

# 响应面法优选铁皮石斛总多糖脱蛋白工艺

严婧, 夏伯候, 章莹, 黄杰, 谭茜, 肖榕, 廖端芳, 吴萍\*

(湖南中医药大学 干细胞中药调控与应用研究室, 湖南省中药不良成分快速检测及脱除工程技术研究中心, 中药有毒物质防控技术湖南省工程实验室, 长沙 410208)

**[摘要]** 目的: 优选铁皮石斛总多糖的胰蛋白酶联合 Sevage 法脱蛋白工艺, 为该有效部位的深度开发和综合利用提供参考。方法: 以总多糖保存率和蛋白脱除率为评价指标, 通过单因素试验比较 Sevage 法、木瓜蛋白酶法、胰蛋白酶法和胰蛋白酶联合 Sevage 法; 以蛋白脱除率为指标, 酶解时间、酶用量、酶解温度和粗多糖溶液与 Sevage 试剂体积比为考察因素, 利用 Box-Behnken 响应面法优化条件。结果: 胰蛋白酶联合 Sevage 法具有较高的总多糖保存率及蛋白脱除率; 最佳工艺条件为酶解时间 1.5 h, 酶用量  $0.21 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 酶解温度  $63.25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , 总多糖溶液-Sevage 试剂 (4.27:1); 蛋白脱除率  $(87.15 \pm 7.93)\%$ , 总多糖保存率  $(81.32 \pm 8.54)\%$ 。结论: 不同方法对铁皮石斛总多糖的脱蛋白效果有明显差异, 胰蛋白酶联合 Sevage 法的效果最佳。

**[关键词]** 铁皮石斛; 总多糖; 脱蛋白; Sevage 试剂; 保留率

**[中图分类号]** R283.6; R284.1; R284.2; R696+.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)17-0019-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016170019

## Optimization of Deproteinization Technology of Total Polysaccharides from *Dendrobii Officinalis Caulis* by Response Surface Methodology

YAN Jing, XIA Bo-hou, ZHANG Ying, HUANG Jie, TAN Qian, XIAO Rong, LIAO Duan-fang, WU Ping\*  
(Hunan Engineering Laboratory for Prevention and Control Technology of Toxic Substances of Chinese Medicine, Hunan Research Center of Engineering Technology for Rapid Test and Removal of Undesirable Components of Chinese Medicine, Stem Cell Laboratory of Regulation and Application of Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize deproteinization technology of *Dendrobii Officinalis Caulis*. **Method:** With retention rate of total polysaccharides and deproteinized rate as the indexes, single factor tests were adopted to compare Sevage method, papain enzymatic, trypsin method and trypsin combined Sevage method. Effects of enzymolysis time, enzyme dosage, enzymolysis temperature and volume ratio of coarse polysaccharide solution to Sevage reagent on deproteinization technology was optimized by response surface method. **Result:** Trypsin combined Sevage method had higher retention rate of total polysaccharides and deproteinized rate; optimum deproteinization technology was as follows: enzymolysis time of 1.5 h, enzyme dosage of  $0.21 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , enzymolysis temperature at  $63.25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , coarse polysaccharide solution-Sevage reagent (4.27:1). Under these conditions, deproteinized rate and retention rate of total polysaccharides were  $(87.15 \pm 7.93)\%$  and  $(81.32 \pm 8.54)\%$ . **Conclusion:** Effect on total polysaccharides from *Dendrobii Officinalis Caulis* has significant difference with different deproteinized method, Trypsin combined Sevage method has optimum deproteinized effect.

