

高泽磊,田童童,张 建. 新疆白芸豆中凝集素的提取及纯化工艺[J]. 江苏农业科学,2017,45(6):191-196.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.06.050

新疆白芸豆中凝集素的提取及纯化工艺

高泽磊,田童童,张 建
(石河子大学食品学院,新疆石河子 832003)

摘要:为了研究新疆白芸豆中凝集素的提取及纯化工艺,以凝集素特异性活力为评价指标,通过单因素及响应面分析法对新疆白芸豆中的凝集素进行研究。结果表明,新疆白芸豆中凝集素提取的最佳工艺参数为料液比 1 g : 10 mL、pH 值 7.5、提取时间 20 h、提取液为磷酸盐缓冲溶液(PB),在该条件下模型预测凝集素特异性活力为 1 209.04 HU/mg,实际试验值为 1 193.62 HU/mg。利用二乙氨乙基(DEAE)A-50 阴离子交换层析和 Sephadex G-75 凝胶层析进行纯化,通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析,确定目标凝集素的分子量为 30~40 ku。

关键词:白芸豆;凝集素;响应面分析;纯化

中图分类号:TS201.1;R284.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)06-0191-05

凝集素(lectin)是一类至少有 1 个非催化结构域、能非共价地可逆结合专一性单糖或寡糖的非免疫源性、非酶本质的糖结合蛋白,目前在动物、植物、微生物和病毒中均有发现^[1-3]。关于凝集素的免疫作用、抗营养作用(致毒作用)、使细胞表面成分再分布、修饰细胞膜酶的活力、阻断卵受精、对脂肪细胞具有类似胰岛素的活性等也逐渐被研究和证实^[4-5]。目前对于凝集素的研究主要集中于植物凝集素,由于凝集素对于单糖或糖复合物特异性结合的能力,使其在如信号转导、免疫反应、植物防御等诸多信号过程中均具有重要作用。同时,凝集素具有细胞凝集、抗病毒、抗真菌及诱导细胞凋亡或自噬等多种能力,因此在生命科学、医学及农业方面均有较好的研究价值和应用前景。

在植物凝集素研究中发现,豆科植物凝集素种类最丰富,有 600 多种,其中 70 多种已经被分离纯化,大多来自豆科植物的种子,在成熟种子中占蛋白质总含量的 10% 左右^[6]。另外,在其他组织,如叶、茎、果实、树皮、根中也分布着一些与种子凝集素高度同源的凝集素^[7-9],它们虽然与种子凝集素有类似的氨基酸序列和糖结合特异性,但仍然是由不同基因编码的。豆科植物凝集素一级氨基酸序列和三级结构相似性很高,但是糖专一性和四级结构却有很大的不同^[10]。因此,研究不同豆科类来源凝集素的结构,对于豆科类凝集素在生物学、农学和医学领域的应用具有重要的意义。

白芸豆(white kidney bean)属豆科(Leguminosae)蝶形花亚科(Papilionoideae)菜豆族菜豆属^[11]。由于其营养价值丰富(100 g 干豆中含碳水化合物 37.6%~48.5%,蛋白质 19.9%~20.0%,脂肪 1.6%~2.1%,钙 120 mg,铁 10 mg),因此可作为一种高钾低钠食品,适合高血脂、心脏病、动脉硬化

化和忌盐者食用^[12],而且食用后不会产生腹泻、乏力、厌食、体质量反弹等现象,完全符合世界卫生组织的减肥原则^[13-16]。因此,自白芸豆从阿根廷、墨西哥引进并经人工栽培驯化后已经在全国各地广泛种植。然而,目前关于白芸豆中凝集素的研究却鲜有报道。因此,本研究以新疆白芸豆为研究对象,通过响应面分析法优化凝集素的提取工艺,并通过实际试验考察以验证响应面模型的正确性。利用二乙氨乙基(DEAE)A-50 阴离子交换层析和 Sephadex G-75 凝胶层析对凝集素的粗提取物进行纯化,通过十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析,确定目标凝集素的分子量,以期为后续研究其结构及生理功能打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

主要材料:白芸豆,购自新疆石河子市好家乡超市。主要试剂:牛血清蛋白(分析纯),天津市致远化学试剂有限公司;磷酸二氢钠(分析纯)、磷酸氢二钠(分析纯),天津市福晨化学试剂厂;氯化钠(分析纯)、分析纯乙醇(95%),天津市永晟精细化工有限公司;三羟甲基氨基甲烷(Tris,分析纯),北京拜尔迪生物科技有限公司;考马斯亮蓝(Coomassie Brilliant Blue)G-250(分析纯),Biotopped。

1.2 仪器与设备

主要仪器与设备:PHS-3C 型 pH 计,上海仪电科学仪器股份有限公司;BINDER 电热恒温鼓风干燥箱,北京航鹏普瑞技术开发中心;Heraeus Multifuge X3 电动离心机,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;RHP-600 高速粉碎机,浙江荣浩工贸有限公司;KQ-200VDE 超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;UVmini-1240 紫外分光光度计,岛津(中国)有限公司;JM-B10002 电子天平,诸暨市超泽衡器设备有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 原料预处理 将市场上购买的白芸豆去除杂质,准确称取 30 g,在 4℃ 冰箱中用 150 mL 蒸馏水浸泡 24 h,捞去杂质并沥干后,手工去皮,在 35℃ 烘箱中干燥后经粉碎机粉碎,过 80 目筛得到白芸豆种子粉末。将经过上述处理的样品装

