的生理作用, 既可开发为保健品, 也可作为动物饲料添加剂使用<sup>[1-2]</sup>, 因此杏鲍菇黄酮的开发前景十分广阔, 但学术界对杏鲍菇黄酮提取技术的报道却不是很多, 虽已有学者探讨过在超声波清洗器中采用超声波辅助乙醇浸提的方法提取杏鲍菇黄酮, 但此法所获得的黄酮提取率只有 2.92%<sup>[3]</sup>。本研究尝试利用超声波粉碎技术与复合酶解技术相结合的方法提取杏鲍菇黄酮, 以期获得更高的黄酮提取率, 为开发杏鲍菇黄酮资源提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

杏鲍菇, 购于绥化市大润发超市; 硝酸铝、亚硝酸钠、氢氧化钠、磷酸氢二钠、柠檬酸等均为国产分析纯试剂, 产自天津市津东天正精细化学试剂厂; 木瓜蛋白酶和纤维素酶, 购于武汉诺辉化工有限公司。

### 1.2 主要仪器

752 型紫外可见分光光度计: 上海菁华科技仪器有限公司; 赛多利斯 BSA224S 型电子分析天平: 德国赛多利斯公司; JY92-II DN 型超声波细胞粉碎仪: 宁波新芝生物科技有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 测定方法

采用硝酸铝-亚硝酸钠法测定杏鲍菇中黄酮的含量。标准曲线的绘制及线性回归方程的获得方法参见文献[4]。杏鲍菇黄酮提取率的计算公式如下:

$$R = \frac{C_1}{C_0} \times 100\%$$

收稿日期: 2017-09-09

基金项目: 黑龙江省大学生创新创业训练计划项目(201610236011); 绥化学院科研创新团队项目(SC2014002)

作者简介: 王广慧(1973-), 女, 副教授, 硕士, 研究方向为生物活性物质提取。

式中:

$R$ ——杏鲍菇黄酮提取率(%);

$C_1$ ——提取液中黄酮含量(g);

$C_0$ ——杏鲍菇原料质量(g)。

### 1.3.2 超声波辅助复合酶法提取杏鲍菇黄酮的操作步骤

将杏鲍菇清洗干净后切片,用烘箱在 $50^{\circ}\text{C}$ 下干燥至恒重,粉碎后放入高速万能粉碎机中粉碎2 min,即制得杏鲍菇干粉。精确称取每份为3.0 g的杏鲍菇粉若干份,置于烧杯中,按试验设计要求加入磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液,搅拌均匀后用超声波粉碎机进行处理,然后加入复合酶(木瓜蛋白酶和纤维素酶按质量比1:1混合)并在恒温水浴锅中进行酶解。酶解后在沸水浴中放置5 min以灭酶活,再以3 500 r/min的转速离心10 min后弃沉淀。在上清液中加入3倍体积的95%乙醇,在 $4^{\circ}\text{C}$ 冰箱中沉淀12 h,以去除多糖、蛋白质等杂质。离心后吸取上清液1 mL放于10 mL容量瓶中,按照文献[4]中的方法测吸光值,并根据线性回归方程和提取率计算公式计算出样品中的黄酮提取率。每个样品平行试验3次。

### 1.3.3 单因素试验

#### (1)料液比对杏鲍菇黄酮提取率的影响

取5份杏鲍菇粉,每份3.0 g,分别按照1:10、1:20、1:30、1:40、1:50(g:mL)的料液比设置加入pH 5.4的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液,先在400 W的超声波功率下处理5 min,然后加入样品量1.20%(W/W)的复合酶并在 $50^{\circ}\text{C}$ 下酶解浸提60 min。提取后测定杏鲍菇黄酮提取率。

#### (2)超声波功率对杏鲍菇黄酮提取率的影响

固定料液比为1:20(g:mL),缓冲液pH 5.4,超声时间为5 min,酶添加量为1.20%,酶解温度为 $50^{\circ}\text{C}$ ,酶解时间为60 min,将5份杏鲍菇粉分别按照超声波功率为200 W、300 W、400 W、500 W、600 W进行处理。处理后测定杏鲍菇黄酮提取率。

