

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2019.09.004

◇ 药学研究 ◇

化香树果序多糖脱蛋白工艺研究

张丽华¹, 刘裕¹, 赵鹏¹, 张婷婷¹, 杜永鹏²作者单位:¹陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046; ²咸阳市丽彩医药有限公司, 陕西 咸阳 712046

通信作者: 赵鹏, 男, 教授, 研究方向为天然药用活性成分分离纯化, E-mail: zhaopeng65@sina.com

基金项目: 陕西省自然科学基金(2019JM502); 陕西省中医管理局中医药科研课题(ZYPT012); 陕西省教育厅自然专项(14JK1194); 陕西省教育厅重点实验室项目(14JS024)

摘要: **目的** 应用木瓜蛋白酶法脱除化香树果序多糖中蛋白, 探究最佳工艺条件。 **方法** 通过对酶用量、酶作用时间、酶作用温度及pH值四个单因素考察, 采用响应面优化法试验分析。 **结果** 最佳工艺条件, 木瓜蛋白酶用量 1.508%, 温度 65 ℃, 酶解时间 92.3 min, pH=7.0, 多糖蛋白脱除率为 90.90%, 多糖保留率为 84.06%。 **结论** 木瓜蛋白酶法是一种较优的多糖脱除蛋白方法。

关键词: 化香树果序; 多糖; 木瓜蛋白酶; 脱蛋白

Study on deproteinization of polysaccharides from *Platycarya strobilacea* Sieb.et Zucc

ZHANG Lihua¹, LIU Yu¹, ZHAO Peng¹, ZHANG Tingting¹, DU Yongpeng²

Author Affiliations: ¹School of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang, Shaanxi 712046, China; ²Xianyang Li Cai Pharmaceutical co., LTD, Xianyang, Shaanxi 712046, China

Abstract: **Objective** To screen the optimum method for deproteinization of *Platycarya strobilacea* Sieb.et Zucc polysaccharides. **Methods** In this study, the optimum conditions for deproteinized papain were studied by four single factors, enzyme dosage, enzyme action time, enzyme temperature and pH, and response surface optimization and orthogonal experiment. **Results** The optimum process condition was that the papain 1.508%, 65 ℃, 92.3 min, and pH=7. The rate of the removal from polysaccharides protein was maximum, which was 90.90%, and the retention rate of polysaccharides was excellent, which was 84.06%. **Conclusion** The papain-deproteinization method was the best for protein removal from *Platycarya strobilacea* Sieb.et Zucc polysaccharides.

Key words: *Platycarya strobilacea* Sieb.et Zucc; Polysaccharides; Papain; Deproteinization

化香树为胡桃科植物, 药用部位为其干燥果序, 具有清热燥湿, 消肿散瘀, 止痒杀虫等功效^[1-4]。通过相关文献报道和临床实验表明, 化香树果序中的多糖成分具有较好的抗氧化活性^[5]。

多糖是由 10 个以上的单糖经过糖苷键连接而成的糖链。它是中药中普遍存在的一种成分, 具备免疫调节、抗肿瘤抗癌、降血糖血脂、抗衰老、抗辐射等药理作用, 其中免疫促进作用是最重要的^[6]。基于多糖在临床疾病方面的广泛应用和作为美容食品、化妆品、保健品的有效成分, 因而多糖具备较大的开发利用价值。

但在对提取的多糖进行药理活性研究时, 发现多糖中蛋白质对药理活性的研究影响较大, 因此对得到的粗多糖进行除蛋白处理就非常必要而且关键^[7-8]。酶法是以酶为催化剂使多糖溶液中的蛋白质发生反应从而达到去除蛋白的作用, 所以此方法

脱蛋白效果较好。同时, 由于酶专一性较高, 该酶不会与多糖发生结合, 多糖保留率较高, 所以, 该法为效果较好的多糖蛋白脱除方法^[9-11]。因此, 本实验自 2018 年 1—4 月通过对木瓜蛋白酶脱除过程中的酶作用条件进行了重点研究, 最终筛选确定了化香树果序多糖脱蛋白的最佳工艺路线, 并通过响应面法优化筛选出了其最优的蛋白脱除条件, 为化香树果序多糖的进一步应用研究做了贡献。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 材料: 化香树果序粗多糖(通过本实验室制得, 含量 46.65%), 三氯甲烷(AR)、正丁醇(AR)、小牛血清白蛋白(AR)、考马斯亮蓝(AR)、浓硫酸(AR)、木瓜蛋白酶(活力单位 > 4 万 U/g, 北京鼎国生物技术有限责任公司)。