收稿日期:2016-09-30

基金项目:石河子大学青年骨干教师培训(编号:3152SPXY01027)。

作者简介:高泽磊(1992—),男,内蒙古赤峰人,硕士研究生,研究方向为食品加工与安全。E-mail:1549838248@qq.com。

通信作者:张 建,博士,副教授,研究方向为食品生物化学。E-mail:zhangjian0411@163.com。

入聚乙烯袋中,4 ℃冰箱中保藏备用。

1.3.2 蛋白质浓度的测定 对蛋白质含量的测定采取的是考马斯亮蓝 G-250 法。参考王孝平等的方法^[17],略有改动。

1.3.3 白芸豆凝集素活力检测 参照李笑梅等的方法^[18-19],略有改动。利用采血管抽取新鲜鸡血 10 mL,抽取 2 mL 至肝素钠抗凝管中。将新鲜血液倒入离心管中并于 3 000 r/min 离心 3 min,用移液枪去除上层血清,向沉淀中添加生理盐水以清洗红细胞。轻轻颠倒摇匀洗涤,然后再次于 3 000 r/min 离心 3 min,去除上清液,如此重复操作洗涤 3 次。根据红细胞压积,按照离心出的红细胞体积,加入生理盐水配成浓度 2% 的红细胞悬液,在 4 ℃冰箱中保存备用。在 96 孔反应板上,每孔加入 50 μL 生理盐水;在 96 孔板各排第 1 孔内分别加入 50 μL 样品溶液,混匀后从第 1 孔吸取 50 μL 加入第 2 孔,混匀后再吸取 50 μL 加入第 3 孔,按此方法倍比稀释到第 11 孔,混匀后吸取 50 μL 弃去,以第 12 孔作空白对照;再在每孔内加入 50 μL 红细胞悬液,水平摇动,放置 1.5 h 后观察凝集效果。凝集素的特异性活力计算方法见式(1):

特异性活力(HU/mg) =
$$\frac{\text{血凝滴度}(2^n) \times 1\,000\ \mu\text{g}/\text{mg}}{\text{每孔添加体积}(\mu\text{L}) \times \text{凝集素或粗蛋白浓度}(\mu\text{g}/\mu\text{L})}$$
 (1)

式中: n 为样品经过倍比稀释后在 96 孔“V”形板上的凝集孔数,孔; 2^n 为凝集素的血凝滴度,指在 96 孔板上使鸡血红细胞凝集的最小稀释倍数。

1.3.4 提取条件优化单因素试验

1.3.4.1 提取剂的确定 准确称取 10 g 豆粉,按料液比 1 g : 10 mL,分别加入 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(PB, pH 值为 7.6)、生理盐水、去离子水、Tris-HCl(pH 值为 7.6),超声波振荡 20 min 后,在 4 ℃冰箱中进行浸提,设定提取时间为 18 h;浸提液经 4 层纱布过滤后,将上清液倒入离心管中,于 6 000 r/min 离心 20 min,将得到的上清液分别用 96 孔“V”形板反应法和考马斯亮蓝 G-250 法进行血凝检测和蛋白质含量测定,确定最佳提取液。

1.3.4.2 提取液 pH 值的确定 准确称取 10 g 豆粉,按料液比 1 g : 10 mL,分别加入 0.05 mol/L pH 值为 6.4、6.8、7.2、7.6、8.0 的 PB,超声波振荡 20 min 后,在 4 ℃冰箱中进行浸提,设定提取时间为 18 h;浸提液经 4 层纱布过滤后,将上清液倒入离心管中,于 7 000 r/min 离心 20 min,将得到的上清液分别利用 96 孔“V”形板反应法和考马斯亮蓝 G-250 法进行血凝检测和蛋白质含量测定,确定最佳 pH 值。

1.3.4.3 料液比的确定 准确称取 10 g 豆粉,分别按 1 g : 6 mL、1 g : 8 mL、1 g : 10 mL、1 g : 12 mL、1 g : 14 mL 的料液比,加入 0.05 mol/L PB(pH 值 = 7.6),超声波振荡 20 min 后,在 4 ℃冰箱中进行浸提,设定提取时间为 18 h;浸提液经 4 层纱布过滤后,将上清液倒入离心管中,于 6 000 r/min 离心 20 min,将得到的上清液分别利用 96 孔“V”形板反应法和考马斯亮蓝 G-250 法进行血凝检测和蛋白质含量测定,确定最佳料液比。

1.3.4.4 提取时间的确定 准确称取 10 g 豆粉,按照料液比 1 g : 10 mL,加入 0.05 mol/L PB(pH 值 = 7.6),超声波振荡 20 min 后,在 4 ℃冰箱中进行浸提,分别设定提取时间为 16、18、20、22、24 h;浸提液经 4 层纱布过滤后,将上清液倒入

离心管中,于 8 000 r/min 离心 20 min,将得到的上清液分别利用 96 孔“V”形板反应法和考马斯亮蓝 G-250 法进行血凝检测和蛋白质含量测定,确定最佳提取时间。

