

双水相法萃取平菇蛋白及性质研究

谢慧贤, 王猛, 张英男, 杨智涿

Extraction of *Pleurotus ostreatus* Protein by the Aqueous Two-phase System and Its Characterization

XIE Huixian, WANG Meng, ZHANG Yingnan, and YANG Zhilai

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023040184>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

酶法水解富硒平菇蛋白工艺优化

Enzymatic Hydrolysis of Selenium-enriched *Pleurotus ostreatus* Protein

食品工业科技. 2020, 41(24): 168-173 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020030286>

双水相法分离纯化灵芝中三萜的工艺优化

Optimization of extraction and purification process of triterpenoids from the fruitbodies of *Ganoderma lucidum* in aqueous two-phase system

食品工业科技. 2018, 39(9): 170-174,180 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.09.030>

响应面法优化黑胡萝卜红色素双水相萃取工艺

Optimization of Extraction Technology of Anthocyanidins from *Daucus carota* L. by Aqueous Two-phase System Based on Response Surface Methodology

食品工业科技. 2021, 42(7): 195-200 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020060219>

双水相体系萃取藤茶蛇葡萄素工艺的优化

Optimization of Extraction Technology of Ampelopsin from *Ampelopsis grossedentata* by Aqueous Two-Phase System

食品工业科技. 2021, 42(6): 181-186,194 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020050287>

聚乙二醇-硫酸铵双水相体系萃取松花粉中总黄酮的工艺研究

Study on the extraction of total flavonoids from Pine Pollen in PEG400/ (NH₄)₂SO₄ aqueous two-phase system

食品工业科技. 2017(11): 266-269 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.11.042>

双水相萃取技术的新发展

Progress of aqueous two-phase extraction technique

食品工业科技. 2017(08): 395-400 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.08.068>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

谢慧贤, 王猛, 张英男, 等. 双水相法萃取平菇蛋白及性质研究 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(4): 187-196. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023040184

XIE Huixian, WANG Meng, ZHANG Yingnan, et al. Extraction of *Pleurotus ostreatus* Protein by the Aqueous Two-phase System and Its Characterization[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(4): 187-196. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023040184

· 工艺技术 ·

双水相法萃取平菇蛋白及性质研究

谢慧贤, 王猛*, 张英男, 杨智涑

(南京财经大学食品科学与工程学院, 江苏省现代粮食流通与安全协同创新中心, 江苏省食用菌保鲜与深加工工程研究中心, 江苏南京 210023)

摘要:为实现绿色高效提取平菇蛋白, 本研究利用浊点法绘制聚乙二醇-硫酸铵 (PEG-(NH₄)₂SO₄) 双水相体系相图, 以蛋白萃取浓度和萃取率为评价指标, 考察了双水相体系中 PEG 分子量、PEG 质量分数、(NH₄)₂SO₄ 质量分数、平菇蛋白粗提液质量分数等因素对平菇蛋白萃取效率的影响, 探究了平菇蛋白基本成分、乳化特性、起泡特性、持水持油性等性质。结果表明, 通过响应面法优化双水相法萃取平菇蛋白最佳工艺条件: PEG2000 质量分数为 19.5%、(NH₄)₂SO₄ 质量分数为 22.6%、蛋白粗提液质量分数为 26%。在此条件下, 平菇蛋白的提取率为 93.16%, 上相平菇蛋白浓度为 1.71 mg/mL。双水相法萃取所得平菇蛋白组成均一、粒径大小约为 220.2 nm, 氨基酸总含量 221.46 mg/g, 其中天冬氨酸 (Asp) 含量最多, 为 25.06 mg/g。平菇蛋白乳化稳定性、起泡性和持水性分别为 65.22%、79.87%、2.61±0.18 g/g, 与相近食品蛋白质对比, 平菇蛋白具有较高的乳化稳定性、起泡性和持水性。本研究采用绿色环保、试剂低毒性的双水相法萃取了平菇蛋白, 为食品工业蛋白质提取的绿色可持续发展提供一个新途径, 为基于平菇蛋白开发功能食品提供研究基础。

关键词:平菇蛋白, 双水相法, 工艺优化, 乳化特性

中图分类号: TS255.2

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2024)04-0187-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023040184



本文网刊:

Extraction of *Pleurotus ostreatus* Protein by the Aqueous Two-phase System and Its Characterization

XIE Huixian, WANG Meng*, ZHANG Yingnan, YANG Zhilai

(College of Food Science and Engineering, Nanjing University of Finance and Economics, Collaborative Innovation Center for Modern Grain Circulation and Safety, Jiangsu Province Engineering Research Center of Edible Fungus Preservation and Intensive Processing, Nanjing 210023, China)

Abstract: To achieve green and efficient extraction of *Pleurotus ostreatus* protein (PP), the phase diagram of the PEG-(NH₄)₂SO₄ aqueous two-phase system (ATPS) was constructed using the cloud point method. Protein extraction concentration was utilized as evaluation indicator to investigate the effects of ATPS factors such as the molecular weight and mass fraction of PEG, mass fraction of (NH₄)₂SO₄, and proportion of added crude PP extraction. Furthermore, the basic components of PP including emulsification characteristics, foaming properties, and water and oil holding capacities were explored. The optimal process conditions for PP extraction were determined using response surface methodology, with PEG2000 mass fraction set at 19.5%, (NH₄)₂SO₄ mass fraction at 22.6%, and protein crude extract mass fraction at 26%. Under these conditions, the extraction rate of protein reached 93.16%, with a protein content of 1.71 mg/mL. Analysis of the physical and chemical properties revealed uniform protein composition with an average particle size of approximately 220.2 nm. The total amino acid content was measured at 221.46 mg/g, with the highest aspartic acid (Asp) content at 25.06 mg/g. Moreover, PP exhibited exceptional emulsification stability 65.22%, foaming properties 79.87%, and water

收稿日期: 2023-04-21

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD); 国家自然科学基金 (21802163)。

作者简介: 谢慧贤 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品资源开发与利用, E-mail: 2669447906@qq.com。

* 通信作者: 王猛 (1989-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 食品资源开发与利用, E-mail: mwang@nufe.edu.cn。

holding capacity 2.61 ± 0.18 g/g. Compared with similar food proteins, PP protein had higher emulsifying stability, foaming ability, and water holding capacity. This study used a green, environmentally friendly, and low toxicity aqueous two-phase method to extract PP protein, providing a new approach for the green and sustainable development of protein extraction in the food industry, and a research foundation for the development of functional foods based on PP protein.

Key words: *Pleurotus ostreatus* protein; aqueous two-phase system; process optimization; emulsifying properties

平菇(*Pleurotus ostreatus*)又称蚝菇或牡蛎菇,是我国当前栽培产量最高的四大食用菌品种之一^[1]。菇中含有丰富的营养物质,尤其是蛋白质。平菇蛋白作为一种优质的蛋白质来源,具有高蛋白含量、良好的氨基酸组成和多样化生物活性等特点,在食品工业、保健品及药物研究等领域具有广泛的应用潜力。研究表明每 100 g 干平菇中蛋白质含量高达 19~26 g^[2],必需氨基酸含量充足,符合联合国粮农组织与世界卫生组织(FAO/WHO)对于氨基酸组成的推荐^[3]。与动物和植物蛋白质相比,平菇蛋白质具有较强的热稳定性、耐酸碱性及高效的降解活性,适用于投入工业化生产,作为开发功能性或特色食品潜在来源^[4-5]。

