

五味子多糖脱蛋白工艺的研究

汪艳群,孟宪军*,李冬男,孙希云,李 斌
(沈阳农业大学食品学院,辽宁沈阳 110161)

摘 要: 为建立五味子多糖脱蛋白工艺,对三氯乙酸-正丁醇法、Sevag 法、酶法+三氯乙酸-正丁醇、酶法+Sevag 处理脱除蛋白进行了研究,并测定处理后多糖液中蛋白质含量。结果表明:酶法+三氯乙酸-正丁醇脱蛋白效果最好,即蛋白酶用量为 1%、处理温度为 50℃、处理时间为 140min、pH 为 5,酶处理后再用等体积的三氯乙酸-正丁醇溶液重复处理 4 次,蛋白质含量低于 0.005mg/mL。

关键词: 五味子,多糖,脱蛋白

Study on removal of protein from polysaccharides of *Schisandra chinensis* Turcz.Bail.

WANG Yan-qun, MENG Xian-jun*, LI Dong-nan, SUN Xi-yun, LI Bin

(College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: To establish the technology of removal of protein from polysaccharides of *Schisandra chinensis* Turcz. Bail., the methods of acetocastin-n-butyl alcohol, chloroform-n-butyl alcohol and both combining enzyme pretreatment respectively were studied and the content of protein was detected after treatment. The results showed that the method of acetocastin-n-butyl alcohol combining enzyme pretreatment was the best. After enzymic hydrolysis pretreatment of adding 1% protease to the polysaccharide solution in 50℃ at pH5 for 140min, acetocastin-n-butyl alcohol was added with the same volume of polysaccharide solution to get rid of protein. Treatment of acetocastin-n-butyl alcohol was repeated four times and the content of protein come down to 0.005mg/mL.

Key words: *Schisandra chinensis* Turcz.Bail.; polysaccharides; removal of protein

中图分类号: TS201.2⁺3

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2011)03-0280-05

五味子(*Schisandra chinensis*(Turcz.) Baill.)又名五梅子、玄及、会及、山花椒等,木兰科多年生落叶藤本。五味子可食用也可药用,其应用已有 2000 多年的历史,常作为方剂用于治疗 and 预防各种疾病,可用于生产药品、保健品、化妆美容品和多种饮品、食品添加剂等。20 世纪 90 年代以来,许多学者从五味子水提液中分离得到了多糖,目前已经发现五味子多糖具有保肝、抗疲劳、提高白细胞数量、增强免疫系统功能、清除氧自由基、抗衰老、镇静催眠、抑制肿瘤、抗突变、镇痛、降血糖、降血脂等生理活性^[1-4]。通常情况下,在多糖提取液中,蛋白质占了很大比例。所以,脱除多糖中的蛋白质已经成为多糖精制过程中非常重要的一步。同时,如何尽量脱除蛋白质并且保留多糖的有效成分也成为了一个很有意义的研究课题^[5]。因此,研究五味子多糖脱蛋白工艺,对扩大其应用和工业化生产具有现实

意义。为了进一步开发利用这一植物资源,本文通过四种不同的方法,单独或联合对五味子粗多糖进行脱蛋白处理,并对其脱蛋白效果和对多糖含量的影响进行研究和比较,得到五味子粗多糖脱蛋白的最佳工艺。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

五味子粗多糖 实验室自制,减压干燥备用;无水乙醇、葡萄糖、乙醚、苯酚、浓硫酸、牛血清白蛋白、考马斯亮蓝 G-250、三氯乙酸、正丁醇、氯仿、木瓜蛋白酶 均为分析纯。

7200 型可见分光光度计 尤尼柯(上海)有限公司;电热恒温水浴锅 常州国华电器有限公司;RE-52 型旋转蒸发器 上海博通经贸有限公司;SHZ-III B 型循环水真空泵 上海华琦科学仪器有限公司;TDL-5000B 型离心机 上海安亭科学仪器厂;DZF6050 真空干燥箱 上海一恒科技有限公司。

