

宋丹靓敏, 么宏伟, 曾伟民, 等. 响应面法优化超声微波联用辅助提取黑木耳黑色素工艺 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(7): 162–170.
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020050340

SONG Danliangmin, YAO Hongwei, ZENG Weimin, et al. Optimization of Ultrasound-Microwave Assisted Extraction of Melanin from *Auricularia auricula-judae* by Response Surface Methodology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(7): 162–170. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020050340

· 工艺技术 ·

响应面法优化超声微波联用辅助提取黑木耳黑色素工艺

宋丹靓敏^{1,2}, 么宏伟³, 曾伟民^{1,2}, 冯磊⁴, 王淼^{1,2}, 程文^{1,2}, 万鹏^{1,2}, 雷虹^{1,2,*}

(1. 黑龙江大学农业微生物技术教育部工程研究中心, 黑龙江哈尔滨 150500;
2. 黑龙江大学生命科学学院黑龙江省普通高校分子生物重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150080;
3. 黑龙江省林副特产研究所, 黑龙江牡丹江 157011;
4. 黑龙江省林业科学院, 黑龙江哈尔滨 150040)

摘要: 以黑木耳 (*Auricularia auricula-judae*) 粉末为材料, 研究了超声微波联用辅助提取黑木耳黑色素的方法。通过单因素实验考察黑木耳干粉粉碎粒度、超声功率、微波功率和超声微波联用时间对提取效果的影响, 并采用响应面法优化工艺条件。通过与传统溶剂提取法及超声辅助提取法进行比较, 结合扫描电镜 (Scanning electron microscope) 观察不同提取方法对于黑木耳干粉组织结构的破坏程度, 以此验证超声微波联用辅助提取黑木耳黑色素的优势。结果表明: 木耳黑色素的最佳提取工艺条件是: 超声功率 398 W、微波功率 392 W、联合作用时间 31 min。此条件下黑木耳黑色素吸光度为 0.984, 粗黑色素得率达到 9.10%, 相较传统溶剂法提取法 (7.20%)、超声辅助提取法 (5.20%) 分别提高 26.38%、75.00%。经比较不同提取方法后的黑木耳组织的 SEM 图像, 表明黑木耳组织经超声微波联用辅助提取方法后, 组织结构破损严重。结果证实: 超声微波联用辅助提取黑木耳黑色素的方法相较于传统溶剂法可节约溶剂的使用量, 相较于超声辅助提取法所耗费的时间有所减少, 并且可提升黑木耳黑色素得率。

关键词: 黑木耳黑色素, 超声微波联用, 响应面设计, 扫描电镜, 组织结构

中图分类号: TS201.1 文献标识码: B 文章编号: 1002-0306(2021)07-0162-09

DOI: [10.13386/j.issn1002-0306.2020050340](https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020050340)

Optimization of Ultrasound-Microwave Assisted Extraction of Melanin from *Auricularia auricula-judae* by Response Surface Methodology

SONG Danliangmin^{1,2}, YAO Hongwei³, ZENG Weimin^{1,2}, FENG Lei⁴, WANG Miao^{1,2},
CHENG Wen^{1,2}, WAN Peng^{1,2}, LEI Hong^{1,2,*}

(1. Engineering Research Center of Agricultural Microbiology Technology,
Heilongjiang University, Harbin 150500, China;
2. Heilongjiang University Key Laboratory of Molecular Biology, College of Life Sciences, Harbin 150080, China;
3. Heilongjiang Provincial Institute of By-products, Mudanjiang 157011, China;
4. Heilongjiang Academy of Forestry, Harbin 150040, China)

Abstract: The ultrasound-microwave assisted extraction(UMAE) of melanin from *Auricularia auricula-judae* powder was studied in this study. The effects of particle size, ultrasonic power, microwave power and ultrasound-microwave combined

收稿日期: 2020-05-28

基金项目: 黑龙江省森林工业总局科技计划项目 (sgzjY2015016); 黑龙江大学横向课题 (17016); “三区”科技人才项目。

作者简介: 宋丹靓敏 (1996-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全方向, E-mail: 188181263@qq.com。

* 通信作者: 雷虹 (1971-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品微生物, E-mail: leihong@hlju.edu.cn。

action time on the extraction of melanin from *A. auricula-judae* powder were investigated by single factor experiment, and the process conditions were optimized by response surface methodology. Compared with the traditional solvent extraction method and ultrasound assisted extraction method, combined with scanning electron microscope (SEM), the damage degree of different extraction methods on the structure of *A. auricula-judae* dry powder was observed, so as to verify the advantages of ultrasound-microwave assisted extraction of *A. auricula-judae* melanin. The results showed that the optimal extraction conditions were as follows: Ultrasonic power 398 W, microwave power 392 W, combined action time 31 min. Under these conditions, the absorbance of *A. auricula-judae* melanin was 0.984, and the yield reached 9.10%. Compared with the traditional solvent extraction method (7.20%) and ultrasound-assisted extraction method (5.2%), the extraction yield of *Auricularia auricula* melanin increased by 26.38% and 75.00%, respectively. Compared the SEM images of the tissue of *A. auricula-judae* with different extraction methods, it was shown that the tissue structure of *A. auricula-judae* was seriously damaged after ultrasound-microwave assisted extraction. The results confirmed that the method of ultrasound-microwave assisted extraction of *A. auricula-judae* melanin could save the amount of solvent compared with the traditional solvent method, reduce the time spent compared with the ultrasound-microwave assisted extraction method, and improve the yield of *A. auricula-judae* melanin.

