响应面法优化金针菇抗氧化物质的超声波辅助提取工艺

杨 念，芮汉明*

(华南理工大学轻工与食品学院，广东 广州 510640)

摘 要：目的：采用超声波辅助提取法从金针菇中提取抗氧化物质，利用响应曲面法对提取工艺参数进行优化，得出最优工艺参数。方法：采用DPPH自由基法检测提取物的清除自由基能力，选择对清除率有显著影响的3个因素——乙醇体积分数、超声功率、提取时间，做三因素三水平响应面分析试验。结果：通过典型性分析得出最优工艺为乙醇体积分数95%、超声频率40kHz、超声功率300W、提取时间20.24min。在此条件下所得提取物DPPH自由基清除率达到了85.32%。结论：超声波辅助提取的金针菇抗氧化物质具有较高清除率，响应曲面法优化提取金针菇抗氧化物质条件参数可行。

关键词：金针菇；抗氧化；超声波；响应面分析

Optimization of Ultrasonic-assisted Extraction of Antioxidants from the Fruiting Body of *Flammulina velutipes* by Response Surface Analysis

YANG Nian，RUI Han-ming*

(College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract：Objective: Ultrasonic treatment was introduced to the ethanolic extraction of antioxidants from the fruiting body of *Flammulina velutipes* with the aim of enhancing cell disruption, and the extraction process was optimized by response surface methodology. Methods: For the evaluation of the ability of extract to scavenge free radicals, a DPPH free radical system was constructed. Ethanol concentration, ultrasonic power and extraction time were selected as major factors that influence DPPH radical scavenging ratio, and the pairwise interactive influences of the three factors at three levels on DPPH radical scavenging ratio were probed by response surface analysis. According to the results of canonical analysis, the optimum conditions for the extraction of antioxidants with high DPPH radical scavenging activity were using 95% ethanol for 20.24 min extraction under the assistance of ultrasonic treatment at 40 kHz and 400 W. The extract under these conditions presented a DPPH radical scavenging ratio of 85.32%. Conclusion: Ultrasonic treatment is helpful to extract highly DPPH radical scavenging antioxidants. Response surface methodology has good feasibility to be used as a mathematical approach to optimize process parameters for the extraction of antioxidants from the fruiting body of *Flammulina velutipes*.

Key words：*Flammulina velutipes*；antioxidant；ultrasonic；response surface analysis

中图分类号：TS201.1 文献标识码：A 文章编号：1002-6630(2011)04-0126-05

人们长期以来一直使用合成抗氧化剂进行食品及油脂的抗氧化和保鲜，但实验证明人工合成抗氧化剂有较多的副作用，如2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)的毒性很大，它能抑制人体呼吸酶活性、使肝脏微粒体酶活性增加，能使人的WI-38胚胎细胞分裂后期发生阳性的染色体异常[1]。国内使用的其他化学合成抗氧化剂如叔丁基对苯二酚等，目前实验证实或怀疑有潜在的致癌作用[2]，过量添加会损害人体健康。因此许多人工合成抗氧化剂在国外已被限制使用。近几年，国际上倾向于研究和开发安全无毒和天然的食品抗氧化剂，研究和应用天然抗氧化剂也成为当今世界食品工业的重要课题。

金针菇(*Flammulina velutipes*)别名毛柄金钱菇、冬菇、朴菇和构菌等[3]，它属于口蘑科和小火焰菌属[4]，因其金黄细嫩的柄如金针而得名。目前，对于金针菇提取物的抗氧化性研究比较少，在国外略间报道[5-7]。

超声波提取技术是利用超声具有的机械效应、空化

收稿日期：2010-04-02

作者简介：杨念(1985—)，女，硕士研究生，研究方向为食品加工与贮藏。E-mail：yn1311@sina.com

*通信作者：芮汉明(1953—)，男，副教授，学士，研究方向为食品加工与贮藏。E-mail：rhmlsy@tom.com

效应及热效应[8]，加强了胞内物质的释放、扩散和溶解，加速了有效成分的浸出，超声波提取的机理[9]正是体现于这些特殊效应，而且超声波提取法具有能耗低、效率高、不破坏有效成分等特点[10]，目前已成功地用于多种植物有效成分的提取[11-12]。响应面分析法(response surface methodology，RSM)是一种优化工艺参数，解决多变量问题的统计方法，系数学与统计学的结合，有助于快速建模、缩短优化时间和提高工程应用可信度[13]。随着计算机技术的发展，它成为一种精确度高、优化效果好、具有很高实用价值的优化技术[14]。本实验运用响应面法(RSM)对超声波提取金针菇抗氧化物质的工艺条件进行优化。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