1.3.5 响应面试验设计 在单因素试验基础上,采用 Design-Expert 7.0 软件应用响应面分析法,以料液比(A)、提取时间(B)和 pH 值(C)为主要影响因素,以特异性活力为(Y)为响应值,设计 3 因素 3 水平试验(表 1),选用 Box-Behnken 通过试验数据拟合响应面模型,对单因素试验结果进行响应面试验,研究工艺条件对提取效果的影响。每个试验组合重复试验 3 次,取其平均值作为结果,试验结果采用 Design-Expert 7.0 软件分析,确定最佳工艺路线。

表 1 响应面分析试验因素与水平

水平	A:料液比 (g : mL)	B:提取时间 (h)	C:pH 值
-1	1 : 8	16	7.2
0	1 : 10	18	7.6
1	1 : 12	20	8.0

1.3.6 白芸豆凝集素的硫酸铵分级沉淀法纯化 将白芸豆豆粉与提取剂混合,置于 4 ℃冰箱,将溶液进行超声波振荡,抽提 24 h,用 4 层纱布过滤,弃去滤渣,滤液于 10 000 r/min 离心 15 min,收集上清液;向上清液中加入固体硫酸铵至 40% 饱和度,置于 4 ℃冰箱 12 h,然后于 10 000 r/min 离心 15 min;收集上清液后,逐渐加固体硫酸铵至溶液 70% 饱和度,4 ℃静置 12 h 后于 10 000 r/min 离心 15 min,收集沉淀,将沉淀溶于提取剂,透析、冷冻干燥,得到白芸豆凝集素粗提物,置于 4 ℃冰箱中备用。

1.3.7 白芸豆凝集素的柱层析纯化 (1)DEAE A-50 的预处理。称取 5 g A-50,悬于 500 mL 蒸馏水中,1 h 后倒去上层细粒;再按 1 g A-50 加 15 mL 0.5 mol/L NaOH 的比例,将 A-50 浸泡于 0.5 mol/L NaOH 中,搅匀,静置 30 min,反复用蒸馏水洗至 pH 值呈中性;再用 0.5 mol/L HCl 同以上操作过程进行处理;最后用 0.5 mol/L NaOH 再处理 1 次,放于电热炉上煮沸 30 min 进行脱气处理,处理完后将 A-50 浸泡于 pH 值 7.5 的 PB 中过夜。(2)装柱。将 PB 缓冲溶液沿玻璃棒倒入柱中约 1/4 高度,再倒入预处理后与上样缓冲液调成稀糊状的 A-50,待 A-50 凝胶沉降 2~3 cm 厚时,开启出水口螺旋夹,控制流速 1 mL/min,同时连续倒入糊状 A-50 凝胶至所需高度;关闭出水口,待 A-50 凝胶完全沉降后,塞紧柱上口;平衡:开启出水口螺旋夹,控制流速 12~14 d/min,使约 2 倍体积的洗脱液流出。(3)Sephadex G-75 凝胶预处理。100 mL 烧杯中称取 5 g G-75,加入 50 mL 去离子水,浸泡溶胀 24 h;随后倒去 Sephadex G-75 溶胀后凝胶上层的清水,加入凝胶等体积的 1.0 mol/L NaOH 溶液处理,用搅拌棒轻轻搅动,并浸泡 1 h 后倒去上层液体,再用蒸馏水洗涤,洗涤过程中用倾去法除去细颗粒,其方法是将凝胶搅匀(注意不要过分用力搅拌以防止颗粒破碎)并放置数分钟;将未沉淀的细颗粒随上层的水倒掉,重复 3~5 次,直至上层没有细颗粒为止,再浸泡于水中至中性;将 G-75 凝胶水溶液放于电热炉上进行煮沸脱气处理 30 min。装柱方法类似 DEAE A-50 阴离子柱。平衡后即可正常使用。

1.3.8 SDS-PAGE 分析方法 SDS-PAGE 采用 Laemmli 的

方法^[20],不连续垂直板状凝胶电泳。白芸豆凝集素电泳条件:浓缩胶 5%,分离胶 12%。(1)试剂的配制。10% SDS:将 10 g SDS 加水定容至 100 mL。10% 过硫酸铵:0.1 g 过硫酸铵加 1.0 mL 水,混匀,使用前配制。丙烯酰胺单体贮液:29.10 g 丙烯酰胺 + 0.90 g *N,N'*-甲叉双丙烯酰胺加水定容至 100 mL,用棕色瓶于 4 ℃ 保存。分离胶缓冲贮液(1.5 mol/L Tris - HCl, pH 值 8.8):将 18.15 g Tris 溶于 80 mL 水,用 4 mol/L HCl 调 pH 值至 8.80,定容至 100 mL,4 ℃ 保存。浓缩胶缓冲贮液(1.0 mol/L Tris - HCl, pH 值

6.8):将 12.10 g Tris 溶于 60 mL 水,用 4 mol/L HCl 调 pH 值至 6.80,定容至 100 mL,4 ℃ 保存。样品缓冲液:1% SDS,0.1 mol/L Tris - HCl,0.01 mol/L β-巯基乙醇,0.1 g/L 溴酚蓝,150 g/L 蔗糖, pH 值 8.0,4 ℃ 保存。电泳缓冲液:3.0 g Tris + 14.4 g 甘氨酸(gly) + 1.0 g SDS,加水定容至 1 000 mL,4 ℃ 保存。脱色液:50 mL 甲醇,75 mL 冰乙酸,875 mL 纯水。染色液:2.5 g 考马斯亮蓝 R-250,454 mL 甲醇,92 mL 冰乙酸,454 mL 纯水。