Key words: *Auricularia auriculata-judae* melanin; ultrasound-microwave combination; response surface design; scanning electron microscope; structure of the organization

黑木耳(*Auricularia auricula-judae*), 又名光木耳。按照真菌学分类属于担子菌纲, 木耳目, 木耳科, 木耳属^[1]。我国是世界上主要的木耳生产国, 年产量占世界总产量的 60% 以上, 其产区遍布 20 多个省(自治区、直辖市)^[2]。作为一种营养丰富的食用菌, 黑木耳具有多种保健作用。研究发现, 黑木耳黑色素具有抗氧化、抗辐射、抗病毒、提高免疫力等许多重要的生理功能, 极具开发潜力^[3]。同时, 黑色素(Melanin)被认为是黑色食品中最重要的功能成分之一^[4]。黑色素是由吲哚或酚类化合物氧化聚合而成的非均质高分子化合物, 一般呈黑色、褐色或者棕色, 广泛存在于动植物和微生物中^[5]。同时在食品加工、化妆品开发、疾病预防治疗等方面也都有着广阔的应用前景^[6]。

侯若琳等^[7]采用正交法和响应面法对纤维素酶-超声波协同提取黑木耳黑色素的提取工艺进行了优化, 并对最优条件下提取的黑木耳黑色素体外抗氧化活性进行了检测。潘磊等^[8]使用响应面对超声波辅助法提取黑木耳黑色素工艺进行优化。Harki 等^[9]用碱提酸沉法从真菌细胞中提取黑色素粗品, 于 7 mol/L 的盐酸中在 100 ℃ 下水解 2 h, 离心, 依次用 0.01 mol/L 的盐酸和蒸馏水对色素沉淀进行洗涤, 最后用氯仿洗涤, 即得纯化的黑色素。李琦等^[10]研究了黑木耳黑色素的提取纯化和鉴定方法, 运用紫外-可见光谱扫描和傅里叶红外光谱扫描的方法对黑木耳黑色素的基本结构进行了鉴定, 发现黑木耳黑色素与酪氨酸合成黑色素表现出相对一致的紫外-可见光谱和傅里叶红外光谱特征, 最终将黑木耳黑色素归类为 3, 4-二羟基苯丙氨酸(DOPA)类黑色素。

超声波-微波辅助提取(UMAE)是一种结合超声波和微波方法的新工艺技术, 它充分利用了微波和超声空化的高能效应, 克服了传统超声波和微波提取的缺点^[11]。这种方法能够快速、有效地在低温环境条

件下提取, 节省能源和时间。并且, UMAE 已被用于从植物中提取多种活性化合物, 如番茄红素、植物油、多糖和低聚糖^[12]。然而, 现阶段使用超声波-微波辅助提取法从黑木耳中提取黑色素的研究较为少见。

本文采用超声-微波联用辅助法提取木耳黑色素, 在明确黑木耳黑色素最大吸收波长的前提下, 研究黑木耳干粉粉碎粒度、超声功率、微波功率、联合作用时间对黑木耳黑色素吸光度的影响, 使用响应面法优化黑木耳黑色素提取工艺, 并结合扫描电镜检测, 与传统溶剂法提取黑木耳黑色素方法进行比较, 最终明确超声-微波联用辅助提取法对黑木耳黑色素提取的优势所在, 以期为黑木耳黑色素的进一步开发提供技术依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

黑木耳材料 由东宁黑木耳产业基地提供, 菌种保藏号: HDXZ-1; 氢氧化钠、乙酸乙酯、乙醇、磷酸二氢钠、三氯甲烷、柠檬酸 均为分析纯, 天津市光复科技发展有限公司; 盐酸 分析纯, 哈尔滨理工化学试剂有限公司; 酪氨酸合成黑色素 标准品, 购于 Sigma 公司。

FDV 手提式小型高速粉碎机 北京环亚有限公司; SL-SM200 超声波微波组合反应系统 南京顺流仪器有限公司; H2050R 台式高速大量冷冻离心机 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; UV-2500 岛津紫外分光光度计 日本岛津公司; AB104-N 电子天平 常熟市天量仪器有限责任公司; PHS-25 pH 计 上海仪电科学仪器股份有限公司; W201 电热恒温水浴锅 天津市泰斯特仪器有限公司; S-4800 扫描式电子显微镜 日本株式会社; 冷冻干燥机 上海那艾精密仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 黑木耳原料预处理 黑木耳原料为干制品, 使

用粉碎机进行粉碎,将粉碎完成的黑木耳粉末依次过200、160、120、80、40目筛,收集不同目数下黑木耳干粉并将其置于自封袋中,于干燥条件下保存备用。

1.2.2 传统溶剂法提取黑木耳黑色素工艺 黑木耳干品经粉碎后,过40目筛。准确称取黑木耳粉末样品10.0 g,加入250 mL浓度为3 mol/L的盐酸,70 °C下搅拌浸提1 h,混合物经4000 r/min离心15 min,分离上清和沉淀,沉淀采用氢氧化钠调节其pH至12,充分溶解搅拌后,再经4000 r/min离心15 min^[13]。取上清0.5 mL,用蒸馏水稀释180倍,于紫外分光光度计上测定其吸光度。其余上清液采用3 mol/L盐酸调节pH至2,静置10 min后,4000 r/min离心15 min取沉淀,得到黑色素粗品。

1.2.3 超声波辅助法提取黑木耳黑色素工艺 取粉碎后过40目筛黑木耳粉末10.0 g,按照料液比1:30 mL,加入0.1 mol/L NaOH溶液,超声破壁处理(功率80 W,80 min),10000 r/min离心,15 min。取上清液0.5 mL用蒸馏水稀释180倍,测定吸光度^[14]。其余上清液采用3 mol/L盐酸调节pH至2,静置10 min,沸水浴酸沉10 h,10000 r/min离心15 min取沉淀,即为黑色素粗品。

1.2.4 超声-微波联用辅助提取法提取黑木耳黑色素工艺 取黑木耳粉末10.0 g,加入0.1 mol/L NaOH溶液,调节提取液pH至12,使用超声-微波联用处理,10000 r/min离心,15 min,取上清0.5 mL用蒸馏水稀释180倍,测定吸光度。其余上清液采用3 mol/L盐酸调节pH至2,静置10 min,沸水浴酸沉10 h,10000 r/min离心15 min后,沉淀即为黑色素粗品。

1.2.5 黑木耳黑色素的纯化 将所提取的黑木耳黑色素粗提物,先后采用氯仿、乙酸乙酯和乙醇洗涤,最后沉淀再用蒸馏水洗涤3~5次,最后一次离心,取固体,经冷冻干燥即得黑色固体粉末状的精制黑木耳黑色素。