碱提酸沉法是目前常用的蛋白质提取方法之一,该方法成本低,但在工业化生产中大量使用酸碱造成环境污染,此外高浓度碱液易产生有害物质及发生不可逆变性,蛋白生物活性丧失,营养价值下降^[6]。双水相体系(Aqueous two-phase system, ATPS)是一种分离和纯化生物分子的分离技术,是基于聚合物(如聚乙二醇,PEG)与无机盐(如硫酸铵, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)间不相容性造成两相分配系数差异而实现分离的^[7],通常可通过调整聚合物与无机盐浓度来优化相分配系数,从而提高萃取效率。双水相萃取具有以下优点:操作条件温和,双水相萃取通常在室温下进行,不使用有机溶剂,能够有效保护蛋白质生物活性^[8];能够快速分离,耗时短^[9],体系具有低毒性等^[10-12]。目前已有双水相体系应用于藻蓝蛋白等^[13-14]天然食品的分离纯化工作。近几年来,王莹等^[15]应用 PEG4000- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 双水相体系萃取分离香菇柄水提液中的多糖与蛋白质,蛋白萃取率达 81.57%; Menegotto 等^[16]通过使用柠檬酸钠和乙醇 ATPS 和膜分离(MSP)萃取旋藻蛋白,旋藻蛋白的萃取率为 87%。

本实验利用双水相技术提取平菇中的蛋白质成分,通过单因素实验和响应面分析,系统地优化了平菇蛋白的提取工艺条件,获得了较高提取效率和纯度,实现了高产高质的平菇蛋白提取,具有一定创新性。本实验探究了平菇蛋白的结构和性质,建立食用菌蛋白质提取和评价的新方法,希望为解决传统方法在平菇蛋白提取方面的局限性和不足之处提供参考。此外,双水相体系具有分离提纯效率高、易于放大生产和连续操作等特点,本实验充分发挥了双水相体系分离技术在平菇蛋白提取中的优势,为平菇蛋白在食品工业中的应用开辟了新的可能性。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

平菇粉 江苏兴化市品灿食品有限公司;大豆油 南京市超市;聚乙二醇(PEG800、PEG2000、PEG4000、PEG8000)、硫酸铵、盐酸、氢氧化钠等其他普通试剂 分析纯,均为国药集团化学试剂有限公司;考马斯亮蓝 G-250、牛血清白蛋白 北京索莱宝科技有限公司;双蒸水 生工生物工程股份有限公司;考马斯亮蓝染色液、脱色液 上海碧云天生物技术有限公司。

PHB-4-pH 计 上海精密科学仪器有限公司;FS-2 高速分散器 东方医疗器械公司;LABCONCO 冷冻干燥机 北京照生仪器设备有限公司;Spectra-Max Plus 384 全波长酶标仪 美谷分子仪器有限公司;H1650-W 台式高速离心机 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;日立 L-8900 全自动氨基酸分析仪 上海林理仪器有限公司;日立 TM3000 台式扫描电镜 上海思耐达精密仪器公司;PE SP 2 傅里叶红外光谱仪 天津博天胜达科技发展有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 平菇蛋白粗提液制备 将平菇粉以 1:20 的料液比(w/v)溶于超纯水,用 1 mol/L NaOH 溶液调节至 pH=10,在 50 °C 下热水浴 2.5 h 后,3000×g 离心 20 min,取上清液,放入 4 °C 冰箱备用^[15]。

1.2.2 双水相体系相图的绘制 采用浊点法^[17]绘制 PEG- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 双水相体系相图。计算 PEG、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 在总质量中的质量分数(w/w),以 PEG 质量分数为纵坐标,硫酸铵质量分数为横坐标,得到一条浊点曲线。

根据式(1)、式(2)计算 PEG 及 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数:

$$y_{\text{PEG}}(\%) = \frac{m_1}{m_1 + m_2 + m_3} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

$$y_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}(\%) = \frac{m_3}{m_1 + m_2 + m_3} \times 100 \quad \text{式(2)}$$

式中: m_1 表示 PEG 的质量, g; m_2 表示超纯水的质量, g; m_3 表示 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的质量, g; y_{PEG} 表示 PEG 的质量分数, %; $y_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}$ 表示 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的质量分数, %。

1.2.3 双水相萃取平菇蛋白单因素实验 本研究考察了 PEG 分子量、PEG2000 质量分数、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数、蛋白粗提液质量分数(即加入的蛋白粗提液占双水相萃取体系的比例)这四个因素对 ATPS

萃取平菇蛋白的影响。将蛋白粗提液加入 PEG-(NH₄)₂SO₄ 体系中, 用超纯水补余至 10 g, 固定 pH6.5, 振荡混合均匀后室温下静置 30 min 至完全分相。以蛋白萃取浓度及萃取率评估萃取效果。

为了确定萃取平菇蛋白的最适 PEG 分子量 (800、2000、4000、6000、8000 Da), 依据双水相图选择质量分数为 30% 的不同分子量的 PEG, (NH₄)₂SO₄ 质量分数为 20% 和蛋白粗提液质量分数 20% 进行单因素实验; 为了探究 PEG2000 质量分数 (15%、20%、25%、30%、35%、40%) 对萃取效果的影响, 固定 (NH₄)₂SO₄ 质量分数为 20%, 蛋白粗提液质量分数 20%, 进行单因素实验; 为了探究 (NH₄)₂SO₄ 质量分数 (17%、19%、21%、23%、25%) 对萃取效果的影响, 固定 PEG2000 质量分数为 20%, 蛋白粗提液质量分数为 20%, 进行单因素实验; 为了探究蛋白粗提液质量分数 (15%、18%、21%、24%、27%) 对萃取效果的影响, 固定 PEG2000 质量分数为 20%, (NH₄)₂SO₄ 质量分数为 21%, 进行单因素实验。

1.2.4 响应面法优化平菇蛋白的双水相萃取条件
在单因素实验的基础上, 运用 Design-Expert8.0.6 软件, 依据 Box-Behnken 设计原理, 以 A (PEG2000 质量分数)、B ((NH₄)₂SO₄ 质量分数)、C (蛋白粗提液质量分数) 为自变量, 以平菇蛋白萃取浓度为响应值评估萃取效果, 设计 3 因素 3 水平的响应面优化试验。具体的试验因素、水平及编码见表 1。

表 1 响应面试验因素水平设计
Table 1 Response surface test factor level design

因素	水平		
	-1	0	1
A PEG2000质量分数(%)	18	20	22
B (NH ₄) ₂ SO ₄ 质量分数(%)	19	21	23
C 蛋白粗提液质量分数(%)	22	24	26

1.2.5 平菇蛋白含量测定及萃取率计算 在 PEG 2000-(NH₄)₂SO₄ 双水相体系中, 体系混合均匀后静置, 待分相后读取上下相体积, 分别从上下相取样测定平菇蛋白的萃取率和蛋白萃取浓度。蛋白萃取浓度采用 Bradford 法测定。

根据式(3)、式(4)分别计算平菇蛋白得率(Y)及在上相中的萃取率(E):

$$Y(\%) = \frac{m}{M} \times 100 \quad \text{式 (3)}$$

$$E(\%) = \frac{C_{\text{上}}V_{\text{上}}}{C_{\text{上}}V_{\text{上}} + C_{\text{下}}V_{\text{下}}} \times 100 \quad \text{式 (4)}$$

式中: C_上表示体系上相平菇蛋白的浓度, mg/mL; C_下表示下相平菇蛋白的浓度, mg/mL; V_上表示上相的体积, mL; V_下表示下相的体积, mL; m 表示经 ATPS 萃取得到的平菇蛋白质量, g; M 表示平菇干粉的质量, g。

