

## 五味子水溶性蛋白质的提取工艺优化

刘畅, 严铭铭\*, 邵帅, 万志强, 吴程彦, 付美丽  
(长春中医药大学, 长春 130117)

**[摘要]** **目的:**探讨碱提酸沉法提取五味子水溶性蛋白质的工艺条件。**方法:**以蛋白质提取率为评价指标,采用单因素试验和正交试验考察料液比、提取温度、提取时间及提取液 pH 对五味子水溶性蛋白质提取工艺的影响,分析水溶性蛋白质的等电点及分子组成。采用考马斯亮蓝 Bradford 法测定提取液中蛋白质含量。**结果:**五味子蛋白质的等电点 3.4。最佳提取条件为料液比 1:35,提取温度 35 ℃,提取时间 2 h,提取液 pH 9.5,水溶性蛋白质提取率 43.62%。SDS-PAGE 电泳分析表明五味子水溶性蛋白质主要含有 50,40,38,21 kDa 的亚基和少量 18,16 kDa 的亚基。**结论:**优选的五味子水溶性蛋白质提取工艺稳定可行,为该成分的功能性保健食品开发提供参考。

**[关键词]** 五味子; 水溶性蛋白质; 等电点; 电泳; 碱提酸沉法

**[中图分类号]** R283.6;R284.2;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)02-0016-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015020016

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141204.1002.008.html>

**[网络出版时间]** 2014124 10:02

**Optimization of Extraction Process of Water-soluble Protein from Schisandrae Chinensis Fructus**  
LIU Chang, YAN Ming-ming\*, SHAO Shuai, WAN Zhi-qiang, WU Cheng-yan, FU Mei-li (*Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China*)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize alkali extraction and acid precipitation process of water-soluble protein from Schisandrae Chinensis Fructus. **Method:** With extraction rate of protein as index, single factor tests and orthogonal design were adopted to optimize extraction process of water-soluble protein by taking solid-liquid ratio, pH of extract, extraction temperature and time as factors, isoelectric point and molecular components of water-soluble protein were analyzed. Coomassie brilliant blue Bradford was employed to determine protein content in extract. **Result:** Isoelectric point of water-soluble protein was 3.4. Optimum extraction conditions was as following: solid-liquid ratio of 1:35, pH of extract 9.5, extraction temperature at 35 ℃, extraction time of 2 h. Extraction rate of water-soluble protein was up to 43.62%. SDS-PAGE analysis showed that majority subunits of water-soluble protein were 50, 40, 38, 21 kDa, and a small amount of 18, 16 kDa. **Conclusion:** This optimized extraction process is stable and feasible, this study provides a reference for development of functional health food by water-soluble protein from Schisandrae Chinensis Fructus.

**[Key words]** Schisandrae Chinensis Fructus; water-soluble protein; isoelectric point; electrophoresis; alkali extraction and acid precipitation method

五味子果实具有明显的医疗保健作用和极高的营养价值,具有收敛固涩、补肾宁心、益气生津之功效,主治梦遗滑精、遗尿尿频、久嗽虚喘、津伤口渴、久泻不止、自汗盗汗、内热消渴、心悸失眠等

证<sup>[1]</sup>。大量动物和临床试验表明五味子除了具有保肝降酶作用外,还具有抗炎<sup>[2]</sup>、抗肿瘤<sup>[3]</sup>、免疫调节<sup>[4]</sup>、抗氧化及治疗糖尿病<sup>[5]</sup>等活性。目前,关于五味子的研究主要集中于木脂素类<sup>[6]</sup>、多糖类<sup>[7]</sup>和

**[收稿日期]** 20140811(019)

**[基金项目]** 吉林省重点科技攻关项目(20140204070YY)

**[第一作者]** 刘畅,在读硕士,从事中药化学及新药开发研究,Tel:13664311625,E-mail:liu\_chang406@163.com

**[通讯作者]** \* 严铭铭,教授,博士,从事药物化学、中药化学及新药开发研究,Tel:13578990277,E-mail:yanmm595@yahoo.com.cn

挥发油类<sup>[8]</sup>等成分。但对五味子蛋白质的研究报道较少,林伟卓等<sup>[9]</sup>采用凯氏定氮法测定五味子全氮及氨基酸含量,万志强等<sup>[10]</sup>研究了五味子蛋白质的提取纯化及含量测定,结果表明五味子中含有 17 种氨基酸,其中 6 种为人体自身不能合成的必须氨基酸,说明五味子除作为中药材外还可研制开发功能性保健食品。本实验以五味子为原料,采用碱提酸沉法提取五味子水溶性蛋白质,通过单因素试验和正交试验优选工艺条件,利用 SDS-PAGE 对提取的五味子蛋白质进行分析,为该成分的资源开发提供参考。

