

张 凤, 黄 芳. 薤白多糖除蛋白工艺条件优化研究[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(12): 285–287.

薤白多糖除蛋白工艺条件优化研究

张 凤, 黄 芳

(南京晓庄学院生物化工与环境工程学院, 江苏南京 211171)

摘要:采用胰蛋白酶脱除薤白多糖中蛋白质,应用响应面分析法对工艺条件进行优化。以蛋白脱除率为考察指标,选用超声时间、水浴温度、酶液 pH 值、酶液用量 4 个因素,通过 Box – Behnken 试验设计对工艺条件进行优化。结果表明,薤白多糖最佳脱蛋白工艺条件为:超声时间 45 min、水浴温度 38 ℃、酶液 pH 值 8.0、10 mL 体系酶液用量 0.80 mL,在此条件下蛋白脱除率为 88.25%,与模型的预测值 88.85% 基本一致。

关键词:胰蛋白酶;响应面;脱蛋白;薤白;多糖;工艺优化

中图分类号:TS201.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002–1302(2013)12–0285–03

薤白(*Allium macrostemon* Bunge),别名野蒜、小蒜、小根蒜、苦蒜等,是百合科葱属多年生草本植物,其鳞茎上屈蒸至半熟后晒干或烘干入药称作薤白^[1–3]。据《本草纲目》记载,薤白具有瘀血可散、胸痹刺痛可愈、中恶猝死可救等作用^[4]。薤白多糖是薤白的主要活性成分之一,具有抗菌、抗氧化等功能。关于薤白中多糖的提取已有报道^[5]。多糖提取方法较多,但在提取过程中,常伴随有一定的蛋白质会吸附多糖,影响后续试验中多糖的分离纯化^[6–7],因此选择蛋白去除率高且多糖损失率小的除蛋白方法是关键环节。研究表明,酶法脱蛋白是一种脱蛋白效率高、操作简单、多糖损失小的有效脱蛋白方法^[8]。本研究采用胰蛋白酶对薤白多糖中蛋白质进行去除,通过响应面试验设计优化了酶法脱除薤白多糖中蛋白质的工艺条件,这也可为其他多糖除蛋白工艺研究提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

薤白购自中药材市场。无水葡萄糖、苯酚、浓硫酸均为分析纯。胰蛋白酶(活力单位 $\geq 50\ 000$ U/g)、考马斯亮蓝 G–250、牛血清白蛋白标准品等生化试剂,购于中国医药集团上海化学试剂公司。

主要仪器包括:AUY120 电子天平(日本岛津);7230G 可见分光光度计(上海精密仪器有限公司);HH–6 水浴锅(金坛市精达仪器制造厂);KQ200KDB 高功率数控超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司);RE–52A 旋转蒸发器(上海雅荣生化仪器设备有限公司);DZF6021 真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);CT14D 型高速离心机(上海天美生化仪器设备有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 薤白粗多糖的制备 薤白洗净烘干至恒重→粉碎过

40 目筛→精密称取粉末→加适量蒸馏水超声辅助提取→离心→过滤→滤液减压浓缩→乙醇沉淀(乙醇浓度 80%)→真空干燥→薤白粗多糖→精密称取 0.1 g→50 mL 容量瓶定容→多糖溶液,备用。

1.2.2 胰蛋白酶脱除薤白多糖蛋白质的工艺 移取薤白多糖溶液 5 mL,置于锥形瓶中,与 pH 值 8.0、浓度为 500 U/mL 的胰蛋白酶酶液分别同时放入 37 ℃ 的水浴锅内预热 10 min。向多糖溶液加入 0.80 mL 酶液,定容至 10 mL 后置于 38 ℃ 水浴中超声 45 min 脱除蛋白。之后,将溶液放入 100 ℃ 水浴锅中灭酶 10 min,冷却至室温,14 000 r/min 高速离心 10 min,收集上清液,测定蛋白含量。

1.2.3 蛋白质含量的测定 采用考马斯亮蓝法^[9]:以牛血清蛋白为标准品,在 595 nm 条件下测定吸光度,得回归方程 $y = 0.029\ 3x + 0.006\ 2$ ($n = 5$,其中 x 为蛋白含量, $\mu\text{g/mL}$; y 为吸光度), r^2 为 0.997 3。

