

安兆祥, 蔡志鹏, 黄占旺, 等. 黑木耳蛋白提取工艺优化及其功能特性研究 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(18): 157-166. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020120003

AN Zhaoxiang, CAI Zhipeng, HUANG Zhanwang, et al. Optimization of Extraction Process of *Auricularia auricula* Protein and Its Functional Properties[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(18): 157-166. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020120003

· 工艺技术 ·

黑木耳蛋白提取工艺优化及其功能特性研究

安兆祥, 蔡志鹏, 黄占旺, 沈勇根*, 徐 弦, 程宏桢, 李晓明, 刘馥源
(江西农业大学食品科学与工程学院, 江西省发展与改革委员会农产品加工
与安全控制工程实验室, 江西南昌 330045)

摘要: 为了提高黑木耳蛋白提取率, 采用超声波-酶法提取黑木耳蛋白并对其在不同 pH 下的功能特性进行研究。通过单因素实验, 结合 Plackett-Burman 试验设计和 Box-Behnken 试验设计, 确定超声波-酶法提取黑木耳蛋白最适提取工艺, 并在不同 pH 下对所得蛋白功能特性进行测定。结果表明, 黑木耳蛋白的最适提取工艺参数为: 料液比 1:88 (g/mL)、超声时间 30.5 min、酶解 pH8.5、酶解温度 65.8 °C, 在该条件下, 蛋白提取率为 57.11%±0.12%。pH 对黑木耳蛋白功能特性的影响显著。pH3.5 时蛋白泡沫稳定性最好, 达到 74.90%; 随 pH 增大 (3.5~9.5), 溶解性、起泡性、乳化性、乳化稳定性、持水性和吸油性显著提高 ($P<0.05$), 泡沫稳定性显著 ($P<0.05$) 下降。本研究结果为黑木耳蛋白的提取利用和综合开发提供理论依据。

关键词: 黑木耳蛋白, 超声波, 酶解, 功能特性, 等电点

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2021)18-0157-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2020120003

本文网刊:



Optimization of Extraction Process of *Auricularia auricula* Protein and Its Functional Properties

AN Zhaoxiang, CAI Zhipeng, HUANG Zhanwang, SHEN Yonggen*, XU Xian, CHENG Hongzhen,
LI Xiaoming, LIU Fuyuan

(Laboratory of Agro-processing and Safety Control Engineering, Jiangxi Development and Reform Commission,
College of Food Science and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: The aim of this work was to enhance of the protein extraction yield of *Auricularia auricula* by ultrasonic-enzymatic method and its functional properties under different pH were studied. Through single factor experiments, combined with Plackett-Burman experiment design and Box-Behnken experiment design, the optimum extraction process for the ultrasonic-enzymatic method of *Auricularia auricula* protein was determined, and the functional properties of the protein were measured under different pH. The results showed that the optimum extraction process parameters of *Auricularia auricula* protein were as follows: Solid-to-liquid ratio 1:88 (g/mL), ultrasonic time 30.5 min, enzymolysis pH8.5, enzymolysis temperature 65.8 °C, under these conditions, the protein extraction rate was 57.11%±0.12%. The pH had significant effects on the functional properties of *Auricularia auricula* protein. The protein foam stability was the best at pH3.5, reached 74.90%. With the increasing of pH (3.5~9.5), solubility, foaming, emulsifying, emulsifying stability, water holding capacity and oil absorption increased significantly ($P<0.05$), and foam stability decreased significantly ($P<0.05$). The results would provide a theoretical basis for the extraction, utilization and comprehensive development of *Auricularia auricular* protein.

Key words: *Auricularia auricula* protein; ultrasound; enzymatic hydrolysis; functional properties; isoelectric point

收稿日期: 2020-12-02

基金项目: 江西主栽食用菌贮藏保鲜及加工技术研究 (JXXTCX2018-03-04)。

作者简介: 安兆祥 (1997-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 果蔬贮藏与加工, E-mail: 2864657136@qq.com。

* 通信作者: 沈勇根 (1971-), 男, 硕士, 教授, 研究方向: 果蔬贮藏与加工, E-mail: 137898404@qq.com。

黑木耳(*Auricularia auricula*), 又名树鸡、光木耳、木蕊等, 木耳科木耳属胶质真菌, 在我国主要栽培于黑龙江、四川、广西和云南等地。黑木耳子实体胶质含量较高, 质地柔软平滑, 味道鲜美^[1]。中医学认为, 黑木耳具有润肺止咳、滋肾养胃、润燥、补气养血等作用, 黑木耳富含蛋白质、矿物质、多糖、维生素、膳食纤维和氨基酸等物质, 是我国珍贵的药食兼用真菌^[2]。黑木耳蛋白含量为 10.0~16.2 g/100 g^[3], 其蛋白质中含有 17 种氨基酸, 尤以谷氨酸和天门冬氨酸为主^[4]。研究表明, 黑木耳蛋白具有抗肿瘤^[5] 功效。

黑木耳因蛋白质含量高、脂肪热量低等特点, 已成为获取植物蛋白的新兴资源^[1]。依据黑木耳蛋白的凝胶特性, 将其添加到半固体食品中, 可以改善食品的机械性能; 在液体食品中可以提高乳化液的稳定性, 还可以降低油-水界面的张力, 提高该物质的热稳定性, 延长其货架期^[4]。目前, 提取植物蛋白常规的方法有酶法、超声波法、碱法和复合法等^[2]。左莹等^[6] 采用酶法水解玉米淀粉糖渣蛋白, 提取率为 39.77%, 酶法提取反应条件温和, 能耗低, 但提取率低, 成本高; 姚兴存等^[7] 采用超声波辅助提取条斑紫菜蛋白, 提取率为 37.6%, 超声波法耗能少、时间短, 但对仪器设备要求高; 李晓明等^[8] 采用碱法提取白玉菇蛋白, 提取率为 43.19%, 碱法操作简单, 成本低, 但高碱条件易使蛋白变性。近年来, 国内外的研究成果表明, 超声辅助酶法的提取技术具有很大的研究前景^[9-10]。超声辅助酶法是近年来发展较快的新型提取方法, 由于超声波在溶液中迅速产生空化、剪切、剧烈搅拌等作用, 同时结合酶高效、专一的特点, 能够降解植物细胞壁及组织, 提高细胞壁和细胞膜通透性并加速蛋白的溶出^[11]。许新月等^[12] 采用超声辅助酶法提取杏鲍菇蛋白, 提取率为 75.7%; Hildebrand 等^[13] 使用超声波辅助溶菌酶提取小球藻蛋白, 回收率从 33% 提高至 42%, 使用超声波辅助蛋白酶提取可促进蛋白质的恢复率(58%~82%)。因此, 相比于传统的蛋白提取方法, 超声波-酶法具有省时、节能和高效等优点, 已广泛应用于生物活性成分等的提取^[14-15]。

国内外关于黑木耳蛋白的研究鲜有报道, 主要集中在黑木耳碳水化合物的提取和功能性质研究^[16-17], 且运用超声波-酶法优化黑木耳蛋白提取工艺的研究尚未见报道。本实验拟研究超声波-酶法提取黑木耳蛋白, 通过单因素实验, 结合 Plackett-Burman(PB) 试验设计和 Box-Behnken 试验设计, 确定黑木耳蛋白最适提取工艺, 并在不同 pH 下对所得蛋白功能特性进行测定, 以期黑木耳蛋白的提取利用与综合开发提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