1.2.6 平菇蛋白理化性质的测定

1.2.6.1 SDS-PAGE 表征平菇蛋白 SDS-PAGE 预制胶 (浓缩胶 5%, 分离胶 12%), 在 5% 浓缩胶中电泳 (80 V, 30 min), 然后在 12% 分离胶中电泳 (120 V, 60 min)。电泳结束后用考马斯亮蓝染色液快速染色 2 h, 最后反复脱色至条带清晰可见。

1.2.6.2 氨基酸组成分析 采用全自动氨基酸分析仪测定平菇蛋白的氨基酸组成。按照 GB 5009.124-2016 方法进行测定。

1.2.6.3 微观形貌及粒径分布分析 利用扫描电镜扫描平菇蛋白形貌特征; 利用动态光散射仪测定平菇蛋白粒径分布。

1.2.6.4 傅里叶红外光谱分析 取干燥样品 1.00 mg 与 100 mg KBr 混合研磨, 放入仪器中扫描, 区间为 4000~400 cm⁻¹ 波数范围测定吸收光谱, 分辨率 4 cm⁻¹, 扫描 16 次。

1.2.7 平菇蛋白功能性质的测定

1.2.7.1 平菇蛋白等电点及溶解度的测定 参照李晓明等^[18]的方法并稍作改动。配制 2%(w/v)平菇蛋白溶液, 加入 0.1mol/L 的 HCl 溶液或 0.1mol/L 的 NaOH 溶液调节蛋白溶液 pH 至 3.2、3.4、3.6、3.8、4.0、4.2、4.4、4.6、4.8, 涡旋使蛋白充分溶解, 以 2500×g 离心 10 min, 取上清液用 Bradford 法测定平菇蛋白含量。上清液吸光值最低的溶液, 其 pH 即为平菇蛋白等电点; 参照 Lee 等^[19]的方法并稍作改动, 配制 2%(w/v)平菇蛋白溶液, 加入 0.1mol/L 的 HCl 溶液或者 0.1mol/L 的 NaOH 溶液调节蛋白溶液 pH 至 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0, 磁力搅拌 1 h, 以 2500×g 离心 10 min, 取上清液用 Bradford 法测定上清液蛋白含量。根据式(5)计算平菇蛋白溶解度 (NSI)。

$$NSI(\%) = \frac{\text{上清液蛋白含量}}{\text{样品溶液中蛋白含量}} \times 100 \quad \text{式 (5)}$$

1.2.7.2 乳化特性及起泡特性的测定 参照 Akharume 等^[20]及薛蕾等^[21]的方法测定平菇蛋白乳化性及乳化稳定性。配制 2%(w/v)平菇蛋白溶液, 加入 0.1mol/L HCl 溶液或 0.1mol/L NaOH 溶液调节溶液 pH 至 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0, 加入等体积大豆油, 在高速分散器中以 10000 r/min 高速搅打 2 min, 随后迅速量取一定量体积于离心管中, 2500×g 离心 10 min, 测定乳化层的高度及离心管液体总高度, 然后再将离心管放入 80 °C 水浴 30 min, 冷却至室温后以 2500×g 离心 10 min, 测定乳化层高度。根据式(6)、式(7)计算平菇蛋白的乳化性(EAI)和乳化稳定性(ESI):

$$EAI(\%) = \frac{\text{乳化层高度}}{\text{离心管液体总高度}} \times 100 \quad \text{式 (6)}$$

$$ESI(\%) = \frac{30 \text{ min后乳化层高度}}{\text{初始乳化层高度}} \times 100 \quad \text{式 (7)}$$

参照张思思^[22]的方法测定平菇蛋白起泡性及起泡稳定性。配制 2%(w/v)平菇蛋白溶液,加入 0.1 mol/L HCl 溶液或者 0.1 mol/L NaOH 溶液调节平菇蛋白溶液 pH 至 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0,在高速分散器中 10000 r/min 高速搅打 2 min,随后迅速将其倒入量筒中,记录上层泡沫的体积,静置 30 min 后再次记录上层泡沫体积。根据式(8)、式(9)计算平菇蛋白的起泡性(FA)及泡沫稳定性(FS):

$$FA(\%) = \frac{\text{停止搅拌时泡沫体积}}{\text{蛋白溶液体积}} \times 100 \quad \text{式(8)}$$

$$FS(\%) = \frac{\text{30 min后泡沫体积}}{\text{初始泡沫体积}} \times 100 \quad \text{式(9)}$$

1.2.7.3 持水性及持油性的测定 参照 Tabatabaei 等^[23]的方法测定。按照 2%(w/v)称取定量蛋白溶于超纯水/大豆油中,充分振荡摇匀,以 2500×g 离心 10 min,倒去上清液,测定离心管中残留物的重量。根据式(10)、式(11)分别计算平菇蛋白的持水性(WHC)及持油性(OHC):

$$WHC(\text{g/g}) = \frac{\text{离心管残留物质量} - \text{样品质量}}{\text{样品质量}} \times 100 \quad \text{式(10)}$$

$$OHC(\text{g/g}) = \frac{\text{离心管残留物质量} - \text{样品质量}}{\text{样品质量}} \times 100 \quad \text{式(11)}$$

1.3 数据处理

结果以至少三次重复处理的“平均值±标准差”表示。使用 SPSS19 软件进行统计分析,采用单因素方差分析后用 Duncan 法进行差异显著性比较, $P < 0.05$, 差异显著。本实验的数据采用 Origin8.0 软件作图。

2 结果与分析

2.1 双水相体系确定

利用浊点法绘制了不同 PEG-(NH₄)₂SO₄ 双水相相图。如图 1 所示,相图呈双曲线形状,浊点组成的曲线呈双节线。PEG 分子量越大,所形成的双节线越趋向原点,成相临界点浓度越低。反之,成相

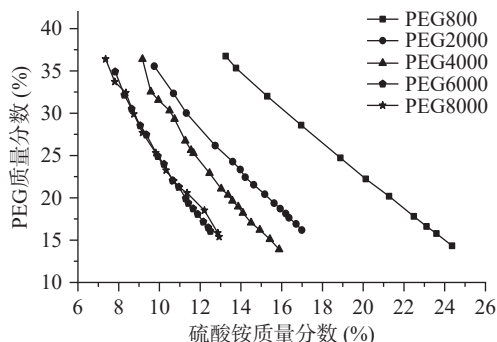


图1 PEG-(NH₄)₂SO₄ 双水相体系相图

Fig.1 Phase diagram of PEG-(NH₄)₂SO₄ aqueous two-phase system

界点浓度越高;曲线上方任意浓度比可以形成 ATPS, 曲线下方则表示无法成相。由图 1 可选择 PEG 质量分数为 15%~40%, (NH₄)₂SO₄ 质量分数 17%~25% 做单因素实验范围。

2.2 双水相法萃取单因素实验

PEG 分子量对 ATPS 萃取平菇蛋白质的影响如图 2a 所示,随着 PEG 分子量增加,蛋白萃取浓度和萃取率均呈先升后降的趋势。当 PEG 分子量为 2000 时,蛋白萃取浓度和萃取率达到最大,分别为