仪器: HHS 恒温水浴锅(巩义予华仪器厂); AL204 型分析天平(梅特勒-托利多仪器(上海))

有限公司); UV-265 型紫外分光光度计(日本岛津公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 蛋白质标准曲线的绘制 本实验采用考马斯亮蓝染色法,此方法的原理是考马斯亮蓝 G-250 染料在游离状态为红色,当它与蛋白质结合后则呈现蓝色,在一定浓度范围内蛋白质的浓度和溶液在 595 nm 波长下的吸光度呈正比^[10]。将 100 mg 考马斯亮蓝 G-250 溶解于 50 mL 95% 乙醇中并搅拌均匀,在向其中加入 100 mL 85%(W/V)磷酸溶液,加蒸馏水至 1 000 mL 刻度线处进行定容。取 10 mg 牛血清白蛋白加一定的蒸馏水,用容量瓶配制成 0.1 mg/mL 的标准蛋白质溶液。取 6 支具塞试管,分别移入标准液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 配制成不同浓度的 6 管溶液,定容至 2 mL,再加入 5 mL 考马斯亮蓝 G-250 显色剂,充分振荡混合均匀后静置显色 2 min,用比色法将空白溶液作为对照组,在波长 595 nm 处测定各管溶液的吸光度,测定应在 1 h 内完成。以牛血清白蛋白含量为 x 轴,以吸光度为 y 轴,拟合得标准曲线方程: $y = 6.5986x + 0.0132$, $R^2 = 0.9982$,呈良好的线性关系。

1.2.2 蛋白质浓度^[10]的测定 准确配制 5 mg/mL 的多糖溶液,取两只具塞试管,第一管中加入 1.0 mL 多糖溶液,在第二管管中加入 1.0 mL 蒸馏水,并分别取考马斯亮蓝 5.0 mL 加入两管中,振荡摇匀,静置显色 2 min,在 595 nm 处以第二管溶液为对照组调零,测第一管溶液吸光度,根据上述所得标准曲线求得该多糖中蛋白的浓度 $C_{前}$ 。蛋白脱除率的计算:

$$\text{蛋白脱除率}(\%) = \frac{(C_{前} - C_{后})}{C_{前}} \times 100\%$$

式中: $C_{前}$:为多糖脱蛋白前蛋白质的浓度; $C_{后}$:为多糖脱蛋白后蛋白质的浓度。

1.2.3 化香树果序多糖保留率计算 应用苯酚-硫酸法^[10]测定多糖含量,化香树果序多糖的保留率计算:

$$\text{多糖保留率}(\%) = \frac{M_{后}}{M_{前}} \times 100\%$$

式中: $M_{前}$:为多糖脱蛋白前多糖的含量; $M_{后}$:为多糖脱蛋白后多糖的含量。

1.3 统计学方法 响应面分析方法^[12]是目前经常采用的一种试验设计方法。通过合理的试验设计进行试验,并对试验得到的数据,应用 Design-Expert v7.1.3 软件,进行多元二次回归方程数据拟合,绘制响应曲面和等高线图,分析预测得到较优工艺参数。Design-Expert v7.1.3 软件是专业响应面分析软件,能够大大地减少所需要的实验次数,提高实

验效率。响应面法相对于正交试验法,精密度高、预测值接近真实值,结果更加合理、可靠。

2 结果

2.1 木瓜蛋白酶法脱蛋白

2.1.1 酶用量 分别将 0.5%、1%、1.5%、2%、2.5% (酶底比)的木瓜蛋白酶加入到预先准备好的 5 支含 1 mL 化香树果序粗多糖溶液的试管中,放在水浴锅中,设置温度为 50 ℃,在 pH 值为 7.0 条件下,保温 1 h,3 000 r/min 离心 5 min,倾倒入上层脱蛋白的多糖溶液。实验结果如图 1 所示。

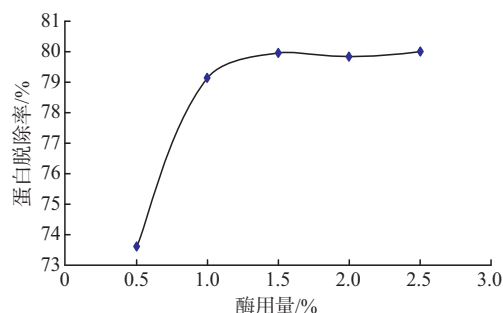


图1 酶用量对蛋白脱除率的影响情况

根据图 1 可知,当酶用量增大时,蛋白脱除率随之而迅速增大;当酶用量达到 1.5% 时,蛋白脱除率达到最大值 80%,之后慢慢趋于稳定,则说明酶用量为 1.5% 时蛋白脱除率较佳。