蛋白质去除率 = (处理前蛋白含量 – 处理后蛋白含量) / 处理前蛋白含量 $\times 100\%$ 。

1.2.4 响应面试验设计 根据单因素试验结果,选择超声时间、水浴温度、溶液 pH 值、酶液用量等 4 个主要因素,分别选择 3 个水平(表 1),以蛋白脱除率(Y)为考察指标,进行响应面试验设计^[10–11],优化胰蛋白酶脱除薤白多糖中蛋白的工艺条件。

表 1 Box – Behnken 响应曲面设计试验因素水平和编码

编码	A:超声时间 (min)	B:水浴温度 (℃)	C:溶液 pH 值	D:酶液用量 (mL)
1	35	30	7.5	0.40
0	45	37	8.0	0.80
–1	55	44	8.5	1.20

2 结果与分析

2.1 响应面工艺回归模型的建立及方差分析

在单因素试验基础上,依据 BBD 中心组合试验设计进行了 29 组试验,其中 5 组中心点重复试验,试验结果见表 2,回归模型的方差分析见表 3。

收稿日期:2013–04–28

基金项目:南京晓庄学院科研项目(编号:2012NXY18);江苏省高校自然科学研究项目。

作者简介:张 凤(1964—),女,四川会理人,实验师,从事化学实验的教学与研究工作。E–mail:zhmf007@163.com。

表 2 薤白多糖除蛋白工艺响应曲面试验设计及结果

试验号	A	B	C	D	蛋白脱除率 (%)
1	1	0	0	1	79.96
2	1	0	-1	0	80.28
3	0	0	1	1	80.43
4	0	0	0	0	88.84
5	0	1	0	1	78.67
6	-1	0	-1	0	78.69
7	1	0	1	0	82.09
8	1	1	0	0	82.48
9	0	0	-1	1	76.73
10	0	0	1	-1	78.24
11	0	0	0	0	88.77
12	0	1	0	-1	76.71
13	0	-1	-1	0	76.00
14	0	0	0	0	88.72
15	-1	0	0	-1	80.07
16	-1	1	0	0	80.31
17	0	0	0	0	88.36
18	0	-1	0	1	72.79
19	0	-1	0	-1	76.64
20	1	-1	0	0	77.17
21	0	0	-1	-1	77.35
22	0	0	0	0	88.15
23	0	-1	1	0	76.37
24	1	0	0	-1	80.46
25	-1	0	0	1	80.15
26	-1	0	1	0	83.47
27	0	1	-1	0	76.32
28	0	1	1	0	82.54
29	-1	-1	0	0	77.14

表 3 蛋白脱除率回归模型的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	543.13	14	38.80	119.93	<0.000 1	**
A	0.57	1	0.57	1.75	0.206 5	
B	36.47	1	36.47	112.74	<0.000 1	**
C	26.31	1	26.31	81.34	<0.000 1	**
D	0.046	1	0.046	0.14	0.712 9	
AB	1.14	1	1.14	3.54	0.080 9	
AC	2.21	1	2.21	6.82	0.020 5	*
AD	0.084	1	0.084	0.26	0.618 1	
BC	8.56	1	8.56	26.45	0.000 1	**
BD	8.44	1	8.44	26.09	0.000 2	**
CD	1.97	1	1.97	6.10	0.027 0	
A ²	50.65	1	50.65	156.58	<0.000 1	**
B ²	268.66	1	268.66	830.49	<0.000 1	**
C ²	132.19	1	132.19	408.65	<0.000 1	**
D ²	218.44	1	218.44	675.27	<0.000 1	**
残差	4.53	14	0.32			
失拟	4.17	10	0.42	4.69	0.074 9	
纯误差	0.36	4	0.089			
总和	547.66	28				
r ²	0.991 7					
r _{Adj} ²	0.983 5					