黑木耳 市购, 产地黑龙江省; 菜籽油 市购, 产地安徽芜湖金龙鱼工厂; 无水乙醇 天津市大茂化学试剂厂; 牛血清蛋白(BSA) 上海源叶生物科技有

限公司; 碱性蛋白酶(15 万 U/g, 最适作用温度 65 ℃、pH8.5) 河南万邦实业有限公司; 考马斯亮蓝 G-250 上海强顺化学试剂有限公司; 硫酸铜、硫酸钾、硼酸、磷酸均为分析纯。

K-355 凯氏定氮仪 瑞士步琪有限公司; SB-3200DTD 超声波清洗仪 宁波新芝生物科技股份有限公司; WFJ 2100 可见分光光度计 尤尼科(上海)科学仪器有限公司; Q500B 高速多功能粉碎机 上海冰都电器有限公司; SF-GL-20 高速冷冻离心机 上海菲恰尔分析仪器有限公司; T-25 basic 高速分散机 艾卡(广州)仪器设备有限公司; BSA124S 电子天平 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司; 便携式 pH 计 上海大普仪器有限公司; BYXX-50 烘箱 杭州艾博科技工程有限公司; Scientz-10N 冷冻干燥机 宁波新芝生物科技股份有限公司;

1.2 实验方法

1.2.1 样品预处理 挑选无霉烂虫蛀、无机械损伤的黑木耳清洗除杂, 于烘箱 60 ℃ 烘干 4 h, 冷却后粉碎, 过 100 目筛, 得到黑木耳粉, 置于干燥环境下保存, 备用。

1.2.2 黑木耳蛋白提取工艺流程 黑木耳粉→称量→溶解→超声处理→调 pH→酶解→灭酶→离心分离→取上清液(蛋白提取液)→测蛋白含量→等电点沉淀→离心分离→沉淀水洗至中性→真空冷冻干燥→黑木耳蛋白。

1.2.3 操作要点 黑木耳按 1.2.1 方法预处理, 称取一定量的木耳粉末, 按料液比 1:80(g/mL) 进行溶解, 然后在超声功率 180 W, 50 ℃ 超声 30 min, 之后用 0.1 mol/L NaOH 溶液调溶液 pH 为 10.5, 再添加 5% 的碱性蛋白酶, 40 ℃ 水浴加热酶解 2 h, 90 ℃ 灭酶 15 min, 10000 r/min 离心 15 min, 收集上清液, 得到蛋白提取液, 用 0.1 mol/L HCl 溶液调 pH 至 3.5, 于 4 ℃ 冰箱中冷沉 24 h 后, 12000 r/min 离心 15 min, 收集沉淀, 水洗至中性, 真空冷冻干燥, 得黑木耳蛋白。

1.2.4 单因素实验 在超声波-酶法提取黑木耳蛋白工艺中, 首先对木耳粉进行超声波预处理, 处理结束后进入酶解反应, 研究各参数对蛋白提取率的影响。以蛋白提取率为指标, 分别考察料液比(1:50、1:60、1:70、1:80、1:90、1:100 g/mL)、超声时间(10、20、30、40、50、60 min)、超声温度(30、40、50、60、70、80 ℃)、酶添加量(1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0%、6.0%)、酶解 pH(8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5)、酶解温度(45、50、55、60、65、70 ℃)、酶解时间(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h) 共计 7 个因素对黑木耳蛋白提取率的影响。每个水平重复 3 次, 取均值, 试验过程中固定超声功率为 180 W, 不变水平值为: 超声时间 30 min、超声温度 50 ℃、酶解 pH 为 10.5、料液比 1:80(g/mL)、酶解时间 2 h、酶添加量 5%、酶解温度 40 ℃。

1.2.5 Plackett-Burman(PB)试验设计 PB 设计中,将 1.2.4 中 7 个单因素依次编码为 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 和 X_7 。对于每个因素,均设定高(+)、低(-) 2 个水平,以蛋白提取率(Y)为响应值, X_1 ~ X_7 影响因素为自变量,共进行 12 次试验。因素和水平如下表 1。

表 1 PB 试验设计因素与水平
Table 1 PB experiment design factors and levels

因素	低水平(-)	高水平(+)
X_1 料液比(g/mL)	1:80	1:100
X_2 超声时间(min)	20	40
X_3 超声温度(°C)	50	70
X_4 酶添加量(%)	4	6
X_5 酶解pH	8	9
X_6 酶解温度(°C)	60	70
X_7 酶解时间(min)	60	120

1.2.6 Box-Behnken 试验设计 根据 PB 试验结果,选取料液比(A)、超声时间(B)、酶解 pH(C)和酶解温度(D)作为 Box-Behnken 试验设计(见表 2)的 4 个自变量,建立响应值与自变量之间的函数关系,进而寻求黑木耳蛋白提取工艺的最优组合。

表 2 Box-Behnken 试验设计因素与水平
Table 2 Factors and levels of Box-Behnken experiment design

因素	水平		
	-1	0	1
A料液比(g/mL)	1:80	1:90	1:100
B超声时间(min)	20	30	40
C酶解pH	8	8.5	9
D酶解温度(°C)	60	65	70

1.2.7 黑木耳蛋白提取率的计算

1.2.7.1 黑木耳总蛋白含量的测定 参照 GB 5009.5-2016《食品中蛋白质的测定》^[18] 凯氏定氮法,测得黑木耳粉末中总蛋白含量为(11.38±0.25)g/100 g。

1.2.7.2 黑木耳提取液中蛋白含量的测定 首先配制不同质量浓度的牛血清蛋白标准溶液,采用考马斯亮蓝法^[19]测定 595 nm 处的吸光度值,并做空白对照,分别以蛋白含量与吸光度值为横纵坐标,绘制牛血清蛋白标准曲线: $y=4.6925x+0.0808(R^2=0.9992)$ 。另外,取黑木耳蛋白提取液,按照上述方法,测定上清液蛋白含量。

按照式(1)计算黑木耳蛋白提取率:

$$\text{黑木耳蛋白提取率(\%)} = \frac{\text{上清液中蛋白含量}}{\text{黑木耳总蛋白含量}} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

1.2.8 黑木耳蛋白等电点(pI)的测定 称取 6.0 g 木耳粉于 500 mL 烧杯中,加入 480 mL 的蒸馏水,搅拌溶解,用 0.1 mol/L NaOH 溶液调 pH 至 9.0,40 °C 水浴加热提取 2 h 后,8000 r/min 离心 30 min,取上

清液 20 mL 分装于 50 mL 烧杯中,用 HCl 调 pH 分别为 2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0,重复试验 3 次,于 4 °C 冰箱中冷沉 24 h 后,12000 r/min 离心 15 min,取上清液于 595 nm 处测定吸光值,吸光值最低时的 pH 即为黑木耳蛋白等电点。

1.2.9 黑木耳蛋白功能特性的测定

1.2.9.1 起泡性及泡沫稳定性的测定 参照张思思等^[20]的方法并做调整。配制浓度为 2% 的样品 40 mL,调节不同 pH 为 2.0、3.5、5.0、6.5、8.0、9.5,快速分散 2 min(9500 r/min),倒出分散液,及时读取均质停止时泡沫体积以及均质停止 30 min 后的泡沫体积。计算公式如下。

$$\text{起泡性(\%)} = \frac{\text{搅拌停止时泡沫体积(mL)}}{\text{蛋白溶液体积(mL)}} \times 100 \quad \text{式(2)}$$

$$\text{泡沫稳定性(\%)} = \frac{\text{30 min后泡沫体积(mL)}}{\text{初始泡沫体积(mL)}} \times 100 \quad \text{式(3)}$$