1.2 蛋白质含量的测定

以牛血清蛋白为标准物,用考马斯亮蓝 G-50 染色法制备蛋白质标准曲线^[4-6]。

收稿日期: 2010-02-22 * 通讯联系人

作者简介: 汪艳群(1980-),女,博士在读,讲师,研究方向:天然活性成分。

1.3 多糖含量的测定

用葡萄糖为标准物,使用苯酚-硫酸法^[6-9],在恒温 25℃,在 490nm 处测定标准物浓度与吸光度的对应关系,制备标准曲线。

1.4 三氯乙酸-正丁醇法脱蛋白

配制 2% 浓度粗多糖溶液,使三氯乙酸-正丁醇 (V:V 为 1:10) 与五味子多糖液等体积混合,振荡 10min,静置 1h,重复 7 次^[7-9]。

1.5 Sevag 法脱蛋白

配制 2% 浓度粗多糖溶液,加入其体积 1/3 的氯仿-正丁醇(4:1) 溶液,振荡 30min,经离心去除沉淀后,取少量水相测蛋白质含量,然后将水相再加入其体积 1/3 的氯仿-正丁醇溶液,重复 13 次^[7-9]。

1.6 酶处理条件优化

称取 200mg 五味子粗多糖溶于 1000mL 水中。根据蛋白酶的技术参数,结合实验要求选取:蛋白酶用量、处理温度、处理时间、pH 四个因素。应用“Minitab”软件,采用中心复合设计方法^[10-11],对实验进行设计(因素水平设计见表 1),同时进行局部控制,使其他实验条件保持一致。

表 1 中心组合设计因素水平表

因素	水平		
	-1	0	1
A 蛋白酶用量(%)	1	2	3
B 处理温度(℃)	40	50	60
C 处理时间(h)	2	3	4
D pH	5	6	7

1.7 酶法与三氯乙酸-正丁醇法结合脱蛋白

酶法与三氯乙酸-正丁醇法相结合使用,重复 8 次。

1.8 酶法与 Sevag 法结合脱蛋白

酶法与 Sevag 法相结合使用,重复 9 次。

2 结果与讨论

2.1 蛋白质标准曲线

实验制备蛋白质标准曲线,得到回归曲线和直线方程: $A_1 = 0.110 C_1 - 0.109$ (C_1 : 蛋白质溶液浓度),相关系数 $r_1 = 0.9972$,见图 1。

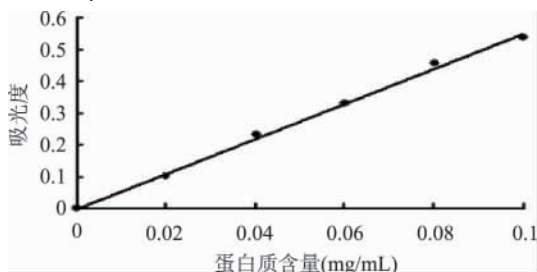


图 1 蛋白质标准曲线

2.2 葡萄糖标准曲线

实验制备葡萄糖标准曲线,得到回归曲线和直线方程, $A_2 = 0.164 + 5.270 C_2$ (C_2 : 葡萄糖溶液浓度),相关系数 $r_2 = 0.9985$,见图 2。

