

蛋白酶-Sevag 法去除木瓜总多糖中蛋白质的工艺优选

王光宁*, 麦咏相, 李炳锋
(广东药学院中药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的: 优选蛋白酶-Sevag 法去除木瓜总多糖中蛋白质的工艺条件。方法: 以总多糖保留率和蛋白脱除率为评价指标, 通过单因素试验考察酶解 pH 和 Sevag 法处理次数对去除工艺的影响, 利用星点设计-效应面法考察酶底质量分数、酶解时间及温度对酶解工艺的影响。采用 UV 测定蛋白质含量, 检测波长 280 nm。结果: 最佳工艺条件为酶解 pH 7, 时间 89 min, 温度 54 ℃, 酶底质量分数 1.70%, Sevag 法处理数 1 次; 总多糖保留率 70.04%, 蛋白脱除率 63.42%, 与预测值的偏差分别为 1.42% 和 0.17%。结论: 优选的工艺条件预测性良好, 在有效去除蛋白的同时可尽可能地避免总多糖的损失, 减少有机溶剂的使用次数。

[关键词] 木瓜总多糖; 蛋白酶-Sevag 法; 星点设计-效应面法; 总多糖保留率; 蛋白脱除率
[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)15-0049-05
[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014150049

Optimization of Protein Removal Technology for Total Polysaccharides in Chaenomelis Fructus by Papain Enzyme-Sevag Method

WANG Guang-ning*, MAI Yong-xiang, LI Bing-feng

(School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize technology conditions of protein removal from total polysaccharides in Chaenomelis Fructus by papain enzyme-Sevag method. **Method:** Taking ratios of total polysaccharides retention and proteins removal as indexes, central composite design-response surface methodology was used to optimize technology conditions of enzymatic hydrolysis with enzyme concentration, hydrolysis time and temperature as independent variables, single factor experiments were adopted to optimize pH and number of Sevag. The content of proteins was determined by UV, detection wavelength was set at 280 nm. **Result:** Optimal technology conditions were hydrolysis pH 7, the mass fraction of enzyme substrates 1.70%, hydrolysis temperature at 54 ℃, hydrolysis time 89 min, treatment once of Sevag. Under these conditions, ratios of total polysaccharides retention and proteins removal were 70.04% and 63.42%, whose deviations were 1.42% and 0.17% by comparing with their predicted values, respectively. **Conclusion:** This optimized had highly predictive, it could effectively remove proteins, at the same time, avoid loss of total polysaccharides as much as possible, reduce use of organic solvents.

[Key words] total polysaccharides from Chaenomelis Fructus; papain enzyme-Sevag method; central composite design-response surface methodology; retention rate of total polysaccharides; removal rate of proteins

木瓜习称皱皮木瓜, 性温、味酸, 归肝、脾经, 功效舒筋活络、和胃化湿, 主要用于治疗风湿性关节炎, 化学成分包括萜类、多糖类、有机酸、黄酮类

等^[1]。其中多糖类成分具有减轻佐剂型关节炎大鼠关节肿胀和疼痛、多发性关节炎程度及抗氧化作用^[2]。

[收稿日期] 20140508(002)

[通讯作者] *王光宁, 硕士, 讲师, 从事中药炮制及复方研究, Tel: 020-39352169, E-mail: wgnim@sina.com

多糖类成分提取后杂质较多,其纯度高低会直接影响后续结构分析、药理活性及构效关系研究的准确性,需精制后才可进行后续研究。目前有关木瓜总多糖提取工艺的研究较多^[3-4],但纯化工工艺的研究尚未见报道。本实验在前期研究基础上,选择蛋白酶-Sevag 法去除木瓜总多糖中蛋白质,采用星点设计-效应面法优选酶解工艺条件,为木瓜总多糖的精制及后续结构鉴定提供参考。

1 材料

UV-2450 型紫外-可见分光光度计(日本岛津), YP1002N 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司), TDL80-2B 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂), UPH-II-100L 型超纯水机(西安优普仪器有限公司)。

