响应面法优化小球藻蛋白质提取工艺

王晓琴，张学武

（华南理工大学轻工与食品学院，广东广州 510640）

摘要：利用响应面法对小球藻蛋白质的提取工艺进行优化。采用单因素试验和二次回归旋转组合试验确定提取条件，结果表明提取小球藻蛋白质的最佳工艺参数为液料比 21:1，压力 170 MPa，循环次数 4。在此条件下小球藻蛋白质提取率为 45.78%。

关键词：小球藻；蛋白质；响应面法

文章篇号：1673-9078(2012)3-300-303

Optimization of Protein Extraction from Chlorella using Response Surface Methodology

WANG xiao-qin, ZHANG xue-wu

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

Abstract: The optimization of the extraction process of protein from Chlorella was achieved by response surface methodology. The optimization strategy used was a series of one-factor-at-a-time investigations and subsequent response surface analysis based on a quadratic regression rotary combination design. Results showed that Liquid-to-solid ratio of 21:1, pressure of 170 MPa and cycling times of 4 were found optimum for protein extraction from Chlorella. Under these optimum conditions, the yield of protein was 45.78%.

Key words: *Chlorella*; protein; response surface methodology

小球藻（*Chlorella*）是一类普生性单细胞绿藻，其生态分布广，易于培养，生长速度快，是进行生物技术研究的好材料，并且也是好的单细胞蛋白的来源，它与螺旋藻、盐藻、栅藻等微藻的开发利用一起构成了微藻生物技术，已发展成为生物技术领域的一个重要分支[1]。小球藻具有抗肿瘤活性、增加免疫力、解毒保肝、降压作用等[2~6]，其粗蛋白品质好，已经成为小球藻应用领域十分活跃、备受重视的一个方面[7]。

由于小球藻有比较完整的细胞壁结构，因此其胞内蛋白质的提取比较困难，一般都需要进行破壁处理才能有效提取。目前传统的小球藻蛋白质提取方法大多是采用反复冻融[8]、超声[9]、反复冻融超声[10]、化学试剂法[11]、酶法破壁[12]后进行提取，处理量小、能耗高、甚至引起小球藻蛋白变性。因此，建立简单高效安全的小球藻蛋白质提取方法具有重要意义。本研究采用响应面试验（二次回归旋转组合设计）优化小球藻蛋白质提取的工艺参数，旨在为小球藻的深入研究及在食品中的应用提供一定参考。

收稿日期：2011-06-04

基金项目：广东省教育部产学研结合项目（2009B090300271）

作者简介：王晓琴(1986-)，女，硕士研究生，研究方向：天然产物成分提取及其活性研究。

通讯作者：张学武，教授，博士生导师

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

小球藻干粉，购自江门粤健生物工程有限公司；Bio-Rad Protein Assay 试剂盒，购自 Bio-Rad Laboratories Inc.

1.2 仪器与设备

酶联免疫检测仪（Model-550），美国 Bio-Rad 公司；低温超高压连续流细胞破碎机，广州聚能生物科技有限公司；高速冷冻离心机（5415R），德国 Eppendorf 公司；电子天平（BS224S）；凯氏定氮仪（KDY-9820）。

1.3 方法

1.3.1 小球藻中蛋白质总量测定[13]

利用凯氏定氮法测得小球藻中蛋白质总量为 48.18%。

1.3.2 提取液中蛋白含量测定

采用 Bio-Rad Protein Assay 法，按试剂盒说明操作，每个样本设 3 个平行孔。同时以标准牛血清蛋白的质量浓度（分别为 0.05 mg/mL，0.1 mg/mL，0.2 mg/mL，0.3 mg/mL，0.4 mg/mL，0.5 mg/mL）为横坐标，OD_{595} 值为纵坐标绘制标准曲线，作为定量的依据。