金针菇子实体　市售。DPPH 自由基　美国 Sigma 公司；其他试剂均为分析纯。

1.2　仪器与设备

台式离心机　上海安亭科学仪器厂；722S 型分光光度计　上海棱光技术有限公司；旋转蒸发仪　上海青浦沪西仪器厂；电子分析天平　北京赛多利斯仪器系统有限公司；TH300 型超声波清洗机　济宁天华超声电子仪器有限公司。

1.3　方法

1.3.1　提取工艺

金针菇子实体，60℃烘干，粉碎过 50 目筛。将金针菇粉与不同体积分数的乙醇混合加入到具塞锥形瓶中，进行超声处理，然后将提取物离心(4000r/min，15min)过滤，旋转蒸发至原体积的 1/5，用 DPPH 自由基法测其抗氧化、清除自由基的能力。

1.3.2　DPPH 自由基法检测抗氧化性

在 1mL 200μmol/L DPPH 自由基无水乙醇溶液中加入 500μL 样品溶液，用无水乙醇定容至 2mL，用力摇匀后于室温放置 30min，测定其在波长 517nm 处的吸光度(A_s)；以 500μL 无水乙醇代替样品为空白对照(A_0)；以 500μL 样品与 1mL 无水乙醇混合液为样品对照(A_x)，以消除样品本身颜色的影响；以无水乙醇调仪器零点。计算抗氧化剂对 DPPH 自由基的清除率(R)[15-16]。

$$R/\% = (A_0 - \frac{A_s - A_x}{A_0}) \times 100$$

1.3.3　金针菇抗氧化物质提取的单因素试验

对超声频率、超声功率、超声时间、乙醇体积分数进行单因素试验，分别考察这 4 个因素对自由基清除率的影响。

超声频率的选择：取 3g 经过前处理备用的金针菇粉，在料液比 1:10(g/mL)、超声功率 180W、超声时间 40min、乙醇体积分数 75% 条件下，分别在超声频率 20、25、40、(20＋25)、(20＋40)、(25＋40)kHz 时进行超声波提取试验，测定试验所得的金针菇提取液的自由基清除率，通过提取液自由基清除率的大小确定超声频率的范围。

超声功率的选择：其他条件不变，超声频率 40kHz，分别在超声功率 60、120、180、240、300W 时进行超声波提取试验，测定试验所得的金针菇提取液的自由基清除率，通过提取液自由基清除率的大小确定超声功率的范围。

超声时间的选择：其他条件不变，分别在超声时间 10、20、30、40、50、60min 时进行超声波提取试验，测定试验所得的金针菇提取液的自由基清除率，通过提取液 DPPH 自由基清除率的大小确定超声时间的范围。

乙醇体积分数的选择：其他条件不变，分别在乙醇体积分数 55%、65%、75%、85%、95% 时进行超声波提取试验，测定试验所得的金针菇提取液的 DPPH 自由基清除率，通过提取液 DPPH 自由基清除率的大小确定乙醇体积分数的范围。

1.3.4　响应面法优化金针菇抗氧化物质提取工艺条件

在单因素试验基础上，固定超声频率 40kHz，采用 Box-Behnken 试验设计，分别以乙醇体积分数、超声功率和超声时间为考察对象，以金针菇提取液的自由基清除率为响应值，设计三因素三水平响应面分析，因素与水平设计见表 1。

表 1　金针菇抗氧化物质提取响应面试验因素水平表

Table 1　Coded variables and their coded levels in response surface analysis

水平	因素		
	x_1 乙醇体积分数/%	x_2 超声功率/W	x_3 超声时间/min
－1	75	180	10
0	85	240	20
1	95	300	30

