

响应面法优化草菇菌丝凝集素超声波提取工艺研究

刘 主, 陈 珺 霞

(韶关学院 英东生命科学学院, 广东 韶关 512005)

摘 要:以草菇菌丝体为试材,以凝集素提取液的总活力为指标,在单因素试验的基础上,利用3因素3水平的Box-Behnken中心组合试验和响应面分析法设计优化了草菇菌丝凝集素的超声波提取工艺。结果表明:超声功率为310 W、超声处理时间为36 min、液料比为4.5:1,是草菇菌丝凝集素超声波提取的最佳工艺;在该条件下,其20 g草菇菌丝的凝集素提取液的总活力为76 386 U。

关键词:草菇菌丝;凝集素;超声波提取;响应面分析

中图分类号:S 646 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)19-0138-04

凝集素(Lectin)是一类具有糖专一性、可促使细胞凝集的蛋白质或糖蛋白^[1]。它对血细胞、淋巴细胞、恶性细胞均有凝集功能,具有鉴定血型及微生物,抗感染、抗炎症、抗血栓,促进细胞分裂,免疫调节等功效,已成为相关领域的特效工具^[2-6]。

凝集素是食用菌中重要的药理成分之一,研究显示,食用菌凝集素对大多数食用菌子实体的杀虫活性起重要作用,且不受蛋白酶及热影响,是一种良好的杀虫剂候选材料,可能是一种可以用于抵抗害虫的基因源^[7];同时,它也在促进菌丝分化、子实体形成方面具有活性^[8-9]。Hsu等^[5]从草菇子实体中分离得到的凝集素Fip-*ovo*,具有抗肿瘤活性、免疫调节功能,且促淋巴细胞分裂的功效是伴刀豆凝集素的10倍。

从食用菌子实体中提取凝集素,原料成本高且操作复杂;而从菌丝体中提取则相对容易。菌丝液体培养简单、生长速度快,且可在实验室条件下标准化生产、品质可控。超声波提取技术可以加强胞内物质的释放、扩散和溶解,加速了有效成分的浸出,且能耗低、效率高,不破坏有效成分^[10-12],已广泛用于生物组织中有效成分的提取^[13-15]。

该研究以超声波辅助处理从草菇菌丝体中提取凝集素,并通过响应面法对提取工艺进行优化,对草菇菌丝凝集素的分离纯化、分析和开发应用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料草菇购于韶关市一市场。

液体培养基(PDSB):新鲜土豆200 g/L,葡萄糖20 g/L,磷酸二氢钾3 g/L,硫酸镁1.5 g/L。固体培养基(PDA):液体培养基中加入琼脂20 g/L。

透析袋(27 mm,3 500 Da),Spectrum(USA);2-巯基乙醇,Amresco(USA);聚乙二醇20 000,Sigma(USA);其它均为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 草菇菌丝凝集素的提取 选取新鲜未开伞的草菇,取其菌柄与菌盖交接处组织,接入含PDA的培养皿中,32℃培养,得到所需草菇菌种。草菇菌种接入装有PDSB培养基的250 mL锥形瓶中,置于32℃培养箱中培养8 d。称取20 g草菇菌丝,加入100 mL 0.01 mol/L (pH 7.4)的PBS缓冲液,再加入2-巯基乙醇至浓度0.1%(v/v),用高速匀浆仪充分研磨成匀浆,依照设计的试验方案进行超声波处理,3 500 r/min下离心20 min,取上清液加入硫酸铵至饱和度为90%^[16],静置过夜。10 000 r/min离心30 min,沉淀溶解于PBS缓冲液中,透析24 h后用聚乙二醇20 000浓缩,得到一定体积的凝集素提取液。

1.2.2 红细胞悬浮液的制备及凝集反应 用EDTA作抗凝剂采集小鼠血液,离心,除去血浆,用PBS液洗涤3~5次,使红细胞悬浮于PBS液中,浓度为2%。在微量“V”型血凝板上按孙册等^[17]的方法进行活力测定:取30 μL的草菇菌丝凝集素提取液与等体积的PBS缓冲液在“V”型血清微量稀释板上进行倍比稀释,然后加入30 μL 2%的小鼠红细胞悬液,振荡摇匀后,室温放置2 h,显微镜下检查凝集结果。计算凝集素提取液的

