

邓政东,程爱芳,蒲玉婷. 黑木耳凝集素的提取工艺[J]. 江苏农业科学,2015,43(3):259-260.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.03.085

黑木耳凝集素的提取工艺

邓政东,程爱芳,蒲玉婷

(武汉生物工程学院生命科学与技术学院,湖北武汉 430415)

摘要:以黑木耳为原料,采用磷酸缓冲液浸提,在料液比、浸提时间、浸提温度等单因素试验的基础上,设计正交试验,以研究黑木耳凝集素的最佳提取工艺。结果表明,以磷酸盐缓冲液为提取剂,料液比 1 g : 15 mL,提取温度为 30 ℃,提取时间为 16 h 条件下,黑木耳凝集素的凝集活性最高,达到 0.742。

关键词:黑木耳;凝集素;提取工艺;凝集活性

中图分类号: S646.601;R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2015)03-0259-02

黑木耳(*Auricularia auricula*)营养丰富,是我国传统的食药兼用菌,含有多糖、凝集素、三萜类等药用成分,具有提高免疫功能、抗癌、降血脂等功效。随着双孢菇、灵芝、金针菇和口蘑等真菌凝集素及抗肿瘤效果的发现,真菌凝集素的作用被逐渐认识,它具有凝集细胞、活化淋巴细胞、免疫调节、抑制癌细胞、抑制植物病原真菌等作用^[1-3]。我国是黑木耳的生产和消费大国,研究黑木耳中包括凝集素在内的多种活性成分的提取工艺,对黑木耳的开发和利用具有重要意义。本研究利用磷酸缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)浸提法,采用正交试验,优化提取工艺条件,以期在黑木耳凝集素在食品、医药、保健方面的研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

黑木耳干品从市场购买,经粉碎、筛分、密封后存放于阴凉处备用。鸡血由武汉生物工程学院基础生物学实验室提供。试验所需试剂均为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 黑木耳凝集素的提取方法 取黑木耳干品粉末 2.5 g,选取合适的提取试剂,以料液比 1 g : 20 mL 在 4 ℃ 条件浸提过夜。浸提液经过滤,4 000 r/min 冷冻离心 30 min。上清液加入固体硫酸铵至饱和度为 50%,4 ℃ 盐析 12 h。沉淀经冷冻离心、透析后,用 PBS 溶解,获得凝集素粗品。

1.2.2 凝集活性的测定 采用孙册等的方法^[4],检测凝集效价,即凝集素倍比稀释后,加入等量的 2% 鸡红细胞悬液,静置 1 h 观察结果。根据红细胞凝集分类标准,判定红细胞凝集效价^[5]。参照赵则海等的方法^[6],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)。以凝集活性为指标,筛选提取的最佳工艺。

1.2.3 提取剂的选择 分别以 PBS (0.05 mol/L, pH 值 7.2)、0.9% NaCl、蒸馏水作为提取剂,提取黑木耳凝集素,血

凝法检测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 以黑木耳凝集素的凝集活性为指标,以 PBS 为提取试剂进行单因素试验。料液比分别为 1 g : 10 mL、1 g : 15 mL、1 g : 20 mL、1 g : 25 mL、1 g : 30 mL;提取温度分别为 4、20、30、40 ℃;提取时间分别为 6、12、18、24 h,确定各因素对试验的影响。

1.2.5 正交试验设计 选取料液比、提取温度、提取时间 3 个因素,以凝集活性为指标,进行 $L_9(3^3)$ 正交试验,试验设计见表 1,对黑木耳凝集素的提取最佳工艺进行研究^[7-8]。

表 1 黑木耳凝集素提取工艺正交试验因素水平

水平	因素		
	A:料液比 (g : mL)	B:提取温度 (℃)	C:提取时间 (h)
1	1 : 15	25	8
2	1 : 20	30	12
3	1 : 25	35	16

2 结果与分析

2.1 提取剂的选择

提取剂种类对黑木耳凝集素凝集活性的影响见图 1。以 PBS 为提取剂,凝集活性最高,蒸馏水次之,生理盐水最弱。综合考虑凝集素的凝集活性和稳定性,选取 PBS 为提取剂。

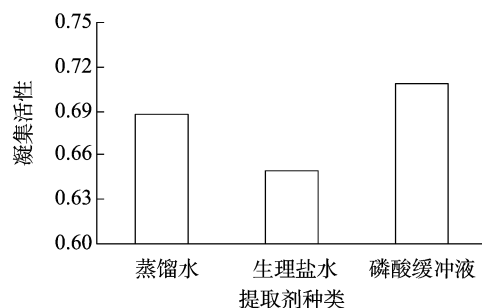


图1 不同提取剂对黑木耳凝集素凝集活性的影响

2.2 单因素试验

2.2.1 料液比对黑木耳凝集素凝集活性的影响 由图 2 可知,随着提取剂 PBS 用量的增大,提取的凝集素凝集活性也

收稿日期:2014-08-05

基金项目:武汉生物工程学院教研项目(编号:2010J07、2013JYI01)。

作者简介:邓政东(1973—),男,广东蕉岭人,硕士,讲师,从事细胞生物学教学和科研工作。E-mail:dzddoron@sina.com。

增大,料液比 1 g : 15 mL 时,凝集活性基本达到最高;此后随着提取剂用量的增加,凝集素凝集活性有下降的趋势。提取剂用量少会导致提取率低和提取液黏稠,而用量过多会使提取液浓缩工作的负荷增加,因此确定最佳料液比为 1 g : 15 mL。

2.2.2 提取温度对黑木耳凝集素凝集活性的影响 由图 3 可知,在 4 ~ 30 ℃,黑木耳凝集素的凝集活性随温度升高而增加,30 ℃ 时达到最高;温度超过 30 ℃ 时,凝集活性明显下降。结