表 2 SDS - PAGE 分离胶和浓缩胶的组分

贮液	丙烯酰胺单体贮液 体积(mL)	浓缩胶缓冲贮液 体积(mL)	分离胶缓冲贮液 体积(mL)	10% SDS 体积(μL)	H ₂ O 体积 (mL)	10% 过硫酸铵 体积(μL)	四甲基乙二胺 (TEMED) 体积(μL)
分离胶(体积分数 12%)	2.00	—	1.3	50	1.60	50	2
浓缩胶(体积分数 5%)	0.17	0.13	—	10	0.68	10	1

(2)操作方法。每次电泳时,样品和 marker 须在沸水浴中保持 5 min,然后在常温下进行电泳。电泳结束后将凝胶小心放入容器中加入染色液,染色结束后用脱色液在脱色摇床上脱色,其间更换脱色液 3 ~ 4 次直到条带清晰。凝胶的组分见表 2,胶板大小为 80 mm(W) × 73 mm(H) × 0.75 mm(T)。

2 结果与分析

2.1 提取条件优化单因素试验

2.1.1 不同提取剂对白芸豆凝集素特异性活力的影响 由图 1 可见,提取液种类的不同对白芸豆凝集素特异性活力有明显影响,PB 组的凝集素特异性活力明显高于 Tris - HCl 组、生理盐水组、去离子水组,这可能与凝集素是一种水溶性的蛋白质或者糖蛋白有关,蛋白质在具有一定离子强度的浸提剂中的溶解度要高于在去离子水中的溶解度,而 Tris - HCl 组有更多的杂蛋白溶解出来,对进一步的分离纯化造成负担,导致凝集素含量下降。因此,确定 PB 作为提取液。

2.1.2 pH 值对白芸豆凝集素特异性活力的影响 由图 2 可

见,pH 值从 6.4 增加至 7.6 过程中,随 pH 值的不断上升,白芸豆凝集素的特异性活力值也逐渐增大,这可能是由于凝集素作为一种蛋白质,是一种两性解离的物质,当提取剂 pH 值接近凝集素的等电点时,会使凝集素发生沉淀,导致对应的特异性活力值较低;当 pH 值为 7.6 时,特异性活力达到最大值,为 1 179.661 HU/mg,说明在此 pH 值条件下,有利于更多的凝集素溶出。因此,确定 pH 值为 7.6 为最佳提取液 pH 值。

2.1.3 料液比对白芸豆凝集素特异性活力的影响 从图 3 可见,随着料液比的增加,凝集素的特异性活力也发生明显的变化,总体呈先提高后降低趋势;在料液比 1 g : 10 mL 时白芸豆凝集素的特异性活力达到峰值,在料液比较低的时候,白芸豆凝集素的特异性活力较低。究其原因,可能是当料液比较低时,由于提取剂的浓度不够,导致蛋白质不能完全被提取,随着料液比的增加,传质动力增加,蛋白质的提取率也就随之上升,相应的凝集素特异性活力提高。因此,从原料的成本考虑,选择提取料液比 1 g : 10 mL 比较适宜。

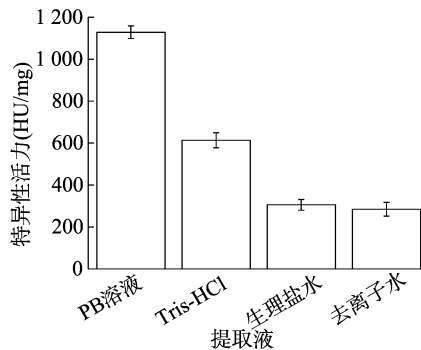


图1 提取液对白芸豆凝集素特异性活力的影响

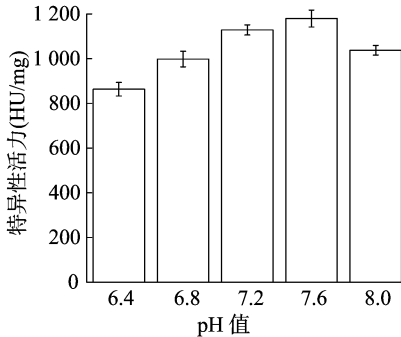


图2 pH 值对白芸豆凝集素特异性活力的影响

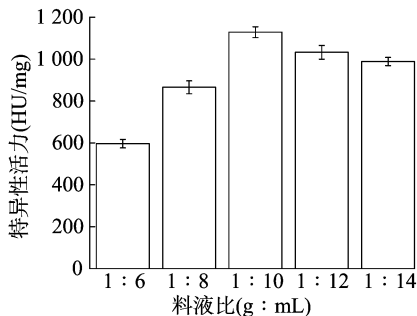


图3 料液比对白芸豆凝集素特异性活力的影响

2.1.4 提取时间对白芸豆凝集素特异性活力的影响 从图 4 可见,随着提取时间的延长,凝集素活力先上升后下降,时间为 18 h 时,达到峰值。说明利用提取剂提取豆粉中的凝集素时,时间的延长有利于凝集素的溶出;但是,提取时间并不是越长越好,过度的时间延长可能会导致豆粉中的一些酶类将蛋白质分解,同时由于微生物的存在,它们的生长繁殖也会消耗一些蛋白质,而这些损失掉的蛋白质中有可能含有凝集素;此外,时间越长,成本越高,因此选择凝集素活力表现最佳