第一作者简介:刘主(1977-),男,湖南宁远人,博士,副教授,现主要从事生物化学与分子生物学等研究工作。E-mail:liuzhu77@126.com。

基金项目:韶关学院科研资助项目(2011-12);韶关学院大学生创新创业训练计划资助项目(sycxcy2012-007)。

收稿日期:2014-05-19

总活力。

1.2.3 单因素试验 在超声波提取草菇菌丝凝集素的工艺中,主要考虑超声波功率、超声波处理时间及液料比 3 个因素对菌丝凝集素总活力的影响。在超声波处理时间为 30 min,液料比为 3:1,分别采用 100、200、300、400、500 W 功率进行超声波处理;在超声波功率为 400 W,液料比为 3:1 的条件下,分别采用 10、20、30、40、50 min 进行超声波处理;在超声波功率为 400 W,处理时间为 30 min 的条件下,按液料比分别为 1:1、2:1、3:1、4:1、5:1(PBS 溶液)进行超声波处理。超声波处理后静置 2 h。

1.2.4 响应面试验 依据 Design Expert 8.0.6.1 软件和 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理,综合单因素试验结果,选取超声波功率(A)、处理时间(B)和液料比(C)3 个因素为自变量,以草菇菌丝凝集素提取液的总活力(Y)为响应值,进行 3 因素 3 水平的响应面设计与分析试验,其试验因素与水平设计见表 1。

表 1 响应面分析试验因素与水平

Table 1 Factors and levels of response surface design

因素 Factor	水平 Level		
	-1	0	1
A 超声波功率 Ultrasonic power/W	200	300	400
B 处理时间 Extraction time/min	20	30	40
C 液料比 Liquid-solid ratio	3:1	4:1	5:1

2 结果与分析

2.1 超声波提取草菇菌丝凝集素的单因素试验

2.1.1 超声波功率对草菇菌丝凝集素提取的影响 由图 1 可知,随着超声波功率的增加,凝集素提取液的总活力先升后降,当超声波功率为 300 W 时,其草菇凝集素总活力最大。增大超声波功率可强化传质,也使细胞的破碎程度增加,从而有利于凝集素在溶液中的浸出;但随着超声功率的继续增强,凝集素的结构可能被破坏,从而最终导致活力的降低。

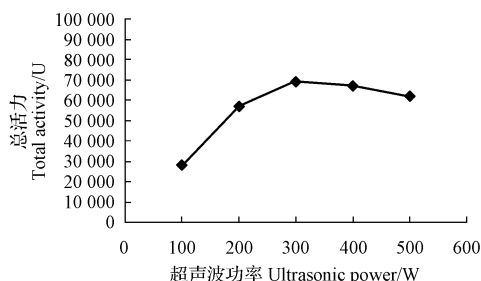


图 1 超声波功率对凝集素提取液总活力的影响

Fig. 1 Effect of ultrasonic power on the total lectin activity of extracting solution

2.1.2 超声波处理时间对草菇菌丝凝集素提取的影响 由图 2 可知,随着超声波处理时间的增加,凝集素活

性随着时间的增加而提高,当处理时间为 30 min 时,凝集素提取液的总活力达到最大。而当时间再增加时,总活力反而降低,可能是由于长时间的超声处理,导致溶液温度升高或破坏了凝集素的结构,影响了凝集素的稳定性。

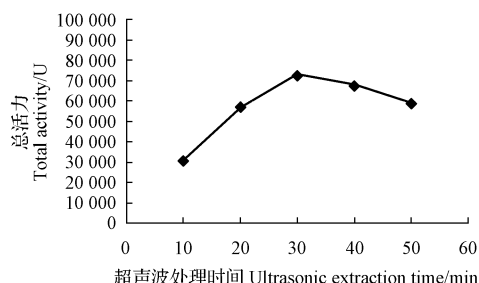


图 2 超声波处理时间对凝集素提取液总活力的影响

Fig. 2 Effect of ultrasonic extraction time on the total lectin activity of extracting solution