2.3 三氯乙酸-正丁醇法脱蛋白

如图 3 可知,五味子粗多糖经三氯乙酸-正丁醇脱蛋白处理后,蛋白质含量明显下降,经过 6 次处理

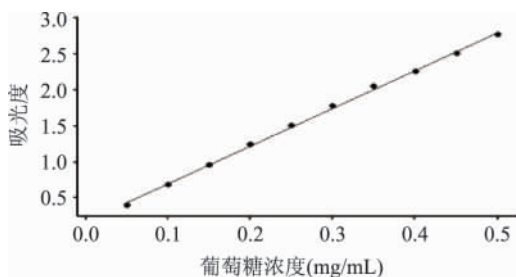


图 2 葡萄糖标准曲线

后蛋白质含量在 0.005mg/mL 左右。在蛋白质脱除的过程中多糖的含量下降趋势明显。

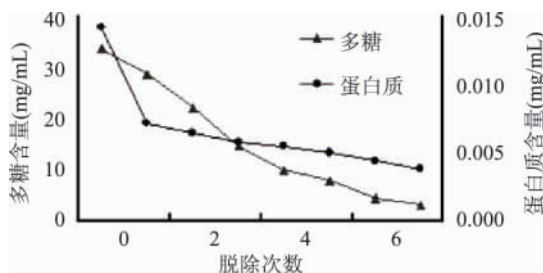


图 3 三氯乙酸-正丁醇法脱蛋白曲线

2.4 Sevag 法脱蛋白

如图 4 可知,五味子粗多糖经 Sevag 法脱蛋白处理后,蛋白质含量明显下降,经过 9 次处理后蛋白质含量达到 0.005mg/mL,在 10 次处理后维持在 0.004mg/mL 左右。同样在蛋白质脱除的过程中多糖的含量有明显下降趋势,且损失量较大。

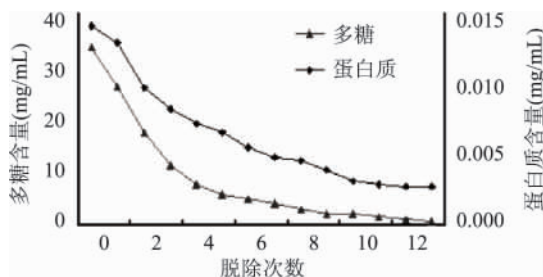


图 4 Sevag 法脱蛋白曲线

2.5 酶处理条件优化

2.5.1 模型的拟合 通过对蛋白酶用量、处理温度、处理时间、pH 进行实验优化设计(结果见表 2),得到相应的二次方程模型:

$$Y = 0.0988 + 0.0049A + 0.0083B + 0.0051C + 0.0139D + 0.0027AB + 0.0025AC - 0.0054AD - 0.0042BC - 0.0005BD - 0.0039CD - 0.0023A^2 + 0.0386B^2 + 0.0006C^2 - 0.0017D^2$$

其中: Y 是响应值,即五味子粗多糖中蛋白质的含量, A、B、C、D 分别表示蛋白酶用量、处理温度、处理时间、pH。

响应面分析中对实验结果进行拟合的二次模型方差分析见表 3。F 值为 18.71,多元相关系数为 $R^2 = 94.24\%$,预测 $R^2 = 78.20\%$,调整 $R^2 = 89.20\%$,说明模型对实验实际情况拟合较好; P 值 < 0.0001 (P 值 < 0.05 视为模型拟合显著),表明该模型高度显著,可用来进行响应值的预测。

表3 中心组合设计二次模型方差分析

类型	自由度	平方和	均方	F 值	P 值	显著水平
回归	14	0.0166	0.0012	18.71	<0.0001	**
纯误差	6	0.0004	0.0001			
失拟性	10	0.0006	0.0001	0.90	0.5800	
总和	30	0.0177				

注: $p < 0.01$, 极显著 **; $0.01 < p < 0.05$, 显著 *; 表 4~表 6 同。

表4 二次模型回归方程系数显著性检验

模型项	回归系数	标准误差	T 值	P 值	显著水平
常数项	0.0988	0.0024	41.791	<0.0001	**
A	0.0049	0.0019	2.604	0.0190	*
B	0.0083	0.0019	4.414	<0.0001	**
C	0.0051	0.0019	2.723	0.0152	*
D	0.0139	0.0019	7.411	<0.0001	**
A ²	-0.0023	0.0050	-0.504	0.6214	
B ²	0.0386	0.0050	7.800	<0.0001	**
C ²	0.0006	0.0050	0.122	0.9043	
D ²	-0.0017	0.0050	-0.343	0.7367	
AB	0.0027	0.0020	1.377	0.1882	
AC	0.0025	0.0020	1.232	0.2364	
AD	-0.0054	0.0020	-2.706	0.0162	*
BC	-0.0042	0.0020	-2.123	0.0500	*
BD	-0.0005	0.0020	-0.254	0.8033	
CD	-0.0039	0.0020	-1.941	0.0707	