1.2.9.2 溶解性的测定 参照李晓明等^[8]的方法并做调整。称量一定质量的蛋白样品,配制质量浓度为 10 g/L,分别量取 20 mL 待测样液,调节不同 pH 为 2.0、3.5、5.0、6.5、8.0、9.0,使之充分溶解,室温条件下搅拌 45 min,4000 r/min 离心 20 min,沉淀不溶蛋白,采用考马斯亮蓝法测定上清液中蛋白含量。计算公式如下。

$$\text{溶解性(\%)} = \frac{\text{上清液蛋白含量}}{\text{样品中蛋白含量}} \times 100 \quad \text{式(4)}$$

1.2.9.3 乳化性及乳化稳定性的测定 参照薛蕾等^[21]的方法并做调整。配制 1% 蛋白溶液,量取 25 mL 样品于烧杯中,调节不同 pH 为 2.0、3.5、5.0、6.5、8.0、9.5,加入相同比例的菜籽油,快速分散 2 min(9500 r/min),快速移取 25 mL 乳化液离心 15 min(2500 r/min),将离心管取出立于水平桌面迅速读取乳化层高度及液体总高度。再将上述乳化液 80 °C 水浴 30 min,用自来水冷却至室温,离心 15 min(2500 r/min),取出读取并记录剩余乳化层高度。计算公式如下。

$$\text{乳化性(\%)} = \frac{\text{乳化层高度(mm)}}{\text{液体总高度(mm)}} \times 100 \quad \text{式(5)}$$

$$\text{乳化稳定性(\%)} = \frac{\text{30 min后乳化层高度(mm)}}{\text{初始乳化层高度(mm)}} \times 100 \quad \text{式(6)}$$

1.2.9.4 持水性的测定 参照杨希娟等^[22]的方法并做调整。先对 25 mL 离心管进行称重,再称取 0.5 g 黑木耳蛋白样品于离心管中,加入 10 mL 蒸馏水配成蛋白待测液,调节不同 pH 为 2.0、3.5、5.0、6.5、8.0、9.5,振荡、混匀,常温下静置 30 min,使之

充分吸水, 3000 r/min 离心 20 min, 除去上层水液, 称取离心管和残留物总质量。计算公式如下。

$$\text{持水性}(\text{g} \cdot \text{g}^{-1}) = \frac{\text{离心管残留物质量}(\text{g}) - \text{样品质量}(\text{g})}{\text{样品质量}(\text{g})} \quad \text{式(7)}$$

1.2.9.5 吸油性的测定 参照张艳荣等^[23]的方法并做调整。先对 10 mL 的离心管进行称重, 再称取 0.5 g 黑木耳蛋白样品于离心管中, 随后加入 10 mL 菜籽油, 调节不同 pH 为 2.0、3.5、5.0、6.5、8.0、9.5, 振荡、混匀, 静置 30 min, 3000 r/min 离心 20 min, 除去上层油液, 称取离心管和残留物总质量。计算公式如下。

$$\text{吸油性}(\text{g} \cdot \text{g}^{-1}) = \frac{\text{离心管残留物质量}(\text{g}) - \text{样品质量}(\text{g})}{\text{样品质量}(\text{g})} \quad \text{式(8)}$$

1.3 数据处理

使用 Design expert 11.0 进行 PB 试验和 Box-Behnken 试验设计及响应面试验数据优化, 试验重复 3 次, 通过 SPSS 20.0 进行数据分析, 采用新复极差法(Duncan's)进行显著性分析($P < 0.05$ 表示有显著差异, $P < 0.01$ 表示有极显著差异), Origin 2018.0 进行绘图处理。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

探究各因素对黑木耳蛋白提取率的影响, 如图 1

所示。

从图 1A 可以看出, 随料液比的增大黑木耳蛋白的提取率呈先上升后下降的趋势。当料液比为 1:90(g/mL)时, 蛋白提取率最大。这是因为随溶液体积增大, 木耳粉在溶液中的分散度和接触面积随之增大, 加速蛋白的溶出, 提取液用量继续增加, 超声破碎不充分^[2], 蛋白提取率下降显著($P < 0.05$)。故选取料液比 1:90(g/mL)进行下一步优化。

图 1B 显示, 黑木耳蛋白提取率随超声时间的延长呈先上升后下降的趋势, 在 30 min 破碎效果达到最佳($P < 0.05$)。原因可能是超声波所产生的机械效应和空化效应大大加强了细胞破碎程度, 显著增大了蛋白溶出速率。30 min 后, 蛋白提取率开始下降, 可能是破碎时间过长, 细胞内降解蛋白的酶溶出, 破坏了蛋白的结构, 机器产生大量热使蛋白质降解和变性^[24]。所以选取超声时间为 30 min 进行下一步优化。

由图 1C 可以看出, 黑木耳蛋白提取率随超声温度的升高呈先上升后下降的趋势, 蛋白提取率在超声温度达到 60 °C 时最高, 超声温度继续升高, 蛋白提取率下降显著($P < 0.05$)。原因可能是超声温度和超声过程中产生的热效应共同作用使溶液体系温度过高, 引起物料糊化和蛋白质变性^[25], 提取率下降明显。所以选取超声温度为 60 °C 进行下一步优化。

图 1D 中, 黑木耳蛋白提取率随酶添加量的增加逐渐升高, 当酶添加量达到 5% 时, 蛋白提取效果最

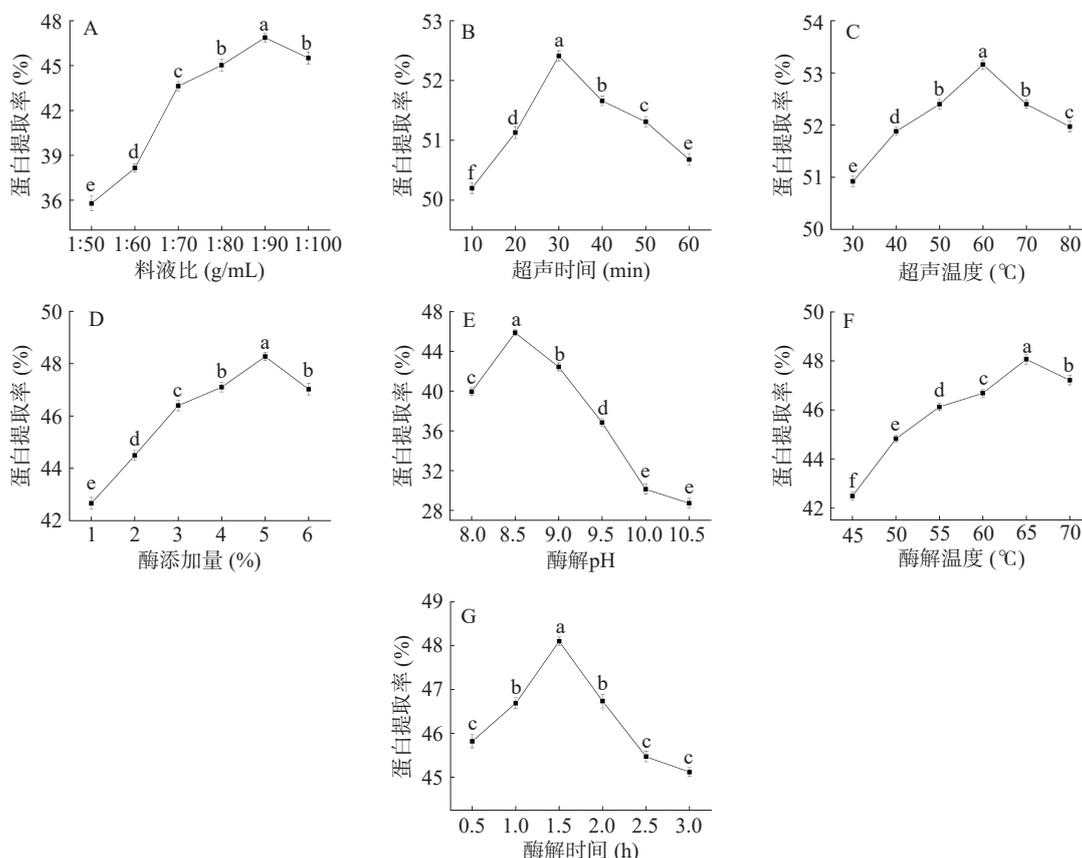


图 1 各因素对黑木耳蛋白提取率的影响

Fig.1 Effects of various factors on the extraction rate of *Auricularia auriculata* protein