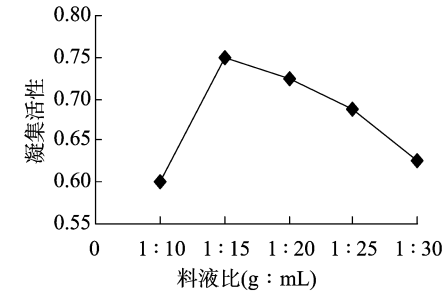


图2 料液比对黑木耳凝集素凝集活性的影响

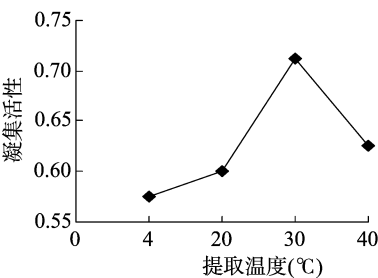


图3 提取温度对黑木耳凝集素凝集活性的影响

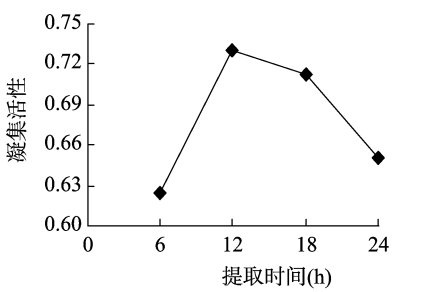


图4 提取时间对黑木耳凝集素凝集活性的影响

2.3 正交试验

正交试验结果和极差分析见表 2,方差分析结果见表 3。影响黑木耳凝集素提取因素的主要顺序为:提取时间(C) > 提取温度(B) > 料液比(A)。由表 3 可知,因素 C 有显著差异,说明提取时间对凝集素凝集活性的影响最明显;因素 A、B 没有显著差异,对凝集素凝集活性没有显著性影响。结合极差和方差分析、单因素试验,确定黑木耳凝集素提取的最佳工艺参数是 A₁B₂C₃,即提取温度 30 ℃、料液比 1 g : 15 mL,浸提时间 16 h。此组合没有出现在正交表中,经过 3 次验证试验后,提取的凝集素的凝集活性平均为 0.742,大于正交组合中的任一组合。

表 2 黑木耳凝集素提取工艺正交试验结果

试管号	因素				凝集活性
	A:料液比	B:提取温度	C:提取时间	D:空列	
1	1	1	1	1	0.625
2	1	2	2	2	0.713
3	1	3	3	3	0.719
4	2	1	2	3	0.663
5	2	2	3	1	0.731
6	2	3	1	2	0.600
7	3	1	3	2	0.675
8	3	2	1	3	0.638
9	3	3	2	1	0.625
k ₁	0.686	0.654	0.621		
k ₂	0.665	0.694	0.667		
k ₃	0.646	0.648	0.708		
R	0.040	0.046	0.087		

3 结论与讨论

本试验以单因素试验和正交试验相结合,对黑木耳凝集素提取工艺条件进行优化,得到最佳提取工艺为:以 PBS 为提取剂,料液比 1 g : 15 mL,提取温度 30 ℃,提取时间为 16 h,经饱和度 50% 的硫酸铵盐析、透析后,获得的黑木耳凝集素的凝集活性达到 0.742。

果表明黑木耳凝集素对温度比较敏感,提取温度过高可能导致凝集素变性失活,凝集活性下降,因此提取温度应选择 30 ℃。

2.2.3 提取时间对黑木耳凝集素凝集活性的影响 由图 4 可知,提取时间在 12 h 以内,黑木耳凝集素的凝集活性随着提取时间的延长而增加,12 h 时达到峰值;此后,随着提取时间的延长,凝集素的凝集活性缓慢下降。综合考虑凝集素的提取率、凝集活性以及提取进度,确定提取时间为 12 h。

表 3 黑木耳凝集素提取工艺正交试验结果方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著水平
因素 A	0.002 37	2	0.001 185	4.23	不显著
因素 B	0.003 77	2	0.001 885	6.732	不显著
因素 C	0.011 50	2	0.005 750	20.54	显著
误差	0.000 56	2	0.000 280		
总和	0.018 20	8			

注:F_{0.01}(2,2) = 99,F_{0.05}(2,2) = 19。

本试验以凝集素的凝集活性为指标,考察不同因素对提取的影响。在血凝法试验中,如何确定凝集素提取液的凝集效价比较困难。相比较其他方法,通过对凝集效价加权平均数获得量化的凝集活性,在凝集素提取及凝集活性研究中,可操作性更强。由于凝集素的本质是蛋白质或糖蛋白,蛋白质含量与凝集活性之间有相关性,因此在凝集素的提取过程中,可以参考蛋白质的提取和检测方法。

参考文献:

[1]李星云,黄 敏,宁安红,等. 抗肿瘤真菌蛋白的研究进展[J]. 国际肿瘤学杂志,2007,34(8):576-579.

[2]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.

[3]吴丽萍,袁建颖,李 飞,等. 4 种食用菌提取物对 2 种植物病原真菌的抑制作用[J]. 安徽农业科学,2009,37(8):3587-3589.

[4]孙 册,朱 政,莫庆汉,等. 凝集素[M]. 北京:科学出版社,1986:20-21.

[5]孙 东,刘鹏举,郑晓翠,等. 桑叶凝集素的提取工艺优化研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(21):2564-2567.

[6]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.

[7]权美平. 苦杏仁苷乙醇提取工艺参数优化[J]. 江苏农业科学,2013,41(5):260-261.

[8]周 彬,杨文革,缪 建,等. 槲寄生凝集素粗品提取工艺研究[J]. 中成药,2007,29(5):762-764.