

# 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

文章编号: 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<sup>[1]</sup>。小球藻具有抗肿瘤活性、增加免疫力、解毒保肝、降压作用等<sup>[2-6]</sup>, 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<sup>[7]</sup>。

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<sup>[8]</sup>、超声<sup>[9]</sup>、反复冻融超声<sup>[10]</sup>、化学试剂法<sup>[11]</sup>、酶法破壁<sup>[12]</sup>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。本研究采用响应面法(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<sup>[13]</sup>

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<sub>595</sub> 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

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

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 °C，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 °C，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 °C，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

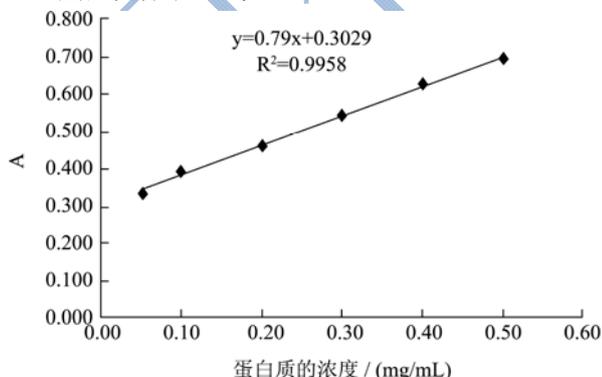


图 1 蛋白质标准曲线

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

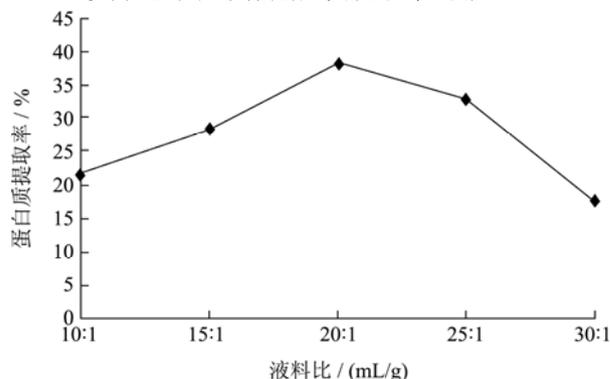


图 2 液料比对小球藻蛋白质提取率的影响

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

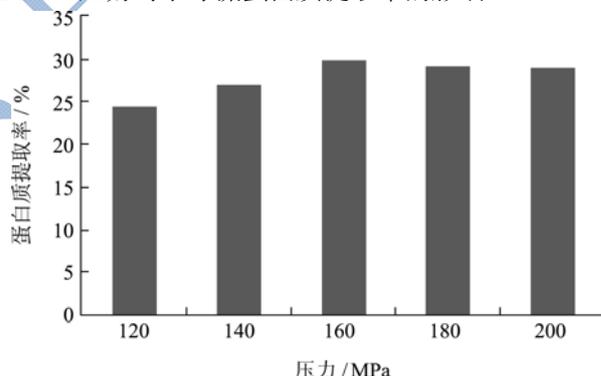


图 3 压力对小球藻蛋白质提取率的影响

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。

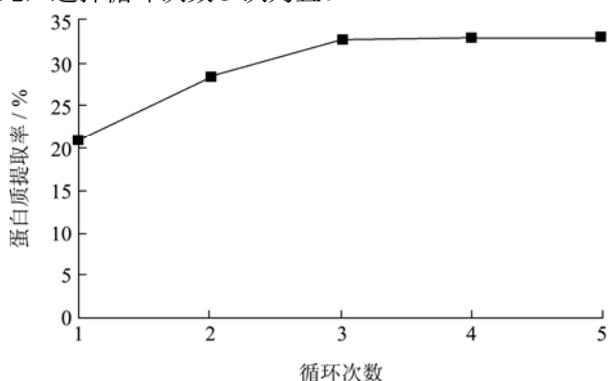


图 4 循环数对小球藻蛋白质提取率的影响

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 Expert 7.0.0 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:

$$Y = +44.81 + 5.51A + 1.65B + 3.47C + 0.86AB + 1.52AC - 0.27BC - 5.91A^2 - 1.27B^2 - 3.93C^2$$

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( $R^2=0.9953$ ), 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, A<sup>2</sup>, B<sup>2</sup>, C<sup>2</sup> 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 <sup>2</sup>	1	146.98	146.98	359.77	<0.0001**
B <sup>2</sup>	1	6.78	6.78	16.59	0.0047**
C <sup>2</sup>	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。

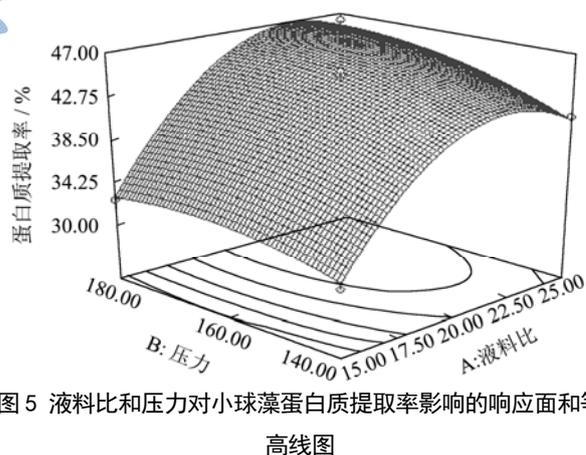


图 5 液料比和压力对小球藻蛋白质提取率影响的响应面和等高线图

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。

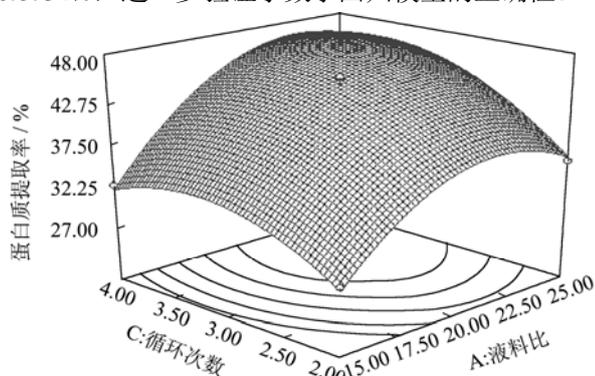


图 6 液料比和循环次数对小球藻蛋白质提取率影响的响应面和等高线图

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

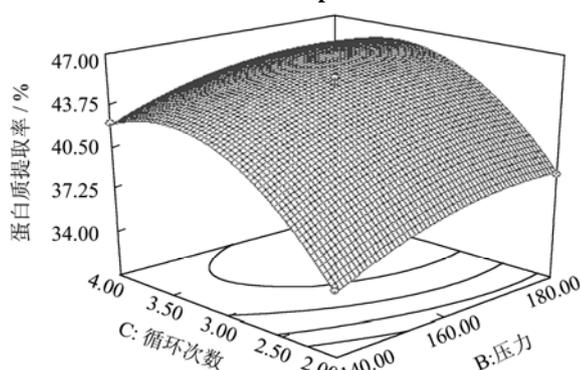


图 7 压力和循环次数对小球藻蛋白质提取率影响的响应面和等高线图

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:  $Y=+44.81+5.51A+1.65B+3.47C+0.86AB+1.52AC-0.27BC-5.91A^2-1.27B^2-3.93C^2$ 。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 immunopotential [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(自然科学版), 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