好($P<0.05$), 然而当酶添加量大于 5% 时, 蛋白提取率开始缓慢下降。原因可能是酶在适宜浓度范围内, 伴随酶添加量的增大, 酶加速细胞壁的降解, 使原料中的蛋白更易溶出。当酶溶度达到饱和时, 由于所有底物均已和酶形成中间产物继续提高酶的浓度, 反而会使酶促反应降低, 且酶本身具有竞争性抑制作用, 故当酶添加量超过一定范围时, 黑木耳蛋白提取率反而会降低^[26]。所以选取酶添加量为 5% 进行下一步优化。

由图 1E 所示, 黑木耳蛋白提取率随酶解 pH 的增大迅速升高, 当 pH 到达 8.5 时酶的破壁效果最好, 蛋白提取率最高, pH 继续增大, 蛋白提取率下降显著($P<0.05$)。由此可知, 黑木耳蛋白提取率随 pH 的增大而明显升高, 表明碱性 pH 能够疏松蛋白结构, 提高蛋白溶解性, 但碱性过强则会致使蛋白变性, 从而破坏蛋白品质^[25]。故选取酶解 pH 为 8.5 进行下一步优化。

由图 1F 可知, 黑木耳蛋白提取率随酶解温度的升高呈先上升后下降趋势。酶活性在温度为 65 °C 时, 达到最大值, 蛋白溶出速率也达到最大。温度继续升高, 酶活性遭到破坏, 破壁效果显著下降($P<0.05$), 蛋白提取率也随之降低^[27]。所以选取提取酶解温度

65 °C 进行下一步优化。

图 1G 显示, 黑木耳蛋白提取率随酶解时间的延长, 呈现先上升后下降的趋势。当反应时间为 1.5 h 时, 蛋白提取率最大, 此后, 延长酶解时间提取率下降显著($P<0.05$), 原因可能是底物随酶解时间的延长而不断减少, 酶解产物的积累抑制了酶的活力, 同时部分溶出蛋白被水解, 导致蛋白提取率下降^[28]。故选取酶解时间为 1.5 h 进行下一步优化。

2.2 PB 试验设计结果

根据表 3 试验结果, 利用 Design-Expert 11.0 软件进行多元回归方程拟合和方差分析, 得到以黑木耳蛋白提取率为响应值的最优回归方程为: $Y=131.42842-0.230957X_1+0.236742X_2+0.111009X_3+0.497741X_4-5.37870X_5-0.690105X_6+4.26641X_7$ 。

根据表 4 方差分析结果可知, 该模型差异极显著($P<0.01$), $R^2=0.9713$, 即有 97.13% 的试验数据可用该模型解释。对黑木耳蛋白提取率的影响极显著($P<0.01$)的因素依次为 $X_6>X_5$, 影响显著($P<0.05$)的因素依次为 $X_2>X_1>X_7$, X_3 、 X_4 影响不显著($P>0.05$)。因此, 选取酶解温度、酶解 pH、超声时间和料液比 4 个因素进行 Box-Behnken 试验。

表 3 PB 试验设计方案及结果

Table 3 Design scheme and results of PB experiment

实验号	X_1 料液比(g/mL)	X_2 超声时间(min)	X_3 超声温度(°C)	X_4 酶添加量(%)	X_5 酶解pH	X_6 酶解温度(°C)	X_7 酶解时间(h)	蛋白提取率(%)
1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	37.05
2	1	1	1	-1	-1	-1	1	52.13
3	-1	1	-1	1	1	-1	1	51.08
4	-1	1	1	-1	1	1	1	52.31
5	1	1	-1	1	1	1	-1	34.42
6	-1	1	1	1	-1	-1	-1	42.48
7	1	-1	1	1	-1	1	1	37.75
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	38.63
9	1	-1	-1	-1	1	-1	1	36.17
10	-1	-1	1	-1	1	1	-1	42.83
11	1	-1	1	1	1	-1	-1	41.96
12	-1	-1	-1	1	-1	1	1	45.82

表 4 PB 试验设计方差分析结果

Table 4 Analysis of variance results of PB experiment design

项目	平方和	df	均方	F值	P值
模型	433.30	7	61.90	19.34	0.0062**
X_1	64.01	1	64.01	19.99	0.0111*
X_2	67.26	1	67.26	21.01	0.0102*
X_3	14.79	1	14.79	4.62	0.0981
X_4	2.97	1	2.97	0.9286	0.3898
X_5	86.79	1	86.79	27.11	0.0065**
X_6	142.87	1	142.87	44.63	0.0026**
X_7	54.61	1	54.61	17.06	0.0145*
残差	12.81	4			
总离差	446.10	11			
$R^2=0.9713$		$R^2_{Adj}=0.9211$			

注: *表示对结果影响显著($P<0.05$); **表示对结果影响极显著($P<0.01$); 表6同。

2.3 Box-Behnken 试验设计结果

根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理^[24], 综合单因素实验和 PB 试验结果, 以黑木耳蛋白质提取率作为响应值, 考察料液比、超声时间、酶解 pH 和酶解温度 4 个因素对于结果的影响, 以得出最优试验条件。Box-Behnken 试验方案与结果见表 5, 方差分析结果见表 6。

表 5 Box-Behnken 试验设计方案及结果
Table 5 Design scheme and results of Box-Behnken experiment

实验号	A料液比 (g/mL)	B超声时间 (min)	C酶解 pH	D酶解温度 (°C)	Y蛋白提取率 (%)
1	0	0	0	0	57.20
2	1	0	0	1	44.89
3	-1	0	0	1	50.15
4	-1	0	1	0	50.33
5	0	1	0	-1	46.70
6	0	0	0	0	57.17
7	0	1	1	0	49.62
8	1	0	1	0	42.30
9	0	0	1	1	49.51
10	1	0	-1	0	46.10
11	-1	1	0	0	48.75
12	1	0	0	-1	45.10
13	0	0	0	0	57.34
14	0	0	1	-1	46.70
15	0	0	-1	-1	45.58
16	0	-1	0	1	49.27
17	-1	0	-1	0	45.50
18	0	-1	0	-1	48.20
19	1	-1	0	0	45.35
20	0	0	-1	1	48.35
21	-1	-1	0	0	49.30
22	-1	0	0	-1	46.12
23	0	0	0	0	56.40
24	0	-1	1	0	46.82
25	0	1	0	1	50.50
26	1	1	0	0	47.52
27	0	0	0	0	56.60
28	0	1	-1	0	46.90
29	0	-1	-1	0	47.69