2.1.2 酶解时间 将 1.5% (酶底比)的木瓜蛋白酶加入到预先准备好的 5 支含 1 mL 化香树果序粗多糖溶液的试管中,放在 50 ℃ 水浴锅中,在 pH 值为 7.0 条件下,保温并依次放置 30、60、90、120、150 min,然后以 3 000 r/min 离心 5 min,倾倒入上层脱蛋白的多糖溶液。实验结果如图 2 所示。

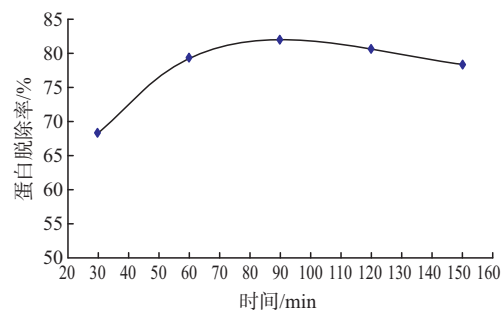


图2 酶解时间对蛋白脱除率的影响情况

由图 2 可知,蛋白脱除率随酶解时间的不断增大,蛋白脱除率逐渐上升,在 90 min 时蛋白脱除率达到最大,之后又随酶解时间的增加而逐渐减小,因此,酶解时间 90 min 为较佳时间。

2.1.3 酶解温度 将 1.5% (酶底比)的木瓜蛋白酶加入到预先准备好的 5 支含 1 mL 化香树果序粗多糖溶液的试管中,分别放在 40、50、60、70、80 ℃ 水浴

锅中,在pH值为7.0条件下,保温放置90 min,然后以3 000 r/min离心5 min,倾出上层脱蛋白的多糖溶液。实验结果如图3所示。

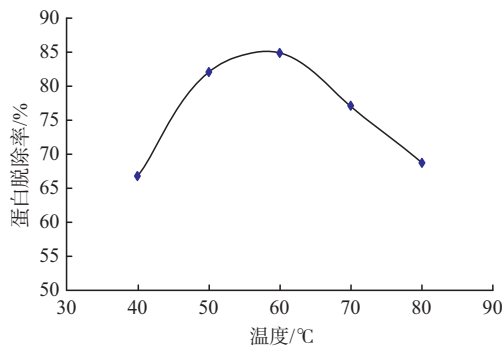


图3 酶解温度对蛋白脱除率的影响

从图3可以看出,温度在40℃到60℃之间时,蛋白脱除率随温度的升高逐渐增大;当达到60℃时,蛋白脱除率达到最大;温度在60℃到80℃之间又随温度的升高而降低。因而,酶解温度60℃为较佳温度。

2.1.4 pH值 将1.5%(酶底比)的木瓜蛋白酶加入到预先准备好的5支含1 mL化香树果序粗多糖溶液的试管中,放在60℃水浴锅中,分别在pH值为5.0、6.0、7.0、8.0、9.0条件下,保温放置90 min,然后以3 000 r/min离心5 min,倾出上层脱蛋白的多糖溶液。实验结果如图4所示。

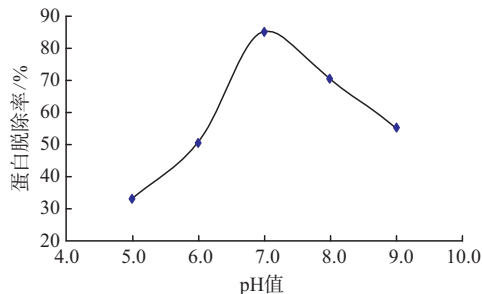


图4 pH值对蛋白脱除率的影响

由图4中可知,当在中性环境时,蛋白脱除效果较好,在酸性和碱性环境时,蛋白脱除效果较差,因此需在中性环境条件下对多糖溶液进行酶解处理。

2.2 响应面 由上述实验可知,木瓜蛋白酶适宜环境是中性,因此在进行响应面优化试验时固定pH值为7.0,以蛋白脱除率为指标,使用酶用量、酶解时间、温度3种因素进行15次试验。响应面因素与水平设计见表1,响应面分析方案见表2。