木瓜药材购自广州市中芝源有限公司(批号 131101),产地四川,经广东药学院中药学院中药资源系李书渊教授鉴定为蔷薇科植物贴梗海棠 *Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai 干燥近成熟果实;牛血清蛋白(国药集团化学试剂有限公司,批号 20120320), *D*-无水葡萄糖对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110833-201205),木瓜蛋白酶(上海阿拉丁试剂有限公司,批号 C1216032),考马斯亮蓝 G250(上海蓝季科技发展有限公司),试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 试液的制备

2.1.1 DNS 试液 称取苯酚 2.3 g 溶于 10% 氢氧化钠溶液(5 mL)中,加水稀释至 23 mL,加入亚硫酸氢钠 2.3 g 溶解,得甲液;称取酒石酸钾钠 85 g 加入 100 mL 氢氧化钠溶液中,加入 1% 3,5-二硝基水杨酸溶液 293 mL,混匀,得乙液;将甲液与乙液相混合,得黄色溶液,贮存于棕色瓶中,室温下于阴暗处放置 7 d 后使用。

2.1.2 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲液 称取磷酸二氢钠 8.34 g 和磷酸氢二钠 0.87 g,加水溶解至 1 L,即得。

2.1.3 木瓜蛋白酶溶液 称取木瓜蛋白酶 1 g,加磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲液溶解并定容至 100 mL,即得。

2.2 粗多糖的提取 取木瓜药材于 60 °C 干燥后粉碎,取 40 ~ 60 目的粉末备用。取木瓜粉末适量,加 10 倍量乙醇浸泡 30 min,回流提取 2 次(2, 1.5 h),滤过,弃滤液,残渣分别用无水乙醇、丙酮、石油醚 25 mL 洗涤 3 次,挥干溶剂于 50 °C 烘干。精密称取

脱脂后的木瓜粗粉,加 50 倍量水提取 2 次(2, 1.5 h),滤过,合并滤液并浓缩至 100 mL。浓缩液冷却后加乙醇使含醇量达 80%,静置过夜,抽滤,沉淀于 60 °C 真空干燥,得木瓜粗多糖。精密称定木瓜粗多糖适量,加水溶解并定容至 15 g·L⁻¹,摇匀,备用。

2.3 总多糖的含量测定 采用 DNS 测定。精密量取粗多糖溶液 5 mL 至 10 mL 量瓶中,加酚酞指示液 1 滴,用 10% 氢氧化钠溶液调至微红色,加水至刻度,摇匀,即得还原糖溶液。精密量取粗多糖溶液 1 mL 置于 10 mL 量瓶中,加水 1 mL 和 6 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 2 mL,沸水浴加热 30 min,冷却后加酚酞指示液 1 滴,用 10% 氢氧化钠溶液调至微红色,滤过并转移至 25 mL 量瓶中,加水定容至刻度,摇匀,即得总糖溶液。精密量取总糖溶液和还原糖溶液各 1 mL,分别置于试管中,各加水至 2.5 mL,精密加入 DNS 试液 2 mL,混匀,沸水浴加热 10 min,取出,立即用冰水浴冷却至室温,将总糖溶液和还原糖溶液分别转移至 25 mL 量瓶中,以试剂为空白对照,于 490 nm 处测定总糖与还原糖的吸光度(*A*),总糖含量减去还原糖含量即为总多糖含量。以葡萄糖为对照品,得回归方程 $Y = 50.738X - 0.1541$ ($R^2 = 0.9998$),方法学考察符合要求。

2.4 蛋白质的含量测定 精密称取牛血清蛋白适量,加水溶解并定容至 0.2 g·L⁻¹。取总多糖溶液与蛋白质标准溶液分别于 200 ~ 800 nm 扫描,结果发现二者均在 280 nm 处有最大吸收,故确定检测波长 280 nm。得回归方程 $Y = 6.1096X + 0.0138$ ($R^2 = 0.9996$),方法学考察符合要求。

2.5 除蛋白工艺考察

2.5.1 酶解 pH 考察 量取 2.2 项下粗多糖溶液 10 mL,共 5 份,加 10% 氢氧化钠溶液和 6 mol·L⁻¹ 盐酸溶液调节 pH 分别为 5, 6, 7, 8, 9,各加入木瓜蛋白酶溶液使酶底质量分数为 2%,于 60 °C 反应 4 h,于 100 °C 杀酶 10 min,离心(3 500 r·min⁻¹, 15 min,下同),取上清液,加水补足至原体积,加入乙醇使含醇量达 80%,静置过夜,抽滤,沉淀用 80% 乙醇反复洗涤,用水复溶至原体积,测定总多糖和蛋白质的含量,计算总多糖保留率和蛋白脱除率。结果显示总多糖保留率在 pH 5 ~ 7 变化不大,在 pH 7 ~ 9 呈降低趋势;蛋白脱除率整体变化不明显,随 pH 增大先略降低之后增大;结合试验操作的可行性,选取木瓜蛋白酶的酶解 pH 7。