2.1.3 液料比对草菇菌丝凝集素提取的影响 由图 3 可知,随着液料比的加大,凝集素总活力不断增大,当液料比超过 4:1 后,总活力增速减缓。提取溶剂用量越多,传质推动力越高,有效成分提取越完全;但在一定的超声波功率和处理时间下,可能由于溶剂量过大会增加处理量和能量吸收,使得提取效果减弱。

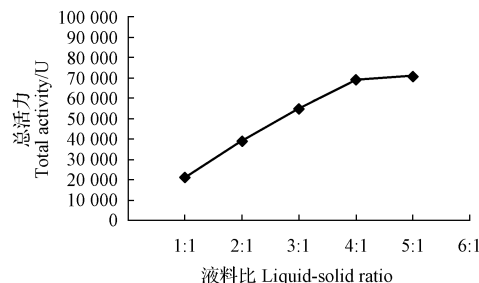


图 3 液料比对凝集素提取液总活力的影响

Fig. 3 Effect of liquid-solid ratio on the total lectin activity of extracting solution

2.2 响应面法优化草菇菌丝凝集素超声波提取条件

2.2.1 响应面法优化草菇菌丝凝集素超声波提取条件

响应面试验设计共 17 次试验,其中析因部分试验 12 次,中心点重复试验 5 次,试验结果见表 2。试验以随机次序进行,利用 Design Expert 8.0.6.1 软件对数据进行多元回归拟合,得到以凝集素提取液总活力 Y 为目标函数: $Y = 73\,580 + 2\,962.5A + 4\,550B + 5\,637.5C - 1\,325AB - 2\,350AC - 2\,925BC - 4\,265A^2 - 2\,240B^2 - 3\,315C^2$ 。由表 3 方差分析结果可知,总模型水平 $P < 0.01$,方程显著。模型的确定系数 $R^2 = 0.9614$,表明其因变量与全体自变量之间的多元回归关系显著,即回归方程能够很好地模拟真实的曲面,该试验方法是可靠的。模型的调整确定

表 2 响应面试验设计及结果

Table 2 Experimental design and results of response surface analysis

试验号 Test number	超声波功率 Ultrasonic power /W	提取时间 Extraction time /min	液料比 Liquid-solid ratio	总活力 Total activity /U
1	300	30	4:1	7.45
2	300	30	4:1	7.31
3	300	40	5:1	7.54
4	300	30	4:1	7.36
5	300	40	3:1	7.13
6	300	30	4:1	7.42
7	400	30	3:1	6.65
8	200	30	3:1	5.29
9	400	20	4:1	6.61
10	200	40	4:1	7.07
11	200	20	4:1	6.05
12	300	20	3:1	5.48
13	400	40	4:1	7.10
14	300	20	5:1	7.06
15	300	30	4:1	7.25
16	400	30	5:1	7.44
17	200	30	5:1	7.02

系数 $R_{Adj}^2=0.9117$, 意味着该模型能解释 91.17% 试验数据的变异性, 因而该模型拟合程度良好, 试验误差小。另外该试验的变异系数(C.V.)为 2.93%, 说明模型方程能较好地反应出真实的试验值。各因素中一次项(A、B、C)、交互项(BC)和二次项(A^2 、 C^2)的 P 值均在 0.05 以下, 说明其对响应值 Y 影响显著; 而交互项(AB、AC)及二次项(B^2)的 P 值大于 0.05, 说明其对结果影响不显著, 表明凝集素提取液的总活力与自变量并非是简单的线性关系。根据回归方程做出响应面分析图, 见图 4~6。从响应面和方差分析结果得到 A(超声波功率)、B(处理时间)、C(液料比)之间交互作用的强弱为: $BC > AC > AB$ 。回归模型中 Y 的最大估计值为 76 683.3 U, 与之对应的自变量 A、B、C 分别为 310.19 W、36.38 min、