#### (3)超声时间对杏鲍菇黄酮提取率的影响

固定料液比为1:20(g:mL),缓冲液pH 5.4,超声波功率为400 W,酶添加量为1.20%,酶解温度为 $50^{\circ}\text{C}$ ,酶解时间为60 min,将6份杏鲍菇粉分别超声波处理3 min、4 min、5 min、6 min、7 min、8 min。处理后测定杏鲍菇黄酮提取率。

#### (4)酶解时间对杏鲍菇黄酮提取率的影响

固定料液比为1:20(g:mL),缓冲液pH 5.4,超声波功率为400 W,超声时间为5 min,酶添加量为1.20%,酶解温度为 $50^{\circ}\text{C}$ ,酶解时间分别设置为

30 min、40 min、50 min、60 min、70 min。处理后测定杏鲍菇黄酮提取率。

#### (5)酶解温度对杏鲍菇黄酮提取率的影响

固定料液比为1:20(g:mL),缓冲液pH 5.4,超声波功率为400 W,超声时间为5 min,酶添加量为1.20%,酶解时间为60 min,酶解温度分别设置为 $30^{\circ}\text{C}$ 、 $40^{\circ}\text{C}$ 、 $50^{\circ}\text{C}$ 、 $60^{\circ}\text{C}$ 、 $70^{\circ}\text{C}$ 。处理后测定杏鲍菇黄酮提取率。

#### (6)酶解pH对杏鲍菇黄酮提取率的影响

固定料液比为1:20(g:mL),超声波功率为400 W,超声时间为5 min,酶添加量为1.20%,酶解温度为 $50^{\circ}\text{C}$ ,酶解时间为60 min,分别在5份杏鲍菇粉中加入pH 5.0、pH 5.4、pH 6.0、pH 6.4、pH 7.0的缓冲液。处理后测定杏鲍菇黄酮提取率。

#### (7)酶添加量对杏鲍菇黄酮提取率的影响

固定料液比为1:20(g:mL),缓冲液pH 5.4,超声波功率为400 W,超声时间为5 min,酶解温度为 $50^{\circ}\text{C}$ ,酶解时间为60 min,酶添加量分别设置为样品量的0.60%、0.80%、1.0%、1.20%、1.40%、1.60%。处理后测定杏鲍菇黄酮提取率。

### 1.3.4 响应面分析试验

得到单因素试验的结果后,从对杏鲍菇黄酮提取率产生较大影响的三个单因素中选择三个水平进行三因素三水平的Box-Behnken试验设计,然后通过Design-expert 8.0.6软件进行响应面分析,确定出超声波辅助复合酶法提取杏鲍菇黄酮的最优条件<sup>[5-22]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 绘制标准曲线