的阶段进行提取。由此可见,提取时间为 18 h 比较合适。

2.2 响应面法优化提取条件

2.2.1 响应面曲面试验设计与结果 在单因素试验的基础上,以特异性活力(Y)为响应值,根据 Design - Expert 7.0 的中心组合设计原理,设计 3 因素 3 水平响应面分析试验,以料液比(A)、提取时间(B)、pH 值(C)为主要影响因素,响应面试验设计见表 1,结果见表 3,对该回归模型及系数进行显著性检验的结果见表 4。

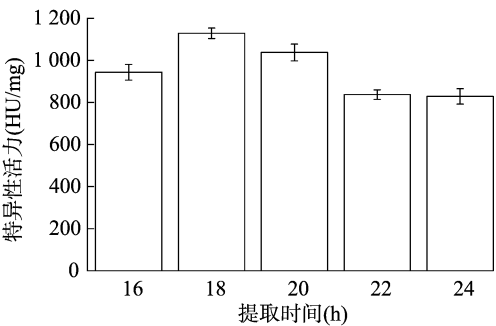


图4 提取时间对白芸豆凝集素特异性活力的影响

表3 响应面分析试验设计及结果

试验号	A:料液比 (g : mL)	B:提取时间 (h)	C:pH 值	特异性活力 (HU/mg)
1	1 : 10	18	7.2	1 128.681
2	1 : 12	20	7.2	1 106.578
3	1 : 8	18	7.6	1 143.133
4	1 : 10	18	7.6	1 179.661
5	1 : 10	20	7.6	1 017.489
6	1 : 8	20	7.2	1 090.528
7	1 : 12	16	8.0	944.363
8	1 : 8	16	8.0	940.143
9	1 : 10	18	7.6	1 069.073
10	1 : 12	16	7.2	962.725
11	1 : 10	18	7.6	1 086.155
12	1 : 10	18	8.0	1 051.492
13	1 : 8	16	7.2	880.413
14	1 : 8	20	8.0	939.914
15	1 : 12	18	7.6	1 071.490
16	1 : 10	16	7.6	991.212
17	1 : 12	20	8.0	980.885

运用 Design - Expert 7.0 数据统计分析软件对表 3 试验结果进行多元回归拟合,得到多元二次回归方程:

$$Y = 411.13 + 7.19A + 41.65B - 31.21C - 3.69AB - 6.65AC - 39.71BC - 3.45A^2 - 106.41B^2 - 20.67C^2$$

由表 4 可看出,模型 P 值 = 0.021 2 < 0.05,该模型是显著的;失拟项 P 值 = 0.791 6 > 0.05,差异不显著;残差均由随

机误差引起,表明所建立的回归二次模型成立,此模型可用作预测和分析白芸豆凝集素提取工艺参数。依据回归系数模型显著性检验可知,在选定的范围内,影响蛋白质提取率的主要因素为 $B > C > A$,即提取时间 > pH 值 > 料液比;模型的 $R^2 = 0.868$,模型拟合程度很好。

表4 回归方程方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	方差	F 值	P 值 > F 值
模型	100 293.48	9	11 143.72	5.13	0.021 2
A	517.10	1	517.10	0.24	0.640 6
B	17 350.39	1	17 350.39	7.98	0.025 6
C	9 742.39	1	9 742.39	4.48	0.072 0
AB	108.86	1	108.86	0.05	0.829 3
AC	353.39	1	353.39	0.16	0.698 8
BC	12 614.68	1	12 614.68	5.81	0.046 8
A ²	31.87	1	31.87	0.01	0.907 0
B ²	30 337.22	1	30 337.22	13.96	0.007 3
C ²	1 145.13	1	1 145.13	0.53	0.491 4
残差	15 210.61	7	2 172.94		
失拟项	8 122.32	5	1 624.46	0.46	0.791 6
纯误差	7 088.29	2	3 544.15		
总和	115 504.09	16			

2.2.2 响应面分析 为进一步研究相关变量之间的交互作用,通过 Design - Expert 7.0 统计软件绘制响应面曲面进行直观分析。从图 5 - A 中可以看出,料液比对凝集素特异性活力的影响呈现线性关系,而提取时间呈二次影响;随着料液比的不断升高,凝集素特异性活力没有表现明显的变化;而随着提取时间的不断增加,凝集素特异性活力呈现出先增强后减弱的趋势。从图 5 - B 中可以看出,料液比对凝集素特异性活力的影响呈现线性关系,而 pH 值呈二次影响;随着料液比的不断升高,凝集素特异性活力没有表现明显的变化;而随着 pH 值的不断上升,凝集素特异性活力呈现出先提高后降低的趋势。从图 5 - C 中可以看出,pH 值和提取时间对凝集素特异性活力都呈二次影响,随着提取时间的增加,凝集素特异性活力呈现先增强后减弱的趋势;随着 pH 值的增加,凝集素特异性活力同样呈先增强后减弱趋势,说明两者的交互作用对蛋白质的提取率均有影响。