注：$X_1=(x_1-85)/5$；$X_2=(x_2-240)/60$；$X_3=(x_3-20)/10$。

2　结果与分析

2.1　金针菇抗氧化物质提取单因素试验

2.1.1　超声频率对金针菇提取物 FPPH 自由基清除率的影响

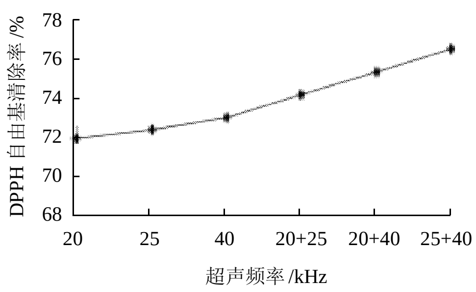


图 1　超声频率对 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.1　Effect of ultrasonic frequency on DPPH radical scavenging ratio of *Flammulina velutipes* extract

如图1所示，随着超声波频率的增加，DPPH自由基清除率出现缓慢的增加，但从经济效益及产率两方面来考虑，应选择40kHz为宜。因此以后的提取试验都选用40kHz，在响应面试验中不做考察。

2.1.2　超声功率对金针菇提取物DPPH自由基清除率的影响

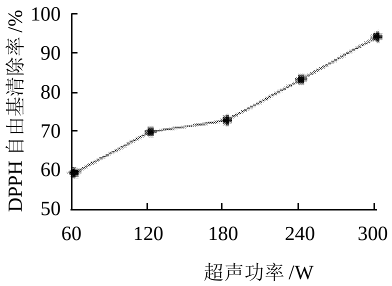


图2　超声功率对DPPH自由基清除率的影响

Fig.2　Effect of ultrasonic power on DPPH radical scavenging ratio of *Flammulina velutipes* extract

如图2所示，随着超声波功率的增加，DPPH自由基清除率呈显著的增加，在超声功率小于180W时，清除率的上升趋势比较平缓，而当功率大于180W时，清除率增长迅速，趋势较陡，所以试验选择超声功率为180～300W为宜。

2.1.3　超声时间对金针菇提取物DPPH自由基清除率的影响

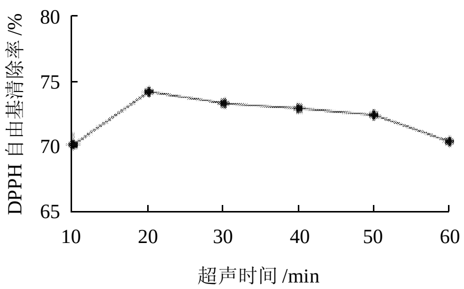


图3　超声时间对DPPH自由基清除率的影响

Fig.3　Effect of ultrasonic treatment time on DPPH radical scavenging ratio of *Flammulina velutipes* extract

如图3所示，在10～20min时，随着超声时间的增加，提取液DPPH自由基清除率呈上升趋势，但当超声波处理时间进一步延长时，DPPH自由基清除率呈不断下降趋势，因此超声时间以20min为宜。

2.1.4　乙醇体积分数对金针菇提取物DPPH自由基清除率的影响

如图4所示，DPPH自由基清除率随着乙醇体积分数的增加，呈不断上升的趋势，当乙醇体积分数75%～85%时，DPPH自由基清除率稍有下降，而当乙醇体积分数达到85%以上时，清除率又呈现不断上升趋势，因此选择乙醇体积分数75%～95%为宜。

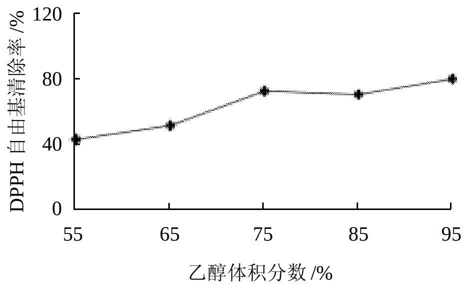


图4　乙醇体积分数对DPPH自由基清除率的影响

Fig.4　Effect of ethanol concentration on DPPH radical scavenging ratio of *Flammulina velutipes* extract

2.2　金针菇抗氧化物质提取工艺响应面法优化试验

表2　金针菇抗氧化物质提取工艺响应面试验方案及结果

Table 2　Experimental design and corresponding results for response surface analysis

试验号	X_1	X_2	X_3	清除率 Y/%
1	－1	1	0	74.08
2	0	1	1	70.20
3	0	1	－1	72.76
4	－1	0	－1	71.06
5	0	－1	1	65.01
6	1	1	0	85.48
7	1	0	1	76.62
8	1	0	－1	78.43
9	0	－1	－1	70.83
10	－1	0	1	62.88
11	－1	－1	0	69.2
12	1	－1	0	74.31
13	0	0	0	70.6
14	0	0	0	70.9
15	0	0	0	69.24
16	0	0	0	74.80
17	0	0	0	69.95