根据Design-Expert v7.1.3软件拟合得到回归方程为:

$$Y = 90.90 + 0.046A + 3.61B + 0.71C + 0.58AB + 2.81AC - 0.67BC - 5.01A^2 - 3.77B^2 - 4.30C^2$$

2.2.1 响应值结果及其拟合模型 根据表3的分析结果可知,通过Design-Expert v7.1.3软件拟合得到

表1 响应面分析因素与水平

因素	水平		
	-1	0	1
A 酶用量 $X_1/\%$	1.0	1.5	2.0
B 温度 $X_2/^\circ\text{C}$	55	60	65
C 酶解时间 X_3/min	80	90	100

表2 Box-Behnken设计方案及响应值

试验序号	A	B	C	蛋白脱除率/%
1	-1	1	0	81.00
2	-1	-1	1	77.80
3	0	-1	1	78.16
4	-1	0	1	77.98
5	1	0	0	86.71
6	1	1	-1	86.53
7	0	-1	-1	84.04
8	1	0	0	85.11
9	1	-1	-1	86.00
10	-1	0	0	78.69
11	0	0	1	90.98
12	0	1	0	84.76
13	0	0	0	90.77
14	0	0	-1	90.94
15	0	1	0	79.41

的模型显著水平远远小于0.05($P < 0.000\ 1$),说明该模型是有统计学意义的,从失拟性检验结果来看,失拟误差并不显著($P = 0.094\ 8$),这说明实验中的未知因素对于试验结果影响不大,预测的回归模型与实际实验结果拟合效果较好。由于预测模型的 $R^2 = 0.997\ 2$,说明蛋白脱除率的实验值与预测值之间的存在着良好的一致性,该模型的变异系数 $CV = 0.51\% < 5\%$,校正系数 $R^2_{\text{Adj}} = 0.992\ 3$,这说明预测的模型可以反映响应值为99.23%的变化,因此通过回归方程能够预测试验的最佳工艺。通过表3方差分析结果可知,各单因素中,影响化香树果序多糖蛋白脱除率最大的是反应温度,其次是时间,其中最不显著的是酶的加入量,酶用量与时间之间的交互影响最为显著。

表3 方差分析表

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	328.33	9	36.48	200.83	<0.000 1
X_1	0.017	1	0.017	0.094	0.771 3
X_2	104.26	1	104.26	573.95	<0.000 1
X_3	4.08	1	4.08	22.44	0.005 2
X_1X_2	1.33	1	1.33	7.34	0.042 3
X_1X_3	31.47	1	31.47	173.26	<0.000 1
X_2X_3	1.78	1	1.78	9.81	0.025 9
X_1^2	92.62	1	92.62	509.86	<0.000 1
X_2^2	52.36	1	52.36	288.26	<0.000 1
X_3^2	68.22	1	68.22	375.55	<0.000 1
残差	0.91	5	0.18		
失拟误差	0.88	3	0.29	23.68	0.094 8
纯误差	0.025	2	0.012		
总和	329.24	14			

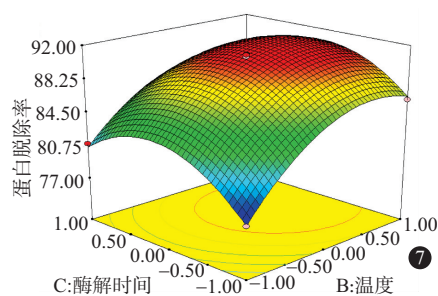
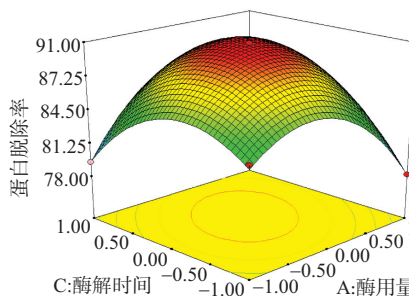
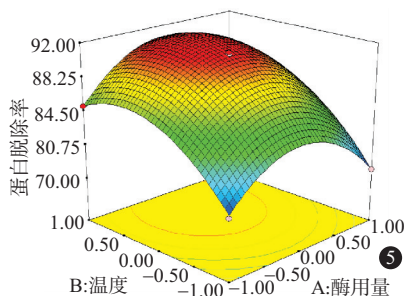


图5 酶用量和温度对蛋白脱除率的交互影响 图6 时间和酶用量对蛋白脱除率的交互影响 图7 时间和温度对蛋白脱除率的交互影响

2.2.2 响应面图分析 根据图5~7分析可知:酶解温度对蛋白脱除效果的影响较大,曲线变化趋势较陡;而酶解时间和酶用量对蛋白脱除效果的影响较小,曲线变化趋势平缓。对回归模型方程求一阶偏导: $X_1 = 0.016, X_2 = 0.951, X_3 = 0.23$ ^[13-14],然后将三个数值带入回归方程,则可计算得到:在酶用量1.508%,酶解温度64.76℃,酶解时间92.3 min时,蛋白脱除率为90.82%。