1.2.6 最大吸收波长检测 称取少量已纯化的黑木耳黑色素溶于pH为8的柠檬酸磷酸氢二钠缓冲液中,在40 °C的条件下,在可控温磁力搅拌器中搅拌溶解1 h,使色素尽可能溶解,溶液经4000 r/min离心15 min,取上清液,使用石英比色皿在波长200~600 nm范围内进行紫外-可见光谱扫描^[15]。

1.2.7 响应面法优化超声-微波联用辅助提取黑木耳黑色素

1.2.7.1 超声-微波联用辅助提取黑木耳黑色素单因素实验设计 a.黑木耳干粉最佳微粉碎粒度测定:使用电子天平称取依次过40、80、120、160、200目筛黑木耳干粉各10.0 g,在料液比1:30 g/mL,超声功率400 W,微波功率200 W,联合处理时间20 min条件下,考察不同粉碎颗粒粒度对于黑木耳黑色素提取的影响,将所得提取液离心,取0.5 mL上清液,用蒸馏

水稀释180倍,于207 nm波长处测定吸光度,以吸光度值大小明确黑木耳干粉最佳微粉碎粒度。b.黑木耳黑色素提取最佳超声功率参数测定:用电子天平称取过120目筛黑木耳干粉10.0 g,料液比1:30 g/mL,微波功率200 W,联合作用时间20 min条件下,通过设置不同超声功率:300、350、400、450、500 W,考察超声功率对于黑木耳黑色素提取的影响,将所得提取液离心,取0.5 mL上清液,用蒸馏水稀释180倍,于207 nm波长处测定吸光度,以吸光度值大小判定最佳超声功率参数。c.黑木耳黑色素提取最佳微波功率参数测定:用电子天平称取过120目筛黑木耳干粉10.0 g,料液比1:30 g/mL,超声功率400 W,联合作用时间20 min条件下,通过改变不同微波功率:100、200、300、400、500 W,考察微波功率对于黑木耳黑色素提取的影响,将所得提取液离心,取0.5 mL上清液,用蒸馏水稀释180倍,于207 nm波长处测定吸光度,通过吸光度值大小明确最佳微波功率参数。d.黑木耳黑色素提取最佳超声-微波联合作用时间测定:用电子天平称取过120目筛黑木耳干粉10.0 g,料液比1:30 g/mL,超声功率400 W,微波功率400 W条件下,通过改变超声-微波联合作用时间为:10、20、30、40、50 min,考察超声-微波联合作用时间对于黑木耳黑色素提取的影响,将所得提取液离心,取0.5 mL上清液,用蒸馏水稀释180倍,于207 nm波长处测定吸光度,以吸光度值大小明确超声-微波联合作用时间的最佳参数。

1.2.7.2 响应面试验设计 单因素实验中首先确定出最佳黑木耳干粉粉碎粒度,在此基础上根据Box-Behnken试验设计原理,设计3因素3水平的响应面分析方法(表1),以吸光度为指标,优化超声-微波联用辅助法提取黑木耳黑色素的工艺参数。

表1 黑木耳黑色素提取 Box-Behnken 试验因素和水平

Table 1 Factors and levels of Box-Behnken test for *A. auricula-judae* melanin extraction

水平	X ₁ 超声功率(W)	X ₂ 微波功率(W)	X ₃ 联合作用时间(min)
1	350	300	20
2	400	400	30
3	450	500	40

1.2.8 黑木耳黑色素提取得率的计算 $W(\%) = (W_1/W_2) \times 100$

式中:W表示黑木耳黑色素粗提物得率,%;W₁表示根据冷冻干燥称重后的黑色素粗提物质量,g;W₂表示黑木耳微粉使用量,g。

1.2.9 不同提取方法处理黑木耳干粉形态分析 使用S-4800扫描电子显微镜(SEM)检测未做提取处理黑木耳干粉样品、传统溶剂提取法处理后黑木耳干粉样品、超声波辅助提取法处理后黑木耳干粉样品、超声-微波联用辅助提取法处理后黑木耳干粉样品的形状和表面特征。于高真空(1.3×10^{-3} PA),1000×放大

倍数, 光源 6.0, 分辨率 9.8 nm, 12.5 kV 加速电势条件下, 观察每个样品经不同提取方法处理后的组织形态结构。

1.3 数据处理

采用 SPSS 17.0 软件中 One-way ANOVA 进行统计分析, 多重比较采用 LSD 法; $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 最大吸收波长的确定

通过最大吸收波长可明确所提取得到的物质是否为黑色素, 亦可将不同提取方法处理后的黑木耳黑色素提取液于其最大吸收波长处进行比较测定, 可对不同提取工艺进行比较分析, 以明确最佳提取工艺参数, 结果见图 1。

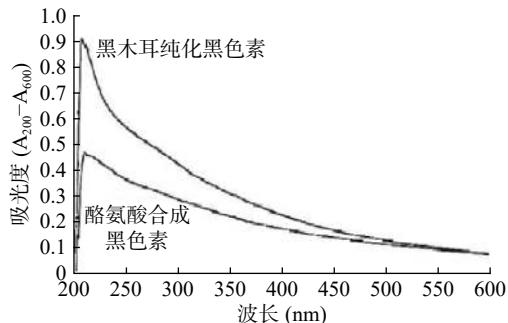


图 1 黑木耳黑色素的紫外扫描图谱

Fig.1 Ultraviolet scanning spectrum of *A. auricula-judae* melanin

由紫外-可见光谱扫描图谱可见, 酪氨酸合成黑色素的紫外扫描最大吸收峰值在紫外波长 210 nm 处, 纯化的黑木耳黑色素的最大吸收峰值在紫外波长 207 nm 处, 在所设定的 200~600 nm 的紫外可-见光谱扫描范围内呈现出了与酪氨酸合成黑色素相对一致的紫外吸收变化规律, 在紫外区具有强吸收, 从最大吸收峰值处开始, 随着扫描波长的逐渐增大, 吸光度呈现出下降的变化趋势, 具有典型的黑色素紫外吸收图谱特征, 这与 Bell 等^[16] 报道的不同来源黑色素的紫外可见光最大吸收峰值在波长在 210 nm 附近具有较高的一致性。

将经不同提取工艺参数提取后的黑木耳黑色素提取液在波长 207 nm 处测定吸光度值, 进行比较分析, 以此吸光度值为评价指标, 确定最佳黑木耳黑色素提取工艺参数条件。