表 3 回归方程方差分析结果

Table 1 Variance analysis of regression model

方差来源 Variation source	平方和 SS	自由度 df	均方 MS	F 值 F value	P 值 P value
模型 Model	7.129×10^8	9	7.921×10^7	19.36	0.0004
A	7.021×10^7	1	7.021×10^7	17.16	0.0043
B	1.656×10^8	1	1.656×10^8	40.47	0.0004
C	2.543×10^8	1	2.543×10^8	62.13	0.0001
AB	7.023×10^6	1	7.023×10^6	1.72	0.2315
AC	2.209×10^7	1	2.209×10^7	5.40	0.0531
BC	3.422×10^7	1	3.422×10^7	8.36	0.0233
A^2	7.659×10^7	1	7.659×10^7	18.72	0.0035
B^2	2.113×10^7	1	2.113×10^7	5.16	0.0573
C^2	4.627×10^7	1	4.627×10^7	11.31	0.0120
残差 Residual	2.865×10^7	7	4.092×10^6		
失拟项 Lack of Fit	2.602×10^7	3	8.672×10^6	13.20	0.0153
误差项 Pure error	2.628×10^6	4	6.570×10^5		
总和 Cor total	7.415×10^8	16			
$R^2=0.9614$ $R_{Adj}^2=0.9117$ C.V.% = 2.93					

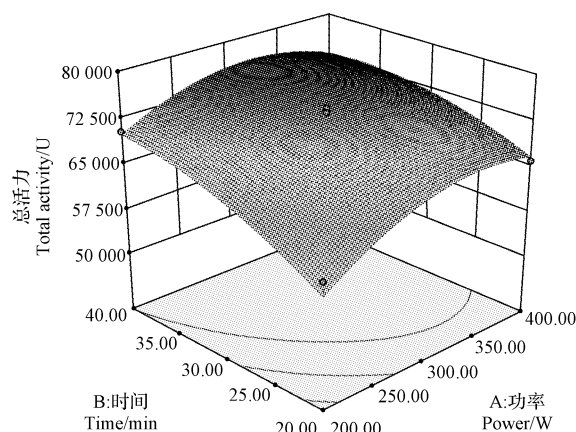


图 4 超声波功率与处理时间对凝集素提取液总活力的影响

Fig. 4 Effect of ultrasonic power and extraction time on the total lectin activity of extracting solution

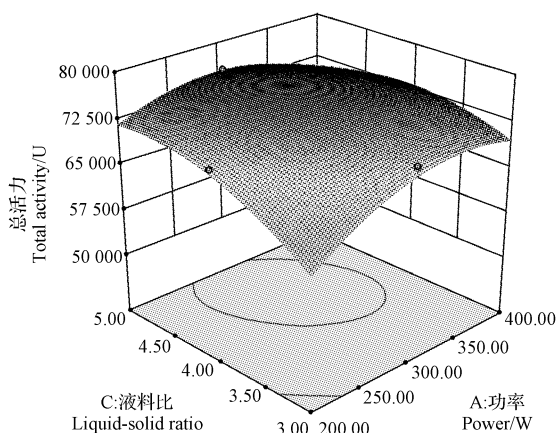


图 5 超声波功率与液料比对凝集素提取液总活力的影响

Fig. 5 Effect of ultrasonic power and liquid-solid ratio on the total lectin activity of extracting solution

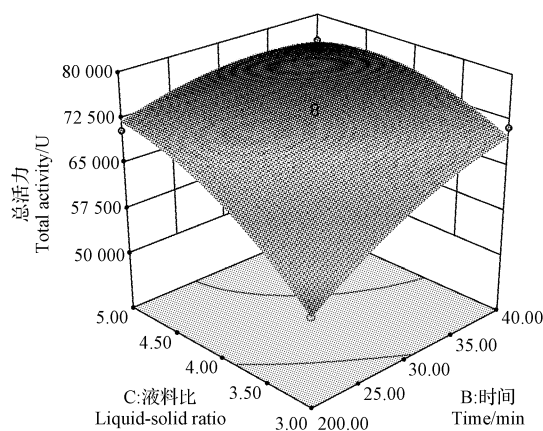


图 6 超声波处理时间与液料比对凝集素提取液总活力的影响

Fig. 6 Effect of ultrasonic extraction time and liquid-solid ratio on the total lectin activity of extracting solution

4.53:1。根据实际操作需要,选出超声波法提取草菇菌丝凝集素的最优条件为超声功率 310 W、超声时间 36 min、液料比 4.5:1。

2.2.2 验证试验 在优化后的超声波提取条件下进行 4 次平行验证试验,草菇菌丝凝集素提取液的总活力平均为 76 386 U,稍低于响应面试验中的最大值,与预测值相比误差仅为 0.39%,因此,利用响应面法得到的优化结果具有实用价值。

