

响应面法优化香椿中 γ -谷氨酰转肽酶的超声波辅助提取条件

贾建颖¹,刘常金^{1,*},王浩宇¹,李楠¹,骆琦¹,王富鑫²

(1.天津科技大学食品工程与生物技术学院,天津 300457;

2.泰安市信通农业开发有限公司,泰安 271400)

摘要:采用响应面分析方法对香椿中的 γ -谷氨酰转肽酶(GGT)超声波辅助提取的工艺进行优化。以单因素实验为基础,以中心组合实验设计为原理,采用三因素三水平的响应面分析方法,将GGT的提取量作为响应值来进行回归分析。得到超声辅助提取GGT的最佳条件:提取功率260 W、提取时间28 min、缓冲液体积240 mL(样品质量10.00 g)。在上述提取条件下,提取液中GGT的含量达到7.188 U/g,与模型预测值基本相符,说明该优化方法合理可行。

关键词:香椿, γ -谷氨酰转肽酶,超声辅助提取,响应面法

Optimization of ultrasonic-assisted extraction conditions of γ -glutamyltranspeptidase from *Toona sinensis* by response surface methodology

JIA Jian-ying¹, LIU Chang-jin^{1,*}, WANG Hao-yu¹, LI Nan¹, LUO Qi¹, WANG Fu-xin²

(1.College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;

2.Taian Xintong Agricultural Development Co.Ltd., Tai'an 271400, China)

Abstract: In order to optimize the ultrasonic-assisted extraction of γ -glutamyltranspeptidase (GGT) from *Toona sinensis*, single factor investigations were initially carried out, followed by construction of a three-factor, three-level Box-Behnken experimental design, quadratic regression fitting for GGT activity as a function of three extraction conditions and response surface analysis. The optimal conditions for the ultrasonic-assisted extraction of GGT were volume of buffer solution of 240 mL (10.00 g), ultrasonic power of 260 W, and ultrasonic time of 28 min. Under the above conditions, the experimental value of GGT activity was 7.188 U/g, which was in basic agreement with the model predicted value.

Key words: *Toona sinensis*; γ -glutamyltranspeptidase; ultrasonic-assisted extraction; response surface methodology

中图分类号:TS255.7

文献标识码:B

文章编号:1002-0306(2016)13-0226-04

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2016.13.037

香椿(*Toona sinensis*)是一种有特殊芳香风味的中国传统树生植物,属于楝科,广泛地分布于中国,可食用,亦可入药,并且香椿特有的风味使其成为了家喻户晓的菜品^[1]。李聚英^[2]、刘常金等^[3]针对香椿的特殊风味采用顶空固相微萃取法对香椿挥发性成分进行富集,通过气相色谱嗅闻联用质谱法(GC-O-MS)研究了香椿香气的组成成分,并确定了其中两种含硫化合物,2-巯基-3,4-二甲基-2,3-二氢噻吩和2-甲基-3,5-二甲基-2,3-二氢噻吩是香椿的特征性香气物质。在李家笑等人^[4]的报道中, γ -谷氨酰-丙基巯基甘氨酸(产生香椿风味的前体物质)通过酶促反应得到谷氨酸和易水解产生丙基巯醇、氨和乙醛酸的中间物,丙基巯醇经过进一步反

应后得到香椿风味物质。 γ -谷氨酰转肽酶(γ -glutamyltranspeptidase, GGT, EC 2.3.2.2)能够特异性地催化 γ -谷氨酰基的转移反应,生成谷氨酸和氨,符合上述反应路径,因此将该酶作为研究材料,进行分离提取后,可进一步验证其在香椿风味产生过程中的作用,对香椿风味产生机理的研究具有重要意义。

目前对植物中的GGT研究很少,多集中于微生物及动物提取,而关于其植物提取方法的研究则更少。因此,对香椿中GGT的提取方法进行研究,对于进一步香椿风味的机理研究具有意义。

已知GGT是谷胱甘肽的代谢路径中起着主要作用的酶^[5],该酶主要是存在于细胞膜的外表面,通过亚基和细胞膜相连^[6]。超声波是广泛应用的提取方

收稿日期:2016-01-12

作者简介:贾建颖(1989-),女,硕士研究生,研究方向:植物酶的研究,E-mail:951891128@qq.com。

* 通讯作者:刘常金(1969-),男,副教授,研究方向:植物化学物与健康食品,E-mail:cjliu@tust.edu.cn。

法之一,超声波提取法用于蛋白质的提取也有明显优势。超声波会产生强烈振动、空化效应以及搅拌作用等,这些作用可以促进提取成分的加速释放,从而提高提取率,缩短提取时间^[7]。本实验采用了超声辅助提取法改进香椿中 GGT 的提取工艺,为深入研究 GGT 及香椿中风味的产生机理提供技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