2.2 超声-微波联用法提取黑木耳黑色素工艺单因素实验结果

2.2.1 黑木耳干粉最佳微粉碎粒度的确定 不同微粉碎粒度参数对黑木耳黑色素提取液吸光度值的影响结果如图 2 所示。可知, 黑木耳干粉微粉碎粒度由过 40 目变化至 120 目(380 μm 变化至 120 μm)过程中, 随着颗粒粒度的减小, 黑木耳黑色素提取液的吸光度逐步增加, 表明黑木耳干粉原料粉碎粒度在该范

围内时, 黑木耳黑色素提取液的吸光度值与微粉碎颗粒粒度呈反比, 微粉碎后所过的筛网目数越大, 黑木耳黑色素提取液吸光度值越大。

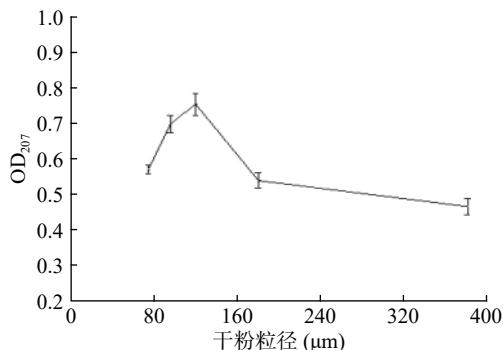


图 2 干粉微粉碎粒度对黑色素吸光度的影响
Fig.2 Effect of dry powder particle size on melanin absorbance

当颗粒粒度超过 120 目(120 μm), 随着微粉碎颗粒粒度的减小, 黑木耳黑色素提取液的吸光度值有所下降, 该结果表明当微粉碎粒度小于 120 μm 后, 黑木耳黑色素提取液吸光度值会随着微粉碎颗粒粒度的降低而降低。得到该结果的原因可能是因为黑木耳样品微粉碎颗粒小于 120 μm 时, 所选用的提取剂为碱性溶液, 这样会导致一些碱溶性杂质的溶出量随之增加, 这些杂质成分与黑木耳黑色素竞争溶出, 从而导致黑木耳黑色素溶解度降低, 使得吸光度有所下降^[17]; 亦有可能是因为在微粉碎的过程中, 为得到颗粒粒径较小的黑木耳干粉原料需要更长的微粉碎时间, 微粉碎时间的增长使得热效应增大, 黑木耳干粉原料中黑色素的结构被破坏, 导致其吸光度值降低。故选用微粉碎粒度 120 μm 的黑木耳干粉原料作为黑木耳黑色素超声-微波联用辅助提取法工艺中微粉碎颗粒粒度最佳参数条件。

2.2.2 超声-微波联用辅助提取最佳超声功率的确定

由图 3 可知, 当超声功率由 300 W 增大至 400 W 的过程中, 黑木耳黑色素提取液的吸光度值持续增大, 与超声功率呈正比, 当超声功率至 400 W 时, 黑木耳黑色素提取液吸光度值达到最大; 当超声功率由 400 W 持续增大时, 可发现, 黑木耳黑色素提取液的吸光度值有所下降, 此范围内, 超声功率与黑木耳黑色素吸光度值呈反比。

该结果发生的原因可能因为超声功率过大所引起的机械剪切作用增强, 从而导致提取液中黑木耳黑色素结构因降解而发生变化, 从而导致损失^[18]。由此可知, 超声功率 400 W 可作为超声-微波联用辅助提取黑木耳黑色素工艺中超声功率最佳单因素条件。

2.2.3 超声-微波联用辅助提取最佳微波功率的确定

由图 4 可知, 当微波功率由 100 W 提升至 400 W 过程中, 随着微波功率的增大, 黑木耳黑色素提取液的吸光度持续增大, 当微波功率达到 400 W 时, 黑木耳黑色素提取液的吸光度值达到最大。随着微波功率的持续增大, 对于黑木耳黑色素提取液吸光度值的提

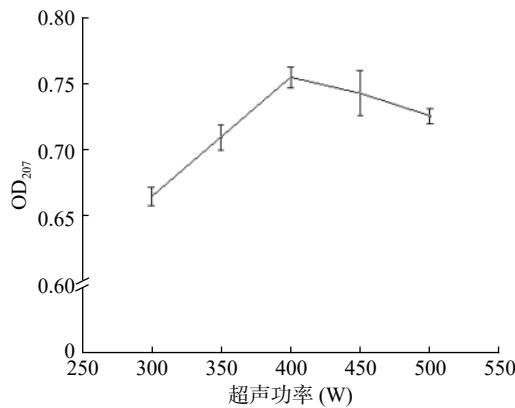


图3 超声功率对黑色素吸光度的影响

Fig.3 Effect of ultrasonic power on melanin absorbance

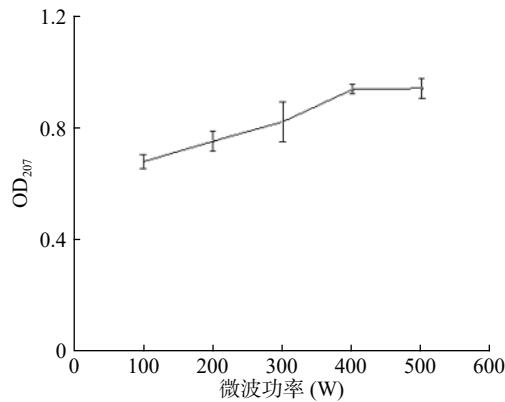


图4 微波功率对黑色素吸光度的影响

Fig.4 Effect of microwave power on the absorbance of melanin

升较小,与400 W微波功率参数条件基本一致。得到该结果的原因可能是由于提取包括扩散、渗透、溶解等过程,随着微波功率的增大,黑木耳微粉中黑色素释放量增大,提取量亦增大。故提取所使用的微波功率越大,提取越完全;当扩散达到平衡时,增大微波功率,提取率不再增大。从节省能源消耗方面考虑,将微波功率400 W设定为超声-微波联用辅助提取黑木耳黑色素工艺中微波功率最佳参数条件。

