

猴头菇凝集素的提取工艺研究

邓政东¹, 程爱芳¹, 郑廷金^{1,2}

(1. 武汉生物工程学院 生命科学与技术学院, 湖北 武汉 430415; 2. 华侨大学 分子药物研究院, 福建 泉州 362021)

摘要:以猴头菇为试材, 采用磷酸缓冲液(PBS)浸提法制备提取液, 在浸提剂 pH 值、料液比、浸提时间、浸提温度等单因素试验的基础上, 采用正交实验设计, 研究了猴头菇凝集素的最佳提取工艺。结果表明: 最佳的提取工艺以 PBS(0.10 mol/L, pH 6.5)为提取剂, 料液比 1:15 (g/mL), 提取温度 4℃, 提取时间 24 h。在此条件下, 猴头菇凝集素的凝集活性达到 0.586, 提取率达到 1.35%。

关键词:猴头菇; 凝集素; 提取工艺; 凝集活性

中图分类号:S 646.1⁺1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)24-0133-03

猴头菇(*Hericium erinaceus*)属担子菌亚门层菌纲猴头菌目猴头菌科猴头菌属, 具有重要的食、药用价值。猴头菇凝集素具有抑菌、抗肿瘤、免疫调节等生理活性^[1-3]。近年来对猴头菇的研究多集中于栽培、多糖提取等方面, 而对猴头菇凝集素(*Hericium erinaceus* Lectin, 简称 HEL)的研究较少, 关于 HEL 提取工艺的研究尚鲜见报道。现应用磷酸缓冲液(PBS)浸提法, 采用正交实验设计研究最优工艺条件, 以期对猴头菇凝集素的提取提供参考, 为其在医学、保健等方面的研究和应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

猴头菇子实体由武汉生物工程学院食用菌栽培实验室提供, 经 30℃ 烘干、粉碎、筛分、密封后存放于阴凉处备用。鸡血由基础生物学实验室提供。试验所需试剂均为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 凝集素的提取 取猴头菇粉末 2 g, 选取合适的提取试剂, 料液比 1:20 (g/mL)左右, 4℃ 浸提过夜。浸提液经过滤后, 4 000 r/min 冷冻离心 30 min。上清液加入固体硫酸铵至饱和度 50%, 盐析 10 h, 所得沉淀经冷冻离心、透析后, PBS 溶解, 获得粗 HEL 样品^[4-5]。

1.2.2 凝集活性的测定 凝集效价的检测参照孙册等^[6]的方法, HEL 倍比稀释后, 加入等量的 2% 鸡红细胞悬液, 静置 1 h 观察结果。参照红细胞凝集分类标

准^[7], 判定红细胞凝集效价。参照赵则海等^[8]的方法, 对凝集效价定性数据赋值, 取其加权平均数作为量化的凝集活性(Agglutinating activity, Aa)。以 HEL 的凝集活性为指标, 优化提取工艺。

1.2.3 提取剂的选择 以 PBS(0.05 mol/L, pH 7.0)、0.9% NaCl、蒸馏水作为提取剂, 参照 1.2.1 的方法提取 HEL, 血凝法检测 HEL 凝集效价和凝集活性, 确定最佳提取试剂。

1.2.4 单因素试验 HEL 提取工艺优化试验的 5 个因素为: PBS 的浓度、pH 值、料液比、提取时间、提取温度。各试验因素的水平范围分别为: PBS 浓度 0.05~0.2 mol/L, pH 6.0~8.0, 料液比 1:15~1:45 (g/mL), 提取时间 6~30 h, 提取温度 4~45℃, 确定各因素对试验的影响^[7]。

1.2.5 正交实验设计 选取料液比、提取时间、提取温度、提取剂 pH 值 4 个因素, 以 HEL 凝集活性为指标, 进行 L₉(3⁴) 正交实验, 对 HEL 提取的最佳工艺进行研究^[9], 因素水平见表 1。