1.3.3 小球藻蛋白质提取率

$$蛋白质提取率(\%)=\frac{提取液中蛋白质含量}{小球藻中蛋白质总量}\times 100\%$$

1.4 单因素试验

1.4.1 液料比对小球藻蛋白质提取率的影响

固定温度为 6 ℃，在压力 160 MPa，循环次数 2 次，液料比分别为 10:1、15:1、20:1、25:1、30:1 的条件下提取小球藻蛋白质。

1.4.2 均质压力对小球藻蛋白质提取率的影响

固定温度为 6 ℃，在液料比 15:1，循环次数 2 次，压力分别为 120 MPa、140 MPa、160 MPa、180 MPa、200 MPa 的条件下提取小球藻蛋白质。

1.4.3 循环次数对小球藻蛋白质提取率的影响

固定温度为 6 ℃，在压力 1600 bar，液料比 15:1，循环次数分别为 1 次、2 次、3 次、4 次、5 次的条件下提取小球藻蛋白质。

1.5 响应曲面优化试验的设计

本试验采用 Design-Expert7.0.0 软件中的 Box-behnken design（BBD）设计原理设计响应面试验。根据单因素试验结果，选取液料比、压力和循环次数 3 个因素作为试验因素，以蛋白质提取率为响应值设计试验，试验因素及水平见表 1。

表 1 响应曲面分析因素与水平

Table 1 Factors and levels of the response surface methodology

水平	因素		
	A [液料比/(mL/g)]	B (压力/MPa)	C (循环次数)
-1	15	140	2
0	20	160	3
+1	25	180	4

2 结果与分析

2.1 蛋白质标准曲线

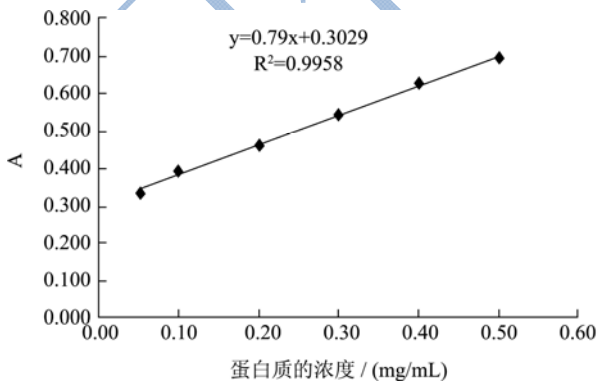


图 1 蛋白质标准曲线

Fig.1 Calibration curve of the chlorella protein

测得蛋白质标准曲线为：Y=0.79X+0.3029，R^2=0.9958。式中，Y 为 OD_{595nm} 值；X 为溶液中蛋白质的浓度。

2.2 单因素对小球藻蛋白质提取率的影响

2.2.1 液料比对小球藻蛋白质提取率的影响

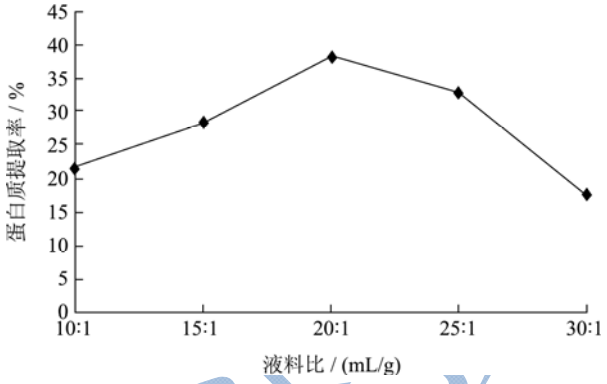


图 2 液料比对小球藻蛋白质提取率的影响

Fig.2 Effect of liquid-solid ratio on the extraction of the chlorella protein

由图 2 可以看出，液料比对小球藻蛋白质提取率有较大的影响。在液料比较低时，蛋白质提取率随着液料比的增大而显著提高，在液料比为 20:1 时蛋白质提取率达到最高值，此后，再增加液料比，蛋白质提取率下降。因此，选择液料比 20:1 为宜。