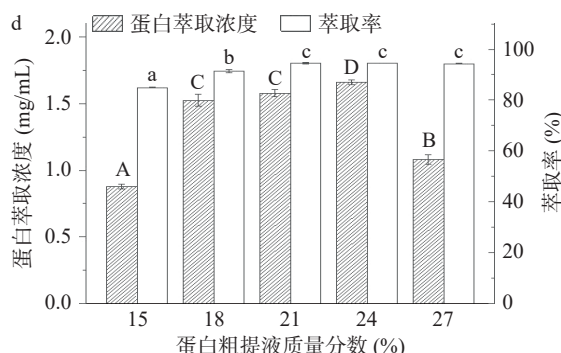
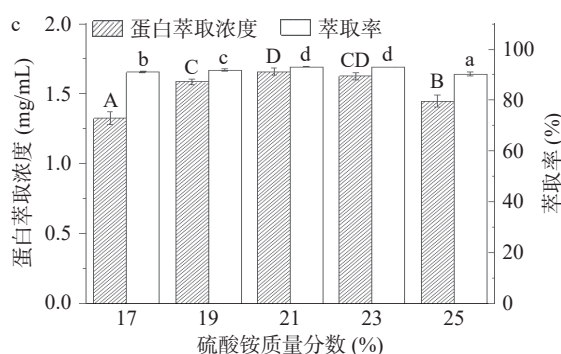
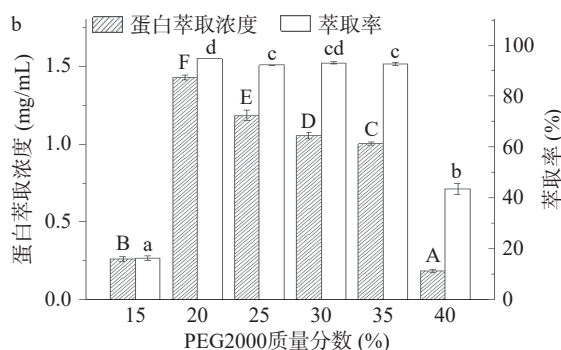
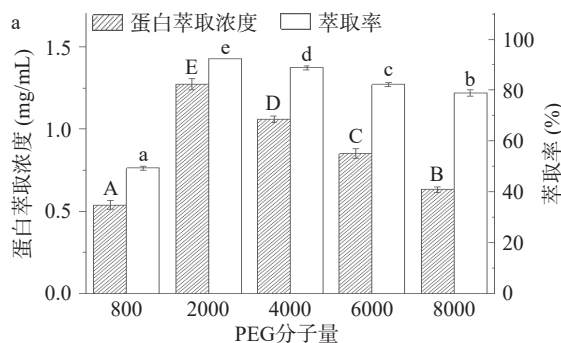


图2 双水相法萃取平菇蛋白的单因素实验

Fig.2 Single factor experiments of aqueous two-phase system of *Pleurotus ostreatus* protein

1.27 mg/mL 和 92.33%, 此时萃取效果最好。这是因为 PEG 分子量越大, 端羟基数目减小, 导致极性程度减少, 疏水性程度增强, 相界面张力增强, 亲水性蛋白质会从上相向下相富集, 萃取效果下降^[24]; 同时, PEG 分子量越大, 相分离时间明显延长, 萃取效果下降, 该现象与 PEG 粘度增大, 空间位阻增强有关^[24]。因此本文确定 PEG 分子量为 2000。

PEG2000 质量分数对 ATPS 萃取平菇蛋白质的影响如图 2b 所示, 随着 PEG2000 质量分数增大, 平菇蛋白萃取浓度和萃取率均呈先增后降趋势。当 PEG2000 质量分数在 15% 时蛋白质溶于无机盐中, 蛋白分配在下相导致萃取效果降低^[25]; 当 PEG2000 在 20% 时, 此时浓度和萃取率分别为 1.43 mg/mL 和 94.75%, 萃取效果最好。有研究表明, PEG2000 质量分数越大, 体系粘度越粘, 不利于两相间物质转移, 导致萃取效果下降^[25]。故本文确定 PEG2000 质量分数为 20%。

(NH₄)₂SO₄ 质量分数对 ATPS 萃取平菇蛋白质的影响如图 2c 所示, 随着 (NH₄)₂SO₄ 质量分数增加, 平菇蛋白萃取浓度呈先增后降趋势。萃取率保持在 90% 以上。当 (NH₄)₂SO₄ 质量分数为 21% 时, 平菇蛋白萃取浓度达到最高, 为 1.66 mg/mL, 蛋白萃取效果最好; 这是因为当 (NH₄)₂SO₄ 质量分数较低, 盐溶作用导致蛋白部分溶解在下相, 萃取效果下降; 而 (NH₄)₂SO₄ 质量分数过高, 盐析作用使得蛋白质变性, 萃取效果下降^[26]。故本文确定 (NH₄)₂SO₄ 质量分数为 21%。

平菇蛋白粗提液质量分数对 ATPS 萃取平菇蛋白的影响如图 2d 所示, 随着平菇蛋白粗提液增加, 蛋白萃取浓度和萃取率均呈先增后降趋势。当蛋白粗提液在 24% 时, 此时浓度和萃取率分别为 1.66 mg/mL 和 94.57%, 萃取效果最好。但当蛋白质量增加到一定浓度时, 继续增加时上相饱和, 更多的蛋白溶解在下相, 造成萃取效果下降。故本文确定平菇蛋白粗提液添加量为 24%。

2.3 响应面试验结果分析

2.3.1 Box-Behnken 试验设计与结果 采用 Design-Expert8.0.6 软件设计 3 因素 3 水平试验, 以平菇蛋白萃取浓度作为响应值进行响应面优化试验, 见表 2。

2.3.2 二次回归模型的建立及显著性分析 运用 Design-Expert8.0.6 软件, 对响应面试验结果进行回归拟合, 得到以 A(PEG2000 质量分数)、B((NH₄)₂SO₄ 质量分数)、C(蛋白粗提液质量分数)为自变量, 以平菇蛋白萃取浓度为响应值的二次多项回归方程:

$$Y=1.59-0.083A+0.12B-0.033C+0.032AB-0.024AC+0.18BC-0.15A^2-0.18B^2-0.016C^2$$

对回归模型的方差分析见表 3。由表 3 可知, 该模型 F 值为 19.692, P 值 < 0.01, 表明该模型差异极显著; 失拟项 P 值 = 0.8994 > 0.05, 不显著, 表明该回

表 2 Box-Behnken 试验设计及结果
Table 2 Design and results of Box-Behnken

实验号	因素			蛋白萃取浓度(mg/mL)
	A	B	C	
1	-1	-1	0	1.266
2	1	-1	0	1.033
3	-1	1	0	1.456
4	1	1	0	1.323
5	-1	0	-1	1.511
6	1	0	-1	1.423
7	-1	0	1	1.478
8	1	0	1	1.295
9	0	-1	-1	1.49
10	0	1	-1	1.354
11	0	-1	1	1.076
12	0	1	1	1.668
13	0	0	0	1.588
14	0	0	0	1.583
15	0	0	0	1.495
16	0	0	0	1.607
17	0	0	0	1.692

表 3 回归方程方差分析
Table 3 Variance analysis of Regression equation

变异来源	平方和	df	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.570	9	0.0633	19.692	0.0004	**
A	0.056	1	0.0556	17.295	0.0042	**
B	0.117	1	0.1166	36.275	0.0005	**
C	0.009	1	0.0085	2.648	0.1477	
AB	0.004	1	0.0042	1.314	0.2894	
AC	0.002	1	0.0023	0.702	0.4299	
BC	0.132	1	0.1325	41.205	0.0004	**
A ²	0.096	1	0.0955	29.708	0.001	**
B ²	0.137	1	0.1370	42.603	0.0003	**
C ²	0.001	1	0.0010	0.320	0.5895	
残差	0.023	7	0.0032			
失拟项	0.003	3	0.0009	0.188	0.8994	不显著
纯误差	0.020	4	0.0049			
总离差	0.592	16				
$R^2=0.962$			$R^2_{Adj}=0.9132$			