利用软件 Design Expert 8.0 对数据进行多元回归拟合,得到蛋白脱除率与试验条件之间的二次多项式方程为: $Y = 88.57 + 0.22A + 1.74B + 1.48C - 0.062D + 0.54AB - 0.74AC - 0.15AD + 1.46BC + 1.45BD + 0.70CD - 2.79A^2 - 6.44B^2 - 4.51C^2 - 5.80D^2$ 。

式中: Y 为蛋白脱除率的预测值; A 、 B 、 C 、 D 分别代表超声时间、水浴温度、溶液 pH、酶液用量的编码值。方差分析结果显示,方程复相关系数的平方 R^2 为 0.991 7,说明该模型极显著 ($P < 0.01$),失拟项 ($r > 0.01$) 不显著及 r_{Adj}^2 为 0.983 5,说明建立的模型能够解释 98.35% 响应值的变化,用该模型对胰蛋白酶脱除薤白多糖中蛋白质的工艺条件进行优化是可行的。

2.2 交互效应

根据回归方程,作响应曲面图,考察所拟合的响应曲面的形状,分析各影响因素对提取率的影响以及各因素间的交互效应,其响应曲面如图 1 所示,6 组图直观地反映了各因素对响应值的影响。从图 1 中可以看出,当 4 个因素中任意 2 个因素取零水平,其余 2 个因素同时变化时,随着两者的增大,多糖提取率均呈现先上升后下降的趋势。比较 6 组图并结合表 3 方差分析可知:方程的二次项的影响均极显著,交互项影响、各一次项显著性参差不齐,表明各因素对蛋白脱除率的影响较复杂,不是简单的线性关系,可以利用回归方程来确定最佳工艺条件。

2.3 验证试验

由模型方程通过软件计算得到脱除薤白多糖中蛋白质的最佳工艺条件为:超声时间 45.28 min、水浴温度 38.13 ℃、酶液 pH 值 8.09、酶液用量 0.81 mL (10 mL 体系),在此条件下多糖提取率的理论值可达 88.85%。根据试验情况将以上工艺参数修正为超声时间 45 min、水浴温度 38 ℃、酶液 pH 值 8.0、酶液用量 0.80 mL (10 mL 体系),实际测得试验结果蛋白脱除率为 88.25%,说明该模型可以较好地预测各试验条件与蛋白脱除率之间的关系,具有一定实用价值。

3 结论

本研究根据中心组合试验设计原理,以蛋白脱除率为响应指标,通过 4 因素 3 水平响应分析对胰蛋白酶脱除薤白多糖中蛋白质的工艺条件进行了优化。优化后得到最佳工艺条件为超声时间 45 min、水浴温度 38 ℃、酶液 pH 值 8.0、酶液用量 0.80 mL (10 mL 体系),在此条件下,测得蛋白脱除率为 88.25%,与模型的预测值 88.85% 基本一致。

参考文献:

[1] 纪远中. 薤白研究近况及开发前景[J]. 天津药学,2005,17(1): 54-56.
[2] 张 卿,高 尔. 薤白的研究进展[J]. 中国中药杂志,2003,28(2):105-107.
[3] 丁 丰,焦淑萍,方 良. 薤白提取物清除羟自由基及抗 DNA 损伤作用的实验研究[J]. 中药材,2005,28(7):592-593.
[4] 李时珍. 本草纲目:下册[M]. 北京:北京人民出版社,1982: 1591-1592.
[5] 夏新奎,杨海霞,李 纯,等. 薤白粗多糖提取工艺研究[J]. 安徽农业科学,2006,34(17):4403-4405.