2.2.3 优化条件重复验证试验 为了便于实验,将脱蛋白的条件设定为:酶用量1.508%,温度65℃,酶解时间92.3 min, pH=7.0进行3次重复验证试验,试验结果如表4所示。

表4 验证试验结果/%

试验次数	蛋白脱除率	多糖保留率
1	90.78	84.21
2	90.98	83.95
3	90.93	84.02
平均值	90.90	84.06

从表4可以看出,蛋白脱除率和多糖保留率在酶用量1.508%,酶解温度64.76℃,酶解时间92.3 min条件下均较高,化香树果序多糖脱蛋白试验重现性较高。

3 结论

研究发现,多糖中的蛋白往往会影响到多糖的活性,其是以结合或者游离态存在,对多糖的脱蛋白纯化工作,均是为了去游离蛋白质而不破坏结合蛋白质,所以确定脱蛋白工艺路线时,一方面要尽可能得除去游离蛋白质,另一方面也要尽可能地减少多糖-蛋白质类复合物、多糖大分子的降解。目前应用较多的脱蛋白工艺是反复应用Sevage法,该工艺最大的缺点就是多糖保留率低、费时和溶剂量大;也有人采用三氯乙酸和盐酸法等工艺,其蛋白脱除率很高,但多糖在酸性环境下容易发生降解,因此其应用受到了一定的限制。相对而言酶法脱蛋白工艺具有条件温和,蛋白脱除率较高等优点引

起了研究者的兴趣。本研究经过对比上述几种多糖蛋白的脱除工艺之后,最终选择应用木瓜蛋白酶工艺,并通过响应面法确定了其最佳脱蛋白条件为:在酶用量1.508%,温度65℃,酶解时间92.3 min, pH=7.0的条件下,化香树果序多糖蛋白脱除率是90.90%,多糖保留率是84.06%。对进一步加深对化香树果序多糖的研究具有一定的意义。

参考文献

- [1] 徐曼,汪咏梅,张亮亮,等.响应面法优化化香树果序提取物的提取条件研究[J].林产化学与工业,2013,33(5):71-76.
- [2] 邓焱,李欣,邵萌,等.化香树果序挥发油的气相色谱-质谱联用分析及体外抗肿瘤活性研究[J].中医药导报,2013,19(11):80-82.
- [3] 李冬,李稳宏,康媛媛,等.化香树果序总黄酮提取动力学研究[J].天然产物研究与开发,2011,23(4):689-692,708.
- [4] 邱博韬,张鸿宇,许志茹,等.多糖分析方法研究进展[J].食品工业科技,2018,39(6):327-333.
- [5] 张淑杰,康玉凡.天然活性多糖研究进展[J].食品工业科技,2017,38(2):379-382.
- [6] 谢明勇,殷军艺,聂少平.天然产物来源多糖结构解析研究进展[J].中国食品学报,2017,17(2):1-19.
- [7] 胡会刚,赵巧丽,庞振才,等.芒果皮渣多糖脱蛋白和脱色工艺研究[J].食品工业科技,2018,39(3):183-188.
- [8] 于晓红,吴宪玲,付薇,等.西洋参多糖脱色脱蛋白方法研究[J].中国食品学报,2017,17(11):145-149.
- [9] 杜宝香,王朋展,蒋海强,等.半夏多糖脱蛋白工艺研究[J].中国食品学报,2018,45(3):108-110.
- [10] 赵鹏,张丽华,李小蓉,等.二色补血草多糖脱蛋白工艺研究[J].医药导报,2011,30(10):1328-1332.
- [11] 宋道,赵鹏,段玺,等.穿山龙多糖脱蛋白工艺研究[J].中药材,2016,39(5):1110-1113.
- [12] 赵鹏,张婷婷,宋道.二色补血草多糖的羧甲基化工艺研究[J].中药材,2014,37(8):1474-1478.
- [13] 陈肖东,苏峰,毕东辉,等.Plackett-Burman设计联用星点设计-效应面法优化双丙戊酸钠缓释片处方[J].安徽医药,2015,19(4):621-626.
- [14] 宋道,赵鹏,张丽华,等.响应面优化酶法提取款冬花多糖工艺研究[J].安徽医药,2016,20(12):2230-2233.

(收稿日期:2018-05-18,修回日期:2018-07-20)