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

归模型可以接受; 模型决定系数 $R^2=0.962$, 校正系数 $R^2_{Adj}=0.9132$, 说明平菇蛋白萃取效果与该模型拟合程度较高, 能够较好地反映各因素与响应值的关系。模型中 A、B、BC、A²、B² 对平菇蛋白萃取效果影响极显著($P<0.01$); C、AB、AC、C² 影响不显著。根据 F 值和 P 值, 各因素对平菇蛋白萃取效果的影响的主次顺序为 B>A>C。

2.3.3 响应面各因素交互作用分析 三维曲面图是对各因素影响蛋白萃取效果的最直观的展现, 曲面越陡峭, 说明因素对响应值的影响越大; 曲面越平缓, 则影响越小。等高线图则说明两因素交互作用对因变量的影响, 若等高线为椭圆型则说明交互作用显著, 反之为圆形则不显著^[27]。由图 3a 可知 (NH₄)₂SO₄ 质量分数和蛋白粗提液质量分数的交互作用等高线为椭圆形, 二者交互作用对响应值的影响显著。图 3b

可知 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 比蛋白粗提液的坡度更陡, 说明 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数对蛋白浓度影响更大。

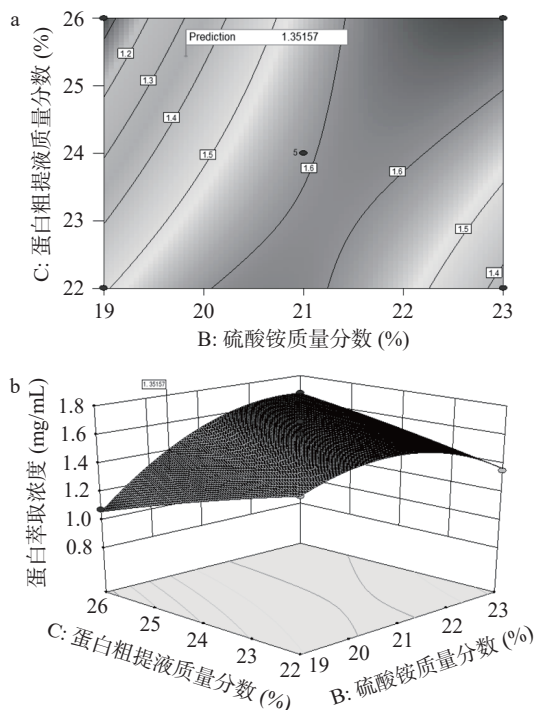


图3 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数与蛋白粗提液质量分数交互作用对蛋白萃取浓度的影响的响应面图

Fig.3 Response surface plot of the interaction between the mass fraction of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and the mass fraction of crude protein extract on the concentration of protein extraction

2.3.4 最佳工艺验证试验 运用 Design-Expert 8.0.6 软件, 分析响应面试验结果, 得到平菇蛋白 PEG2000- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 双水相萃取的最佳工艺参数为: 10 g 总体系中, 19.5% PEG2000, 22.6% 硫酸铵, 26% 蛋白粗提液。通过三次平行试验, 得出平均蛋白浓度 1.71 mg/mL, 与预测值 1.68 mg/mL 相差较小。在此条件下得到的双水相萃取平菇蛋白的萃取率为 93.14%, 萃取效果最好。

2.4 平菇蛋白理化性质分析

2.4.1 SDS-PAGE 分析 平菇蛋白电泳结果如图 4 所示, 平菇蛋白质的亚基分布较为集中, 共有 3 个条带, 其中条带 a 和 b 在 52~66 kDa 之间, 条带 c 在 10~15 kDa 之间。经比较, 本研究的平菇蛋白与同伞菌目香菇蛋白有类似条带(15、22、52.73 kDa)^[28], 因此双水相法能够萃取出平菇蛋白。

2.4.2 氨基酸组成分析 平菇蛋白的氨基酸组成和含量见表 4。除酸水解破坏色氨酸以外, 平菇蛋白的其他氨基酸含量丰富, 富含 17 种氨基酸。其中必需氨基酸 7 种, 非必需氨基酸 10 种。氨基酸总含量 221.46 mg/g, 其中 EAA/TAA 的值为 41.98%, EAA/NEAA 的值为 72.34%。这符合 FAO/WHO 标准规定的 EAA/TAA 须在 40% 左右, EAA/NEAA 在 60% 以上^[29]。从氨基酸含量来看, Asp 和 Glu 含量最多, 它们都属于鲜味氨基酸, 对香味有增强作用^[30], 其次

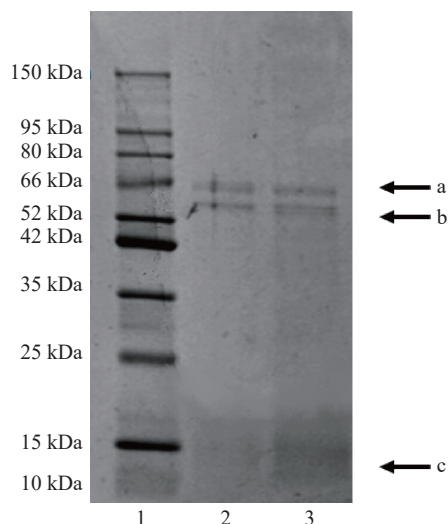


图4 平菇蛋白电泳图

Fig.4 Electrophoresis diagram of *Pleurotus ostreatus* protein
注: 泳道 1 为蛋白 Marker; 泳道 2、3 为经双水相萃取的平菇蛋白。

表 4 平菇蛋白的氨基酸组成及含量

Table 4 Amino acid composition and content of *Pleurotus ostreatus* protein

序号	英文缩写	中文名称	含量(mg/g)
1	Val*	缬氨酸	12.27
2	Leu*	亮氨酸	19.62
3	Ile*	异亮氨酸	13.4
4	Phe*	苯丙氨酸	14.2
5	Lys*	赖氨酸	18.34
6	Met*	蛋氨酸	4.6
7	Thr*	苏氨酸	10.53
8	Ala	丙氨酸	10.36
9	Pro	脯氨酸	7.52
10	His	组氨酸	5.45
11	Gly	甘氨酸	9.2
12	Arg	精氨酸	20.67
13	Cys	半胱氨酸	12.69
14	Tyr	酪氨酸	6.43
15	Asp	天冬氨酸	25.06
16	Glu	谷氨酸	21.67
17	Ser	丝氨酸	9.45

注: *为必需氨基酸。

是 Arg、Leu 苦味氨基酸和 Phe 甜味氨基酸, 这几种呈味氨基酸都对平菇真菌的滋味贡献很大。

2.4.3 形貌及粒径分布分析 利用扫描电镜观察平菇蛋白的外观形貌差异。由图 5a~图 5b 看出, 平菇蛋白呈不规则片状, 大小不均一, 表面粗糙无规律纹理。如图 5c 所示, 通过动态光散射测出平菇蛋白的粒径分布呈多峰分布, 蛋白有出现聚集状态, 其平均粒径约 220.2 nm。

2.4.4 傅里叶红外光谱分析 FTIR 光谱常用于分析蛋白质的二级结构, 从谱图 6 中可获得蛋白质分子中氨基酸基团。目前谱峰指认已经相对成熟, 酰胺 I 带(H-O-H 弯曲振动和 C=O 伸缩振动)主要显示