根据试验结果绘制标准曲线,得到测定黄酮含量的线性回归方程为: $y=10.908x-0.0114$ , $R^2=0.993$ 。

### 2.2 杏鲍菇黄酮提取的试验结果

#### 2.2.1 单因素试验

(1)料液比的影响:试验结果见图1。

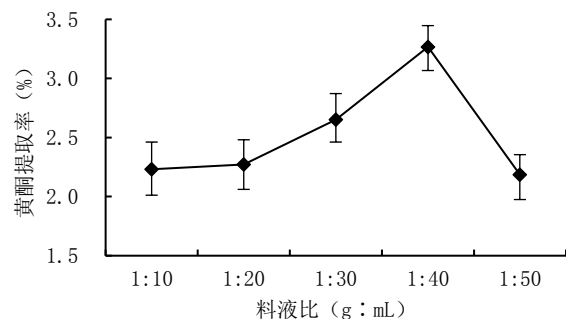


图1 料液比对黄酮提取率的影响

由图 1 可知,在料液比为 1:40 时的提取率最高,说明料液比过高或过低都不利于黄酮类化合物的溶出。

(2)超声波功率的影响:试验结果见图 2。

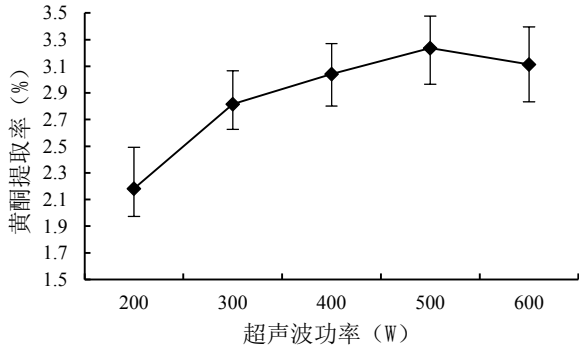


图 2 超声波功率对黄酮提取率的影响

由图 2 可知,超声波功率为 500 W 时杏鲍菇黄酮的提取率最高。推测可能是超声波功率过高时会破坏黄酮类物质的结构,而功率过低则不利于杏鲍菇细胞的解体。

(3)超声时间的影响:试验结果见图 3。

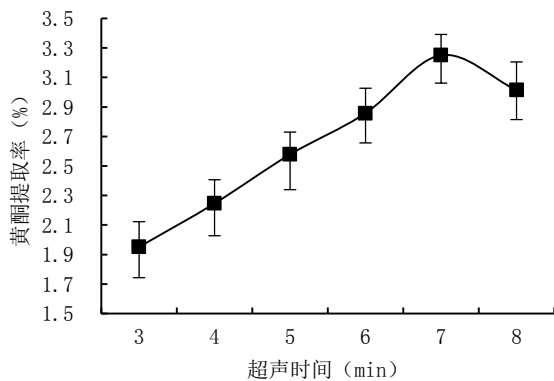


图 3 超声时间对黄酮提取率的影响

由图 3 可知,超声时间为 7 min 时黄酮提取率最高。超声时间过长或过短都不利于黄酮类物质的分离提取。

(4)酶解时间的影响:结果如图 4 所示。

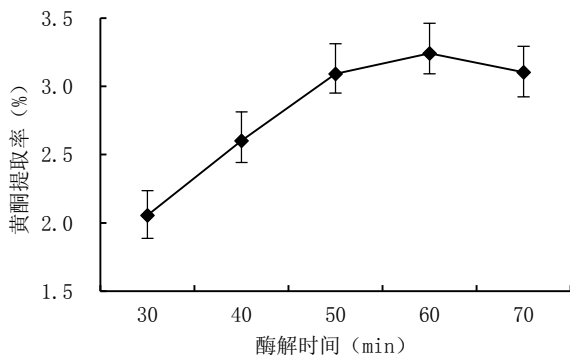


图 4 酶解时间对黄酮提取率的影响

由图 4 可知,酶解时间为 60 min 时黄酮提取

率最高。分析原因可能是酶解时间过短导致酶解反应不完全,而酶解时间过长又会降低酶的活性,这都会降低黄酮的提取率。

(5)酶解温度的影响:试验结果见图 5。

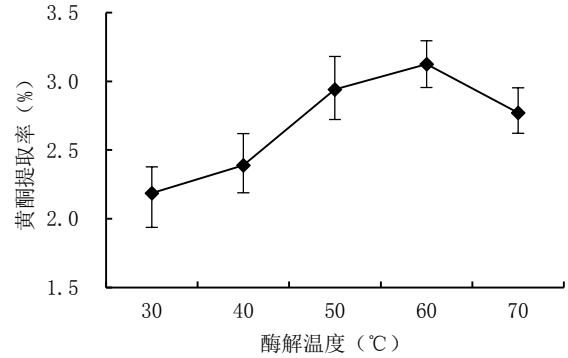


图 5 酶解温度对黄酮提取率的影响

由图 5 可知,酶解温度为 60°C 时黄酮提取率最高。分析可能是过高或过低的温度都影响了酶的活性,从而导致酶解效率降低。

(6)酶解 pH 的影响:试验结果见图 6。

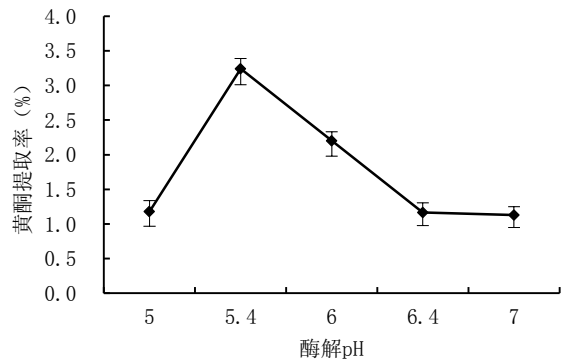


图 6 酶解 pH 对黄酮提取率的影响

由图 6 可知,酶解 pH 为 5.4 时黄酮提取率最高。说明此 pH 最有利于酶活性中心可解离基团的解离,因而酶的活性最高。

(7)酶添加量的影响:结果见图 7。

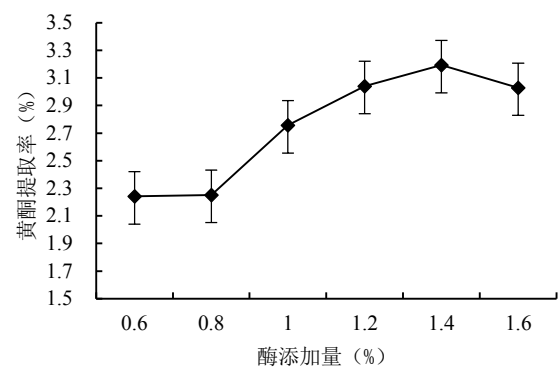


图 7 酶添加量对黄酮提取率的影响

由图 7 可知,酶添加量为 1.4% 时黄酮提取率