2.2.2 压力对小球藻蛋白质提取率的影响

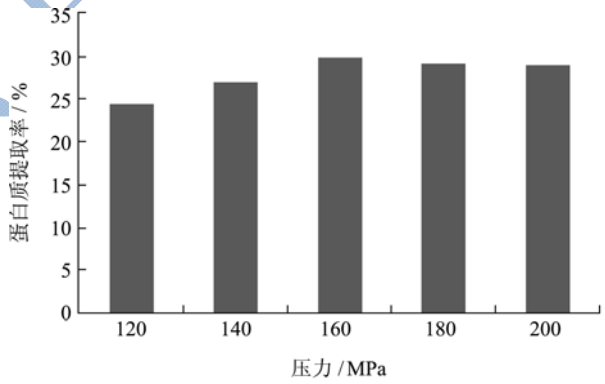


图 3 压力对小球藻蛋白质提取率的影响

Fig.3 Effect of pressure on the extraction of the chlorella protein

由图 3 可知，固定液料比和循环次数，压力从 120 MPa 增加到 160 MPa，小球藻蛋白质提取率明显增大，达到 160 MPa 以后提取率略有下降，但波动的幅度不大。因此，选择压力 160 MPa 为宜。

2.2.3 循环次数对小球藻蛋白质提取率的影响

由图 4 可知，循环 3 次小球藻蛋白质提取率上升迅速，再增加循环次数，蛋白质提取率均变化不大。综合考虑，循环 3 次能得到较高的蛋白质提取率。因

此，选择循环次数 3 次为宜。

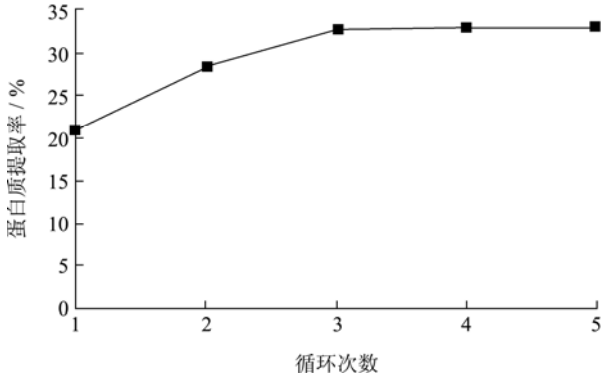


图 4 循环数对小球藻蛋白质提取率的影响

Fig.4 Effect of cycling times on the extraction of the chlorella protein

2.3 响应面实验设计和结果

将所得的试验数据采用 Design Expert7.0.0 软件进行多元回归拟合，得到以小球藻蛋白质提取率为目标函数的二次回归方程：

Y=+44.81+5.51A+1.65B+3.47C+0.86AB+1.52AC-0.27BC-5.91A2-1.27B2-3.93C2

表 2 响应面分析方案及实验结果

Table 2 Design and results of the response surface methodology for chlorella protein extraction

试验号	A	B	C	Y/%
1	0	0	0	44.53
2	1	0	-1	35.00
3	-1	-1	0	30.71
4	0	0	0	44.11
5	0	1	1	44.30
6	1	1	0	46.26
7	0	1	-1	37.92
8	1	-1	0	40.95
9	0	-1	1	41.83
10	0	0	0	45.25
11	-1	0	-1	27.95
12	-1	1	0	32.59
13	1	0	1	45.03
14	0	0	0	44.90
15	-1	0	1	31.90
16	0	0	0	45.24
17	0	-1	-1	34.39

从表 3 可以看出，回归方程因变量和自变量之间的线性关系显著(R2=0.9953)，方程 P＜0.0001，说明此回归方程显著；失拟项 P=0.1827＞0.1，说明方程对实验的拟合度较好，此实验方法可靠。方程中 A，B，C，AC，A2，B2，C2 对响应值影响极显著，AB 对响应值影响显著，BC 对响应值影响不显著。各因素对蛋白质提取率的影响程度大小依次为液料比＞循环次数＞压力。