表2 中心组合设计及结果

实验号	A	B	C	D	预测值 (mg/mL)	实验值 (mg/mL)
1	-1	-1	-1	-1	0.0929	0.0871
2	0	0	0	0	0.09889	0.0892
3	1	-1	1	-1	0.1344	0.1306
4	1	-1	1	1	0.1447	0.1477
5	0	0	0	1	0.1111	0.1056
6	1	-1	-1	1	0.1288	0.1227
7	0	1	0	0	0.1457	0.1399
8	-1	-1	-1	1	0.1402	0.1392
9	-1	1	-1	-1	0.1134	0.1124
10	0	0	0	0	0.0988	0.0927
11	0	0	0	0	0.0988	0.0971
12	1	1	-1	-1	0.1346	0.1286
13	-1	1	1	-1	0.1180	0.1223
14	0	0	-1	0	0.0943	0.1056
15	1	0	0	0	0.1012	0.1005
16	-1	-1	1	1	0.1463	0.1504
17	1	1	-1	1	0.1584	0.1605
18	-1	-1	1	-1	0.1144	0.1142
19	1	1	1	1	0.1573	0.1612
20	0	0	0	0	0.0988	0.0973
21	0	-1	0	0	0.1293	0.1343
22	1	-1	-1	-1	0.1030	0.1075
23	-1	1	-1	1	0.1588	0.1607
24	0	0	1	0	0.1046	0.0926
25	0	0	0	0	0.0988	0.0982
26	-1	0	0	0	0.0915	0.0915
27	0	0	0	0	0.0988	0.1057
28	0	0	0	0	0.0988	0.1138
29	1	1	1	-1	0.1490	0.1520
30	0	0	0	-1	0.0832	0.0880
31	-1	1	1	1	0.1479	0.1454

二次模型中回归系数的显著性检验(表4)表明,因素 B、D 对多糖蛋白的脱除效果的线性效应极显著,因素 A、C 对多糖蛋白的脱除效果的线性效应显著;因素 B² 对多糖蛋白的脱除效果的曲面效应极显著,因素 A²、C²、D² 对多糖蛋白的脱除效果的曲面效应不显著;因素 AD、BC 对多糖蛋白的脱除效果的交互效应显著,因素 AB、AC、BD、CD 对多糖蛋白的脱除效果的交互效应不显著。说明 3 个因素均不同程度地对响应值产生显著或极显著的影响,本实验设计的因素选择是成功的。

将未达到显著水平的因素剔除,将其平方和和自由度并入剩余项,进行第二次方差分析,以提高检验的精确度(表5)。

第二次方差分析,回归 F 值为 35.01,多元相关系数为 $R^2 = 91.42\%$, 预测 $R^2 = 83.24\%$, 调整 $R^2 = 88.81\%$, 说明模型对实验实际情况拟合较好; P 值 < 0.0001, 表明该模型高度显著,可用来进行响应值的预测。根据模型失拟性分析,说明所建立的三元二次回归方程在整个回归空间内的拟合度较好,可用于优化条件的模拟估算。

由表6分析表明,模型回归及保留的各项因素项均达到显著水平,说明蛋白质含量与实验因素之间存在极显著的回归关系,其优化的回归方程为:

$$Y = 0.0983 + 0.0049A + 0.0083B + 0.0051C + 0.0139D + 0.0360B^2 - 0.0054AD - 0.0042BC$$

其中: Y 是响应值,即五味子粗多糖中蛋白质的含量,A、B、C、D 分别表示蛋白酶用量、处理温度、处理时间、pH。

2.5.2 响应值优化与曲面图分析 由“Minitab”软件得到优化条件的处理,确定最优酶法脱蛋白工艺为:

表5 第二次方差分析

类型	自由度	平方和	均方	F 值	P 值	显著水平
回归	7	0.0162	0.0023	35.01	<0.0001	**
误差	6	0.0004	0.0001			
失拟性	17	0.0011	0.0001	0.96	0.5651	
总和	30	0.0177				

表6 第二次回归方程系数显著性检验

模型项	回归系数	标准误差	T 值	P 值	显著水平
常数项	0.0983	0.0023	43.659	<0.0001	**
A	0.0049	0.0019	2.558	0.0181	*
B	0.0083	0.0019	4.335	<0.0001	**
C	0.0051	0.0019	2.674	0.0142	*
D	0.0139	0.0019	7.280	<0.0001	**
B ²	0.0360	0.0030	12.174	<0.0001	**
AD	-0.0054	0.0020	-2.658	0.0145	*
BC	-0.0042	0.0020	-2.085	0.0482	*

蛋白酶用量为 1%、处理温度为 49℃、处理时间为 141min、pH 为 5，理论计算蛋白质含量为达到 0.07mg/mL。根据实际实验情况，把优化的工艺条件调整为蛋白酶用量为 1%、处理温度为 50℃、处理时间为 140min、pH 为 5，在此条件下进行了验证实验，实测蛋白质含量为 0.068 ± 0.007mg/mL，与预测值较接近，证明了响应面实验设计与分析方法在酶法脱除五味子粗多糖蛋白实验中的应用具有准确性和可靠性。

如图 5 可以看出，处理温度对其他三个因素有明显的影响，当处理温度在中间水平条件下，经过处理后的多糖蛋白质含量都较低；在 pH 与蛋白酶用量的曲面图中，曲面略微形成了马鞍型，在 pH 处于低水平时，随着酶用量的增加，蛋白质含量明显升高，但在 pH 处于高水平时，随着酶用量的增加，蛋白质含量略微下降，说明 pH 对蛋白酶活性产生了一定的影响，同时 pH 在 5~6 之间也有助于蛋白质变性，当两者都处于低水平条件下，处理后的多糖蛋白质含量较低；处理时间可能对蛋白酶的活性产生了负面影响，随着时间的减少，多糖中蛋白质含量也随之降

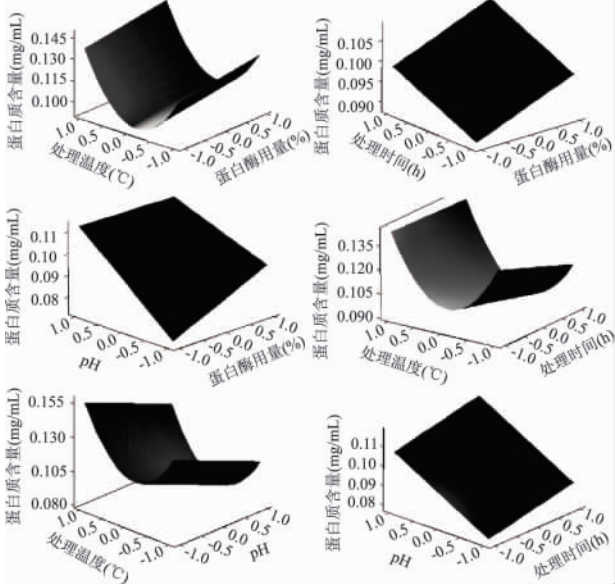


图5 响应面分析图

低；蛋白酶用量的变化并没有对实验结果产生较大影响。产生这种现象可能是由于实验使用的蛋白酶的相关技术参数所至。只有在温度适中，pH 处于酸性，处理时间相对较短的情况下，蛋白酶才能对蛋白质形成较大作用。