## 1 材料

TDL-5 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂), S82-2 型磁力搅拌器(上海志威电器有限公司), UB-7 型 pH 计(美国丹佛仪器公司), UV-1700 型紫外-可见分光光度计(日本岛津), FDU-1200 型冷冻干燥机(东京理化), KYH-111 型高级商用沙冰料理机(中山市快特电器有限公司), MiniSpin Plus 型超高速小型离心机(德国 Eppendorf 公司), DYY-8C 型电泳仪(北京市六一仪器厂)。

五味子采于吉林长白山,经长春中医药大学药学院姜大成教授鉴定为木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* 的干燥成熟果实。Bradford 蛋白浓度测定试剂盒(天根生化科技有限公司,批号 N2603),低相对分子质量标准蛋白质(天根生化科技有限公司,批号 N2416),其他试剂均为国产分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 蛋白质提取率的计算** 采用考马斯亮蓝 Bradford 法<sup>[11]</sup>测定提取液中蛋白质含量,计算蛋白质提取率。

**2.2 五味子水溶性蛋白质的提取**<sup>[12]</sup> 取一定量五味子,加 35 倍量  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH 匀浆,用  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH 将原液(pH 5.6) pH 调至 9.5,于  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  提取 3 h,离心( $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 15 min,下同),弃沉淀,将上清液用  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  HCl 调至等电点,离心,弃上清,沉淀物冷冻干燥,即得五味子水溶性蛋白质。

### 2.3 单因素试验考察<sup>[13]</sup>

**2.3.1 料液比** 取五味子 10 g,共 6 份,固定提取温度  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,提取时间 1 h, pH 10,考察不同料液比(1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40)对蛋白质提取率的影响,结果提取率( $n = 3$ )分别为 23.69%, 29.30%, 30.80%, 37.28%, 38.54%, 47.13%。表明随料液比的不断增大,蛋白质提取率整体呈上升

趋势。但当料液比 1:40 时,提取液 pH 11.65,碱性太强容易使蛋白质变性,此外,食品工业生产过程中,料液比过大会增加成本<sup>[14]</sup>,故料液比确定 1:35。

**2.3.2 提取时间** 取五味子 10 g,共 6 份,在提取温度  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,料液比 1:30, pH 10 的条件下,考察提取时间(1,2,3,4,5,12 h)对蛋白质提取率的影响,结果提取率分别为 32.55%, 33.74%, 35.29%, 32.18%, 31.26%, 28.47%。表明在 3 h 前蛋白质提取率随时间的延长而显著提高,3 h 达最大值,之后蛋白质提取率逐渐下降。这是由于五味子本身需要一定溶胀时间,充分溶胀利于蛋白质的分离溶解,但如果提取时间过长,提取液中已溶蛋白质达到饱和并且随着疏水基团的暴露,有部分蛋白质出现凝聚沉淀,导致提取率降低<sup>[15]</sup>,从缩短生产周期考虑,选择提取时间 3 h。

**2.3.3 提取温度** 取五味子 10 g,共 5 份,固定提取时间 1 h,料液比 1:30, pH 10,选择提取温度分别为 4,25,35,45,55  $^\circ\text{C}$ ,结果蛋白质提取率分别为 35.29%, 35.83%, 38.20%, 36.80%, 30.99%。表明当提取温度为  $25 \sim 35 \text{ }^\circ\text{C}$  时,随温度的升高,蛋白质提取率呈递增趋势,于  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  时达最大值;之后随温度的持续升高,蛋白质提取率明显下降。可能的原因是  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  前,随温度的升高,亲水基团慢慢展开,巯基含量增加,蛋白质的溶解度升高;但随着温度的持续增加,使得原来在分子内部的一些非极性基团暴露在分子表面,故降低了蛋白质的溶解度,促使蛋白质分子间的相互结合而凝结沉淀导致提取率下降,故选择提取温度  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

**2.3.4 提取液 pH** 取五味子 10 g,共 5 份,固定提取时间 1 h,料液比 1:30,提取温度  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,考察提取液 pH(9,9.5,10,10.5,11)对蛋白质提取率的影响,计算提取率分别为 32.61%, 38.56%, 37.34%, 37.25%, 33.42%。结果表明提取液 pH 9~9.5 时,蛋白质提取率呈递增趋势,在 9.5 时达最大值,之后随碱浓度继续增加,蛋白质提取率呈递减趋势。这是由于碱可以使五味子的结构变疏松,破坏分子间的部分氢键使淀粉和蛋白质分离,增加了蛋白质提取率;而当 pH 继续增大时,在强碱条件下五味子蛋白质会发生一些不良反应,如蛋白质水解和变性,同时使蛋白质产品颜色加深,提取物中非蛋白质含量增加,纯度降低<sup>[16]</sup>,故使得蛋白提取率下降,选择提取液 pH 9.5。