**[Key words]** *Dendrobii Officinalis Caulis*; total polysaccharides; deproteinization; Sevage reagent; retention rate

铁皮石斛具有增强机体免疫、抗肿瘤、抗氧化、降血糖、降血脂等药理作用<sup>[1-3]</sup>。其化学成分有多

**[收稿日期]** 20151019(007)

**[基金项目]** 湖南省教育厅重点项目(14A109);湖南省科技厅发改委项目(湘发改高技[2013]1199号);湖南省科技厅科研条件创新专项(2012TT2012);湖南中医药大学校级课题(99820001134)

**[第一作者]** 严婧, 硕士, 从事中药专业研究, Tel:15074911765, E-mail:15074911765@163.com

**[通讯作者]** \* 吴萍, 博士, 副教授, 从事药物分析研究, Tel:13607437848, E-mail:545371528@qq.com

糖类、生物碱类、萜类和微量元素。在药材市场上,铁皮石斛的价格高于金钗石斛近百倍,两者含有大量相同化学成分,但前者有 23 个成分的含量均高于后者,这些成分大部分是多糖类。石斛多糖为主要活性物质,参与了生物体细胞中的各项生理活动,能提高机体免疫功能,具有抗肿瘤、免疫调节、抗炎等作用<sup>[4]</sup>。在石斛多糖的提取液中,蛋白质占比很大,其会结合多糖形成糖蛋白,给多糖的分级、分离带来困难。

常见的蛋白脱除方法有蛋白酶法,Sevage 法,三氯乙酸法和硫酸铵沉淀法<sup>[5-7]</sup>;其中三氯乙酸法脱蛋白效率较高,但易引起多糖的降解;硫酸铵沉淀法的操作复杂繁琐、耗时久,而且会加大粗多糖溶液体积造成浓度降低;酶法联合 Sevage 法在多糖的脱蛋白的工艺中应用越来越广,具有较好的效果和应用前景<sup>[8-9]</sup>。目前,除了用直接比较法进行脱蛋白方法的筛选,大多采用正交试验优化工艺条件<sup>[10-12]</sup>。本实验拟采用酶法联合 Sevage 法脱除铁皮石斛总多糖的蛋白质,利用响应面法优化其脱除蛋白的工艺条件<sup>[13]</sup>,为该有效部位的深度开发提供参考。

## 1 材料

TU-1900 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司),LGJ-30F 型冷冻干燥机(北京松源华兴科技发展有限公司),AL104 型分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。铁皮石斛购自湖南龙山铁皮石斛基地有限公司,经湖南中医药大学药学院周日宝教授鉴定为兰科植物铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 的干燥茎;胰蛋白酶(国药集团化学试剂有限公司),木瓜蛋白酶(合肥博美生物科技有限责任公司),牛血清白蛋白(瑞士 Roche 公司),考马斯亮蓝 G-250(美国 Amresco 公司),无水葡萄糖对照品(美国 Sigma 公司,批号 30805),水为蒸馏水,试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 铁皮石斛总多糖的制备** 取药材 300 g,加 10 倍量 95% 乙醇脱脂,70 ℃ 回流提取 4 h,过滤,药渣挥干乙醇后加入 1.2% 纤维素酶,加 40 倍量水回流提取 2 次,每次 2 h,合并提取液,减压浓缩至适当体积,加入 4 倍量 95% 乙醇,静置过夜,离心 15 min (4 000 r·min<sup>-1</sup>,下同),沉淀冷冻干燥至恒重,即得<sup>[14]</sup>。

**2.2 供试品溶液的制备** 精密称取总多糖样品 4.5 g,置 100 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,即得。

**2.3 总多糖的含量测定**<sup>[15]</sup> 精密称取干燥葡萄糖

对照品 1.25 g,加水定容于 100 mL 量瓶中,精密吸取该溶液 2.0 mL,加水定容至 100 mL,得 250 mg·L<sup>-1</sup> 葡萄糖对照品溶液。精密量取对照品溶液 0, 2.5, 6.0, 7.5, 10.0, 12.5 mL,分别置于 50 mL 量瓶中,各精密吸取 1.0 mL,加入 5% 苯酚 1.0 mL,浓硫酸 5.0 mL,充分摇匀,在 100 ℃ 水浴锅中加热 20 min,取出,置于冰浴中 5 min,于 488 nm 处测定吸光度 A。用水 1.0 mL 按上述流程操作,得空白调零溶液。以 A 为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程  $Y = 0.0166X - 0.0269$  ( $R^2 = 0.9960$ ),线性范围 12.5 ~ 62.5 mg·L<sup>-1</sup>。