2.5.2 星点设计-效应面法考察酶解工艺 选择酶底质量分数、酶解时间及酶解温度为自变量,以木瓜

总多糖保留率和蛋白脱除率为响应值,量取 2.2 项下粗多糖溶液 10 mL,共 20 份,采取星点设计-效应面法优选蛋白酶-Sevag 法去除木瓜总多糖中蛋白质的工艺条件,因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2。

表 1 蛋白酶-Sevag 法去除木瓜总多糖中蛋白质工艺星点试验因素水平

编码水平	X_1	X_2	X_3
	酶底质量分数/%	酶解时间/min	酶解温度/°C
-1.732	1.50	60.00	50.00
-1	1.70	74.19	54.05
0	2.00	95.00	60.00
1	2.30	115.81	65.95
1.732	2.50	130.00	70.00

表 2 蛋白酶-Sevag 法去除木瓜总多糖中蛋白质工艺星点试验安排

No.	X_1	X_2	X_3	总多糖保留率 蛋白脱除率	
				(Y_1)	(Y_2)
1	1	-1	-1	66.44	44.84
2	0	0	1.732	65.78	53.90
3	1	1	1	71.00	43.77
4	1	-1	1	58.64	48.37
5	0	-1.732	0	57.02	50.21
6	-1	1	1	50.63	47.76
7	1.732	0	0	53.20	47.76
8	0	1.732	0	52.54	47.45
9	1	1	-1	76.29	48.83
10	-1	-1	-1	73.28	47.60
11	0	0	-1.732	64.96	52.52
12	-1	1	-1	70.70	48.53
13	-1.732	0	0	57.83	52.82
14	-1	-1	1	62.47	45.30
15~20	0	0	0	56.87	50.04

注:15~20 号为平行试验,结果取平均值。

采用 Design-Expert 8.0.5 软件处理表 2 中试验数据,建立总多糖保留率与各自变量的多元二次响应面回归模型 $Y_1 = 0.57 - 0.014X_1 - 0.013X_2 + 0.002X_3 + 0.046X_1X_2 + 0.022X_1X_3 - 0.008X_2X_3 - 0.005X_1^2 - 0.007X_2^2 + 0.030X_3^2 + 0.015X_1X_2X_3 + 0.023X_1^2X_2 - 0.057X_1^2X_3 + 0.033X_1X_2^2 + 0.075X_1^2X_2^2$ ($R^2 = 0.9911$),模型的 $P < 0.0001$,方差分析见表 3,结果显示除 X_3 和 X_1^2 外,各自变量的一次项和二次项及交互项均具有(极)显著性差异,

说明各自变量对效应值不是简单的线性关系,建立的多元二次回归模型拟合度较好,响应面分析见图 1~3。

表 3 总多糖保留率回归方程方差分析

方差来源	f	SS	MS	F	P
模型	14	0.1022	0.0073	151.5441	<0.0001
X_1	1	0.0011	0.0011	22.2436	0.0053
X_2	1	0.0010	0.0010	20.8257	0.0060
X_3	1	3.362×10^{-5}	3.362×10^{-5}	0.6977	0.4416
X_1X_2	1	0.0168	0.0168	348.0623	<0.0001
X_1X_3	1	0.0040	0.0040	82.0985	0.0003
X_2X_3	1	0.0006	0.0006	11.8193	0.0185
X_1^2	1	0.0003	0.0003	5.7435	0.0619
X_2^2	1	0.0007	0.0007	13.6408	0.0141
X_3^2	1	0.0108	0.0108	224.7303	<0.0001
$X_1X_2X_3$	1	0.0017	0.0017	35.9365	0.0019
$X_1^2X_2$	1	0.0018	0.0018	36.5577	0.0018
$X_1^2X_3$	1	0.0109	0.0109	226.5775	<0.0001
$X_1X_2^2$	1	0.0036	0.0036	74.3339	0.0003
$X_1^2X_2^2$	1	0.0181	0.0181	375.2294	<0.0001
纯误差	5	0.0002	4.82×10^{-5}		
总和	19	0.1025			