2.2.4 超声-微波联用辅助提取最佳联合时间的确定由图5可知,不同的超声-微波联合作用时间参数对于黑木耳黑色素提取液吸光度值的影响不一,当超声-微波联用时间参数设定为30 min时,黑木耳黑色素提取液吸光度值达到最大。但随着所设定的联合作用时间的持续增大,提取液吸光度值下降程度较为明显。发生该种情况的原因可能是由于超声-微波联合作用时间的过长,会使得黑木耳黑色素的结构发生变化^[19],从而有所损失,导致黑木耳黑色素提取液的吸光度值降低。

相较于传统溶剂提取法(90 min)及超声波辅助提取法(80 min)的耗时较长,超声-微波联用辅助提取法可在短时间内对黑木耳干粉原料中的黑色素进行较为充分地提取,以此体现了超声-微波联用辅助提取法可缩短提取时间的优点。由该结果可明确,单

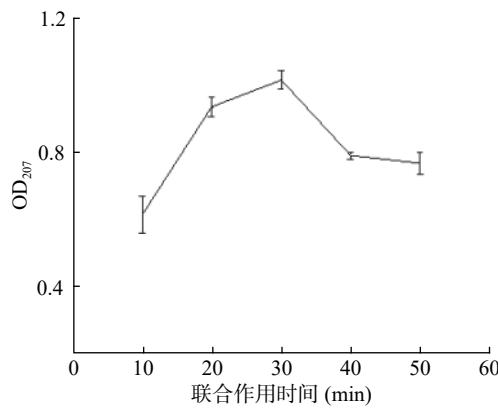


图5 超声-微波联用时间对黑色素吸光度的影响

Fig.5 Effect of ultrasound-microwave combined action time on the absorbance of melanin

因素实验中最佳超声-微波联合作用时间为30 min。

2.3 响应面优化试验

采用Design-Expert 8.0.6.1软件对试验数据进行回归分析。Box-Behnken的3因素3水平试验共17个试验点,前12个是析因点,自变量取值在X₁,X₂,X₃所构成的三维顶点;后5个为零点,为区域的中心点,用来评估试验误差。黑木耳黑色素提取Box-Behnken试验方案与结果见表2。

2.3.1 模型的建立及显著性检验利用Design-Expert 8.0.6.1软件对表2数据进行多元回归拟合,得到黑木耳黑色素吸光度对超声功率、微波功率、作用时间的二次多项回归模型为:Y=0.99-0.016X₁-0.005X₂+0.019X₃-0.014X₁X₂+0.019X₁X₃-0.0025X₂X₃-0.11X₁²-0.060X₂²-0.11X₃²,R²=0.913。其中整体模型极为极显著(P<0.01),失拟项不显著(P>0.05),说明方程和试验拟合较好,可以对超声-微波联用辅助提取法不同参数下黑木耳黑色素提取液的吸光度进行预测。

对回归方程系数进行显著性检验见表3,可知各因素对黑木耳黑色素提取液吸光度影响的排序为:联合作用时间(X₃)>超声功率(X₁)>微波功率(X₂)。其中X₁²、X₃²作用极显著(P<0.01),X₂²作用显著(P<0.05)。

2.3.2 分析响应面和二维等高线图图6、图7、图8是根据回归方程所做出的响应曲面和等高线图,各图形能够直观地反映出各因素之间的交互作用以及各因素和响应值之间的关系,等高线呈圆形表示两因素交互作用不显著,而呈椭圆形或马鞍形则表示两因素交互作用显著^[20]。

由图6可知,当超声功率一定时,黑木耳黑色素提取液的吸光值受微波功率的影响较小,随着微波功率的增大,黑木耳黑色素提取液的吸光值先增大而后有所下降;而当微波功率一定时,超声功率对黑木耳黑色素提取液吸光值的影响较大,吸光度随着超声功

表 2 黑木耳黑色素提取 Box-Behnken 试验方案与结果

Table 2 Scheme and results of Box-Behnken experiment for extraction of *A. auricula-judae* melanin

试验号	X ₁	X ₂	X ₃	OD ₂₀₇	试验号	X ₁	X ₂	X ₃	OD ₂₀₇
1	-1	-1	0	0.841	10	0	1	-1	0.847
2	1	-1	0	0.853	11	0	-1	1	0.797
3	-1	1	0	0.819	12	0	1	1	0.831
4	1	1	0	0.774	13	0	0	0	0.963
5	-1	0	-1	0.768	14	0	0	0	0.977
6	1	0	-1	0.684	15	0	0	0	1.025
7	-1	0	1	0.826	16	0	0	0	0.986
8	1	0	1	0.817	17	0	0	0	1.007
9	0	-1	-1	0.823					

表 3 方差分析

Table 3 Variance analysis

方差来源	自由度	平方和	均方	F值	P值
X ₁	1	1.985E-003	1.985E-003	1.08	0.3324
X ₂	1	2.311E-004	2.311E-004	0.13	0.7328
X ₃	1	2.775E-003	2.775E-003	1.52	0.2579
X ₁ X ₂	1	8.123E-004	8.123E-004	0.44	0.5266
X ₁ X ₃	1	1.406E-003	1.406E-003	0.77	0.4098
X ₂ X ₃	1	2.500E-005	2.500E-005	0.014	0.9102
X ₁ ²	1	0.051	0.051	27.99	0.0011**
X ₂ ²	1	0.015	0.015	8.16	0.0245*
X ₃ ²	1	0.049	0.049	26.61	0.0013**
模型	9	0.13	0.015	8.16	0.0057**
残差	7	0.013	1.830E-003		
失拟项	3	0.010	3.465E-003	5.74	0.0623
纯误差	4	2.415E-003	6.038E-004		
总和	16	0.15			