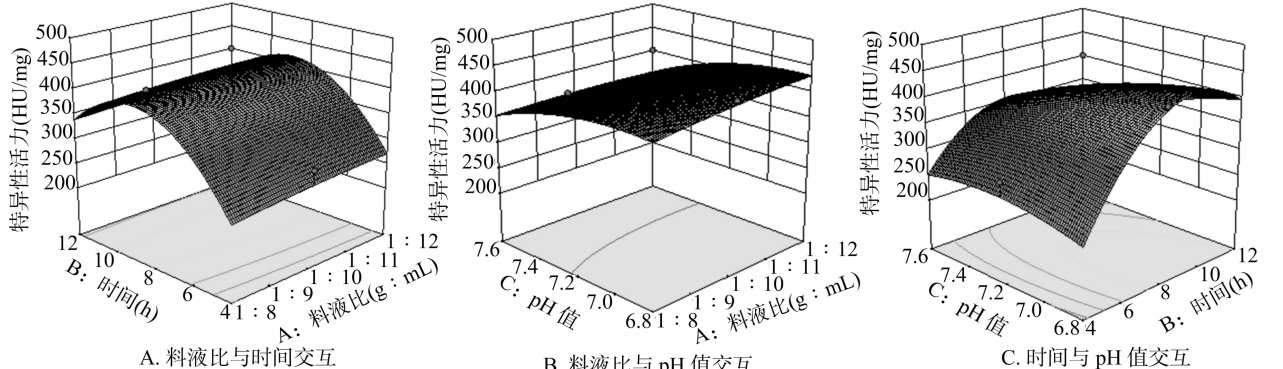


图5 料液比、提取时间及 pH 值的交互作用对白芸豆凝集素特异性活力影响的响应曲面

综合分析图 5 - A、图 5 - B、图 5 - C 可以看出,提取时间和 pH 值变化时,响应值变化较大,表现为曲线较陡;提取时间和 pH 值对凝集素的特异性活力影响较明显,料液比影响

不大。

2.2.3 验证试验 对回归模型进行参数优化,分析得到白芸豆凝集素提取最优工艺参数为料液比 1 g : 10 mL,pH 值 7.5,

提取时间 20 h, 特异性活力可达到 1 209.04 HU/mg。为了验证试验预测结果, 用以上优化参数重复试验 3 次, 平均特异性活力为 1 193.62 HU/mg, 与理论值偏差 1.3%, 没有明显差异, 试验结果证明, 响应面分析法对工艺优化是非常有效的。

2.2.4 DEAE A-50 阴离子交换层析 离子交换层析利用带电分子之间的电荷差异来进行分离。蛋白质是一种两性电解质, 当蛋白质所处环境的 pH 值发生变化时会引起蛋白质本身所带电荷的变化。当蛋白质所处的环境 pH 值 > 等电点 (pI) 时, 带负电; 当环境的 pH 值 < pI 时带正电。凝集素的 pI 约在 5.5 ~ 6.0 之间, 因此采用 pH 值为 7.5 的磷酸缓冲液作为洗脱液, 选用阴离子交换层析法进行凝集素的分离。

将凝集素粗品溶液用水系膜除杂, 用 pH 值 7.5、0.05 mol/L PB 作为上样缓冲液, 紫外检测器检测平稳后开始工作。上样量为 3 mL, 经缓冲溶液洗脱获得第 1 个吸收峰。然后按照 NaCl 浓度 0.05、0.20、0.50 mol/L 的变化梯度进行梯度洗脱。各浓度梯度洗脱后得到的洗脱结果见图 6, 其中峰 1 为 PB 洗脱液直接洗脱获得的穿透峰, 峰 2 为添加 0.05 mol/L NaCl 的 PB 洗脱峰, 峰 3 为添加 0.20 mol/L NaCl 的 PB 洗脱峰, 峰 1 具有凝集能力, 其余的则不含有凝集素, 因此将经过洗脱后获得的峰 1 溶液保存备用。

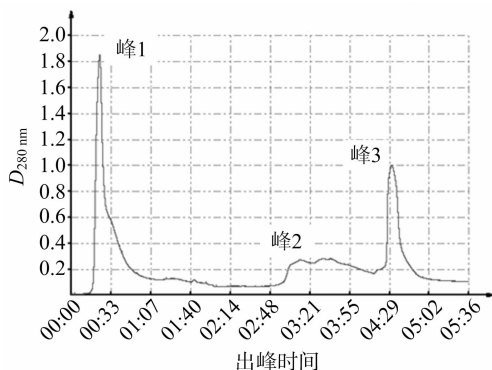


图6 DEAE A-50 梯度洗脱峰

2.2.5 Sephadex G-75 分子筛 分子筛层析是依据样品中物质分子的差别而进行分离的, 洗脱时分子量大的物质直接被冲洗下来, 而分子量小的在洗脱时会进入凝胶孔内增加运行的距离, 使得大分子量的先洗脱下来, 小分子量的后洗脱下来, 从而实现目标产物的分离。将 DEAE A-50 纯化后的溶液过水系膜后上 Sephadex G-75 分子筛柱。用 pH 值 7.5、0.05 mol/L PB 作为上样缓冲液, 上样量 5 mL。得到如图 7 所示的洗脱结果, 经红细胞检测表明, 该凝集素具有凝集活力。