**2.4 蛋白质的含量测定**<sup>[16]</sup> 称取考马斯亮蓝 G-250 10 mg 溶于 5 mL 的 95% 乙醇中,加入 85% 磷酸 10 mL,加水稀释至 100 mL,置于棕色量瓶中,得考马斯亮蓝溶液。精密称取牛血清白蛋白 10.0 mg,用少量水溶解并定容至 100 mL,得 0.1 g·L<sup>-1</sup> 蛋白质标准溶液,置 4 ℃ 冰箱中保存。精密量取蛋白标准溶液 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,各加入考马斯亮蓝溶液 5.0 mL,加水定容,摇匀,室温反应 10 min。以水为空白。在 595 nm 处测定 A,以 A 为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程  $Y = 0.0073X + 0.0082$  ( $R^2 = 0.9994$ ),线性范围 0.001 ~ 0.01 g·L<sup>-1</sup>。

## 2.5 脱蛋白方法比较

**2.5.1 Sevage 法** 平行取 3 份供试品溶液,每份 50 mL,分别加入 1/4 倍量 Sevage 试剂[三氯甲烷-正丁醇(4:1)],剧烈振摇,离心 10 min,静置,去除下层有机相及中间层蛋白质与 Sevage 试剂生成的乳胶物沉淀,收集上清液,重复操作 7 次,计算蛋白脱除率及总多糖保存率分别为 (70.50 ± 5.15)%, (69.02 ± 8.25)%。

**2.5.2 酶法** 取 6 份供试品溶液,每份 50 mL,3 份加入 2 g·mL<sup>-1</sup> 木瓜蛋白酶,温度调至 55 ℃,pH 7;3 份加入 2 g·mL<sup>-1</sup> 胰蛋白酶,温度 37 ℃,pH 8。水浴酶解 5 h,沸水中酶灭活 10 min,冷却至室温,离心 10 min,去除变性酶沉淀,计算蛋白脱除率分别为 (55.46 ± 4.65)%, (63.24 ± 7.31)%,总多糖保存率分别为 (74.75 ± 9.97)%, (74.73 ± 9.62)%。

**2.5.3 胰蛋白酶-Sevage 联用法** 平行取 3 份供试品溶液,每份 50 mL,按 2.5.2 项下方法处理后,采用 Sevage 法继续处理上清液,结果发现随着 Sevage 处理次数的增加,蛋白脱除率有所增加,经 3 次 Sevage 处理后,基本没有蛋白质变性后乳胶状物质出现,计算蛋白脱除率及总多糖保存率分别为

(74.54 ± 6.85)% , (71.42 ± 9.14)% 。

## 2.6 胰蛋白酶联合 Sevage 法脱蛋白工艺优选

**2.6.1 单因素试验** 取总多糖供试品溶液 50 mL, 按 2.5.3 项下方法处理, 在固定其他因素的情况下, 考察酶解时间、酶用量、酶解温度、总多糖溶液与 Sevage 试剂体积比对铁皮石斛总多糖蛋白脱除率的影响。结果酶解 1, 2, 3, 4, 5 h 时的蛋白脱除率分别为 67.59% , 72.44% , 66.81% , 63.31% , 57.72% ; 胰酶添加量 0, 0.5% , 1% , 1.5% , 2% 时的蛋白脱除率分别为 77.01% , 83.53% , 72.02% , 70.51% , 67.20% ; 酶解温度 30, 40, 50, 60, 70 °C 时的蛋白脱除率分别为 63.22% , 74.57% , 77.84% , 81.60% , 70.00% ; 总多糖溶液与 Sevage 试剂体积比 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 时的蛋白脱除率分别为 63.80% , 64.87% , 62.76% , 72.44% , 56.43% 。酶解温度 > 60 °C 时, 蛋白脱除率降低, 可能温度过高致使生物酶受热变性而使其活性降低。