最高。

### 2.2.2 响应面试验结果

根据单因素试验结果,在其他因素都固定为最佳值的情况下,选择料液比、超声时间和酶解pH对杏鲍菇黄酮提取率影响较大的因素进行Box-Behnken试验设计,设计方案见表1,响应面试验结果见表2,方差分析结果见表3。

利用软件 Design-Expert 8.0.6对数据进行分析,得到回归方程为:

$$R=4.54+0.53A+0.19B-0.042C+0.11AB-0.25AC+0.16BC-0.98A^2-0.45B^2-1.02C^2$$

表1 响应面试验因素水平表

水平	因素		
	A 料液比(g:mL)	B 超声时间(min)	C 酶解 pH
-1	1:30	6	5
0	1:40	7	5.4
1	1:50	8	6

表2 响应面试验结果

序号	因素			提取率(%)
	A	B	C	
1	0	-1	1	2.554
2	0	-1	-1	3.226
3	-1	0	-1	1.618
4	-1	0	1	2.314
5	1	0	1	2.964
6	0	0	0	4.582
7	1	0	-1	3.277
8	0	0	0	4.542
9	0	1	1	3.233
10	-1	-1	0	2.541
11	1	1	0	3.924
12	0	0	0	4.365
13	1	-1	0	3.284
14	0	1	-1	3.278
15	0	0	0	4.637
16	-1	1	0	2.725
17	0	0	0	4.572

表3 方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	13.15	9	1.46	48.26	<0.0001***
A-A	2.26	1	2.26	74.59	<0.0001***
B-B	0.30	1	0.30	9.98	0.0159*
C-C	0.014	1	0.014	0.46	0.5192
AB	0.052	1	0.052	1.72	0.2315
AC	0.25	1	0.25	8.40	0.0230*
BC	0.098	1	0.098	3.25	0.1146
A <sup>2</sup>	4.01	1	4.01	132.25	<0.0001***
B <sup>2</sup>	0.84	1	0.84	27.63	0.0012**
C <sup>2</sup>	4.39	1	4.39	144.95	<0.0001***
残差	0.21	7	0.030		
失拟值	0.17	3	0.056	5.27	0.0712
纯误差	0.043	4	0.011		
总离差	13.37	16			