2.2.6 SDS-PAGE 检测分析 通过对比标准分子量蛋白各条带对应的分子量, 得知目标蛋白的分子量大小在 30 ~ 40 ku (图 8)。

3 结论

用 Design-Expert 7.0 统计软件, 根据单因素试验和响应面分析试验对白芸豆凝集素提取工艺进行优化, 采用响应面法对白芸豆凝集素提取方法进行优化, 得到拟合方程: $Y = 411.13 + 7.19A + 41.65B - 31.21C - 3.69AB - 6.65AC - 39.71BC - 3.45A^2 - 106.41B^2 - 20.67C^2$, 以及提取最优条件: 料液比 1 g : 10 mL, pH 值 7.5 的 0.05 mol/L PB, 提取时间

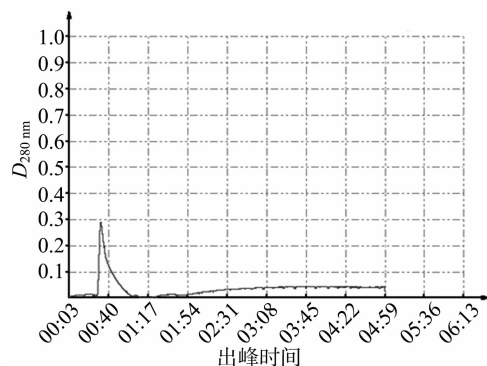
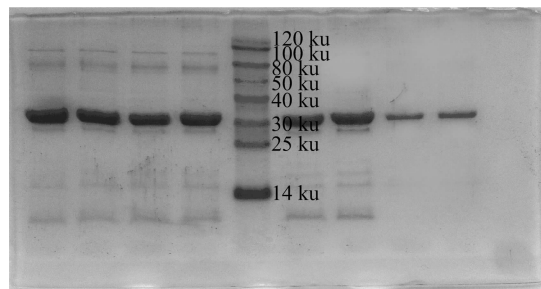


图7 Sephadex G-75 洗脱峰



从左往右计数, 第 1、2、3、4、6、7 点样孔—DEAE A-50 阴离子交换层析纯化后的样品; 第 5 点样孔—marker; 第 8、9 点样孔—经过 Sephadex G-75 纯化后的样品

图8 白芸豆凝集素样品的 SDS-PAGE 电泳结果

20 h, 白芸豆凝集素特异性活力为 1 193.62 HU/mg。白芸豆凝集素粗品, 经过 DEAE A-50、Sephadex G-75 分子筛及 SDS-PAGE 分析后表明, 初步分离产物中白芸豆凝集素的分子量在 30 ~ 40 ku, 含量较高。

参考文献:

- [1] 王克夷, 许强. 凝集素和毒素[J]. 生物化学与生物物理学报, 2002, 32(3): 201-205.
- [2] Lavelle E, Grant G, Pusztai A, et al. Mucosal immunogenicity of plant lectins in mice[J]. Immunology, 2000, 99(1): 30-37.
- [3] 罗德生, 顾熊飞, 马润泉. 凝集素研究进展[J]. 医学综述, 1996, 2(3): 119-121.
- [4] 孙册, 朱政, 莫汉庆. 凝集素[M]. 北京: 科学出版社, 1986: 1-52.
- [5] 柯佳颖, 陈寅山, 饶小珍. 凝集素及其生物学作用[J]. 宁德师专学报(自然科学版), 2005, 17(1): 19-22.
- [6] Sharon N, Lis H. Legume lectins—a large family of homologous proteins[J]. The FASEB Journal, 1990, 4(14): 3198-3208.
- [7] Branco A, Bernabé R, Dos Santos Ferreira B, et al. Expression and purification of the recombinant SALT lectin from rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Protein Expression and Purification, 2004, 33(1): 34-38.
- [8] Lannoo N, Verweken W, Proost P, et al. Expression of the nucleocytoplasmic tobacco lectin in the yeast *Pichia pastoris*[J]. Protein Expression and Purification, 2007, 53(2): 275-282.
- [9] Nomura K, Ashida H, Uemura N, et al. Purification and characterization of a mannose/glucose-specific lectin from *Castanea crenata*[J]. Phytochemistry, 1998, 49(3): 667-673.

岳有军,赵文佳,赵 辉,等. 基于多颜色通道组合的 UVI 空间农作物阴影去除方法[J]. 江苏农业科学,2017,45(6):196-200.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.06.051

基于多颜色通道组合的 UVI 空间农作物阴影去除方法

岳有军¹, 赵文佳¹, 赵 辉^{1,2}, 王红君¹

(1. 天津市复杂系统控制理论与应用重点实验室/天津理工大学, 天津 300384; 2. 天津农学院, 天津 300384)