**2.6.2 响应面试验** 以蛋白质脱除率为效应值, 酶解时间、酶用量、酶解温度、总多糖溶液与 Sevage 试剂体积比为自变量, 采用四因素三水平响应面分析法优化工艺参数, 将所得数据用 Design-Expert 8.0 软件进行分析, 试验安排及结果见表 1。由方差分析可知, 该模型具有显著性意义, 同时该模型拟合较好而且信噪比较低; 4 个因素对铁皮石斛多糖的脱蛋白率均具有显著性影响, 交互项 AC, BD, CD 具有显著性影响, 响应面分析见图 1。经二次项拟合得模型方程  $Y = -181.920 + 23.789A + 30.941B + 6.141C + 61.600D + 16.915AB + 0.378AC - 40.704AD - 7.425BD + 0.055CD + 18.471A^2 - 26.003B^2 - 0.110C^2 + 1.053D^2 - 4.158A^2B - 5.050A^2D + 7.453AD^2 + 0.026C^2D - 0.374CD^2$  ( $R^2 = 0.990$ )。通过计算得最佳工艺条件为酶解时间 1.5 h,

表 2 回归方程方差分析

Table 2 Variance analysis of regression equation

方差来源	SS	f	MS	F	P
模型	1 410.203	18	78.345	57.484	<0.000 1
A	120.988	1	120.988	88.772	<0.000 1
B	114.483	1	114.483	83.999	<0.000 1
C	196.771	1	196.771	144.377	<0.000 1
D	20.234	1	20.234	14.847	0.003 2
AB	0.080	1	0.080	0.058	0.814 0
AC	57.093	1	57.093	41.891	<0.000 1
AD	6.587	1	6.586	4.832	0.052 6
BD	55.133	1	55.133	40.453	<0.000 1
CD	17.657	1	17.657	12.955	0.004 9
A <sup>2</sup>	94.011	1	94.011	68.979	<0.000 1
B <sup>2</sup>	274.128	1	274.128	201.136	<0.000 1

表 1 铁皮石斛总多糖脱蛋白工艺 Box-Behnken 试验分析

Table 1 Box-Behnken test analysis of deproteinization technology of total polysaccharides from Dendrobii Officinalis Caulis

No.	A 酶解时间/h	B 酶用量 /%	C 酶解温度/°C	D 总多糖溶液-Sevage 试剂	蛋白脱除率 /%
1	2	0.5	50	3:1	85.24 ± 5.78
2	2	0.5	60	4:1	79.23 ± 6.73
3	2	1	60	3:1	74.55 ± 9.24
4	2	0.5	60	4:1	86.59 ± 8.21
5	2	0.5	70	3:1	82.35 ± 4.34
6	2	0	60	3:1	59.62 ± 5.65
7	2	1	50	4:1	73.16 ± 1.34
8	3	0.5	50	4:1	74.45 ± 7.77
9	2	0.5	60	4:1	72.33 ± 6.64
10	3	1	60	4:1	61.62 ± 6.57
11	2	0.5	60	4:1	85.39 ± 2.33
12	1	0	60	4:1	88.40 ± 3.49
13	2	0.5	60	4:1	89.01 ± 5.54
14	3	0	60	4:1	72.22 ± 7.49
15	2	0.5	70	5:1	89.46 ± 8.32
16	2	1	60	5:1	77.76 ± 9.90
17	3	0.5	60	5:1	67.79 ± 7.68
18	1	1	60	4:1	80.01 ± 3.32
19	1	0.5	70	4:1	87.71 ± 1.87
20	2	0	70	4:1	87.49 ± 9.46
21	3	0.5	60	3:1	85.10 ± 5.16
22	1	0.5	60	5:1	65.65 ± 6.34
23	2	0.5	50	5:1	84.42 ± 8.82
24	1	0.5	50	4:1	86.22 ± 9.19
25	2	0	60	5:1	79.46 ± 3.32
26	3	0.5	70	4:1	88.76 ± 2.57
27	2	0	50	4:1	72.64 ± 7.48
28	2	1	70	4:1	84.77 ± 11.21
29	1	0.5	60	3:1	70.32 ± 4.57