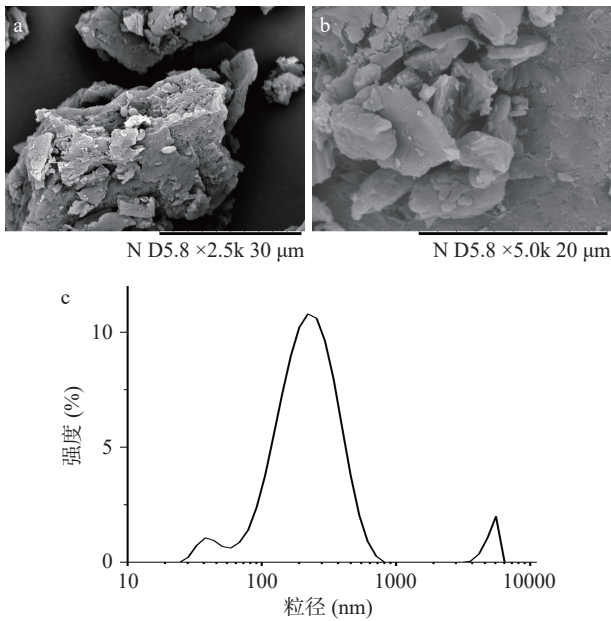


图 5 平菇蛋白的形貌及粒径分布图

Fig.5 Morphology and particle size distribution diagram of *Pleurotus ostreatus* protein

注: 其中 a 是×2500 倍的电镜图; b 是×5000 倍的电镜图; c 是粒径分布图。

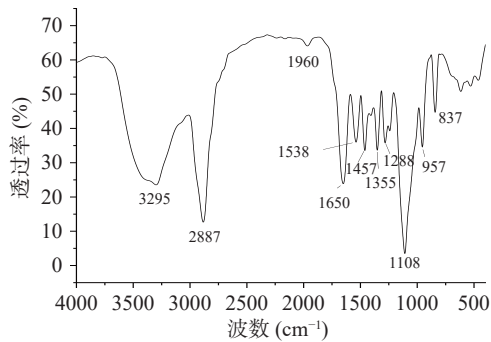


图 6 平菇蛋白红外光谱图

Fig.6 Infrared spectrum of *Pleurotus ostreatus* protein

在 $1700\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ 处, 酰胺 II 带(N-H 弯曲)的吸收范围在 $1600\sim 1500\text{ cm}^{-1}$ 处, 酰胺 III 带(C-O 和 C-O-C)的吸收范围在 $1350\sim 1200\text{ cm}^{-1}$ 处^[31]。从图 6 可知, 在 $4000\sim 500\text{ cm}^{-1}$ 处发现了几个主要谱带。平菇蛋白具有酰胺 I 带(1650 cm^{-1})、酰胺 II 带(1538 cm^{-1})、酰胺 III 带(1355 和 1288 cm^{-1})特征峰。在 3295 cm^{-1} 处有蛋白质链与水分子氢键形成的吸收带, 在 2887 cm^{-1} 处观察到饱和 C-H 伸缩振动引起的吸收峰, 在 1355 和 1288 cm^{-1} 处有由 C-OH 振动引起的吸收峰。

2.5 功能性质分析

2.5.1 平菇蛋白等电点及溶解性的分析 本试验考察了平菇蛋白等电点及溶解性的性质。如图 7a 可知, 随着 pH 升高平菇蛋白吸光值先降后升。当体系 pH=4.2 时吸光值最小, 可知 pH=4.2 为蛋白质的等电点; 如图 7b 可知, 蛋白溶解度随着 pH 增大呈现先降后升趋势。当 pH 在等电点附近时蛋白质溶解

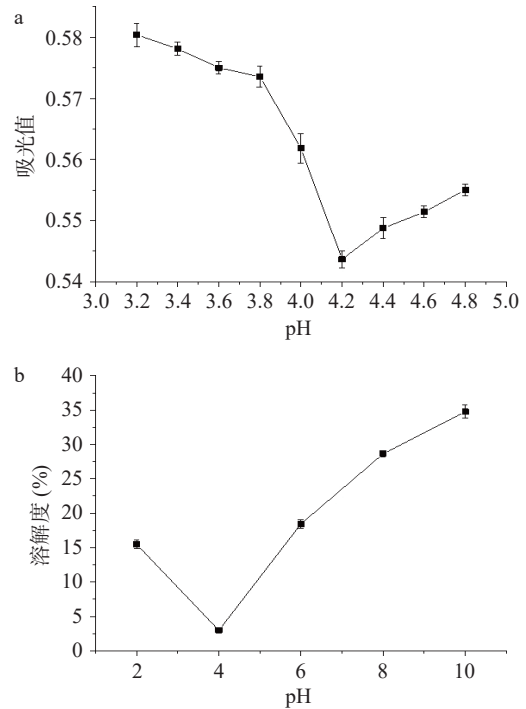


图 7 平菇蛋白的等电点及溶解性

Fig.7 Isoelectric point and solubility map of *Pleurotus ostreatus* protein

性最低, 仅为 2.99%。

pH 在 4 附近时, 平菇蛋白的吸光值和溶解性最低, 这是因为等电点与溶解度之间有一定关系。在等电点附近, 由于蛋白质净电荷为零, 其表面电荷相互抵消, 从而减小了蛋白质分子之间的静电排斥作用。这会导致蛋白质分子容易聚集和沉淀, 溶解度相对较低。因此, 在等电点附近蛋白质溶解度最低。而在远离等电点蛋白分子表面同性电荷暴露, 静电斥力和离子水合作用增强, 促进蛋白质分子在溶液中分散。这样, 蛋白质的溶解度在远离等电点后相对较高^[32-33]。

2.5.2 平菇蛋白乳化特性及起泡特性分析 本试验考察了平菇蛋白乳化特性。如图 8a 所示, 随着 pH 增大, 平菇蛋白质的乳化性和乳化稳定性均呈现先降后升趋势。当 pH=10 时, 乳化性及乳化稳定性最高, 分别为 59.91% 和 65.22%。在碱性条件下, 平菇蛋白质的乳化性及乳化稳定性均上升, 这是因为平菇蛋白带负电荷, 导致多肽链在油-水界面展开与排斥, 已溶解的蛋白快速吸附到油-水界面, 吸附量越多, 乳化能力越强, 乳液越稳定^[34]。与 Jhan 等^[35] 报道的珍珠小米蛋白(乳化性最高为 68.98%, 乳化稳定性最高为 28.98%)相比较, 平菇蛋白乳化性略低, 但乳化稳定性则明显高于珍珠小米蛋白。平菇蛋白良好的乳化稳定性能够防止产品水出油现象的产生^[36]。

本实验考察了平菇蛋白起泡特性。如图 8b 所示, 随着 pH 的增大, 平菇蛋白质的起泡性呈现先降后升趋势, 而起泡稳定性则呈现先升后降趋势。当 pH 接近等电点时, 蛋白质的起泡性最小, 为 19.07%。

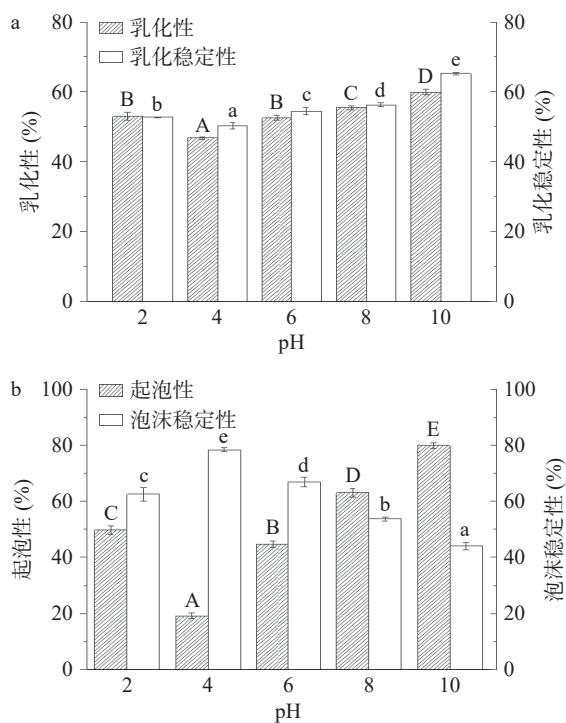


图8 平菇蛋白乳化特性及起泡特性图

Fig.8 Emulsifying and foaming properties of *Pleurotus ostreatus* protein

而此时起泡稳定性最高,为78.32%,这是因为在等电点时溶解性最低,等电点附近蛋白水化能力较小,仅蛋白的可溶性部分参与泡沫的生成,因此起泡性最差^[37];而这些不溶解的蛋白质粒子的吸附增加了蛋白质膜的粘合力,起泡稳定性得到增强;当pH偏离等电点后,溶解度增加,疏水相互作用力减弱,起泡性更好。与López等^[38]报道的蛋白(FA在pH=8.0时为28.68%,FS最高为57%)相比,本研究的平菇蛋白起泡性及起泡稳定性均略优。研究显示,良好的起泡性有助于形成稳定的气泡结构,改善食品均匀细腻的口感和优良的质构特性^[34]。