表 1 正交实验因素水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平 Level	因素 Factor			
	A(浸提温度) /℃	B(浸提时间) /h	C(料液比) /(g·mL ⁻¹)	D(提取试剂 pH 值)
1	4	12	1:15	6.5
2	15	18	1:25	7.0
3	25	24	1:35	7.5

1.2.6 硫酸铵饱和度对 HEL 影响 按照最佳组合工艺提取 HEL。将提取液均分为 5 份, 分别加入不同饱和度(30%~70%)硫酸铵盐析处理。采用考马斯亮蓝 G-250 法^[10]测定蛋白质含量, 采用血凝法测定 HEL 凝集活性^[8]。

第一作者简介:邓政东(1973-), 男, 广东蕉岭人, 硕士, 讲师, 现主要从事细胞生物学等教学与科研工作。E-mail: dzddoron@sina.com.

基金项目:武汉生物工程学院资助项目(2010J07, 2013JYI01)。

收稿日期:2014-09-02

2 结果与分析

2.1 提取剂的选择

由图 1 可知,以 PBS 为提取剂,HEL 凝集活性最高,蒸馏水次之,生理盐水最弱。综合考虑 HEL 的凝集活性、稳定性,选取 PBS 为提取剂。

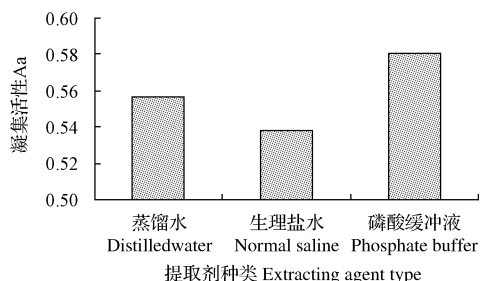


图 1 不同提取剂对 HEL 凝集活性的影响

Fig. 1 Effect of different extracting solvent on Aa of HEL

2.2 单因素试验

2.2.1 PBS 浓度对 HEL 凝集活性的影响 由图 2 可知,当 PBS 浓度较低时,HEL 凝集活性随 PBS 浓度的升高而上升,在 0.10 mol/L 时达到最高,随后 HEL 凝集活性又开始下降。因此,PBS 的浓度选择 0.10 mol/L 较为合适。

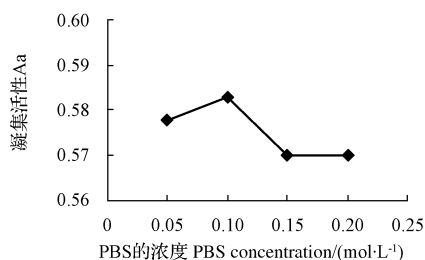


图 2 PBS 的浓度对 HEL 凝集活性的影响

Fig. 2 Effect of concentration of PBS on Aa of HEL

2.2.2 浸提液 pH 值对 HEL 凝集活性的影响 由图 3 可以看出,在弱酸至中性范围,HEL 凝集活性有微弱增长,pH 7.0 时活性最强;中性至弱碱性范围,凝集活性开始下降。因此,选取 PBS(0.10 mol/L, pH 7.0)作为提取试剂。

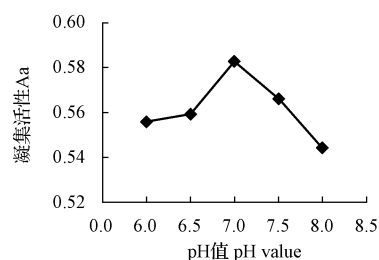


图 3 浸提液 pH 值对 HEL 凝集活性的影响

Fig. 3 Effect of pH value of the extracting solvent on Aa of HEL

2.2.3 料液比对 HEL 凝集活性的影响 由图 4 可知,料液比为 1:15~1:35 (g/mL) 时,提取的 HEL 凝集活性有下降的趋势;料液为 1:45 (g/mL) 时,凝集活性迅速降低。综合考虑 HEL 的凝集活性以及后续分离纯化操作的成本,以料液比 1:15 (g/mL) 进行提取比较适宜。