3 结论

在单因素试验的基础上,利用响应面分析法筛选出了草菇菌丝凝集素的超声波最佳提取工艺:超声波功率为 310 W、超声处理时间为 36 min、液料比为 4.5:1。在该条件下,20 g 草菇菌丝的凝集素提取液的总活力为 76 386 U。

参考文献

- [1] 刘源,肖瑾,鲍锦库,等.微生物凝集素的研究进展[J].国际口腔医学,2007,34(1):18-21.
- [2] Guillot J, Kanska G. Lectins in higher fungi[J]. Biochem Systematic Ecology, 1997, 2(3): 203-230.
- [3] 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):92-96.
- [4] 孙慧,赵辰光,全鑫.一种新杨树菇凝集素的纯化及生化特性[J].中国生物化学与分子生物学报,2003,19(1):96-102.
- [5] Hsu H C, Hsu C I, Lin R H, et al. Fip-vvo, a new fungal immunomodulatory protein isolated from *Volvariella volvacea* [J]. Biochem J, 1997, 323:

557-565.

- [6] Ngai P H, Ng T B. A mushroom (*Ganoderma capense*) lectin with spectacular thermostability, potent mitogenic activity on splenocytes and anti-proliferative activity toward tumor cells [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 314: 988-993.
- [7] Peumans W J, van Damme E J M. Lectins as plant defense proteins [J]. Plant Physiology, 1995, 109: 347-352.
- [8] 孙慧,赵辰光,全鑫.杨树菇凝集素 AAVP 具有抗病毒和促进菌丝分化功能[J].中国生物化学与分子生物学报,2003,19(2):210-214.
- [9] Wang H X, Ng T B, Liu Q H. Isolation of a new heterodimeric lectin with mitogenic activity from fruiting bodies of the mushroom *Agrocybe eylin-dracea* [J]. Life Sciences, 2002, 70: 877-885.
- [10] 郭永刚,王景芹.超声波在石油化工中应用的研究进展[J].当代化工,2008,37(1):5-6.
- [11] 杨景峰,罗志刚,罗发兴.物理波在真菌多糖提取中的应用[J].粮油食品科技,2007,15(5):56-58.
- [12] 王宏雨.响应面法优化超声波循环提取长裙竹荪抗氧化物质工艺研究[J].食用菌学报,2012,19(1):56-60.
- [13] 韩伟,叶亚婧,雷祖海,等.超声波在活性成分提取中的应用进展[J].机电信息,2011(20):33-38.
- [14] 白明生,陈彦云,李国旗.洋葱皮总黄酮的超声波提取工艺研究[J].食品科技,2008(12):189-193.
- [15] 张帆,丁浩,曹研,等.杜木英超声波辅助提取蜜环菌子实体多糖的工艺研究[J].食品工业科技,2012,33(9):218-221.
- [16] 陈珺霞,刘主.草菇凝集素的提取研究[J].韶关学院学报(自然科学),2013,34(4):46-49.
- [17] 孙册,朱政,莫汉庆.凝集素[M].北京:科学出版社,1986.

Effect on Optimization of Ultrasonic-assisted Extraction of Lectin from *Volvariella volvacea* Mycelium Using Response Surface Methodology

LIU Zhu, CHEN Jun-xia

(Yindong College of Life Sciences, Shaoguan University, Shaoguan, Guangdong 512005)

Abstract: Taking mycelium of *Volvariella volvacea* as material, with total lectin activity of extracting solution as the indicator, based on the single factor experiments, the ultrasonic-assisted extraction technology of *Volvariella volvacea* mycelium lectin was optimization by Box-Benhnken central composite design and response surface methodology. The results showed that the optimal extraction conditions were ultrasonic power 310 W, extraction time 36 min and liquid-solid ratio 4.5:1. Under these conditions, the total lectin activity of extracting solution of 20 g *Volvariella volvacea* mycelium was 76 386 U.

Keywords: *Volvariella volvacea* mycelium; lectin; ultrasonic-assisted extraction; response surface analysis