注: *表示差异显著($P < 0.05$), **表示差异极显著($P < 0.01$)。

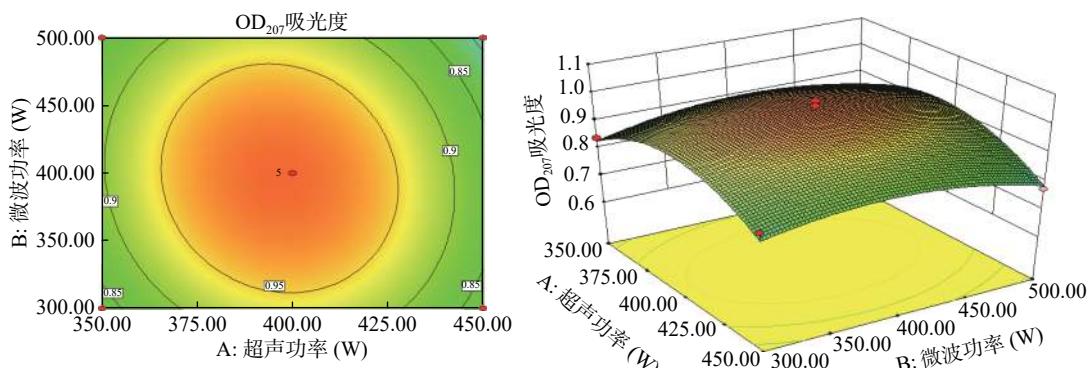


图 6 超声功率和微波功率对黑色素吸光度影响的响应面和等高线图

Fig.6 Response surface and contour diagram of the effect of ultrasonic power and microwave power on the absorbance of melanin

率的增大而增大,但是当超声功率增大到一定的程度,随着超声功率的增大,黑木耳黑色素提取液的吸光值反而逐渐降低。超声功率与微波功率的等高线排列疏松且椭圆曲率小,近似圆形。说明微波功率与超声功率之间的交互作用不明显。

由图 7 可以看出,黑木耳黑色素提取液的吸光值随着提取时间的变化,呈现先升高后降低的变化趋势;超声功率对于提取液的吸光值影响情况同样一致,在超声-微波联合作用时间为 30 min,超声功率

为 400 W 时,黑木耳黑色素提取液的吸光值达到最大。超声功率与超声-微波联合作用时间的坡度陡峭,等高线较为密集,椭圆曲率较大。说明超声功率与超声-微波联合作用时间之间交互作用有一定相关性,但经过方差分析并不显著。而且超声-微波联合作用时间的等高线相较超声功率密集,说明超声-微波联合作用时间的影响大于超声功率。

由图 8 可以看出,在微波功率 400 W,联合作用时间为 30 min 时,黑木耳黑色素提取液的吸光值达

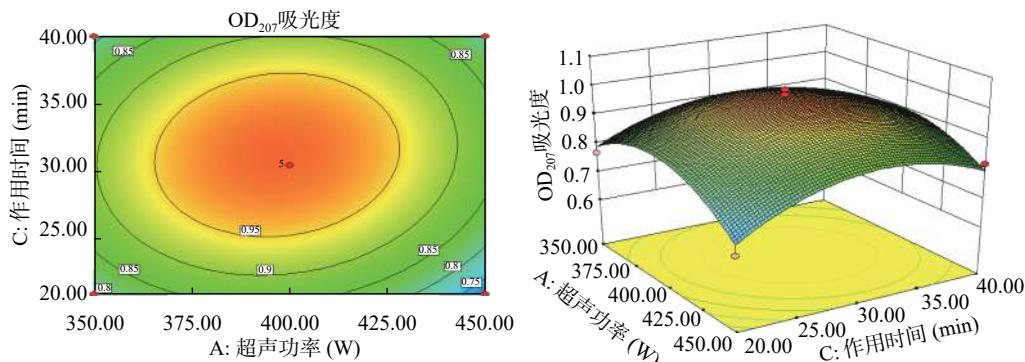


图 7 超声功率和联合作用时间对黑色素吸光度影响的响应面和等高线图

Fig.7 Response surface and contour diagram of the effect of ultrasonic power and combined action time on the absorbance of melanin

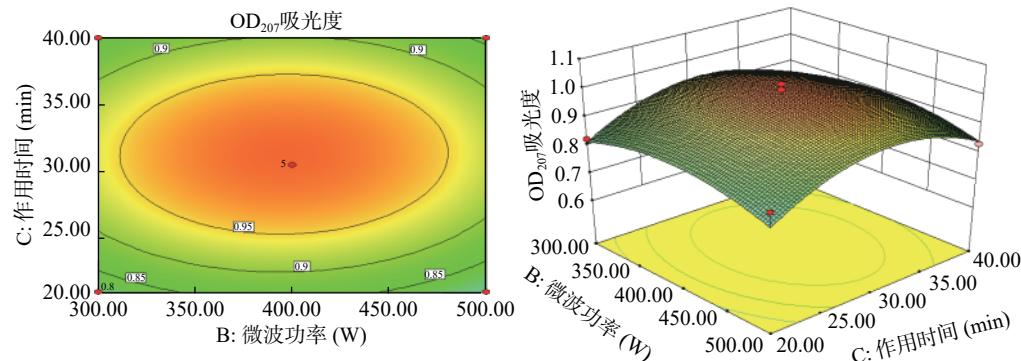


图 8 微波功率和联合作用时间对黑色素吸光度影响的响应面和等高线图

Fig.8 Response surface and contour diagram of the effect of microwave power and combined action time on the absorbance of melanin

到最大。微波功率变化曲面相较联合作用时间变化曲面平缓,说明微波功率对黑木耳黑色素提取液吸光值的影响较联合作用时间对黑木耳黑色素提取液吸光值的影响小,与方差分析的结果一致。从等高线图可以看出,联合作用时间轴向的等高线密集,说明联合作用时间对黑木耳黑色素吸光值影响较大,而微波功率轴向的等高线相对稀疏,说明微波功率对黑木耳黑色素提取液吸光值影响较小^[21]。

2.3.3 反应条件优化及模型验证 经由 Design-Expert 8.0.6.1 软件分析该模型下,黑木耳黑色素超声-微波联用辅助提取法最佳提取工艺条件为:超声功率 398.04 W、微波功率 392.36 W、联合作用时间 30.79 min。此时,黑木耳黑色素提取液理论吸光度为 0.993 ± 0.003 。

为检验响应面可靠性,采用最佳提取工艺条件做黑木耳黑色素超声-微波辅助提取验证试验。同时考虑到实际操作的可行性和局限性,将工艺参数修正为超声功率 398 W、微波功率 392 W、联合作用时间 31 min。在修正条件下进行 3 次平行试验,测得黑木耳黑色素提取液的平均吸光度为 0.984,与理论值 0.993 基本吻合。