对表 5 中的数据, 采用响应面方法分析试验结果, 得到黑木耳蛋白提取率(Y)的二次回归方程为:
 $Y=56.94-1.57A+0.28B+0.43C+1.19D+0.68AB-2.16AC-1.06AD+0.8975BC+0.6825BD+0.01CD-5.68A^2-3.78B^2-5.18C^2-4.47D^2$ 。

由表 6 可知, 该模型差异极显著($P<0.01$), 决定系数 R^2 为 0.9926, 说明模型拟合程度良好, 能较好地拟合试验结果。失拟项不显著($P>0.05$), 说明模型误差较小, 校正决定系数 R^2_{Adj} 为 0.9851, 说明模型的相关性和解释度都很好, 可以用此模型进行理论分析和预测。模型一次项 A、D, 交互项 AC、AD、BC, 二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 对黑木耳蛋白提取率的影响极显著($P<0.01$), 一次项 C, 交互项 AB、BD 影响显著($P<0.05$)。4 个影响因素中, 对黑木耳蛋白质提取率影响最大的为料液比, 其次为酶解温度和酶解 pH, 影响最小的为超声时间。

表 6 Box-Behnken 试验方差分析结果

Table 6 Variance analysis results of Box-Behnken experiment

变异来源	平方和	df	均方	F值	P值
模型	474.37	14	33.88	133.53	<0.0001**
A	29.74	1	29.74	117.19	<0.0001**
B	0.9408	1	0.9408	3.71	0.0747
C	2.22	1	2.22	8.74	0.0104*
D	16.97	1	16.97	66.88	<0.0001**
AB	1.85	1	1.85	7.29	0.0173*
AC	18.62	1	18.62	73.38	<0.0001**
AD	4.49	1	4.49	17.71	0.0009**
BC	3.22	1	3.22	12.7	0.0031**
BD	1.86	1	1.86	7.34	0.0169*
CD	0.0004	1	0.0004	0.0016	0.9689
A^2	209.28	1	209.28	824.77	<0.0001**
B^2	92.63	1	92.63	365.05	<0.0001**
C^2	174.14	1	174.14	686.29	<0.0001**
D^2	129.76	1	129.76	511.38	<0.0001**
残差	3.55	14	0.2537		
失拟项	2.86	10	0.2865	1.67	0.3289
误差项	0.6877	4	0.1719		
总离差	477.92	28			
$R^2=0.9926$					
$R^2_{Adj}=0.9851$					

2.4 各因素之间交互作用和响应面分析

由 Design-Expert 11.0 软件对试验结果进行响应面图的绘制, 通过 3D 响应面图能直观地反映出各因素及因素之间的交互作用对黑木耳蛋白提取率的影响^[29]。响应面分析结果见图 2。

由图 2a、图 2e 可以看出, AB、BD 响应面曲面较陡峭, 料液比和酶解温度的变化曲线比超声时间的变化曲线陡峭, 说明料液比和酶解温度比超声时间的影响都更显著一些; 由图 2b、图 2c、图 2d 可知, AC、AD、BC 响应面曲线陡峭, 根据曲面的陡峭程度, 可得出料液比和酶解温度的交互作用对蛋白提取率的影响最大, 料液比和酶解 pH 次之, 超声时间和酶解 pH 两者相差不大且影响较小; 由图 2f 可知, CD 响应面曲面相对平缓, 两者交互作用对蛋白提取率的影响不显著, 与方差分析结果一致。

2.5 最佳工艺条件的确定及验证实验

Design-Expert 11.0 软件对试验的优化结果为料液比 1:88.34(g/mL)、超声时间 30.45 min、酶解 pH8.54、酶解温度 65.78 °C, 该条件下的蛋白提取率预测值为 57.19%。采用优化后的参数进行验证实验, 为方便操作, 条件参数设为料液比 1:88(g/mL)、超声时间 30.5 min、酶解 pH8.5、酶解温度 65.8 °C, 该条件下重复试验 3 次, 测得黑木耳蛋白质平均提取率为 57.11%±0.12%, 与模型预测值 57.19% 无明显差异, 说明该模型优化得到的黑木耳蛋白提取工艺参数可靠。

2.6 黑木耳蛋白等电点

探究黑木耳蛋白等电点, 如图 3 所示。

由图 3 可知, 随着溶液 pH 的增大, 蛋白吸光度

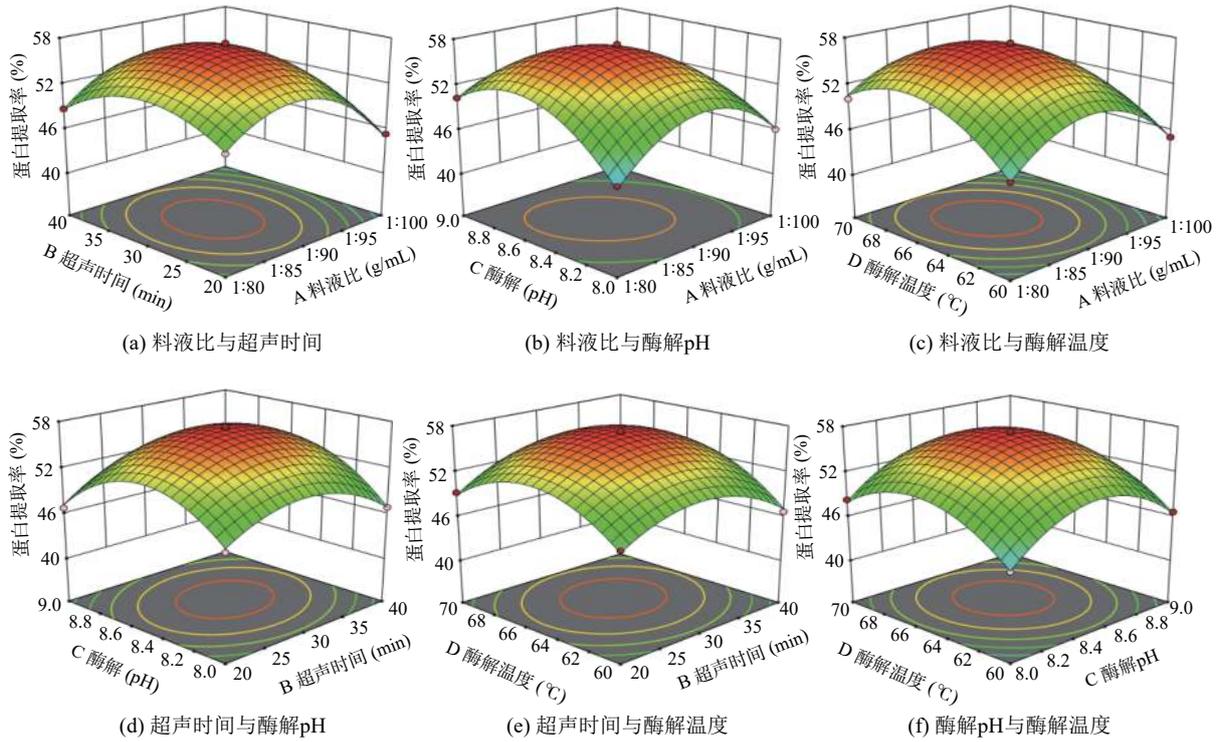


图 2 各因素交互作用对黑木耳蛋白提取率影响的响应面图

Fig.2 Response surface plots showing the interaction effects of various factors on the extraction rate of *Auricularia auricularata* protein