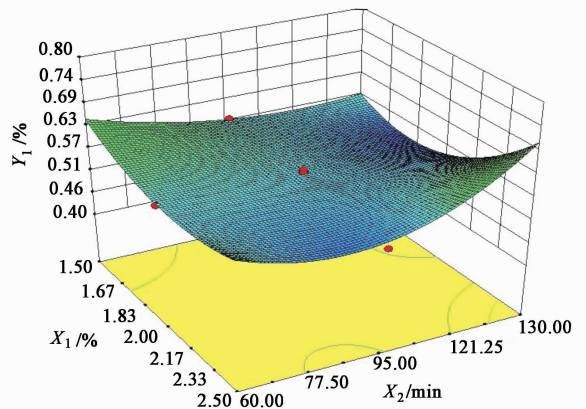


图 1 酶底质量分数-酶解时间对木瓜总多糖保留率的效应曲面

由图 1 可知,随着酶解时间和酶底质量分数的增大,总多糖保留率均呈先下降后上升的趋势。由图 2 可知,随着酶解温度的上升,总多糖保留率呈略微下降的趋势;在温度较高时,总多糖保留率随酶底质量分数的增加而上升,温度较低时呈先下降后上升的趋势,总体而言温度较低时的总多糖保留率高于温度较高时的。由图 3 可知,随着酶解温度上升,总多糖保留率呈减少趋势;随着酶解时间的增加,总

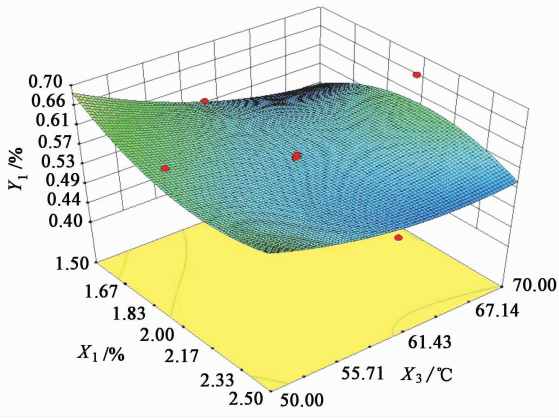


图 2 酶底质量分数-酶解温度对木瓜总多糖保留率的效应曲面

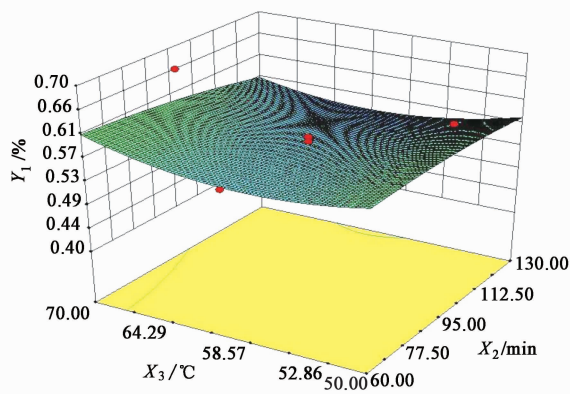


图 3 酶解时间-酶解温度对木瓜总多糖保留率的效应曲面

多糖保留率呈先下降后上升的趋势。总体上在酶底质量分数较高、温度较低、反应时间较长的情况下,总多糖保留率较高。

采用 Design-Expert 8.0.5 软件处理表 2 中试验数据,建立蛋白脱除率与各自变量的多元二次响应面回归模型 $Y_2 = 0.50 - 0.015X_1 - 0.008X_2 + 0.004X_3 - 0.005X_1X_2 + 0.002X_1X_3 - 0.008X_2X_3 + 0.0009X_1^2 - 0.004X_2^2 + 0.011X_3^2 - 0.013X_1X_2X_3 + 0.012X_1X_1^2X_2 - 0.0099X_1X_2^2 - 0.039X_1^2X_2^2$, 模型调整后 $R^2 = 0.9415$, $P = 0.0014$, 方差分析见表 4。结果发现 $X_1, X_2, X_2X_3, X_3^2, X_1X_2X_3, X_1^2X_2, X_1^2X_3, X_1^2X_2^2, X_1X_2^2$ 均具有(极)显著性差异,说明各自变量对效应值不是简单的线性关系,建立的多元二次回归模型拟合度较好,响应面分析见图 4~6。