香椿嫩叶 (*Toona sinensis*.A.Juss.) 天津科技大学实验苗圃;三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 购自 Solarbio 公司;双甘肽 购自上海金穗生物科技有限公司;L-γ-谷酰胺-对硝基苯胺 购自生工生物工程(上海)股份有限公司;β-巯基乙醇 购自 Sigma 公司,其它试剂 均为国产分析纯。

752N 单光束紫外可见分光光度计 上海菁华科技仪器有限公司;Centrifuge 5810R 高速冷冻离心机 Thermo 公司;真空冷冻干燥机 北京德天佑科技发展有限公司;SB25-12 超声波机 宁波新芝生物科技股份有限公司;实验标准筛 60 目 上海陆顺兴工厂制造;400gHK-08 粉碎机 广州市旭朗机械设备有限公司;FA1104A 电子天平 上海精天电子仪器有限公司;HH-4 数显恒温水浴锅 常州普天仪器制造有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品提取 植物样品经真空冷冻干燥,粉碎机粉碎,过 60 目筛,备用。精确称取 1.000 g 样品粉末,置于 100 mL 的锥形瓶中,加入 50 mL 的 Tris-HCl 缓冲液(0.5 mol/L pH7.6),将该提取液体系放置于冰浴环境中,超声提取 20 min,提取功率 200 W。超声后的提取液,8000 r/min 离心 20 min 后,取上清液测定酶活性,计算酶含量。

1.2.2 酶活测定方法及提取率计算 取 2 mL 工作液(0.1 mol/L Tris-HCl 1.2 mL, 0.1 mol/L 双甘肽 0.4 mL, 5 mmol/L L-γ-谷酰胺-对硝基苯胺 0.4 mL),加酶液 1.0 mL,置于具塞试管中混合均匀,于 37 ℃ 反应 30 min 后,加入 3 mL 1.5 mol/L 乙酸中止反应。在 410 nm 处测定吸光值,并根据标准曲线计算样品中的 GGT 活性^[8]。

单位酶活(U)的定义为在上文提到的反应条件下,每分钟产生 1 μmol 的 P-nitroanilide 即定义为 1 个单位的酶活。

GGT 提取量/(U/g) = 样品的总 GGT 活性/香椿粉的质量。

1.2.3 样品提取的单因素实验和响应面实验 利用单因素法实验分析不同缓冲液体积、提取时间以及提取功率对 GGT 提取量的影响。具体操作为称取 10.00 g 样品粉末,分别加入 0.5 mol/L Tris-HCl (pH7.6)缓冲液 20、50、100、200、300 mL,在 4 ℃,提取功率 200 W 条件下提取 20 min;10.00 g 样品粉末,加入 20 mL 缓冲液,在 4 ℃ 提取功率 200 W 条件下分别提取 20、30、40、50、60、70 min;10.00 g 样品粉末,加入 20 mL 缓冲液,提取功率分别在 0、100、200、250、300、400 W 条件下提取 20 min。

根据单因素实验结果,以 Box-Behnken 的中心组合实验为设计原理,利用 Design-expert 8.0 软件进行响应面实验分析^[9],优化 GGT 的超声辅助提取法中缓冲液体积、提取时间和功率提取的工艺,实验因素与水平设计见表 1。

表 1 响应面的分析因素与水平设计

Table 1 Factors and levels of response surface method

水平	因素		
	A 提取功率 (W)	B 提取时间 (min)	C 缓冲液体积 (mL)
-1	200	20	100
0	250	30	200
1	300	40	300

2 结果与分析

2.1 超声波辅助提取法提取 GGT 的单因素实验

2.1.1 不同缓冲液体积对提取 GGT 酶含量的影响 据图 1 可知,随着缓冲液体积的加大,提取液中 GGT 的含量不断增加。当缓冲液体积达到 200 mL(样品质量 10.00 g)时,GGT 的含量达到了最高值(5.34 ± 0.57 U/g),之后进一步增加缓冲液体积,GGT 的含量相对最高值则有所降低。在实验的后续步骤中,如过滤,浓缩等对提取物的消耗也在不断增加,因此出现溶剂量增大,而酶含量下降的情况。综上所述,从原料用量,提取效率,酶活性等方面考虑,选择缓冲液 200 mL 为最佳实验条件。