表3　回归方程各项方差分析

Table 3　Analysis of variance of each term of the constructed regression equation

方差来源	自由度	平方和	均方	F值	P值	显著性
X_1	1	176.91	176.91	39.07	0.0004	**
X_2	1	67.11	67.11	14.82	0.0063	**
X_3	1	42.18	42.18	9.31	0.0185	*
X_1^2	1	54.83	54.83	12.11	0.0103	*
X_1X_2	1	9.89	9.89	2.18	0.1830	
X_1X_3	1	10.14	10.14	2.24	0.1781	
X_2^2	1	4.74	4.74	1.05	0.3403	
X_2X_3	1	2.66	2.66	0.59	0.4687	
X_3^2	1	25.46	25.46	5.62	0.0495	*
模型	9	390.81	43.42	9.59	0.0035	*
残差	7	31.70	4.53			
失拟项	3	12.94	4.31	0.92	0.5078	
纯误差	4	18.76	4.69			
总回归	16	422.51				
R^2=0.9250			R^2_{Adj}=0.8258			

注：*.差异显著(P＜0.05)；**.差异极显著(P＜0.01)。

根据单因素试验结果，采用响应面设计试验，运用根据Box-Benhnken中心组合试验设计原理，对乙醇体积分数(A)、超声功率(B)及超声时间(C)作如下变换：$X_1=(A-85)/15$，$X_2=(B-240)/60$，$X_3=(C-20)/10$。以X_1、X_2、X_3为自变量，以DPPH自由基清除率为响应值(Y)，试验方案及结果见表2。

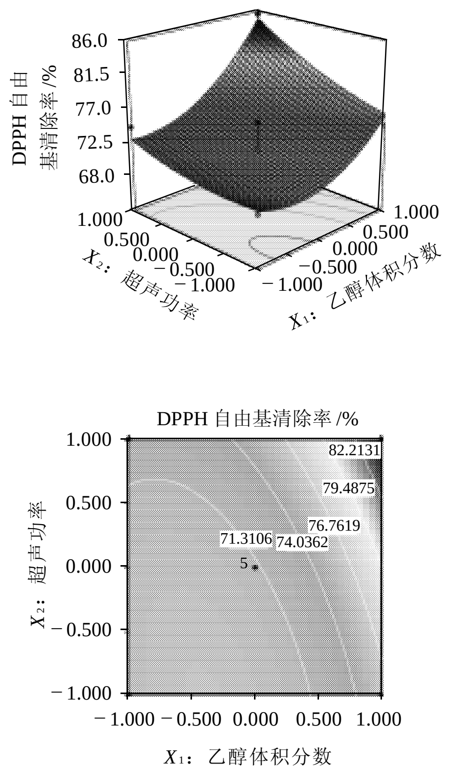
17个试验分为析因点和零点，试验号1～12是析因试验，13～17是中心试验。以金针菇提取液的自由基清除率为响应值，利用Design Expert 7.0.0对表2中试验数据(响应值)进行多元回归拟合及对模型进行方差分析，分析结果如表3所示。从表3可以看出，该模型回归显著。由方差分析结果可知，乙醇体积分数、超声功率和超声时间3个因素在试验过程中均起主要作用，对清除率的影响顺序为：乙醇体积分数＞超声功率＞超声时间。

各因素经二次多项回归拟合后，得到DPPH自由基清除率对乙醇体积分数、超声功率、超声时间3个因素的二次多项回归方程：

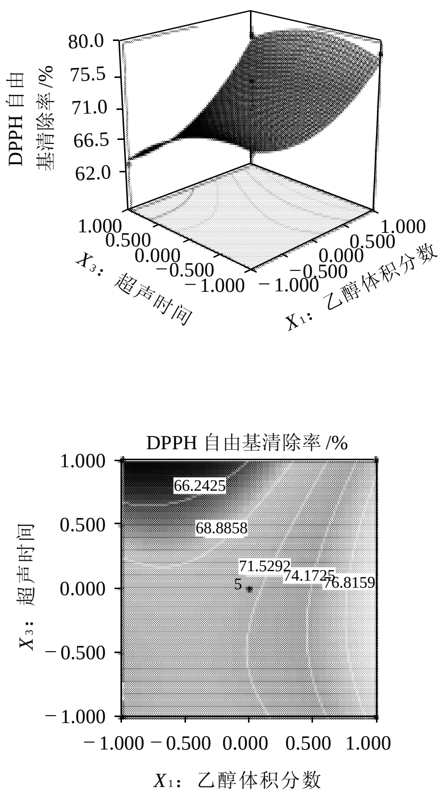
$$Y=71.10+4.70X_1+2.90X_2-2.30X_3+1.57X_1X_2+1.59X_1X_3+0.81X_2X_3+3.61X_1^2+1.06X_2^2-2.46X_3^2$$