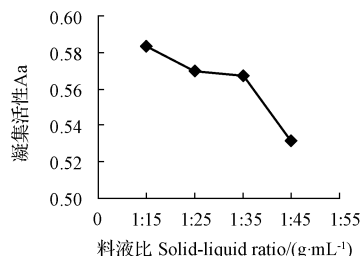


图 4 料液比对 HEL 凝集活性的影响

Fig. 4 Effect of solid-liquid ratio on Aa of HEL

2.2.4 提取时间对 HEL 凝集活性的影响 由图 5 可知,随着浸提时间的延长,HEL 的凝集活性缓慢上升,18 h 达到峰值,随后 HEL 凝集活性下降,因此,选取提取时间为 18 h。

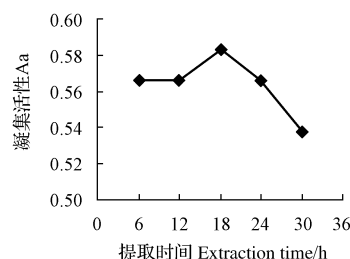


图 5 提取时间对 HEL 凝集活性的影响

Fig. 5 Effect of extraction time on Aa of HEL

2.2.5 提取温度对 HEL 凝集活性的影响 由图 6 可知,在低温条件下,HEL 凝集活性随着提取温度的上升而缓慢上升,在 15℃ 时达到最高值。其后,随着温度的上升 HEL 凝集活性明显下降,表明 HEL 对温度比较敏感,高温可能导致 HEL 变性失活,凝集活性随之下降,因此 HEL 提取温度选择为 15℃。

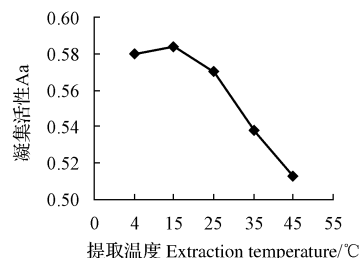


图 6 提取温度对 HEL 凝集活性的影响

Fig. 6 Effect of extraction temperature on Aa of HEL

2.3 正交实验

由表 2 可知,影响 HEL 提取的各因素主次顺序为:提取时间(B)>料液比(C)>提取温度(A)>提取试剂 pH 值

(D);最优组合为 $A_1B_3C_1D_1$,即在 4℃,料液比 1:15 (g/mL),以 PBS(pH 6.5)浸提 24 h。此组合没有出现在正交表中,经过 3 次验证试验后,提取的 HEL 凝集活性平均为 0.586。

表 2 正交实验结果

Table 2 Results of orthogonal test

试验组 编号 No.	A 浸提温度/℃	B 浸提时间/h	C 料液比/(g·mL ⁻¹)	D 提取试剂 pH 值	凝集活性 Aa
1	1	1	1	1	0.531
2	1	2	2	2	0.559
3	1	3	3	3	0.531
4	2	1	2	3	0.481
5	2	2	3	1	0.513
6	2	3	1	2	0.580
7	3	1	3	2	0.463
8	3	2	1	3	0.566
9	3	3	2	1	0.566
K1	1.621	1.475	1.677	1.610	
K2	1.574	1.638	1.606	1.602	
K3	1.595	1.677	1.507	1.578	
R	0.047	0.202	0.170	0.032	

2.4 硫酸铵饱和度对 HEL 的影响

制作蛋白质标准曲线,回归方程为 $y = 3.8298x + 0.0056$, $R^2 = 0.9973$,测定盐析产物中蛋白质含量(主要为 HEL)。血凝法检测 HEL 凝集活性,结果见图 7。硫酸铵饱