注: * 差异显著 ($P < 0.05$); ** 差异极显著 ($P < 0.01$)。

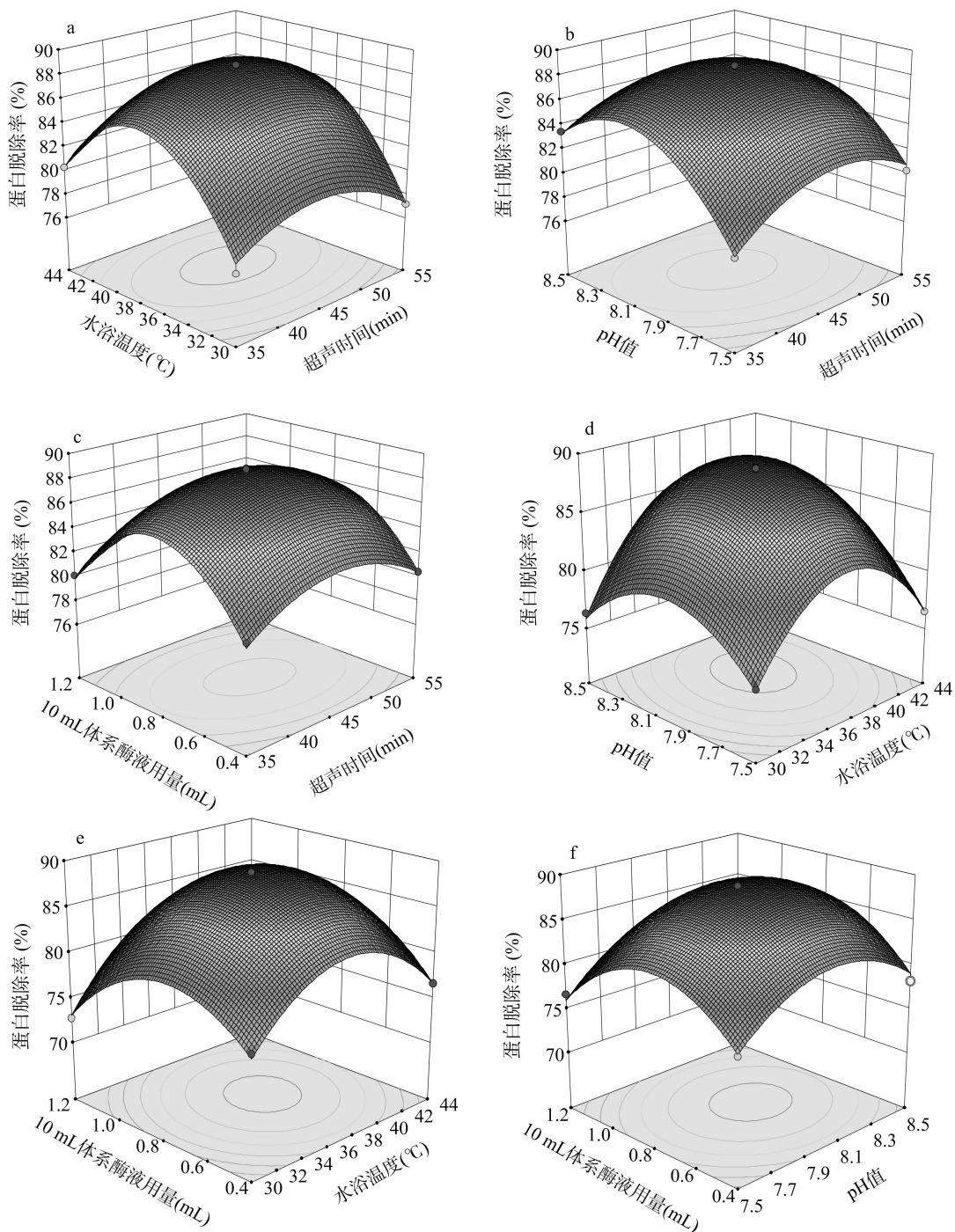


图1 超声时间、水浴温度、溶液pH值和酶液用量对蛋白脱除率影响的响应面

- [6] 罗莹, 林勤保, 赵国燕. 大枣多糖脱蛋白方法的研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28(8): 126-128.
- [7] 张步巧, 黄芳, 周宏. 响应曲面优化仙人掌多糖提取工艺[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(11): 292-293, 376.
- [8] 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.
- [9] 王金鹏, 陈寒青, 邓力, 等. 刺五加多糖提取过程中不同脱蛋白

- 方法的比较研究[J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(1): 155-158, 162.
- [10] 邓黎, 周同永, 皮立, 等. 用响应面法优化人工蛹虫草子实体中虫草素的超声提取工艺[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(5): 225-228.
- [11] 朱兴一, 陈秀, 谢捷, 等. 基于响应面法的闪式提取香菇多糖工艺优化[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(5): 243-245.