将超声-微波联用辅助提取法最佳优化工艺条件下所得到的上清液用 3 mol/L 盐酸,沸水浴沉淀 10 h,经 4000 r/min 离心 15 min 后,取沉淀冷冻干燥后,

测得粗黑色素得率($9.10\% \pm 0.45\%$),相较于传统溶剂提取法粗黑色素得率($7.20\% \pm 0.25\%$)、超声波辅助提取法粗黑色素得率($5.20\% \pm 0.35\%$),使用超声-微波联用辅助提取法,对于黑木耳粗黑色素的提取得率有较高的提升。表明采用响应面法优化得到的黑色素提取条件准确可靠,具有一定应用价值。

2.4 不同提取方法处理黑木耳干粉形态分析

SEM 观察黑木耳组织经过不同提取方法处理后的微观结构,如图 9A、B、C、D 所示。

提取效率与植物组织细胞壁的物理变化存在一定关系^[22]。不同提取方法处理对于黑木耳组织结构的物理变化有着显著影响。黑木耳组织样品经过粉碎处理后(图 9 A),其组织结构几乎完好无损,排列较为紧密,表明粉碎处理对于黑木耳组织的破坏程度较小。经过与粉碎处理的黑木耳组织样品相比,使用传统溶剂提取法、超声波辅助提取法、超声-微波联用辅助提取法处理后(图 9 B、C、D)的黑木耳样品组织结构受到不同程度的破坏,其组织结构破坏程度由大到小排序依次为:超声-微波联用辅助提取法>传统溶剂提取法>超声波辅助提取法。

其中,与传统溶剂提取法以及超声波辅助提取法相比,经超声-微波联用辅助提取法处理后的黑木耳组织样品破损程度较为严重,组织形态完全改变,组织结构排列松散;相较于传统溶剂法,超声波辅助

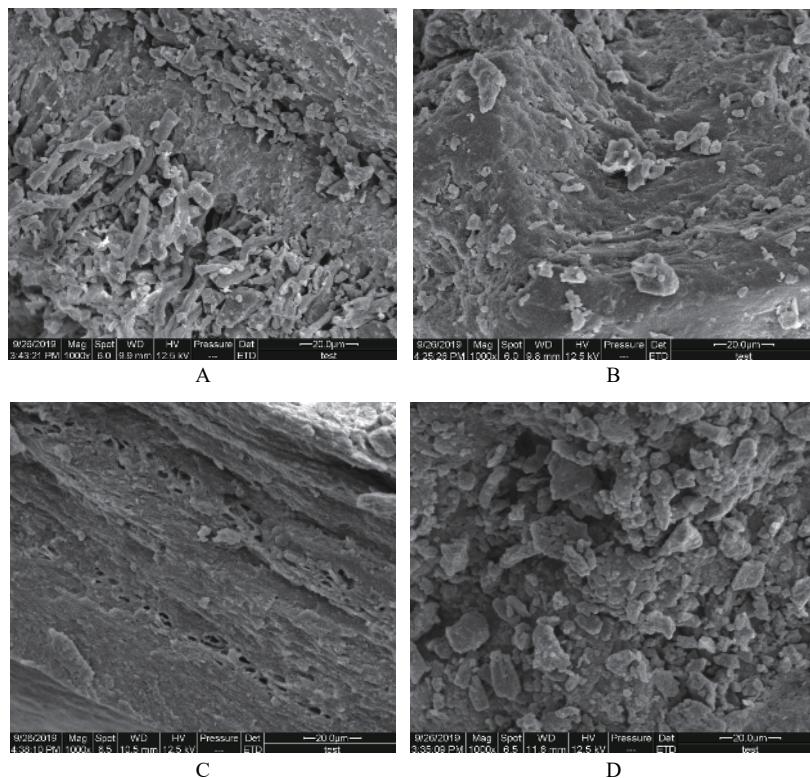


图 9 不同处理方法的黑木耳组织样品扫描电子显微镜图片

Fig.9 Scanning electron microscope images of samples with different treatment methods

注: A: 黑木耳干粉粉碎样品; B: 超声辅助提取法处理后黑木耳样品; C: 传统溶剂提取法处理后黑木耳样品;
D: 超声-微波联用辅助提取法处理后黑木耳样品。

提取法的超声波会产生空化效应, 导致黑木耳组织样品产生空洞, 使其组织状态发生改变; 相较于粉碎处理, 传统溶剂提取法处理后的黑木耳组织样品由于酸水解导致细胞壁中果胶的溶出, 使得组织结构联结更加紧密, 破化程度较小。

3 讨论

与传统溶剂提取法以及超声波辅助提取法相比, 经超声-微波联用辅助提取法处理后的黑木耳组织样品, 破损程度较为严重, 组织形态完全改变, 组织结构排列松散。这可能是由于超声-微波联用辅助提取法是一种结合超声波和微波方法的新工艺技术。其中, 微波可以较为快速地加热整个样品, 诱导已溶解的分子发生迁移。同时, 超声波可增强传质, 提高目标产品的提取量^[23]。其中, 造成黑木耳组织结构的破坏的原因, 归因于超声引起的强烈震动, 以及微波处理可以对黑木耳组织样品进行加热和膨胀, 从而引起冲击和空化效应^[24]。

由不同黑木耳黑色素提取方法工艺所耗费的时间来看, 传统溶剂提取法需耗费 90 min, 超声辅助提取法时长 80 min, 而使用超声-微波联用辅助提取法对于黑木耳黑色素进行提取, 只需 30 min 即可, 这是由于超声系统可在瞬时产生大量的能量, 从而使得黑色素从黑木耳组织内部快速溶解至溶剂中, 相对于渗透过程, 耗时更短。同时, 超声系统可在瞬时产生大量的能量, 从而使得黑色素从黑木耳组织内部快速溶

解至溶剂中, 相对于渗透过程, 耗时更短。另一方面, 微波能量可有效地被提取溶剂吸收, 并同时对样品进行有效加热^[25]。因此, 提取溶剂可渗透进入到组织内部并剧烈膨胀, 随后导致组织结构严重破裂, 使得黑木耳黑色素在超声-微波联合辅助提取期间大量释放到提取溶剂中, 从而提升黑木耳黑色素的提取量。SEM 所提供的不同提取方法处理后的黑木耳组织结构图也印证了超声-微波联合辅助提取的优势所在, 为超声-微波联用辅助提取法可提高黑木耳黑色素提取效率, 提供了具有一定说服力的依据。