酶用量 0.21 g·mL<sup>-1</sup>, 酶解温度 63.25 °C, 总多糖溶液-Sevage 试剂 (4.27:1); 在此条件下, 铁皮石斛总多糖的蛋白脱除率达 89.39% 。

**2.6.3 验证试验** 取供试品溶液 50 mL, 共 3 份, 分别按最佳工艺条件对铁皮石斛总多糖中蛋白进行

方差来源	SS	f	MS	F	P
C <sup>2</sup>	1.870	1	1.870	1.372	0.268 6
D <sup>2</sup>	270.306	1	270.306	198.332	<0.000 1
A <sup>2</sup> B	11.528	1	11.528	8.458	0.015 6
A <sup>2</sup> D	51.002	1	51.002	37.422	0.000 1
AD <sup>2</sup>	148.107	1	148.107	108.671	<0.000 1
C <sup>2</sup> D	13.724	1	13.724	10.069	0.009 9
CD <sup>2</sup>	37.212	1	37.212	27.304	0.000 4
残差	13.629	10	1.363		
失拟项	3.750	6	0.625	0.253	0.933 9
纯误差	9.879	4	2.470		
总误差	1 423.832	28			

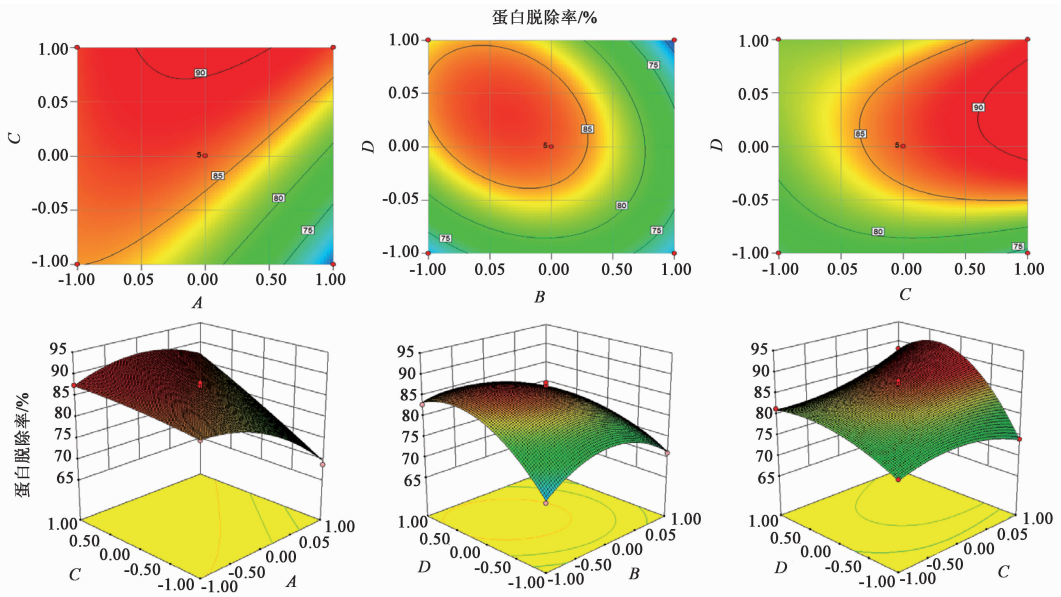


图 1 酶解时间、酶用量、酶解温度及总多糖溶液-Sevage 试剂对蛋白脱除率影响的响应面值与等值线

Fig. 1 Response surfaces and contour plots of effect of enzymolysis time, enzyme dosage, enzymolysis temperature and coarse polysaccharide solution-Sevage reagent on deproteinized rate