经方差分析得到：X_1、X_2项极显著，X_3、X_1^2、X_3^2项对模型的影响也达到了显著水平。因此各种因素和提取率的关系为二次曲线关系，但各种因素的交互作用的影响都不显著，说明各因素之间的交互作用很小。

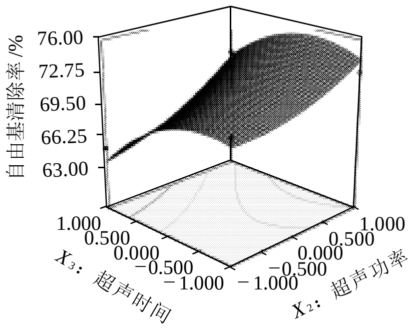
通过回归方程来绘制分析图，考察所拟合的响应曲面的形状，做出响应面立体分析图和相应等高线图，由图5可知，乙醇体积分数是影响DPPH自由基清除率的最主要因素，超声功率次之，选择合适的乙醇体积分数和超声功率，可获得较高的清除率。当超声时间20min时，研究乙醇体积分数和温度的关系，由图5A可以看出，当乙醇体积分数不变时，清除率随超声功率的升高而升高，但当乙醇体积分数处于较低水平时，清除率曲面趋于平缓，而乙醇体积分数处于较高水平时，清除率曲面较陡；当超声功率不变时，清除率随乙醇体积分数的升高而升高，但其清除率的增长趋势明显高于超声频率的。当超声功率240W时，研究乙醇体积分数和超声时间对清除率的影响，由图5B得出，当超声时间不变时，清除率随乙醇体积分数的增大而升高；当乙醇体积分数不变时，清除率随温度的升高而呈现先升高后降低的趋势，且其趋势的变化程度也明显低于乙醇体积分数的。当乙醇体积分数85%时，研究超声功率和超声时间对清除率的影响，由图5C得出，当超声功率不变时，清除率随超声时间的增加而呈现先升高后降低的趋势；当超声时间不变时，清除率随超声功率的升高而升高，超声功率对清除率的影响程度比超声时间的更显著。

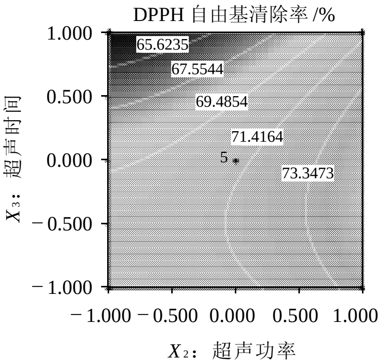


固定水平：超声时间20min。
a.乙醇体积分数与超声功率



固定水平：超声功率240W。
b.乙醇体积分数与超声时间





固定水平：乙醇体积分数85%。

c.超声功率与超声时间

图5 两因素及其交互作用响应面图和等高线图

Fig.5 Response surface and contour plots showing the effects of pariwise interactions of four operating parameters on DPPH radical scavenging ratio of Flammulina velutipes extract

根据回归方程和实际情况得出最优的工艺条件为乙醇体积分数95%、超声频率40kHz、超声功率300W、提取时间20.24min。在此条件下提取理论值达到84.94%，验证实验条件下实际最大值85.32%，理论值与实际值的误差不超过0.45%，结果表明，该模型可以较好地反映出金针菇抗氧化物质提取的条件，从而也证明了响应曲面法优化提取金针菇抗氧化物质条件参数的可行性。