由图 4 可知,温度处于中间水平时蛋白脱除率随时间和酶底质量分数的增加呈先升高后降低的趋势。由图 5 可知,随着酶底质量分数的降低,蛋白脱除率呈增加趋势。由图 6 可知,随着酶解温度的升

表 4 蛋白脱除率回归方程方差分析

方差来源	<i>f</i>	SS	MS	<i>F</i>	<i>P</i>
模型	14	0.013 0	0.000 9	22.860 0	0.001 4
X_1	1	0.001 3	0.001 3	32.691 9	0.002 3
X_2	1	0.000 4	0.000 4	9.726 5	0.026 3
X_3	1	9.522×10^{-5}	9.522×10^{-5}	2.431 6	0.179 7
X_1X_2	1	0.000 2	0.000 2	5.107 4	0.073 4
X_1X_3	1	2.965×10^{-5}	2.965×10^{-5}	0.757 0	0.424 0
X_2X_3	1	0.000 6	0.000 6	15.910 7	0.010 4
X_1^2	1	9.754×10^{-6}	9.754×10^{-6}	0.249 1	0.638 9
X_2^2	1	0.000 2	0.000 2	5.562 0	0.064 9
X_3^2	1	0.001 5	0.001 5	38.614 2	0.001 6
$X_1X_2X_3$	1	0.001 3	0.001 3	32.691 9	0.002 3
$X_1^2X_2$	1	0.000 5	0.000 5	11.545 4	0.019 3
$X_1^2X_3$	1	0.000 3	0.000 3	8.214 8	0.035 2
$X_1X_2^2$	1	0.000 4	0.000 4	9.904 1	0.025 5
$X_1^2X_2^2$	1	0.005 0	0.005 0	127.035 6	<0.000 1
纯误差	5	0.000 2	3.82×10^{-5}		
总和	19	0.012 7			