2.6 四种脱蛋白方法的比较

从图 6 中可以看出，四种方法都对五味子粗多糖有很好的脱蛋白效果，但是在脱除蛋白的过程中同样对多糖也造成了损失。从脱蛋白的效果来看，两种方法与酶法相结合处理要好于两种方法单独处理，这是由于蛋白酶除了酶解多糖溶液中的游离蛋白质外，还对与多糖结合的蛋白质产生了酶解作用，形成了更多的游离蛋白质，为进一步脱除提供了条件。同样从对多糖的损失方面来看，相结合的方法也优于这两种方法的单独使用，能够有效地减少多糖的损失。

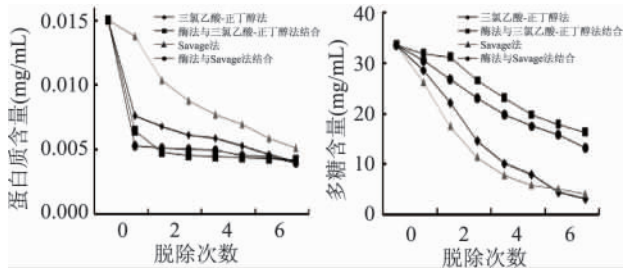


图6 四种不同方法的脱蛋白曲线

酶法 + 三氯乙酸-正丁醇法脱蛋白与酶法 + Sevag 法脱蛋白对蛋白的脱除效果都较好，两种方法在经过 4 次处理后，多糖溶液中蛋白质含量都达到了 0.005mg/mL 以下，酶法 + 三氯乙酸-正丁醇法略低于酶法 + Sevag 法，且继续处理蛋白质含量基本维持不变；两者多糖含量都维持在 20mg/mL 以上，酶法 + 三氯乙酸-正丁醇法要高于酶法 + Sevag 法。同时通过对经过两种处理方法后溶液的剩余体积进行比较发现，酶法 + 三氯乙酸-正丁醇法在经过 4 次以上处理后，溶液的剩余体积都在 45mL 以上，而酶法 + Sevag 法经 4 次以上处理后，溶液的剩余体积已经在 40mL 以下，且随着处理次数的增多而逐渐减少。综合以上因素，最终选择先用酶法对五味子粗多糖溶

液进行处理,然后用等体积三氯乙酸-正丁醇溶液对酶法处理完的溶液进行4次脱蛋白处理,完成对粗多糖的脱蛋白过程。

3 结论

本实验通过对三种不同的方法,单独或联合使用对五味子粗多糖脱蛋白效果的研究和比较,在酶法脱蛋白的实验中通过响应面实验设计方法,考察了蛋白酶用量、处理温度、处理时间、pH对脱蛋白效果的影响。实验分析中,二次方程的模型(总)回归极显著,且第二次方差分析后的失拟性检验不显著,说明通过本次实验所建立的二次回归方程成功地反映了所考察的四个因素与响应值之间的相关性,实验设计科学合理。在酶法处理过程中,蛋白酶用量、处理温度、处理时间、pH都是影响蛋白质含量的关键因素,并且处理温度的曲面效应,蛋白酶用量与pH、处理温度与处理时间的交互作用都对蛋白质含量有显著的影响。各因素对蛋白质含量的影响顺序为:处理温度>pH>处理时间>蛋白酶用量。酶法处理的最佳工艺条件为:蛋白酶用量为1%、处理温度为49℃、处理时间为141min、pH为5。根据实际情况,工艺条件调整为:蛋白酶用量为1%、处理温度为50℃、处理时间为140min、pH为5,在此条件下进行了验证实验,实测蛋白质含量为 $0.068 \pm 0.007 \text{ mg/mL}$,与预测值 0.07 mg/mL 较接近。

通过对几种处理方法后溶液中的蛋白质含量、多糖含量以及多次处理后溶液剩余体积等因素进行比较,最终确定先用酶法在工艺参数为:蛋白酶用量为1%、处理温度为50℃、处理时间为140min、pH为5的条件下对五味子粗多糖溶液进行处理,然后再用等体积三氯乙酸-正丁醇溶液对酶法处理完的溶液进行4次处理,最终多糖溶液中蛋白质含量低于 0.005 mg/mL 。

(上接第279页)

硕士学位论文,2004,7.