**2.4 正交试验设计** 根据单因素试验结果,选取料液比、提取温度、提取时间及提取液 pH 的工艺参数

范围,以五味子水溶性蛋白质提取率为指标,称取五味子 10 g,共 9 份,按  $L_9(3^4)$  表设计正交试验,试验安排及结果见表 1,方差分析见表 2。由直观分析可知,影响五味子水溶性蛋白质提取率的因素顺序为  $A > B > C > D$ 。以极差最小的  $D$  因素为误差项进行方差分析,结果表明因素  $A, B$  具有显著性差异,因素  $C, D$  则均影响不显著,确定最佳工艺条件为  $A_2B_2C_1D_1$ ,即料液比 1:35,提取液 pH 9.5,提取温度 35 ℃,提取时间 2 h。称取五味子 10 g,共 3 份,在最优水平下进行验证试验,结果五味子水溶性蛋白质提取率平均值 43.62% (RSD 0.2%),说明优选的工艺稳定可行。

表 1 五味子水溶性蛋白质提取工艺正交试验分析

Table 1 Orthogonal test analysis for extraction process of water-soluble protein from Schisandrae Chinensis Fructus

No.	A 料液比 /g·mL <sup>-1</sup>	B 提取温度 /℃	C 提取液 pH	D 提取时间 /h	蛋白质 提取率/%
1	1:30	25	9.5	2	35.698
2	1:30	35	10	3	39.694
3	1:30	45	10.5	4	36.364
4	1:35	25	10	4	40.670
5	1:35	35	10.5	2	42.358
6	1:35	45	9.5	3	41.692
7	1:40	25	10.5	3	34.943
8	1:40	35	9.5	4	41.158
9	1:40	45	10.5	2	39.727

表 2 五味子水溶性蛋白质提取工艺方差分析

Table 2 Variance analysis for extraction process of water-soluble protein from Schisandrae Chinensis Fructus

方差来源	SS	MS	F	P
A	29.30	14.65	45.78	<0.05
B	23.66	11.83	36.96	<0.05
C	7.50	3.75	11.72	>0.05
D(误差)	0.64	0.32	1.00	

注:  $F_{0.05}(2, 2) = 19.0$ 。

**2.5 等电点的测定**<sup>[17]</sup> 称取五味子 7 份,每份 10 g,按优选的工艺条件进行提取,离心,分别取上清液 10 mL,加 1 mol·L<sup>-1</sup> HCl 分别调 pH 至 3.2, 3.4, 3.6, 3.8, 4.0, 4.2, 4.4, 静置后离心,收集沉淀物,即得五味子水溶性蛋白质。以 pH 为横坐标,蛋白质保留率为纵坐标,绘制曲线图,见图 1,沉淀量最大的 pH 即为五味子水溶性蛋白质的等电点。结果显示在 pH 3.4 处,蛋白质沉淀量最多,即五味子

水溶性蛋白质等电点 pH 3.4。

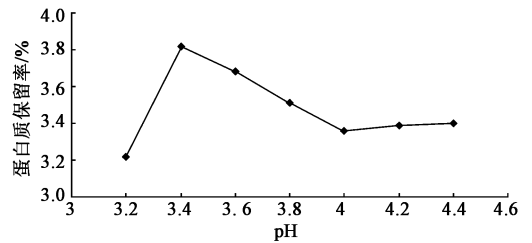
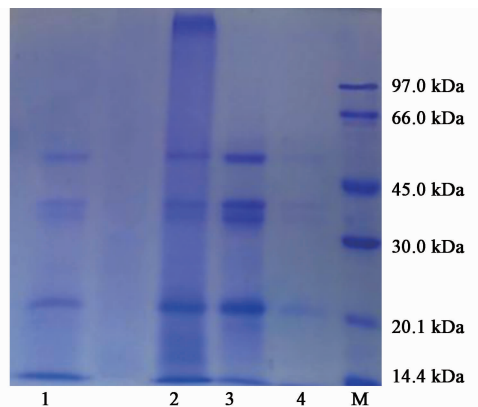


图 1 五味子水溶性蛋白等电点的测定

Fig. 1 Isoelectric point determination of water-soluble protein from Schisandrae Chinensis Fructus

**2.6 SDS-PAGE 凝胶电泳**<sup>[18]</sup> 利用 SDS-PAGE 凝胶电泳法确定五味子水溶性蛋白质亚基的相对分子质量。将提取的五味子蛋白质配制成 1 g·L<sup>-1</sup> 的溶液,与样品缓冲液按 1:1 体积混合后加热煮沸 3 min,配制 12% 分离胶,聚合 45 min 后配制 5% 浓缩胶,上样,浓缩胶、分离胶电压分别为 70, 140 V。观察电泳带,当跑至底部时,及时将胶片取出,进行考马斯亮蓝活性染色,用脱色液甲醇-冰乙酸-水(3:1:6)将背景脱至清晰。采用 SDS-PAGE 凝胶电泳对提取的五味子水溶性蛋白质进行分析,其亚基分布见图 2,结果显示五味子水溶性蛋白质主要含有 50, 40, 38, 21 kDa 的亚基,少量 18, 16 kDa 亚基。