2.3 超声波辅助提取法与其他方法提取金针菇抗氧化物质的比较

通过进行乙醇浸提(料液比1:10、提取时间24h、乙醇体积分数95%)以及乙醇回流提取(料液比1:10、提取时间90min、提取温度40℃、乙醇体积分数95%)，金针菇提取液的DPPH自由基清除率分别为83.09%和82.18%。用超声波辅助法提取金针菇抗氧化物质的最优工艺进行提取，并与乙醇浸提以及乙醇回流提取进行比较可知，超声波法提取金针菇抗氧化物质的最优工艺稳定可靠，同时超声波法辅助提取法优于其他两种方法，不仅缩短了提取时间，降低了能耗，而且提取率也有一定的提高。

3 结　论

超声波的工作原理是利用其产生的空化、机械扰动等物理作用粉碎植物细胞壁使目标物大量的浸出，利用超声波辅助提取金针菇抗氧化物质的效果比较明显，提取效率高、提取时间短、提取温度低等优点，保证了金针菇在提取过程中不会因为长时间的高温而降低其抗氧化活性。

通过单因素试验和响应面法优化超声波辅助提取金针菇抗氧化物试验，得到二次多项式回归模型(R^2=0.9250)。最终确定了超声波辅助提取金针菇抗氧化物质的最佳工艺参数为乙醇体积分数95%、超声频率40kHz、超声功率300W、提取时间20.24min。在此工艺条件下，金针菇提取液的DPPH自由基清除率达到85.32%。

参考文献：

[1] HUI Y H. 贝蕾: 油脂化学与工艺学: 第一卷[M].5版. 徐生康, 裘爱泳, 译. 北京: 中国轻工业出版社, 2001: 244-260.

[2] 秦翠群, 袁长贵. 一类天然的功能性添加剂: 抗氧化剂开发和应用的前景研究[J]. 中国食品添加剂, 2002(3): 59-63.

[3] 杨瑞长, 刘康乾. 食用菌保健功能与食疗方法[M]. 北京: 金盾出版社, 2000.

[4] 于荣利, 秦旭升, 宋凤菊. 金针菇研究概况[J]. 食用菌学报, 2004, 11,(4): 63-68.

[5] JANG M S, SANADA A, USHIO H, et al. Inhibitory effects of 'Enokitake' mushroom extracts on polyphenol oxidase and prevention of apple browning[J]. Lebensm Wiss-u Technol, 2002, 35(8): 697-702.

[6] JANG M S, EUN J B, USHIO H, et al. Antioxidative properties of mushroom *Flammulina velutipes* crude extract on the oxidation of cod liver oil in emulsion[J]. Food Sci Biotechnol, 2004,13(2): 215-218.

[7] BAO H N D, USHIO H, OHSHIMA T. Antioxidative activity and antidiscoloration efficacyof ergothioneine in mushroom (*Flammulina velutipes*)extract added to beef and fish meats[J]. J Agric Food Chem, 2008, 56(21): 10032-10040.

[8] 郭永刚, 王景芹. 超声波在石油化工中应用的研究进展[J]. 当代化工, 2008, 37(1): 5-6; 10.

[9] 杨景峰, 罗志刚, 罗发兴. 物理波在真菌多糖提取中的应用[J]. 粮油食品科技, 2007, 15(5): 56-58.

[10] 黄阿根, 董瑞建. 功能性成分提取与分离纯化方法研究进展[J]. 扬州大学烹饪学报, 2006(1): 59-62.

[11] 张玉祥, 邱蔚芬. 银杏叶超声波提取工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(5): 784-785.

[12] 白明生, 陈彦云, 李国旗. 洋葱皮总黄酮的超声波提取工艺研究[J]. 食品科技, 2008(12): 189-193.

[13] VOHRA A, SATYANARAYANA T. Statistical optimization of the medium components by response surface methodology to enhance phytase production by pichia anomala[J]. Process Biochemistry, 2002, 37(9): 999-1004.

[14] CUI Fengjie, LI Yin, XU Zhenghong, et al. Optimization of the medium composition for production of mycelial biomass and exo-polymer by *Grifola frondosa* GF9801 using response surface methodology[J]. Bioresource Technol, 2006, 97(10): 1209-1216.

[15] 胡喜兰, 韩照祥, 陶莹, 等. DPPH法测定17种植物的抗氧化活性[J]. 食品科技, 2006(10): 264-268.

[16] 许宗运, 马少宾, 张秀萍, 等. DPPH法评价37种植物抗氧化活性[J]. 塔里木农垦大学学报, 2004, 16(2): 1-4.