表 3 回归方程的方差分析

Table 3 Analysis of variance in regression

项目	自由度	平方和	均方	F 值	P 值
回归模型	9	610.46	67.83	166.03	＜0.0001**
A	1	242.85	242.85	594.42	＜0.0001**
B	1	21.77	21.77	53.29	0.0002**
C	1	96.59	96.59	236.44	＜0.0001**
AB	1	2.94	2.94	7.2	0.0314*
AC	1	9.25	9.25	22.64	0.0021**
BC	1	0.28	0.28	0.69	0.4322
A^2	1	146.98	146.98	359.77	＜0.0001**
B^2	1	6.78	6.78	16.59	0.0047**
C^2	1	64.94	64.94	158.94	＜0.0001**
残差	7	2.86	0.41		
失拟项	3	1.91	0.64	2.68	0.1827
净误差	4	0.95	0.24		
总误差	16	613.32	16		

注：*差异显著，P＜0.05；**差异极显著，P＜0.01。R^2=0.9953，R^2_{adj}=0.9893。

根据回归分析结果，作出响应曲面图，如图 5~图 7 所示，可直观地看出交互作用对蛋白质提取率的影响。

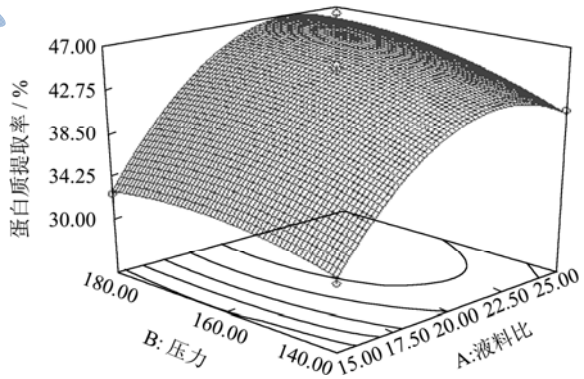


图 5 液料比和压力对小球藻蛋白质提取率影响的响应面和等高线图

Fig.5 Responsive surfaces and contour of the combined effects of liquid-solid ratio and pressure on extraction of the chlorella protein

在选取的各因素范围内，通过 Design Expert 软件分析得出，小球藻蛋白质最佳提取条件为：液料比 20.89:1，压力 173.95 MPa，循环次数 3.77，蛋白质提取率的预测值为 46.6534%。为便于指导实际生产，将最优组合方案定为：液料比 21:1，压力 170 MPa，循环次数 4。按最优组合方案中的提取条件进行验证实

验，重复 3 次，取平均值，测得小球藻蛋白质提取率为 45.78%，与理论值 46.6534%接近，其相对误差为 0.8734%，进一步验证了数学回归模型的正确性。

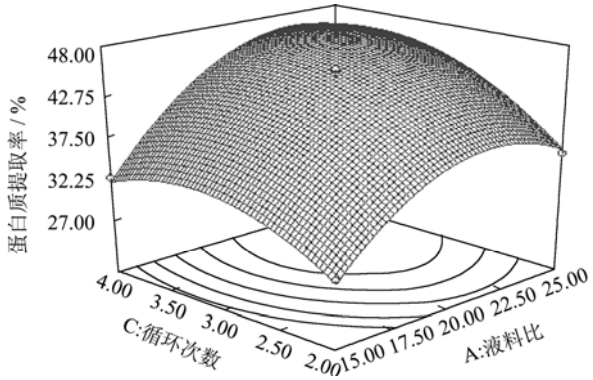


图 6 液料比和循环次数对小球藻蛋白质提取率影响的响应面和等高线图

Fig.6 Responsive surfaces and contour of the combined effects of liquid-solid ratio and cycling times on extraction of the chlorella protein