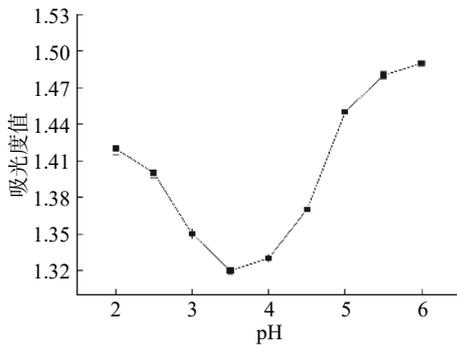


图 3 黑木耳蛋白等电点

Fig.3 Isoelectric point of *Auricularia auricular* protein

值呈先下降后上升趋势, 当 pH 为 3.5 时, 蛋白吸光度值达到最低值, 此时蛋白正、负电荷数相等, 净电荷为零, 这可能是因为蛋白-水间相互作用和蛋白-蛋白间静电排斥作用均降低, 从而引发了蛋白聚合沉淀^[30]。即 pH3.5 为黑木耳蛋白的等电点。

2.7 黑木耳蛋白的功能特性

2.7.1 pH 对黑木耳蛋白起泡性与泡沫稳定性的影响

蛋白起泡性是指蛋白样品在高速搅打过程中通过降低水的表面张力, 并扑捉气体最终形成泡沫的能力; 保持蛋白泡沫产生后的稳定能力即蛋白的泡沫稳定性^[31]。由于蛋白起泡性与蛋白溶解性有很大的关系, 较高的溶解性、表面膜的强度和表面粘度、分子柔性、亲水性基团能够增强蛋白分子与空气的交互作用, 故而对起泡能力产生一定的影响。

图 4 显示, 黑木耳蛋白起泡性随 pH 的增大先下降后上升, 而泡沫稳定性正好相反。当 pH 为 3.5

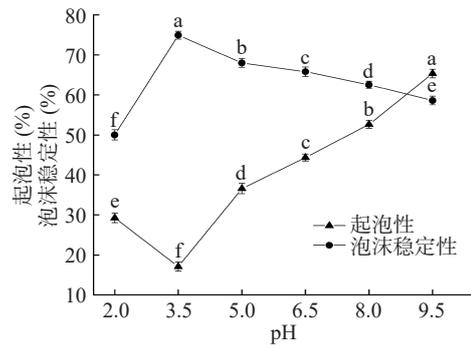


图 4 pH 对黑木耳蛋白起泡性及泡沫稳定性的影响

Fig.4 Effect of pH on the foaming capacity and foam stability of *Auricularia auricular* protein

时, 黑木耳蛋白的起泡性最差(17.10%), 泡沫稳定性最好(74.90%), 随 pH 的不断增大, 起泡性和泡沫稳定性呈相反趋势逐渐靠近, 当 pH 达到 9.5 时, 黑木耳蛋白的起泡性(65.34%)高于其泡沫稳定性(58.60%)。这可能是因为当 pH 在蛋白等电点附近时, 蛋白容易聚集沉淀, 参与形成泡沫的蛋白质量浓度较低, 使其起泡能力最弱, 起泡性最差, 此时, 由于溶液中不溶性颗粒通过静电作用不断吸附于气-液界面, 从而增大蛋白膜的黏性和厚度, 泡沫稳定性随之增加^[21]。

2.7.2 pH 对黑木耳蛋白溶解性的影响 可溶性蛋白在吸水后分散成胶体的性质即为蛋白溶解性^[21]。不同 pH 下蛋白溶解性又有很大差异, 蛋白的溶解性对其在食品工业中的稳定性、风味等有直接的影响。

从图 5 可以看出, 蛋白溶解性随 pH 逐渐增大呈

先下降后上升的U形线。当pH为3.5时蛋白溶解性最低(10.72%), 归因于在等电点附近蛋白发生聚集沉淀, 容易析出; 当溶液体系pH大于或小于3.5时, 黑木耳蛋白-蛋白以及蛋白-水分子之间相互作用增强, 凝聚力下降, 促进溶解, 蛋白溶解性随溶液酸性或碱性的增强不断增大。

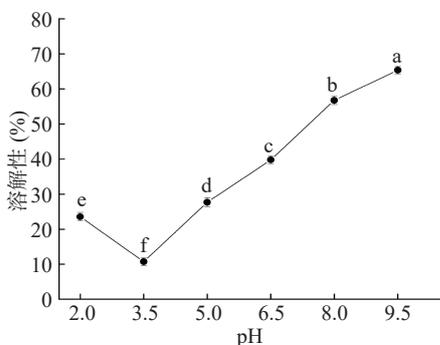


图5 pH对黑木耳蛋白溶解性的影响
Fig.5 Effect of pH on the solubility of *Auricularia auricular* protein

2.7.3 pH对黑木耳蛋白乳化性及乳化稳定性的影响

在高速搅拌下, 蛋白使油被均匀分散在水中形成乳状液的能力叫蛋白乳化性; 维持蛋白乳化液稳定且不出油两相明显分离的能力即蛋白乳化稳定性, 溶液pH、离子浓度、温度和蛋白质浓度都对蛋白乳化性及乳化稳定性有不同程度的影响。

从图6可知, 黑木耳蛋白的乳化性和乳化稳定性都随pH的增大呈先下降后上升的趋势。这是由于当pH为3.5时即黑木耳蛋白的等电点, 此时净电荷为零, 蛋白之间静电排斥力最小, 蛋白溶解性最低, 乳化性(20.56%)和乳化稳定性(54.56%)的能力都最小; 但当pH在远离蛋白的pI时, 黑木耳蛋白乳化性和乳化稳定性呈相同趋势增强, 前者较后者增幅更明显, 由于黑木耳蛋白与水分子之间相互作用增强, 溶于体系溶液的能力增强, 静电斥力增大, 油/水界面的吸附能力增强, 界面张力降低, 蛋白乳化性和乳化稳定性都随之增强^[32]。

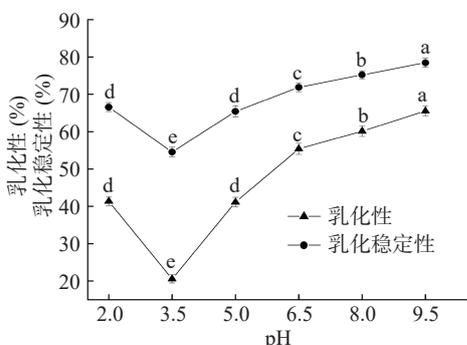


图6 pH对黑木耳蛋白乳化性及乳化稳定性的影响
Fig.6 Effect of pH on the emulsifying property and emulsifying stability of *Auricularia auricular* protein

2.7.4 pH对黑木耳蛋白持水性的影响 蛋白中亲水基团与水结合即吸附水的能力为蛋白持水性, 溶液

体系的pH和温度对蛋白的持水性有一定的影响; 良好的持水性有助于食品贮藏过程中的“保鲜”和“成型”, 保持食品足够的水分, 从而降低水分损失, 防止食品收缩^[32]。

图7可见, 黑木耳蛋白的持水性随pH的增大呈先下降后上升的趋势。pH在蛋白等电点3.5时, 持水性(2.7 g/g)最小, 这是因为处于等电点时的蛋白总电荷为零, 分子间相互作用最大, 缔合和收缩的蛋白质呈现最低的水化和膨胀^[21]; 而当pH远离等电点时, 蛋白以离子形式存在, 使蛋白溶胀性能和黏度增加, 持水性增强。

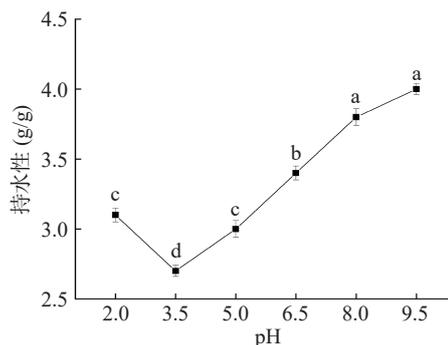


图7 pH对黑木耳蛋白持水性的影响
Fig.7 Effect of pH on the water holding capacity of *Auricularia auricular* protein