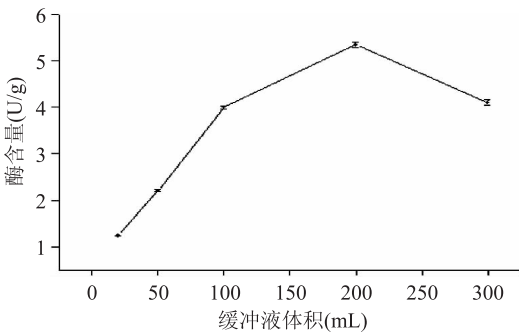


图 1 缓冲液体积对提取 GGT 提取量的影响

Fig.1 Effect of buffer volume on the content of GGT

2.1.2 不同提取功率对提取 GGT 酶含量的影响 据图 2 可知,提取功率的变化是对 GGT 提取量有显著影响的一个条件。随着提取功率的增加,GGT 的提取量也增加。超过最高值后,随着功率的提高,振动加强,对细胞的破坏作用加大,溶质分散程度也加强,有利于 GGT 的扩散浸出^[10]。在适宜的频率条件下,因超声的机械振荡作用、空穴作用和磁致伸缩作用,且对溶液有化学反应、结晶成核的促进功能及对酶催化的协同加速作用,因此表现出酶催化活性的提高^[11]。但是当超过临界值,振动过大时,会产生较高的瞬时温度,而且不能被及时降温,因此可能对酶活性造成一定影响,同时,过强的振动也会破坏蛋白的结构及状态,因此造成酶的活性降低^[12]。综上所述,选择 250 W 作为最佳反应的提取功率,进行实验。

2.1.3 不同提取时间对提取 GGT 酶含量的影响 据

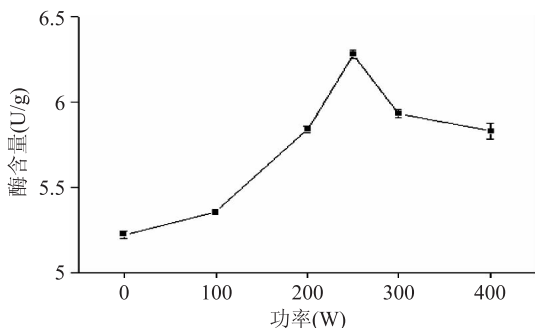


图2 提取功率的变化对提取 GGT 提取量的影响
Fig.2 Effect of extract power on the content of GGT

图3可知,提取时间与 GGT 的提取量变化有着显著的关系,在 30 min 前,随着时间变化,酶的含量出现显著提高,到 30 min 时为最大值(5.65 ± 0.03 U/g),之后随着时间的延长,GGT 的含量出现了明显的下降趋势,主要是因为随着样品提取时间的增加,超声波的热效应增加,提取温度变高,同时过高的温度又会减弱超声波的空化效应,使得超声波对提取物所在样品的细胞壁的破碎作用减小,使细胞内物质的释放和扩散受阻,进而使提取率有所降低,并且超声时间的延长亦会导致了蛋白变性^[13],因而使蛋白质水溶性变差,GGT 的提取量呈现下降趋势。因此,选择 30 min 为最佳提取时间。

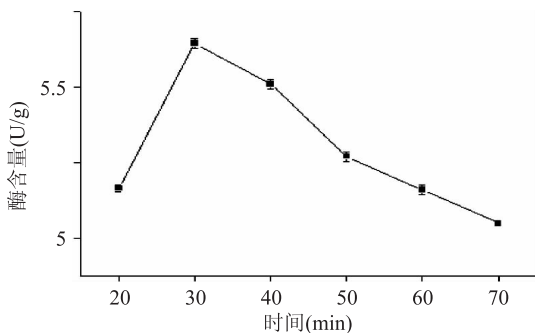


图3 不同提取时间对提取 GGT 提取量的影响
Fig.3 Effect of extract time on the content of GGT

2.2 采用响应面法优化超声波辅助提取法

2.2.1 响应面分析法的实验设计和实验结果 实验方案和实验结果见表 2。

由软件 Design-expert 8.0 对实验结果进行分析,得到回归分析和方差分析,并拟合回归方程,得到 $Y = 7.05 + 0.19A + 0.23B + 0.87C - 0.41AB + 0.15AC - 0.077BC - 0.62A^2 - 0.99B^2 - 1.01C^2$

从表 3 可以看出,回归方程的因变量和自变量之间的线性关系显著($R^2 = 0.9224$),方程中的“Prob > F” = 0.0256 < 0.05,说明该二次方程的模型是显著的;失拟项“Prob > F” = 0.0616 > 0.05,说明该方程对实验的拟合度较好,因此此实验方法是可靠可行的。