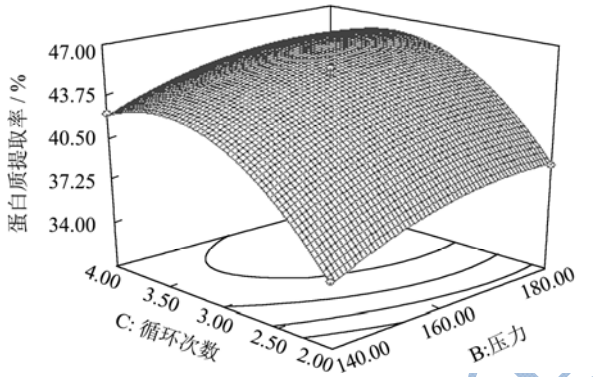


图 7 压力和循环次数对小球藻蛋白质提取率影响的响应面和等高线图

Fig.7 Responsive surfaces and contour of the combined effects of pressure and cycling times on extraction of the chlorella protein

3 结论

3.1 建立了一个以小球藻蛋白质提取率为目标值，液料比、压力、循环次数为因子的数学模型：Y=+44.81+5.51A+1.65B+3.47C+0.86AB+1.52AC-0.27BC-5.91A2-1.27B2-3.93C2。采用此模型在本试验范围内能较准确地预测小球藻蛋白质的提取率。

3.2 通过试验结果的方差分析可知，在本实验范围内，各因素对小球藻蛋白质提取率的影响作用大小顺序依次为液料比>循环次数>压力。

3.3 提取小球藻蛋白质的最佳工艺参数为液料比 21:1，压力 170 MPa，循环次数 4，在此优化工艺条件下，实际测得的小球藻蛋白质提取率为 45.78%，与理论预测值的相对误差为 0.8734%左右。

参考文献

[1] 陈颖,李文彬,孙勇如.小球藻生物技术领域应用现状及展望[J].生物工程进展, 1998, 18(6): 12-16

[2] Tanaka K, Yamada A, Noda K, et al. A novel glycoprotein obtained from Chlorella vulgaris strain CK22 shows antimetastatic immunopotentiation [J]. Cancer Immunol Immunother, 1998, 45(6): 313-320

[3] Hasegawa T, Kimura Y, Hiromatsu K, et al. Effect of hot water extract of Chlorella vulgaris on cytokine expression patterns in mice with murine acquired immunodeficiency syndrome after infection with Listeria monocytogenes[J]. Immunopharmacology, 1997, 35(3): 273-282

[4] Konishi F, Tanaka K, Himeno K, et al. Antitumor effect inducer by a hot water extract of Chlorella vulgaris (CE): resistance to Meth-A tumor growth mediated by CE-induced polymorphonuclear leukocytes [J]. Cancer Immunol Immunother, 1985, 19(2): 73-78

[5] 陈俊辉,魏东.异养小球藻对铁、锌和钙的生物富集作用研究[J].现代食品科技,2010,26(11):1192-1196

[6] Noda K, Ohno N, Tanaka K, Kamiya N,et al. A water soluble antitumor glycoprotein from *chlorella vulgaris* [J]. Planta Med. 1996, 62(5): 423-426

[7] 李师翁,李虎乾.植物单细胞蛋白资源-小球藻开发利用研究的现状[J].生物科技, 1997, 7(3): 45-48

[8] 陈晓清,郑怡,林雄平.二种微藻多糖与蛋白质提取物的抗菌活性[J].福建师范大学学报(白然科学版), 2005, 21(2): 76-79

[9] Ying Shi, Jianchun Sheng, Fangmei Yang, et al. Purification and identification of polysaccharide derived from Chlorella pyrenoidosa [J]. Food Chemistry, 2007, 103(1): 101-105

[10] 魏文志,夏文水,吴玉娟.小球藻蛋白质的分离、纯化及抗氧化特性[J].上海水产大学学报, 2007, 16(2): 135-139

[11] E A Meijer, R H Wijffels. Development of a fast, reproducible and effective method for the extraction and quantification of proteins of micro-algae [J]. Biotechnology Techniques, 1998, 12(5): 353-358

[12] 何扩,张秀媛,李玉锋.小球藻破壁技术及其藻片研制[J].食品工业科技, 2006, 27(2): 32-33

[13] 张水华.食品分析[M].中国轻工业出版社, 2004: 156-158