注:\* $P<0.05$ 为显著;\*\* $P<0.01$ 为较显著;\*\*\* $P<0.001$ 为极显著

由表3可知,模型的 $P < 0.001$ ,说明此回归方程模型极其显著,且模型的失拟值 $P = 0.0712 > 0.05$ 不显著,复相关系数 $R^2 = 0.9841$ ,表明此模型拟合度较好,可以用来分析和预测超声波辅助复合酶法提取杏鲍菇黄酮的工艺条件。从表3还可以看出,A、 $A^2$ 、 $C^2$ 对杏鲍菇黄酮提取率的影响极显著, $B^2$ 影响较显著,B、AC影响显著。

反映各因素对响应值影响的RSM曲面图如图8所示。

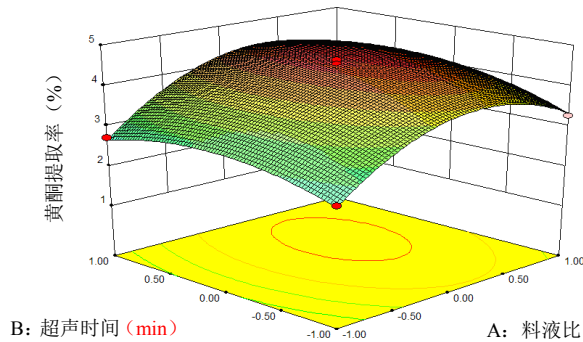


图8 料液比和超声时间对黄酮提取率的影响

从图8可以看出,等高线向料液比方向靠拢,说明料液比对杏鲍菇黄酮提取率的影响大于超声时间;图中等高线接近圆形,表明两因素交互作用不是很强,对黄酮提取率的影响不显著。

从图9可以看出,等高线向料液比方向靠拢,说明料液比的影响大于酶解pH;图中等高线为椭圆

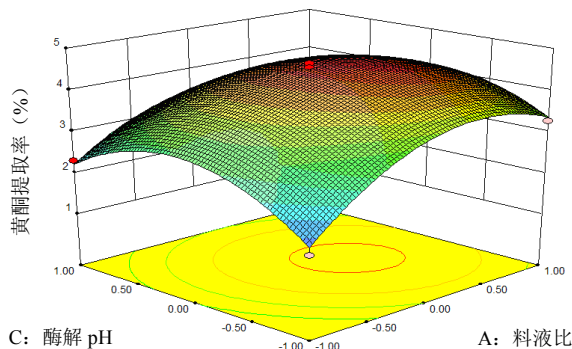


图9 料液比和酶解pH对黄酮提取率的影响

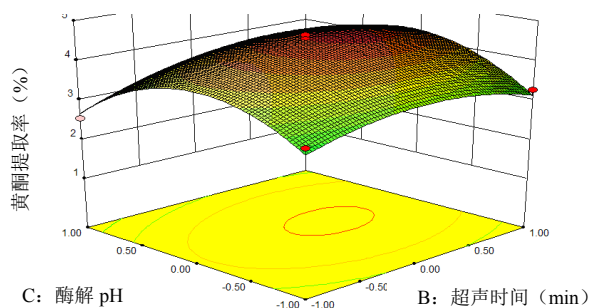


图10 超声时间和酶解pH对黄酮提取率的影响

圆形,表明两个因素间交互作用较强,对黄酮提取率的影响显著。

从图10可以看出,等高线向超声时间方向靠拢,说明超声时间的影响大于酶解pH;图中等高线接近圆形,表明两个因素间交互作用较弱,对黄酮提取率的影响不显著。

### 3 结论

本文通过单因素及响应面试验设计法对超声波辅助复合酶法提取杏鲍菇黄酮的工艺条件进行优化研究。通过Design-Expert 8.0.6软件进行优化后可知,当其他影响因素固定为由单因素试验得到的最佳值时,杏鲍菇黄酮提取工艺的最优条件为:料液比为1:50(g:mL),超声时间为6 min,酶解pH为5.4,预测杏鲍菇黄酮提取率为3.342%。在此条件下进行三次验证实验,得到杏鲍菇黄酮的平均提取率为3.352%。可见实测值与预测值相差很小,说明所建模型与实际情况拟合较好,此响应面法优化杏鲍菇黄酮的提取工艺可靠。