2.2.2 提取工艺的确定及验证实验 运用 Design-expert 8.0 软件对回归模型进行分析,结合图 4~图 6 给出的回归方程的三维响应面图和等高线图可知,各因素的交互作用不显著^[14],回归模型存在最大值^[15-16]。取回归方程的极值点,得到:提取功率、提取时间、缓冲液体积的最佳值分别为 261.37 W,28.33 min,

表 2 响应面设计结果

Table 2 Results of response surface method

实验号	A 提取功率	B 提取时间	C 缓冲液体积	GGT 提取量 (U/g)
1	-1	-1	0	5.097
2	0	-1	-1	3.501
3	1	0	-1	5.036
4	0	0	0	6.872
5	1	1	0	5.165
6	0	1	1	6.641
7	1	0	1	6.538
8	-1	1	0	5.972
9	-1	0	1	5.483
10	0	0	0	7.187
11	-1	0	-1	4.582
12	0	1	-1	4.505
13	0	-1	1	5.946
14	0	0	0	7.079
15	1	-1	0	5.920

表 3 回归方程的方差分析

Table 3 ANOVA of response surface analysis

来源	自由度	平方和	均方	F 值	p 值 Prob > F
模型	9	14.67	1.63	6.60	0.0256
A	1	0.29	0.29	1.18	0.3275
B	1	0.41	0.41	1.68	0.2521
C	1	6.10	6.10	24.69	0.0042
AB	1	0.66	0.66	2.69	0.1619
AC	1	0.090	0.090	0.37	0.5717
BC	1	0.024	0.024	0.097	0.7684
A ²	1	1.43	1.43	5.8	0.0609
B ²	1	2.89	2.89	11.70	0.0188
C ²	1	3.79	3.79	15.35	0.0112
保留值	5	1.23	0.25		
失拟项	3	1.18	0.39	15.39	0.0616
误差项	2	0.051	0.026		
总和	14	15.91			
R ²					0.9224

241.53 mL(10.00 g),在此最优工艺条件下,GGT 的提取量达到最大值,为 7.217 U/g。但是考虑到实验条件以及实际操作过程的便利,将 GGT 的最佳提取工艺条件修正为提取功率 260 W,提取时间 28 min,缓冲液体积 240 mL。为了检验响应面分析法的可靠性,在修正的最优条件下进行三次平行实验,测定的 GGT 提取量为 7.188 U/g,与理论上的预测值基本相符,这说明该回归方程能较为真实地反映出各因素对 GGT 提取量的影响。

3 结论

为优化 GGT 的提取工艺,本实验选提取功率、提取时间和料液比这三个因素进行响应面实验设计。采用 Box-Behnken 设计和 Design-expert 8.0 软件进

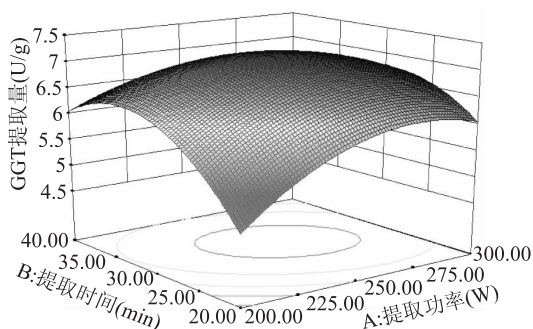


图4 提取功率与提取时间

对 GGT 提取量交互影响效应的响应面 3D 分析图

Fig.4 Response surface of the effects between power and time on the GGT content

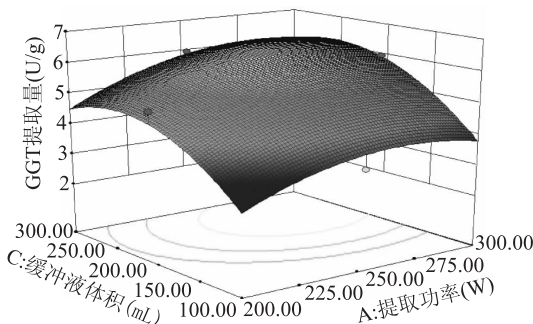


图5 提取功率与缓冲液体积

对 GGT 提取量交互影响效应的响应面 3D 分析

Fig.5 Response surface of the effects between power and buffer volume on the GGT content

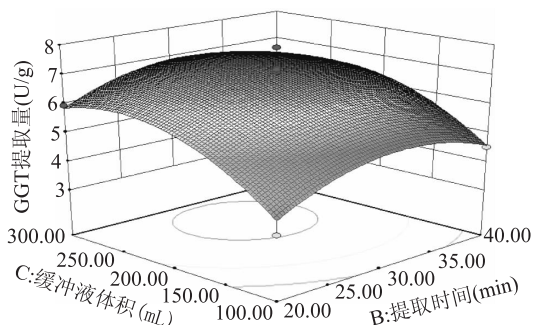


图6 提取时间与缓冲液体积

对 GGT 提取量交互影响效应的响应面 3D 分析

Fig.6 Response surface of the effects between time and buffer volume on the GGT content