2.7.5 pH对黑木耳蛋白吸油性的影响 蛋白的吸油性是指在一定条件下, 蛋白与油脂按一定比例混合后

吸附油脂的能力。影响蛋白吸油性的因素有很多, 如: 蛋白种类、温度及油品, 同时蛋白良好的吸油性在肉制品的加工生产中起着很重要的作用。

由图8可知, 黑木耳蛋白的吸油性随pH的增大呈先下降后上升并趋于平缓的趋势。当pH为3.5时蛋白吸油性最小(2.38 g/g), pH继续升高, 蛋白吸油性上升显著(P<0.05), 当pH为9.5时达到最大值(2.90 g/g), 原因可能是当pH在蛋白等电点附近时, 蛋白容易聚集沉淀, 吸油性最小; 随pH升高, 蛋白分子发生伸展、解离, 内部非极性键暴露且油脂结合能力增大。pH继续升高, 部分蛋白发生变性, 结构发生改变, 分子间的相互作用减小, 吸附能力减弱^[33]。

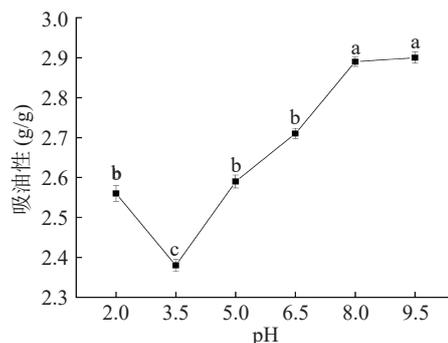


图8 pH对黑木耳蛋白吸油性的影响
Fig.8 Effect of pH on the oil absorption capacity of *Auricularia auricular* protein

3 结论与讨论

各因素对蛋白提取率影响的主次顺序为料液比>酶解温度>酶解 pH>超声时间; 最适提取工艺参数为料液比 1:88(g/mL)、超声时间 30.5 min、酶解 pH8.5、酶解温度 65.8 °C, 获得的理论值为 57.19%, 该条件下, 经验证实际值为 57.11%±0.12%, 证明该模型准确可靠。张莉等^[1]采用碱溶酸沉法提取黑木耳蛋白, 提取率为 64.8%; 林洋^[34]采用超声辅助碱法提取黑木耳蛋白, 提取率为 48.3%; 与之相比, 采用超声波-酶法提取黑木耳蛋白, 提取率居中, 由于实验条件限制, 未能探究超声功率高于 180 W 以后对黑木耳蛋白提取率的影响, 但依据结果可以认为超声波-酶法是一种有效的蛋白提取方法。

pH 对黑木耳蛋白功能特性的影响显著。pH3.5 时蛋白泡沫稳定性最好, 达到 74.90%; 随 pH 增大(3.5~9.5), 溶解性、起泡性、乳化性、乳化稳定性、持水性和吸油性显著提高($P<0.05$), 泡沫稳定性显著下降($P<0.05$)。在适宜的 pH 条件下, 黑木耳蛋白具有较好的溶解性、乳化性、乳化稳定性、泡沫稳定性, 可将其添加至饮料、蛋糕、汤料等食品中。

后期实验可从以下几方面展开: 探究黑木耳蛋白功能特性与温度、离子强度、蛋白质量浓度的关系和影响规律; 通过脱色、超滤、离子交换色谱等技术分离纯化蛋白, 以获得更高纯度的蛋白, 进行其结构鉴定、理化性质研究; 进一步研究黑木耳蛋白的抗氧化活性、功能性产品的开发等。本研究结果为今后黑木耳蛋白的提取工艺以及在食品加工中的应用提供了相应的实验支撑, 同时也为黑木耳的精深加工提供新的思路, 从而有效的提升黑木耳的附加值。

参考文献

- [1] 张莉, 于国萍, 齐微微, 等. 碱溶酸沉法提取黑木耳蛋白质的工艺优化[J]. 食品工业, 2015, 36(6): 24-27. [Zhang L, Yu G P, Qi W W, et al. Optimization of the alkali solution and acid precipitation method to extract protein from *Auricularia auricula* [J]. The Food Industry, 2015, 36(6): 24-27.]
- [2] 赵玉红, 林洋, 张智, 等. 碱溶酸沉法提取黑木耳蛋白质研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(16): 32-36. [Zhao Y H, Lin Y, Zhang Z, et al. Optimization of alkali extraction of protein from *Auricularia auricula* [J]. Food Research and Development, 2016, 37(16): 32-36.]
- [3] 陈雪凤, 韦仕岩, 吴圣进, 等. 不同黑木耳菌株的营养成分分析比较[J]. 食用菌, 2016, 38(2): 72-73. [Chen X F, Wei S Y, Wu S J, et al. Analysis and comparison of nutritional components of different *Auricularia auricula* strains [J]. Edible Fungi, 2016, 38(2): 72-73.]
- [4] 李福利, 张莉, 于国萍. 超声波辅助碱法提取黑木耳蛋白质及其性质研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(6): 2092-2099. [Li F L, Zhang L, Yu G P. Ultrasonic-assisted alkaline extraction and properties of *Auricularia auricular* protein [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2015, 6(6): 2092-2099.]
- [5] 赵爽, 许峰, 刘宇, 等. 黑木耳蛋白质提取物及其抗肿瘤的应
- 用: 中国, 103285042A[P]. 2013-09-11. [Zhao S, Xu F, Liu Y, et al. *Auricularia auricular* protein extract and its anti-tumor application: China, 103285042A[P]. 2013-09-11.]
- [6] 左莹, 张萍, 曹雪丹, 等. 玉米糖渣成分分析及酶解法提取蛋白的工艺优化[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(2): 93-97, 101. [Zuo Y, Zhang P, Cao X D, et al. Component analysis of corn starch cake and enzymatic extraction of protein optimization technology [J]. Food Research and Development, 2015, 36(2): 93-97, 101.]
- [7] 姚兴存, 舒留泉, 盘赛昆, 等. 条斑紫菜蛋白提取与抗氧化活性[J]. 食品科学, 2012, 33(20): 113-118. [Yao X C, Shu L Q, Pan S K, et al. Extraction and antioxidant activity of proteins from *Porphyra yezoensis* [J]. Food Science, 2012, 33(20): 113-118.]
- [8] 李晓明, 陈凯, 黄占旺, 等. 白玉菇蛋白提取工艺优化及其功能特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(4): 239-246. [Li X M, Chen K, Huang Z W, et al. Optimization of protein extraction process and its functional properties of white *Hypsizygos marmoratus* [J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(4): 239-246.]
- [9] Yan Y X, Qin L, Gao J, et al. Protein extraction and sludge dewatering performance of ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of excess sludge [J]. Environmental Science & Pollution Research, 2020, 27(15): 18317-18328.
- [10] Görgüç A, Özer P, Yılmaz F M. Simultaneous effect of vacuum and ultrasound assisted enzymatic extraction on the recovery of plant protein and bioactive compounds from sesame bran [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2020, 87: 103424.
- [11] Fan T, Hu J, Fu L, et al. Optimization of enzymolysis-ultrasonic assisted extraction of polysaccharides from *Momordica charantia* L. by response surface methodology [J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 115: 701-706.
- [12] 许新月, 崔文玉, 黄泽天, 等. 超声辅助纤维素酶法制备杏鲍菇蛋白质工艺优化[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(20): 108-114. [Xu X Y, Cui W Y, Huang Z T, et al. Optimization of protein preparation of *Pleurotus eryngii* by Ultrasonic Assisted Cellulase [J]. Food Research and Development, 2020, 41(20): 108-114.]
- [13] Hildebrand G, Poojary M M, O'Donnell C, et al. Ultrasound-assisted processing of *Chlorella vulgaris* for enhanced protein extraction [J]. Journal of Applied Phycology, 2020, 32: 1709-1718.
- [14] Wang L, Li T, Liu F, et al. Ultrasonic-assisted enzymatic extraction and characterization of polysaccharides from dandelion (*Taraxacum officinale*) leaves [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 126: 846-856.
- [15] Tchabo W, Ma Y, Engmann F N, et al. Ultrasound-assisted enzymatic extraction (UAEE) of phytochemical compounds from mulberry (*Morus nigra*) must and optimization study using response surface methodology [J]. Industrial Crops and Products, 2015, 63: 214-225.
- [16] 朱雪琼. 黑木耳多糖的提取、功能及单糖组成的研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2014. [Zhu X Q. Study on Extraction, Functional and monosaccharide composition of *Auricularia auricula* polysac-