脱除,结果蛋白脱除率(87.15 ± 7.93)%,总多糖保存率(81.32 ± 8.54)%.该结果与预测值较为接近,表明所得数学模型稳定可靠。

### 3 讨论

本研究经过不同脱蛋白方法的比较,发现胰蛋白酶联合 Sevage 法的蛋白脱除效果优于其他 3 种方法,这可能与两者脱蛋白的原理和性质有关。Sevage 法是经典的蛋白脱除方法,利用蛋白质遇到有机试剂变性的原理脱除,但该法去除蛋白的效率低,且每萃取 1 次在去除乳胶状蛋白质时都会将黏附的多糖一并除去,多糖损失率高;酶法条件温和、有机试剂污染少、操作方便,在促进蛋白质水解的同时,多糖损失较小,故采用胰蛋白酶法和 Sevage 法联合应用。与先前文献报道的铁皮石斛多糖脱蛋白工艺结果相比,本研所得铁皮石斛总多糖的蛋白脱除率及总多糖保存率均高于其他方法<sup>[11-12]</sup>。

#### [参考文献]

[1] Zhao Y, Son Y. Antioxidant and anti-hyperglycemic activity of polysaccharide isolated from *Dendrobium chrysotoxum* Lindl [J]. *J Biochem Mol Biol*, 2007, 40 (5):670-677.

[2] Fan Y, He X, Zhou S, et al. Composition analysis and antioxidant activity of polysaccharide from *Dendrobium denneanum* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2009, 45 (2): 169-173.

[3] 吕圭源,颜美秋,陈素红,等.铁皮石斛功效相关药理作用研究进展[J].*中国中药杂志*, 2013, 38 (4): 489-493.

[4] 薛倩倩,尹显梅,尹鸿翔,等.叠鞘石斛多糖抗氧化作

用研究[J].*科学技术与工程*, 2015, 15(12):153-156.

[5] 黄芳,梁倩倩,周宏.响应面法优化龙须菜多糖提取工艺[J].*食品工业科技*, 2013, 34(7):260-264, 272.

[6] 任晓蕾,霍金海,董文婷,等.北青龙衣总多糖脱蛋白工艺比较[J].*中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(10): 16-18.

[7] 刘莉,李泳怡,潘育方.荔枝核多糖脱蛋白工艺考察[J].*中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(23):52-55.

[8] 肖道安.肉苁蓉多糖脱蛋白工艺的优化[J].*江苏农业科学*, 2015, 43(7):314-315.

[9] 张帅,郑宝东,林良美,等.笋壳多糖脱蛋白方法的比较[J].*热带作物学报*, 2015, 36(5):987-990.

[10] 赵俊凌,马洁,李戈,等.齿瓣石斛多糖提取及脱蛋白工艺研究[J].*时珍国医国药*, 2010, 21(11): 2841-2843.

[11] 罗傲雪,范益军,罗傲霜,等.石斛粗多糖脱蛋白方法的研究[J].*安徽农业科学*, 2008, 36(29): 12741-12742.

[12] 梅威威,吴绍康,张浩,等.铁皮石斛多糖提取工艺及脱蛋白方法研究[J].*中华中医药学刊*, 2014, 32(12):2869-2872.

[13] 王永菲,王成国.响应面法的理论与应用[J].*中央民族大学学报:自然科学版*, 2005, 14(3):236-240.

[14] 张利,范明才,冯喜文,等.铁皮石斛中石斛多糖与石斛碱的纤维素酶法提取研究[J].*化学研究与应用*, 2011, 23(3):356-359.

[15] 徐光域,颜军,郭晓强,等.硫酸-苯酚定糖法的改进与初步应用[J].*食品科学*, 2005, 26(8):342-346.

[16] 李娟,张耀庭,曾伟,等.应用考马斯亮蓝法测定总蛋白含量[J].*中国生物制品学杂志*, 2000, 13(2): 118-120.

[责任编辑 刘德文]