廖晓军.果汁的发展趋势[J].中国食物与营养,1999(2):4.

诚夫.世界饮料发展趋势[J].江西食品工业,2002(3):48.

魏玉新.浅析苹果及苹果汁的营养价值与医疗保健作用[J].中国国菜,2002(4):43.

曲杰,尹振波,邵海燕,等.适宜在黑龙江省推广苹果树品种[J].中国林副特产,1995(8):45.

綦菁华.苹果浓缩汁二次混浊形成机理及控制技术研究[J].中国农业大学博士学位论文,2003.

王静,向文胜.现代农业仪器分析应用技术[M].黑龙江:东北林业大学出版社,2000.

石碧,狄莹.植物多酚[M].北京:科学出版社,2000,7.

余冰宾.生物化学实验指导[M].北京:清华大学出版社,2004.

宁正祥.食品成分分析手册[M].北京:中国轻工业出版社,1998.

参考文献

李巧云,居红芳,翟春.五味子粗多糖提取工艺的研究[J].食品科学,2004,25(5):105.

睢大员,高普军,吕中智,等.北五味子粗多糖保肝作用的药理研究[J].吉林中医药,1995,15(1):37.

高晓旭,孟宪军,李继海.北五味子活性多糖降脂减肥作用的研究[J].食品工业科技,2008,29(11):248-250.

Gao X X, Meng X J, Li J H, et al. Hypoglycemic effects of a water-soluble polysaccharide isolated from *Schisandra chinensis* (Turcz.) Bail in alloxan-induced diabetic mice [J]. Journal of Biotechnology, 2008, 1365: 5725.

李知敏,王伯初,周菁,等.植物多糖提取液的几种脱蛋白方法的比较分析[J].重庆大学学报,2004,27(8):57-59.

徐世忱,李广全,孙莹.北五味子粗多糖的提取与成分分析[J].吉林医药工业,1992(4):15.

牛广财,朱丹.马齿苋多糖脱蛋白方法的研究[J].食品研究与开发,2005,26(5):51-53.

刘延吉,祝寰宇.沙棘多糖脱蛋白工艺的优化研究[J].河南农业科学,2008(3):84-87.

Yang B, Jiang Y M, Zhao M M, et al. Effects of ultrasonic extraction on the physical and chemical properties of polysaccharides from longan fruit pericarp [J]. Polymer Degradation and Stability, 2008, (93): 268-272.

Wu Y, Cui S W, Tang J, et al. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from boat-fruited sterculia seeds by response surface methodology [J]. Food Chemistry, 2007, 105: 1599-1605.

Liang R J. Optimization of extraction process of *Glycyrrhiza glabra* polysaccharides by response surface methodology [J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 74: 858-861.

张飞,岳田利,费坚,等.果胶酶活力的测定方法研究[J].西北农业学报,2004(4):134-137.

周会玲,段长青,周存田,等.不同品种苹果汁的褐变及其抑制方法研究[J].西北农林科技大学学报,2001(2):91-93.

吕心泉,武利强.苹果原浆抗氧化防褐变及稳定性实验[J].食品与机械,2002(4):11-12.

杨军,赵学慧.果胶酶在苹果汁加工过程中的应用研究[J].中国酿造,1998(2):5-17.

杨军,赵学慧.果胶酶对果蔬汁作用的研究[J].中国酿造,1998(3):27-28.

毕金峰,魏宝东.酶法提取树莓汁的研究[J].食品科学,2002(12):83-85.

何志刚,李维新,林晓姿.枇杷果汁加工的酶处理技术研究[J].食品科学,2004(1):72-75.

葛毅强,蔡同一,胡小松.果汁二次混浊研究的新进展[J].食品与发酵工业,2002,28(9):46-50.