使用该方法对于黑木耳黑色素进行提取, 提取得率明显高于传统溶剂提取法及超声波辅助提取法, 可作为黑木耳黑色素的高效提取工艺方法。

4 结论

通过单因素和响应面试验得到最佳超声-微波联用辅助提取黑木耳黑色素工艺条件为: 超声功率 398 W、微波功率 392 W、联合作用时间 31 min。此工艺条件下, 黑木耳黑色素提取液吸光度值可达 0.984 ± 0.003 , 黑木耳黑色素粗提物得率为 $9.10\% \pm 0.45\%$; 相较于传统溶剂提取法得率 $7.20\% \pm 0.25\%$ 、超声辅助提取法得率 $5.20\% \pm 0.35\%$, 超声-微波联用辅助提取法分别提升了 26.38%、75.00%, 明显高于该两种方法。

同时, 经过不同提取方法处理后的黑木耳干粉样品组织 SEM 图像的比较, 表明超声-微波联用辅助

提取法相较于其他提取方法,对黑木耳干粉组织结构的破坏程度较大。这些结果表明超声-微波联用辅助法提取黑木耳黑色素方法有一定优势所在,可节约资源,降低提取时间,并且提升提取得率。

参考文献

- [1] 朱丽云,张拥军,李佳,等.粉碎工艺对黑木耳多糖溶出效果的影响研究[J].*中国食品学报*,2010,10(6):150-154.
- [2] 朱磊,王振宇,周芳.响应面法优化微波辅助提取黑木耳多糖工艺研究[J].*中国食品学报*,2009,9(2):53-59.
- [3] Tan M, Gan D, Wei L, et al. Isolation and characterization of pigment from *Cinnamomum burmannii* peel[J]. *Food Research International*, 2011, 44(6): 2289-2294.
- [4] Chen S R, Jiang B, Zheng J X, et al. Isolation and characterization of natural melanin derived from silky fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson)[J]. *Food Chemistry*, 2008, 111(3): 745-749.
- [5] 张敏,陈燕璐,程菲菲,等.木耳黑色素的发酵制备及其清除自由基活性研究[J].*核农学报*,2015,29(2):304-312.
- [6] 刘雅静,袁延强,刘秀河,等.黑木耳营养保健研究进展[J].*中国食物与营养*,2010,6(10):66-69.
- [7] 侯若琳,袁源,项凯凯,等.纤维素酶-超声波协同提取黑木耳黑色素工艺及其抗氧化活性分析[J].*菌物学报*,2019,38(3):414-427.
- [8] 潘磊,辛卓霖,刘波,等.响应面法优化超声辅助提取木耳黑色素[J].*中国食品学报*,2015,15(7):110-116.
- [9] Harki E, Talou T, Dargent R. Purification, characterisation and analysis of melanin extracted from *Tuber melanosporum*Vitt[J]. *Food Chemistry*, 1997, 58(1-2): 69-73.
- [10] 李琦,侯丽华,刘鑫,等.黑木耳黑色素鉴定及提取工艺优化[J].*食品科学*,2010(16):87-92.
- [11] 张莲姬.黑木耳黑色素抗氧化作用的研究[J].*食品研究与开发*,2013,5(34):111-114.
- [12] Lu X, Zheng Z, Li H, et al. Optimization of ultrasonic-microwave assisted extraction of oligosaccharides from lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) seeds[J]. *Industrial Crops and Products*, 2017, 107: 546-557.
- [13] 吴晨霞,陈萍,金晖,等.木耳黑色素的提取及其抗氧化研究[J].*食用菌*,2013,35(4):72-75.
- [14] 张吉祥,赵文静,白晓杰,等.正交试验法优化黑米黑色素的超声辅助提取工艺[J].*食品科学*,2010,31(4):39-41.
- [15] 万鹏.黑木耳黑色素对贫血小鼠肠道微生态的调节[D].哈尔滨:黑龙江大学,2015.
- [16] Bell A A, Wheeler M H. Biosynthesis and functions of melanins[J]. *Ann Rev Phytopathol*, 1986, 24(1): 411-451.
- [17] Liew S Q, Ngoh, G C, et al. Sequential ultrasound-microwave assisted acid extraction (UMAE) of pectin from pomelo peels[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 93: 426-435.
- [18] Afshari K, Samvati V, Shahidi S A. Ultrasonic-assisted extraction and in vitro antioxidant activity of polysaccharide from Hibiscus leaf[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 74: 558-567.
- [19] 张小林,陈博文,孙晓瑞,等.响应面法优化超声波辅助灵芝黑色素提取工艺[J].*核农学报*,2018,32(3):532-538.
- [20] Muralidhar R V, Chirumamila R R. A response surface approach for the comparison of lipase production by *Canida cylindracea* using two different carbon sources[J]. *Biochemistry Engineering Journal*, 2001, 9(1): 17-23.
- [21] 张玉香,屈慧鸽,杨润亚,等.响应面法优化蓝莓叶黄酮的微波提取工艺[J].*食品科学*,2010,31(16):33-37.
- [22] Yang B, Prasad K N, Xie H, et al. Structural characteristics of oligosaccharides from soy sauce lees and their potential prebiotic effect on lactic acid bacteria[J]. *Food Chemistry*, 2011, 126(2): 590-594.
- [23] Zhang B, Yang R Y, Liu C Z. Microwave-assisted extraction of chlorogenic acid from flower buds of *Lonicera japonica* Thunb.[J]. *Separation and Purification Technology*, 2008, 62(2): 480-483.
- [24] Yang L, Cao Y, Jiang J, et al. Response surface optimization of ultrasound-assisted flavonoids extraction from the flower of *Citrus aurantium* L. var. *amara* Engl[J]. *Journal of Separation Science*, 2010, 33(9): 1349-1355.
- [25] Both S, Chemat F, Strube J. Extraction of polyphenols from black tea-conventional and ultrasound assisted extraction[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2014, 21(3): 1030-1034.