2.5.3 平菇蛋白的持水性和持油性 经实验测得平菇蛋白的持水性 2.61 ± 0.18 g/g,持油性 2.64 ± 0.15 g/g。与白灵菇分离蛋白(持水性 2.39 ± 0.09 g/g,持油性 4.47 ± 0.49 g/g)和白灵菇清蛋白(2.13 ± 0.06 g/g,持油性 5.36 ± 0.27 g/g)相比^[37],平菇蛋白持水性较高,持油性则明显较低。研究显示,持水性为 $1.49\sim 4.72$ g/g的蛋白质可用于粘弹性食品中^[39]。

3 结论

APTS作为一种独特的分离和纯化方法,具有操作简单、条件温和的特点,同时体系含水量高可以保持蛋白质等生物活性物质的构象稳定。本实验利用APTS萃取平菇中的蛋白质成分,通过响应面法优化了双水相法萃取平菇蛋白的工艺,得到平菇蛋白的萃取率为93.14%,上相平菇蛋白浓度为 1.71 mg/mL,获得了较高提取效率,实现了高产高质的平菇蛋白提取,为解决传统方法在平菇蛋白提取方面的局限性和不足之处提供参考。通过评估蛋白部分性质,表明

平菇蛋白具有较高的乳化稳定性、起泡性、起泡稳定性、持水性等功能性质,这些特性可以提高产品的质量特性和营养功效,在食品和保健品等领域具有巨大的应用前景。虽然本研究利用APTS获得较好萃取效果,但是该方法在食用菌活性物质萃取等方面研究较少,研究者可以进一步考察pH、盐、有机溶剂、聚合物、离子液体或表面活性剂的种类和浓度等要素,建立食用菌功能物质萃取新方法。另一方面,APTS的应用大多数建立在实验基础上,缺乏对过程规律的认识,尚有许多理论和实践方面的技术有待解决。未来,通过深入研究建立一套完整的理论和方法,可以解释并预测物质在双水相体系中的相行为和被分配物质在两相中分配行为,实现对多组分在APTS中分配行为的有效计算和精准预测,从而实现的生物活性物质的高效提取和分离。这一技术因绿色环保将在生物工程、食品、中药制药、健康产品等领域有广泛应用。

参考文献

- [1] 于清伟,安秀荣,王庆武,等.平菇泰山-20变异菌株的鉴别及其菌丝优化培养[J].中国食用菌,2016,35(3):40-43. [YU Q W, AN X R, WANG Q W, et al. Identification and optimization on mycelial growth of *pleutotus ostreatus* variant strain[J]. Edible Fungi of China, 2016, 35(3): 40-43.]
- [2] 彭炜.富硒平菇中硒蛋白的提取及特膳食品的开发[D].贵阳:贵州大学,2016. [PENG W. Study on extracting technology of selenium-containing protein from se-enriched *Pleurotus ostreatus* and development of foods for special dietary users[D]. Guiyang: Guizhou University, 2016.]
- [3] 王杨阳,刘良忠,周雪琴.酶法水解富硒平菇蛋白工艺优化[J].食品工业科技,2020,41(24):168-173. [WANG Y Y, LIU L Z, ZHOU X Q. Enzymatic hydrolysis of selenium-enriched *Pleurotus ostreatus* protein[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(24): 168-173.]
- [4] ERJAVEC J, KOS J, RAVNIKAR M, et al. Proteins of higher fungi-from forest to application[J]. *Trends in Biotechnology*, 2012, 30(5): 259-273.
- [5] 王延圣,翟夏秋,郑筱光,等.食用菌蛋白质的应用前景及研究热点分析[J].食品工业科技,2019,40(10):339-344. [WANG Y S, ZHAI X Q, ZHENG X G, et al. Application prospects and research hotspots of edible fungi proteins[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(10): 339-344.]
- [6] 方齐国,沈汪洋,赵梅荣,等.荞麦蛋白质的综合研究进展[J].食品研究与开发,2022,43(8):185-192. [FANG Q G, SHEN W Y, ZHAO M R, et al. Comprehensive research progress on buckwheat protein food[J]. Research and Development, 2022, 43(8): 185-192.]
- [7] MONDOR M, HERNÁNDEZ-ÁLVAREZ A J. Emerging solvent extraction technologies for plant protein extraction: Aqueous two-phase extraction; deep eutectic solvent; Subcritical water extraction[M]. *Green Protein Processing Technologies from Plants*, 2023: 111-130.
- [8] CHONG K Y, STEFANOVA R, ZHANG J, et al. Aqueous two-phase extraction of bioactive compounds from haskap leaves (*Lonicera caerulea*): Comparison of salt/ethanol and sugar/propanol systems[J]. *Separation and Purification Technology*, 2020, 252:

- 117399.
- [9] ZHI W, DENG Q. Purification of salvianolic acid B from the crude extract of *Salvia miltiorrhiza* with hydrophilic organic/salt-containing aqueous two-phase system by counter-current chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1116(1-2): 149-152.
- [10] 田明玉. 双水相萃取白蛋白和酶的初步研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2009. [TIAN M Y. Aqueous two-phase extraction of serum albumin and enzymes[D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2009.]
- [11] SOARES R R, AZEVEDO A M, VAN A J M, et al. Partitioning in aqueous two-phase systems: Analysis of strengths, weaknesses, opportunities and threats[J]. *Biotechnology Journal*, 2015, 10(8): 1158-1169.
- [12] 贾春晓. 猪血浆白蛋白的双水相萃取、纯化及鉴定[D]. 南宁: 广西大学, 2017. [JIA C X. The aqueous TWO-phase extraction, purification, and identification of pig plasma albumin [D]. Nanning: Guangxi University, 2017.]
- [13] 邵琳琳. 双水相萃取纯化藻蓝蛋白及其机理研究[D]. 无锡: 江南大学, 2015. [SHAO L L. Study on the purification of phycocyanin by aqueous two phase extraction and related mechanism [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2015.]
- [14] 袁梦媛. 盐析和双水相萃取法在纯化藻蓝蛋白过程中的研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2016. [YUAN M Y. The study of extraction of phycocyanin by salting-out and aqueous two-phase system from cyanobacteria [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2016.]
- [15] 王莹, 邢晓玲, 李岫君, 等. 聚乙二醇-(NH₄)₂SO₄ 双水相萃取香菇多糖中蛋白质[J]. *食品工业*, 2020, 41(5): 57-61. [WANG Y, XING X L, LI Y J, et al. Extraction of protein from lentinan by aqueous two-phase polyethylene glycol/(NH₄)₂SO₄[J]. *The Food Industry*, 2020, 41(5): 57-61.]
- [16] MENEGOTTO A L L, FERNANDES I A, BUCIOR D, et al. Purification of protein from *arthrospira platensis* using aqueous two-phase system associate with membrane separation process and evaluation of functional properties[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2021, 33(5): 2967-2982.
- [17] 王壮飞, 冀颖, 苏桂民, 等. 响应面法优化 fHBP-A 蛋白双水相萃取工艺的探究[J]. *微生物学免疫学进展*, 2022, 50(5): 45-52. [WANG Z F, JI Y, SU G M, et al. Optimization of fHBP-A protein double aqueous phase extraction process by response surface methodology[J]. *Progress in Microbiology and Immunology*, 2022, 50(5): 45-52.]
- [18] 李晓明, 陈凯, 黄占旺, 等. 白玉菇蛋白提取工艺优化及其功能特性研究[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(4): 239-246. [LI X M, CHEN K, HU ANG Z W, et al. Optimization of protein extraction process and its functional properties of white hysizyus marmoreu[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(4): 239-246.]
- [19] LEE K H, RYU H S, RHEE K C. Protein solubility characteristics of commercial soy protein products[J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2003, 80(1): 85-90.
- [20] AKHARUME F, SANTRA D, ADEDEJI A. Physicochemical and functional properties of proso millet storage protein fractions[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 108: 105497-105497.
- [21] 蕾薛, 李大文, 芹尉, 等. 苦杏仁蛋白的功能特性[J]. *食品科学*, 2013, 34(7): 70-75. [LEI X, LI D W, QIN W, et al. Functional Properties of Bitter Almond Protein[J]. *Food Science*, 2013, 34(7): 70-75.]
- [22] 张思思. 扁桃仁蛋白特性及多肽的功能活性研究[D]. 晋中: 山西农业大学, 2014. [ZHANG S S. Study on protein characteristic and polypeptide's functional activity of almond [D]. Jinzhong: Shanxi Agricultural University, 2014.]
- [23] TABTABAEI S, HIJAR B, CHEN B K, et al. Functional properties of protein isolates produced by aqueous extraction of Dehulled yellow mustard[J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2016, 94(1): 149-160.
- [24] 姚明明. 双水相萃取尿酸酶和磷酸甘油氧化酶[D]. 成都: 四川大学, 2007. [YAO M M. Study on separation and purification of Uricase and glyceophosphate oxidase by aqueous two-phase extraction [D]. Chengdu: Sichuan University, 2007.]
- [25] 王飞, 李昕洁. D-最优混料设计优化双水相提取天花粉蛋白工艺关键参数的研究[J]. *济宁学院学报*, 2019, 40(5): 17-21. [WANG F, LI X J. Study on the key parameters of the extraction process of trichosanthin protein in two aqueous phases by D-optimal mixture design optimization[J]. *Journal of Jining University*, 2019, 40(5): 17-21.]
- [26] 吴娇娇, 邢又元, 韩娟, 等. 双水相萃取结合硼酸亲和吸附分离纯化辣根过氧化物酶[J]. *食品科学*, 2022, 43(2): 55-61. [WU Y J, XING Y Y, HAN J, et al. An integrated method combining aqueous two-phase extraction and boric acid affinity adsorption for separation and purification of horseradish peroxidase from horseradish roots[J]. *Food Science*, 2022, 43(2): 55-61.]
- [27] 袁梦, 李春梅, 苏嘉敏, 等. 蒜米蛋白的提取工艺优化及其理化性质分析[J]. *食品工业科技*, 2022, 44: 1-13. [YUAN M, LI C M, SU J M, et al. Optimization of extraction process and analysis of physicochemical properties of wild rice protein[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 44: 1-13.]
- [28] 胡丹慧. 香菇柄蛋白质的提取、性质和新型营养面包的开发[D]. 沈阳: 辽宁大学, 2019. [HU D H. Extraction and properties of the *Lentinus edodes stem* protein and the application of new nutritious bread's development [D]. Shenyang: Liaoning University, 2019.]
- [29] 罗晓莉, 张沙沙, 严明, 等. 云南 8 种栽培食用菌蛋白质和氨基酸分析及营养价值评价[J]. *食品工业*, 2021, 42(8): 328-332. [LUO X L, ZHANG S S, YAN M, et al. Protein and amino acid analysis and nutritional value evaluation of eight cultivation edible fungi in Yunnan Province[J]. *The Food Industry*, 2021, 42(8): 328-332.]
- [30] 崔晓瑞, 徐毓谦, 王丽, 等. 大蒜盖菇两种提取蛋白氨基酸营养评价[J]. *农产品加工*, 2021(1): 46-49. [CUI X R, XU Y Q, WANG L, et al. The amino acids nutrition evaluation of protein of extracted from *Stropharia rugosoannulata* by both methods[J]. *Farm Products Processing*, 2021(1): 46-49.]
- [31] 孙佳悦, 钱方, 姜淑娟, 等. 基于红外光谱分析热处理对牛乳蛋白质二级结构的影响[J]. *食品科学*, 2017, 38(23): 82-86. [SUN J Y, QIAN F, JIANG S J, et al. Effect of heat treatments on the secondary structure of milk proteins analyzed by fourier transform infrared spectroscopy[J]. *Food Science*, 2017, 38(23): 82-86.]
- [32] DU M, XIE J, GONG B, et al. Extraction, physicochemical characteristics and functional properties of Mung bean protein[J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 76(3): 131-140.
- [33] 李琳, 金丽娜, 郭佩佩等. 富硒小米蛋白的理化性质、功能特性及结构研究[J/OL]. *食品与发酵工业*, 1-12 [2024-01-02] <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.033960>. [LI L, JIN L N, GUO P P, et al. Physicochemical properties, functional characteristics, and structure of selenium-enriched millet protein[J/OL]. *Food and Fermentation Industries*, 1-12 [2024-01-02]. <https://doi.org/10.13995/>

j.cnki.11-1802/ts.033960.]

[34] 张婷, 陈美如, 于一丁, 等. 生物酶解影响蛋白起泡特性的因素及机理研究进展[J]. 食品科学, 2022, 43(7): 298-304.

[ZHANG T, CHEN M R, YU Y D, et al. Progress in understanding the factors influencing the effect of enzymatic hydrolysis on protein foaming characteristics and the underlying mechanisms[J]. Food Science, 2022, 43(7): 298-304.]

[35] JHAN F, GANI A, NOOR N, et al. Nanoreduction of millet proteins: Effect on structural and functional properties[J]. ACS Food Science & Technology, 2021, 1(8): 1418-1427.

[36] 周纷. 脂肪类型和脂肪酸饱和程度对猪肉蛋白质乳化特性的影响[D]. 锦州: 渤海大学, 2017. [ZHOU F. Effect of lipid types and fatty acid saturation degree on the pork meat proteins emulsifying properties. [D]. Jinzhou: Bohai University, 2017.]

[37] 黄思韵. 白灵菇蛋白理化与功能特性及其乳液的构建与表征研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2020. [HUANG S Y. Study on physicochemical and functional properties of *Pleurotus tuoliensis* protein and fabrication and characterization of their emulsions [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2020.]

[38] LOPEZ D N, GALANTE M, RAIMUNDO G, et al. Functional properties of amaranth, quinoa and chia proteins and the biological activities of their hydrolyzates[J]. Food Research International, 2019, 116: 419-429.

[39] ALETOR O, OSHODI A A, IPINMOROTI K. Chemical composition of common leafy vegetables and functional properties of their leaf protein concentrates[J]. Food Chemistry, 2002, 78(1): 63-68.