行设计和分析,同时结合实际的操作,得到超声辅助提取 GGT 的最佳条件:提取功率、提取时间、缓冲液体积的最佳条件分别为 260 W, 28 min, 240 mL (10.00 g)。在该最佳提取条件下,提取液中 GGT 的

提取率达到了 7.188 U/g,与理论值是相符合的,这表明了该回归方程较为真实地反映出各因素对香椿中的 GGT 提取量的影响,为 GGT 的提取以及后续实验提供了操作指导。

参考文献

- [1] 陈德根,郝明灼,梁有旺,等.不同种源香椿芽菜感官品质及营养成分分析[J].林业科技开发,2011,25(3):40-43.
- [2] 李聚英,王军,戴蕴青,等.香椿特征香气组成及其在贮藏中变化的研究[J].北京林业大学学报,2011,33(3):127-131.
- [3] Liu C, Zhang J, Zhou Z, et al. Analysis of Volatile Compounds and Identification of Characteristic Aroma Components of *Toona sinensis* (A. Juss.) Roem. Using GC-MS and GC-O [J]. Food & Nutrition Sciences, 2013, 4(3):305-314.
- [4] Jia-Xiao L, Kirk E, Xian-Wen G, et al. Identification of (S, S)- γ -Glutamyl-(cis-S-1-propenyl) thioglycine, a Naturally Occurring Norcysteine Derivative, from the Chinese Vegetable *Toona sinensis* [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2013, 61(31):7470-7476.
- [5] 孟佩佩,刘冬英,蒋敏丽,等. γ -谷氨酰转肽酶的性质及其应用进展[J].食品与发酵工业,2009(9):105-110.
- [6] Mehdi K, Thierie J, Penninckx M J. γ -Glutamyl transpeptidase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its role in the vacuolar transport and metabolism of glutathione [J]. Biochemical Journal, 2001, 359(3):631-637.
- [7] 赵瑞香,王大红,牛生洋,等.超声波细胞破碎法检测嗜酸乳杆菌 β -半乳糖苷酶活力的研究[J].食品科学,2006,27(1):47-50.
- [8] 蒋敏丽. γ -谷氨酰转肽酶酶学性质及其催化应用研究[D].广东:广东药学院,2011.
- [9] 石莉娜,罗红霞,宋阳,等.利用 Box-Behnken 设计优化糯玉米汁加工工艺[J].食品工业,2011(9):32-36.
- [10] 徐艳,刘冠群.超声细胞粉碎提取黄芪多糖[J].中国中医药信息杂志,2007,14(3):44-45.
- [11] 黎春怡,黄卓烈,张东方,等.超声波和超临界流体对酶活性的影响[J].生物技术通讯,2007,18(2):360-362.
- [12] 吕鹏,庄重,凌建亚,等.超声对酶的影响[J].生物技术通讯,2004,15(5):534-536.
- [13] 王长远,许凤,张敏.超声时间对米糠蛋白理化和功能特性的影响[J].中国粮油学报,2014(12):43-47.
- [14] 杨文鸽,谢果凤,颜伟华,等.响应面分析法优化海鳗的湿腌工艺[J].中国食品学报,2010,10(1):133-139.
- [15] 王永菲,王成国.响应面法的理论与应用[J].中央民族大学学报:自然科学版,2005,14(3):236-240.
- [16] Oladipo A A, Gazi M, Yilmaz E. Single and binary adsorption of azo and anthraquinone dyes by chitosan-based hydrogel: Selectivity factor and Box-Behnken process design [J]. Chemical Engineering Research & Design, 2015, 104(C):264-279.

(上接第 225 页)

- [17] 丁文平,丁霄霖.普鲁兰酶和 β -淀粉酶对大米支链淀粉回生影响的研究[J].中国粮油学报,2003,18(1):13-16.
- [18] Shifeng Yu, Ying Ma, Da-Wen Sun. Impact of amylose content on starch retrogradation and texture of cooked milled rice during storage [J]. Journal of Cereal Science, 2009, 50(2):

139-144.

- [19] 钱平,陈潇,张晓娟,等.方便米饭的新型组合干燥工艺[J].食品与发酵工业,2013,39(9):83-87.
- [20] 辛涛.回归分析与实验设计[M].北京:北京师范大学出版社,2010:78-89.