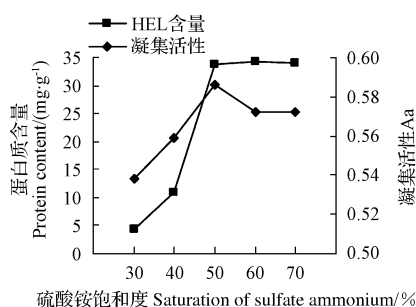


图 7 硫酸铵饱和度对 HEL 的影响

Fig.7 Effect of different saturation of sulfate ammonium on HEL

和度 30%~50%时,HEL 含量和凝集活性均随着饱和度的增加而上升,50%时达到最大值。此后,随着饱和度的增加,HEL 的含量虽然变化不大,但是凝集活性有下降趋势。综合考虑硫酸铵用量、HEL 纯度和凝集活性,硫酸铵盐析的最佳饱和度为 50%。

3 结论

HEL 提取工艺中,最佳提取剂为 PBS,各单因子优水平分别为:提取液浓度 0.10 mol/L、pH 7.0、料液比 1:15 (g/mL)、提取温度 15℃、提取时间 18 h。经正交实验得到 HEL 提取最佳工艺为:提取液为 PBS (0.10 mol/L,pH 6.5)、料液比 1:15 (g/mL)、提取温度 4℃、提取时间 24 h,经饱和度 50%的硫酸铵盐析、透析后,获得的 HEL 凝集活性达到 0.586,蛋白质得率为 1.35%。

参考文献

- [1] 孙正祥,王瑞霞.食用菌中生物活性蛋白的研究进展[J].食用菌学报,2009,16(2):85-90.
- [2] 刘浩,李华.猴头菌提取物抗衰老作用研究[J].山东医药,2009,49(16):37-38.
- [3] 杨炎,周昌艳.猴头菌多糖调节机体免疫力功能的研究[J].食用菌学报,2000,7(1):19-22.
- [4] 刘艳如,余萍,郑怡,等.3种食用菌凝集素的纯化和部分生物学活性的比较[J].福建师范大学学报(自然科学版),2005,21(4):93-95.
- [5] 吴华玉,刘敦华.贺兰山紫蘑菇中蛋白质提取工艺研究[J].食品科技,2011,36(1):185-187.
- [6] 孙册,朱政,莫庆汉,等.凝集素[M].北京:科学出版社,1986:20-21.
- [7] 孙东,刘鹏举.桑叶凝集素的提取工艺优化研究[J].中国中药杂志,2008,33(21):2564-2568.
- [8] 赵则海,肖小琼,邱卓荣,等.四棱豆叶中凝集素的提取及其凝集活性研究[J].现代食品科技,2010,26(12):1341-1344.
- [9] 周彬,杨文革.榭寄生凝集素粗品提取工艺研究[J].中成药,2007,29(5):762-764.
- [10] 吕淑霞.基础生物化学实验指导[M].北京:中国农业出版社,2003:49.

Study on Extraction Technology of Lectin from *Hericium erinaceus*

DENG Zheng-dong¹, CHENG Ai-fang¹, ZHENG Ting-jin^{1,2}

(1. School of Life Science and Technology, Wuhan Institute of Bioengineering, Wuhan, Hubei 430415; 2. Institute of Molecular Medicine, Huaqiao University, Quanzhou, Fujian 362021)

Abstract: Taking *Hericium erinaceus* as material, lectin was extracted with PBS extraction method. On the basis of single factor tests of pH values of the extracting solvents, solid-liquid ratio, extraction time, extraction temperature, orthogonal experiment was designed to optimize the extraction condition of *Hericium erinaceus* lectin (HEL). The results showed that the extracting solvents was PBS, the concentration of sodium chloride was 0.10 mol/L. The best extraction technology was solid-liquid ratio 1:15 (g/mL), pH values of the extracting solvents 6.5, extraction temperature 4℃, extraction time 24 hours. Under these conditions, agglutinating activity of HEL reached 0.586 and extraction rate reached 1.35%.

Keywords: *Hericium erinaceus*; lectin; extraction technology; agglutinating activity