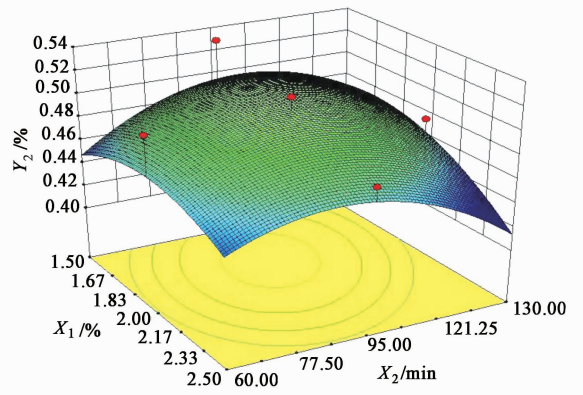


图 4 酶底质量分数-酶解时间对木瓜蛋白脱除率的效应曲面

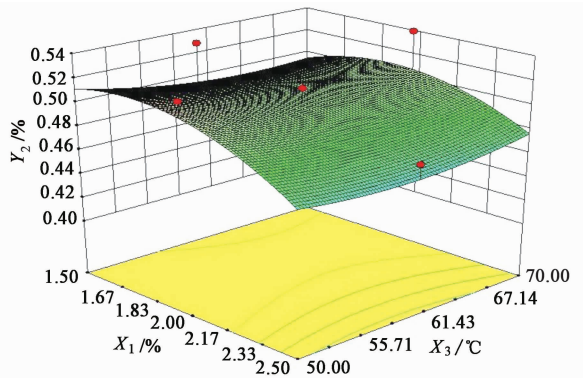


图 5 酶底质量分数-酶解温度对木瓜总多糖保留率的效应曲面

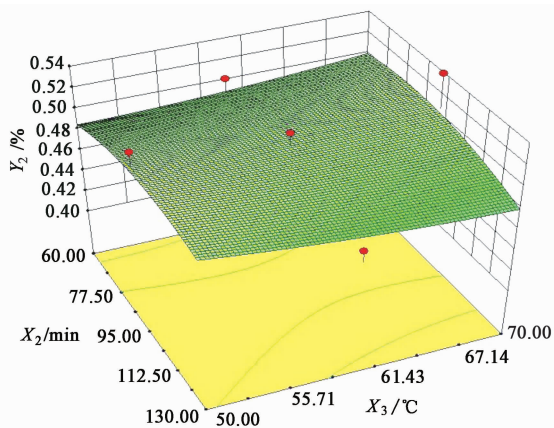


图6 酶解时间-酶解温度对木瓜总多糖保留率的效应曲面

高,蛋白脱除率升高,但总体升幅不大,在温度较低的时候,时间对蛋白脱除率影响较小。

2.5.3 验证试验 通过对木瓜总多糖提取率和蛋白脱除率的二次多元数学模型分析预测,得响应值最大时工艺条件为酶底质量分数 1.70%,酶解时间 88.81 min,温度 54.051 °C;结合实际操作考虑,将工艺条件调整为时间 89 min,温度 54 °C,酶底质量分数 1.70%。量取 2.2 项下粗多糖溶液 10 mL,共 3 份,按该酶解工艺进行验证试验,计算总多糖保留率和蛋白脱除率平均值分别为 70.04% 和 63.42%,RSD 依次为 0.53% 和 0.79%,与预测值的偏差分别为 1.42%,0.17%,表明该模型的预测性良好。

2.5.4 Sevag 法处理次数考察 取 2.5.3 项下酶解后的总多糖溶液 5 份,各加入 0.25 倍量 Sevag 试剂 [三氯甲烷-正丁醇(5:1)],剧烈震荡 30 min,离心,取上清液复溶至原体积,Sevag 法处理次数分别为 1,2,3,4,5 次。结果发现总多糖保留率随处理次数增加而减少,而蛋白脱除率随处理次数增加呈先略上升后趋向稳定的趋势,结合试验操作的可行性,确定 Sevag 法使用数选择 1 次。

3 讨论

预试验采用考马斯亮蓝法测定蛋白质含量,结

果发现随木瓜总多糖溶液质量分数的升高,最大吸收波峰有向右偏移的趋势,导致检测波长不稳定,故未选择考马斯亮蓝法。UV 测定蛋白质含量的原理为蛋白质中酪氨酸和色氨酸残基的苯环含有共轭双键,因此蛋白质溶液在 275 ~ 280 nm 处有一个紫外吸收;在一定浓度范围内,蛋白质溶液在最大吸收波长处的 A 与其浓度成正比,符合朗伯-比耳定律,因此可作定量分析;但当样品中含有嘌呤、嘧啶等核酸类物质,在 280 nm 处测量会有较大干扰,因为核酸在 260 nm 处的吸收比 280 nm 更强,但蛋白质与其相反,试验发现样品溶液在 260 nm 处无吸收,故可排除核酸类物质的影响,说明 UV 适用于测定木瓜总多糖中蛋白质含量。

按优选的工艺采用酶解结合 Sevag 法除木瓜总多糖中蛋白质时,总多糖保留率和蛋白脱除率分别为 70.04% 和 63.42%,而在常用工艺条件下总多糖保留率和蛋白脱除率分别为 62.54% 和 54.21%,说明优化的工艺条件在有效去除蛋白的同时可尽可能地避免总多糖的损失,还可减少有机溶剂的使用次数,降低总多糖因沉淀而损失,且条件温和不会对多糖类成分的结构造成影响。

[参考文献]

- [1] 林丹,郭素华. 木瓜化学成分、药理作用研究进展[J]. 海峡药学,2009,21(10):85.
- [2] 刘捷,王文,卢奎,等. 皱皮木瓜多糖的提取及其抗氧化活性研究[J]. 河南工业大学学报:自然科学版,2011,32(1):48.
- [3] 黄锁义,刘胜利,郭立强,等. 正交设计优化木瓜多糖的超声提取工艺[J]. 安徽农业科学,2012,40(5):2618.
- [4] 王晓梅,张忠山,张晶晶. 木瓜多糖的提取、纯化与鉴定[J]. 安徽农业科学,2011,39(12):7085.

[责任编辑 刘德文]