M. Marker; 2. 原料; 1, 3, 4. 不同浓度的五味子水溶性蛋白

图 2 五味子水溶性蛋白质 SDS-PAGE 凝胶电泳

Fig. 2 SDS-PAGE gel electrophoresis of water-soluble protein from Schisandrae Chinensis Fructus

### 3 讨论

本文综合考察了料液比、提取时间、提取液 pH 等因素对五味子水溶性蛋白质提取率的影响,通过正交试验优选了五味子水溶性蛋白质的提取工艺。蛋白质的含量测定方法包括凯氏定氮法、考马斯亮蓝法、福林酚法、双缩脲法及 BCA 法等,本文采用考马斯亮蓝法对蛋白质提取液进行含量测定,该方法

简单、方便、快速,且相对较为准确,是测定低浓度蛋白质含量的有效方法。利用碱提酸沉法对五味子水溶性蛋白进行提取,成本较低,操作工艺简单,稍加改进后可推广至工业化生产,这对五味子蛋白质的开发利用具有实际意义。

预试验结果表明五味子水溶性蛋白质具有提高小鼠免疫力的作用,能明显改善骨质疏松症。前期研究表明与市场热销的蛋白质粉相比,蛋白粉含18种氨基酸,五味子蛋白质中含有17种氨基酸,且与市售蛋白粉成分相似度>90%,蛋白质含量接近,说明五味子水溶性蛋白质的开发利用具有很好的前景且加工方法简单,为该成分的功能性保健食品开发提供参考。

#### [参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:61-62.

[2] Kang S, Lee K P, Park S J, et al. Identification of a novel anti-inflammatory compound,  $\alpha$ -cubebenoate from *Schisandra chinensis* [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 153(1):242-249.

[3] Qu H M, Liu S J, Zhang C Y. Antitumor and antiangiogenic activity of *Schisandra chinensis* polysaccharide in a renal cell carcinoma model[J]. Int J Biol Macromol, 2014, 66(1):52-56.

[4] Zhao T, Mao G, Mao R, et al. Antitumor and immunomodulatory activity of a water-soluble low molecular weight polysaccharide from *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill [J]. Food Chem Toxicol, 2013, 55(1):609-616.

[5] Zhang M, Liu M, Xiong M, et al. *Schisandra chinensis* fruit extract attenuates albuminuria and protects podocyte integrity in a mouse model of streptozotocin-induced

diabetic nephropathy [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 141(1):111-118.

[6] 王丽薇, 周长新, 赵昱, 等. 北五味子化学成分研究[J]. 中国现代应用药学杂志, 2006, 23(5):363-365.

[7] 戴好富, 周俊, 彭再刚, 等. 北五味子水溶性化学成分[J]. 天然产物研究与开发, 2000, 13(1):24-26.

[8] 戴好富, 谭宁华, 周俊, 等. 北五味子挥发性化学成分研究[J]. 中草药, 2005, 36(9):1309-1310.

[9] 林伟卓, 陈玉海. 北五味子全氮及氨基酸含量测定[J]. 特产研究, 1998(1):35-36.

[10] 万志强, 严铭铭, 展月, 等. 五味子蛋白的提取纯化及含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(17):116-118.

[11] Bradford M M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72(1):248-254.

[12] 董银卯, 冯明珠, 赵华, 等. 燕麦麸蛋白质等电点测定及其稀碱法提取工艺优化的研究[J]. 食品科技, 2007, 32(3):258-265.

[13] 李凤英, 崔蕊静, 李春华. 葡萄籽蛋白质的提取工艺研究[J]. 中国油脂, 2005, 30(4):50-53.

[14] 杨海涛, 刘军海. 蚕豆蛋白质提取工艺的研究[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(2):83-85.

[15] 徐建国, 胡青平, 王迎籽, 等. 碱溶酸沉法提取桑椹籽蛋白质的工艺优化[J]. 中国粮油学报, 2010, 25(6):98-101.

[16] Shih F F, Daigl K W. Preparation and characterization of rice protein isolates [J]. J Am Oil Chem Soc, 2000, 77(8):885-889.

[17] 孙月娥, 明鸣, 王卫东, 等. 巴旦木蛋白提取工艺[J]. 食品科学, 2011, 32(18):19-25.

[18] 夏其昌, 张祥民, 周仲驹, 等. 蛋白质电泳技术指南[M]. 北京:化学工业出版社, 2007:23-30.

[责任编辑 刘德文]