### 参考文献:

- [1] 刘鹏,邢增涛.杏鲍菇研究进展[J].食用菌,2011(6):6-8.
- [2] 张化朋,张静,刘阿娟,等.杏鲍菇营养成分及生物活性物质分析[J].营养学报,2013,35(3):307-309.
- [3] 孙琼,张直峰,李月梅.响应面法优化超声辅助提取杏鲍菇黄酮类化合物工艺研究[J].食品工业科技,2015,36(10):264-268.
- [4] 王广慧.复合酶辅助高压法提取金针菇黄酮的工艺优化[J].中国饲料,2016,27(13):25-27,34.
- [5] 豆亚静,张晓龙,常丽新,等.响应面优化超声波法提取黑豆异黄酮的工艺研究[J].食品工业科技,2013,34(5):259-261.
- [6] 唐健波,肖雄,杨娟,等.响应面优化超声辅助提取刺梨多糖工艺研究[J].天然产物研究与开发,2015,27(2):314-320.
- [7] 刘伟,南光明,李紫薇,等.响应面法优化新疆若羌大枣总黄酮提取工艺及抗氧化活性[J].食品科学,2012,33(22):123-126.
- [8] 侯学敏,李林霞,张直峰,等.响应面法优化薄荷叶总黄酮提取工艺及抗氧化活性[J].食品科学,2013,34(6):124-128.
- [9] 和法涛,刘光鹏,朱风涛,等.响应面法优化热水法浸提猴头菇多糖工艺提高多糖得率[J].食品科技,2015,40(1):210-215.
- [10] 乔艳明,陈文强,解修超,等.响应面法优化香菇胞外多糖提取工艺[J].食用菌学报,2015,22(3):1-5.
- [11] 邹建国,刘飞,刘燕燕,等.响应面法优化微波辅助提取枳壳中总黄酮工艺[J].食品科学,2012,33(2):24-28.
- [12] 贺寅,王强,钟葵.响应面优化酶法提取龙眼多糖工

- 艺[J].食品科学,2011,32(2):79-83.
- [13] 林建原,季丽红.响应面优化银杏叶中黄酮的提取工艺[J].中国食品学报,2013,13(2):83-90.
- [14] 丁双华,叶立斌,陈卫,等.响应面优化提取桑叶多酚的研究[J].中国食品学报,2012,12(1):53-58.
- [15] 石亚中,方娇龙,钱时权,等.响应曲面法优化纤维素酶酶解提取工艺[J].食品科学,2013,34(4):75-79.
- [16] 张志清,宋燕,刘翔.响应面法优化提取花椒籽蛋白质工艺研究[J].核农学报,2013,27(7):988-995.
- [17] 石恩慧,李红,谷明灿,等.响应面法优化超声提取板栗总苞多酚工艺条件[J].中国食品学报,2013,13(5):69-76.
- [18] 李珍,哈益明,李安,等.响应面优化苹果皮渣多酚超声提取工艺研究[J].中国农业科学,2013,46(21):4569-4577.
- [19] 李旭,刘停.杜仲叶总黄酮微波辅助提取工艺的优化及其抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2013,34(4):243-248.
- [20] 陈源,杨道富,范丽华,等.响应面法优化微波提取茂谷橘橙皮总黄酮工艺[J].中国食品学报,2013,13(4):80-86.
- [21] 黄威,李倬林,岳玉兰,等.超声辅助法提取刺玫籽油工艺优化[J].东北农业科学,2016,41(5):107-112.
- [22] 迟燕平,胡楠楠,卢敏,等.米糠阿拉伯木聚糖提取工艺优化[J].东北农业科学,2016,41(5):97-101.

(责任编辑:王昱)