摘要:为了有效地解决基于机器视觉的农业机器人在作业任务中受阴影对农作物识别造成的干扰问题,提出一种基于组合的颜色空间,通过较简单的分割方法可以在组合空间中消除阴影。该方法首先将 RGB 颜色空间下的图像转换到 LAB、YUV 和 HSI 中,获得图像在每个颜色空间中的分量;然后利用直方图、熵值、均方误差和峰值信噪比分析各颜色通道特性,选择合适的颜色通道进行组合。对组合颜色空间进行仿真数据分析,筛选出适合于农田环境下阴影去除的 UVI 空间。通过与包含阴影的不同颜色空间中的图像进行对比试验,说明颜色空间可以经较简单的算法实现图像中阴影的去除,证明该颜色空间对农田环境下阴影去除的有效性、抗干扰性。

关键词:颜色空间;阴影去除;熵值;峰值信噪比;直方图;均方误差

中图分类号:TN911.73 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)06-0196-05

基于视觉的农业机器人是当前农业机械化、精确化发展的趋势,其核心是对采集到的农田图像进行快速、准确的分析。在自然条件下,由于植株相互遮挡以及太阳入射角的影响,复杂的农田环境对采集图像常常产生很多干扰,阴影是农田环境下目标识别的主要干扰因素,使得农田中植株识别、颜色提取和阴影区杂草去除等作业任务困难化,从而降低图像中识别的准确性,同时影响机器人工作效率。因此,有必要对自然状态下获取的图像进行预处理、阴影检测并去除图像中的阴影^[1]。

针对环境中阴影干扰农作物识别的难题,国内外许多学者都进行了相关的研究。常见的阴影去除算法有基于某一颜色空间下,在该颜色空间下研究阴影区与其周围非阴影区的特性^[1],通过对这些特性进行分析,来达到消除阴影的目的。Finlayson 等提出了基于二维积分的阴影去除算法来获得消除

阴影的图像^[2-3],其优势在于很好地保留阴影区域的细节,有较好的视觉效果,但不足之处在于运算复杂度高,而且造成部分细节失真,导致人为干扰因素^[4]。部分学者通过阴影补偿方法,将图像中独立阴影区与周围的非阴影区进行区域匹配,来完成消除阴影^[5]。张华南等提出在单一 YUV 颜色空间下进行阴影检测与去除,在获得 Y 通道强度的情况下采用闭值法寻找阴影区域,对该区域光照强度补偿,然后返回 RGB 颜色空间中消除阴影^[6]。该方法没有去除阴影区的边缘效应,在目标识别中仍然存在干扰。张杰等认为阴影区与非阴影区像素点的 RGB 值之比是一个常量^[7],Barnard 等提出了基于颜色比率的阴影去除方法^[8-9],该算法虽然在阴影去除上得到一定的效果,但是由于其算法较复杂,在背景纹理复杂的情况下,容易造成识别错误。综合以上几种不同的方法,可以看出,针对图像中存在阴影去除问题取得了一定研究成果,但是仍然存在许多不足之处:算法复杂性、实时性差和阴影区域图像细节丢失等缺陷问题,所以有必要对阴影问题加深研究。

对于农田中阴影区域下的农作物的识别问题,本研究采用了一种简单的方法来实现去除阴影。该方法是将单一颜色空间下的图像转换到多颜色空间中,在不同颜色通道中获取图像特性;利用直方图、熵值、均方误差和峰值信噪比得到仿真数据来分析颜色通道特性,构造出适合农田场景下的阴影

收稿日期:2016-01-19

基金项目:天津市农业科技成果转化与推广项目(编号:201203060、201303080)。

作者简介:岳有军(1970—),男,天津人,博士,教授,硕士生导师,主要研究方向为智能控制。E-mail:bakeryue@tjut.edu.cn。

通信作者:赵文佳,硕士,主要研究方向为控制工程。E-mail:460614604@qq.com。

[10] Loris R, Hamelryck T, Bouckaert J, et al. Legume lectins tructure [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1988, 1383(1): 9-36.

[11] 李 锋, 王 竞, 赵晓军. 小白芸豆凝集素的分离纯化及性质研究[J]. 郑州大学学报(理学版), 2010, 42(1): 120-124.

[12] 徐维艳, 王卫东, 秦卫东. 花生蛋白的制备、功能性质及应用[J]. 食品科学, 2010, 31(17): 476-479.

[13] 魏鹏娟, 王鲁峰, 徐晓云, 等. α -淀粉酶蛋白类抑制剂的研究进展[J]. 食品科学, 2011, 32(9): 312-318.

[14] 赵 蓉, 李多伟, 沈晓东, 等. 白芸豆中 α -淀粉酶抑制剂的研究[J]. 中成药, 2008, 30(9): 1355-1357.

[15] 吕风霞, 陆兆新. α -淀粉酶抑制剂的研究进展[J]. 食品科学, 2002, 23(3): 152-155.

[16] 张晓琦, 杨明琰, 马 瑜, 等. 白豆 α -淀粉酶抑制剂糖蛋白的提取纯化及降血糖活性研究[J]. 药物生物技术, 2007, 14(6): 406-410.

[17] 王孝平, 邢树礼. 考马斯亮蓝法测定蛋白含量的研究[J]. 天津化工, 2009, 23(3): 40-42.

[18] 李笑梅. 菜豆凝集素提取方法的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(10): 263-266.

[19] 杨明亮, 王继安. 大豆凝集素含量测定及聚类分析[J]. 大豆科技, 2009(5): 20-23.

[20] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227(5259): 680-685.