- charide[D]. Nanning: Guangxi University, 2014.]
- [17] Zeng F, Zhao C, Pang J, et al. Chemical properties of a polysaccharide purified from solid-state fermentation of *Auricularia auricular* and its biological activity as a hypolipidemic agent[J]. *Journal of Food Science*, 2013, 78(7-8-9): H1470-H1475.
- [18] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. GB 5009.5-2016 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, China food and drug administration. GB 5009.5-2016 National standard for food safety determination of protein in Food[S]. Beijing: China Standards Publishing House, 2016.]
- [19] 吴兴雨, 马佳, 姚玥, 等. 响应面法优化酶法提取亚麻蛋白工艺[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(14): 166-171. [Wu X Y, Ma J, Yao Y, et al. Technology optimization for enzymatic hydrolysis of protein from flax cake by response surface methodology[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(14): 166-171.]
- [20] 张思思. 扁桃仁蛋白特性及多肽的功能活性研究 [D]. 晋中: 山西农业大学, 2014. [Zhang S S. Study on protein characteristic and functional polypeptide's functional activity of almond[D]. Jinzhong: Shanxi Agricultural University, 2014.]
- [21] 薛蕾, 李大文, 尉芹, 等. 苦杏仁蛋白的功能特性[J]. *食品科学*, 2013, 34(7): 70-75. [Xue L, Li D W, Wei Q, et al. Functional properties of bitter almond protein[J]. *Food Science*, 2013, 34(7): 70-75.]
- [22] 杨希娟, 党斌, 吴昆仑, 等. 青稞蛋白的超声波辅助提取工艺及其功能特性研究[J]. *中国食品学报*, 2013, 13(6): 48-56. [Yang X J, Dang B, Wu K L, et al. Study on ultrasonic-assisted extraction technology and functional characteristics of highland barley protein[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2013, 13(6): 48-56.]
- [23] 张艳荣, 高宇航, 刘婷婷, 等. 白灵菇蛋白提取及功能特性和结构分析[J]. *食品科学*, 2018, 39(14): 42-50. [Zhang Y R, Gao Y H, Liu T T, et al. Extraction and Functional and Structural Characteristics of Protein from *Pleurotus nebrodensis*[J]. *Food Science*, 2018, 39(14): 42-50.]
- [24] 许凤, 王长远. 响应面法优化物理辅助碱法提取米糠蛋白工艺[J]. *食品科学*, 2014, 35(20): 11-16. [Xu F, Wang C Y, et al. Optimization of physical force-assisted alkaline extraction of rice bran protein[J]. *Food Science*, 2014, 35(20): 11-16.]
- [25] 蔡路昀, 刘长虹, 曹爱玲, 等. 巴西松籽蛋白超声辅助超滤提取工艺及功能特性研究[J]. *中国粮油学报*, 2012, 27(10): 70-75. [Cai L J, Liu C H, Cao A L, et al. Study on ultrasonic-assisted ultrafiltration extraction technology and functional characteristics of Brazilian pine nut protein[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2012, 27(10): 70-75.]
- [26] 胡文兵, 杨占威, 陈慧, 等. Plackett-Burman 和 Box-Behnken 试验设计优化超声波-酶法提取青钱柳多糖工艺及结构初探[J]. *天然产物研究与开发*, 2017, 29(4): 671-679. [Hu W B, Yang Z W, Chen H, et al. Optimization of ultrasonic and enzyme-assisted extraction of polysaccharides from *Cyclocarya paliurus* by Plackett-Burman and Box-Behnken experiment and analysis of its structure[J]. *Natural Product Research and Development*, 2017, 29(4): 671-679.]
- [27] 漆倩涯, 贡建民, 黄玉琴, 等. 超声破碎辅助蜗牛酶提取杏鲍菇蛋白工艺优化[J]. *食品科学*, 2016, 37(22): 85-91. [Qi Q Y, Yun J M, Huang Y Q, et al. Optimization of ultrasonic-assisted snailase hydrolysis for extraction of protein from *Pleurotus eryngii*[J]. *Food Science*, 2016, 37(22): 85-91.]
- [28] 麻成金, 黄伟, 黄群, 等. 复合酶法提取仿栗籽蛋白的工艺优化[J]. *食品科学*, 2012, 33(20): 27-32. [Ma C J, Huang W, Huang Q, et al. Optimization of dual-enzymatic hydrolysis for protein extraction from *Sloanea hemsleyana* seeds[J]. *Food Science*, 2012, 33(20): 27-32.]
- [29] Geng L J, Zhou W, Qu X Y, et al. Optimization of the preparation of pectin from aloe using a Box-Behnken design[J]. *Carbohydrate polymers*, 2014, 105: 193-199.
- [30] Cui H, Pan H W, Wang P H, et al. Essential oils from *Carex meyeriana* Kunth: Optimization of hydrodistillation extraction by response surface methodology and evaluation of its antioxidant and antimicrobial activities[J]. *Industrial Crops and Products*, 2018, 124: 669-676.
- [31] 徐红华, 谭俊艳, 谢明明, 等. 纤维诱导对乳清浓缩蛋白起泡性的改善作用分析[J]. *农业机械学报*, 2018, 49(8): 353-359. [Xu H H, Tan J Y, Xie M M, et al. Improving foaming properties of whey protein concentrate induced by fibrils[J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2018, 49(8): 353-359.]
- [32] 曾志红, 王强, 林伟静, 等. 绿豆蛋白营养及功能特性分析[J]. *中国粮油学报*, 2012, 27(6): 51-55. [Zeng Z H, Wang Q, Lin W J, et al. Analysis of nutritional and functional characteristics of mung bean protein[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2012, 27(6): 51-55.]
- [33] 郭刚军, 胡小静, 马尚玄, 等. 液压压榨澳洲坚果粕蛋白质提取工艺优化及其组成分析与功能性质[J]. *食品科学*, 2017, 38(18): 266-271. [Guo G J, Hu X J, Ma S X, et al. Extraction, composition analysis and functional properties of protein isolate from hydraulic expeller-pressed macadamia nut meal[J]. *Food Science*, 2017, 38(18): 266-271.]
- [34] 林洋. 黑木耳蛋白质的提取、分离纯化及特性研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2016. [Lin Y. Extraction, purification and characteristic analysis of the protein from *Auricularia auricular*[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2016.]