

野生仙人掌粗多糖脱蛋白方法的研究

朱 苗^{1,2},袁清霞²,程 杰²,李 恒²,李莉梅³,张桂和¹,曾富华^{2,*}

(1.海南大学食品学院,海南海口 570228;

2.湛江师范学院生命科学与技术学院,广东湛江 524048;

3.广东高校边缘热带特色植物工程技术开发中心,广东湛江 524048)

摘 要:采用三氯乙酸(TCA)法、Sevag法、蛋白质等电点法对仙人掌粗多糖进行脱蛋白研究,以蛋白脱除率、多糖损失率和抗氧化性损失率为指标。结果表明:三氯乙酸法脱蛋白效果最好,浓度为3%时,蛋白脱除率为80.28%,多糖损失率为5.98%,抗氧化性损失率为34.56%。

关键词:仙人掌,多糖,脱蛋白,抗氧化性

Study on the deproteinization method for *Opuntia dillenii* Haw. crude polysaccharides

ZHU Miao¹, YUAN Qing-xia², CHENG Jie², LI Heng², LI Li-mei³, ZHANG Gui-he¹, ZENG Fu-hua^{2,*}

(1.College of Food Science, Hainan University, Haikou 570228, China;

2.College of Life Science and Technology, Zhanjiang Normal University, Zhanjiang 524048, China;

3.University Engineering & Technology Development Center of Fringe Tropical Characteristic Plant in Guangdong, Zhanjiang 524048, China)

Abstract: Trichloroacetic acid method, Sevag method and the protein isoelectric point method were used to remove protein from *Opuntia dillenii* Haw. crude polysaccharides. And deproteinization effects of this three methods were compared by the loss of protein, the loss of polysaccharides and the loss of inoxidizability. Results showed that with concentration of trichloroacetic acid 3%, deproteinization was most effective. In this condition, the loss of protein was 80.28%, the loss of polysaccharides was 5.98% and the loss of inoxidizability was 34.56%.

Key words: *Opuntia dillenii* Haw.; polysaccharides; deproteinization; inoxidizability

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2013)24-0229-03

我国仙人掌主要分布在广西、广东、江西、福建等省,资源丰富,发展潜力巨大,开发和利用野生仙人掌符合当今人们自然、健康、绿色的消费需求,在国内外市场都有广阔的发展空间。20世纪早期常被用作牲畜饲料和造酒的原料,在民间也很早就作为治疗溃疡、抗炎、蛇咬伤等的药物^[1]。仙人掌粗多糖(*Opuntia dillenii* Haw. polysaccharides, ODPS)是仙人掌的主要活性成分之一,大量药理学研究表明,其具有降血糖、降血脂、抗肿瘤、抗衰老、抗氧化、提高免疫力和保肝护肝等生物活性^[2-7]。

就文献报道看来,仙人掌多糖的研究主要集中在提取工艺的优化及其药理作用的探讨上,缺乏对其进行系统的、具体的结构描述^[8-10]。因此,我们需要寻找确实有效的分离纯化方法,目前一般采用离子

交换层析的方法进行纯化,但游离蛋白的存在势必会影响到离子交换层析的效果以及多糖得率,因此必须去除其中的游离蛋白。本文以野生仙人掌为原料,探讨不同方法的蛋白脱除率、多糖和抗氧化性损失率,为其进一步分级纯化提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

仙人掌 采自湛江东海岛附近,经湛江师范学院的陈燕副教授鉴定为*Opuntia dillenii* Haw.;考马斯亮蓝G-250和阿拉伯糖 FLUKA BioChemika公司;1,1-二苯基苦基苯肼(DPPH) 美国Sigma公司;硫酸、磷酸、95%乙醇、三氯乙酸、氢氧化钠、氯仿、正丁醇、乙酸 分析纯;水 为超纯水。

Beekman 360型精密pH计 USA Beekman Coulter INC.;日立牌CR22E型高速冷冻离心机 Japan Hitachi Co.;4.5 Liter Freeze Dry System American Labconco Inc.;TU-1800S型紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司;LABOROTA 4003-control型旋转蒸发仪 Germany Heidolph Co.。

1.2 实验方法

1.2.1 仙人掌粗多糖提取工艺 参照本实验室Zhao

收稿日期:2013-05-07 * 通讯联系人

作者简介:朱苗(1989-),女,硕士研究生,研究方向:天然产物开发与利用。

基金项目:国家星火计划(2012GA780016);湛江市科技攻关计划项目(2012C030304,2012C3103019);广东高校边缘热带特色植物工程技术开发中心立项基金(GCZX-B1002);植物工程中心开放基金项目([2012]0103)。

等^[11]的方法进行。新鲜仙人掌茎片除刺洗净、切碎→80%食用酒精浸泡→干燥,粉碎过60目筛→热水浸提→上清液→减压浓缩→3倍体积95%乙醇醇沉→白色沉淀→冻干→粗多糖。

1.2.2 多糖含量的测定 采用苯酚硫酸法^[12],以阿拉伯糖作标准品。标准曲线: $y=0.0185x-0.0068$, $R^2=0.9991$ 。线性范围为7.5~37.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.2.3 蛋白质含量的测定 采用考马斯亮蓝法^[13],以牛血清蛋白作标准品。标准曲线: $y=0.0061x$, $R^2=0.9955$ 。线性范围为10~90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.2.4 抗氧化性的测定 采用清除DPPH自由基的方法^[14]。吸取样品2.0mL于试管中,加入2.0mL 0.1mmol/L DPPH溶液,充分混匀,避光静置30min后,以50%乙醇调零,517nm波长测吸光值 $A_{\text{样品}}$ 。同时,用50%乙醇代替DPPH溶液,测吸光值 $A_{\text{对照}}$;再用50%乙醇代替样品,测吸光值 $A_{\text{空白}}$ 。

清除率(%)=[1-($A_{\text{样品}}-A_{\text{对照}}$)/ $A_{\text{空白}}$] $\times 100$ 式(1)

1.2.5 蛋白脱除率、多糖损失率及抗氧化性损失率的计算方法

蛋白脱除率(%)=(原糖液中蛋白含量-脱蛋白后蛋白含量)/原糖液中蛋白含量 $\times 100$ 式(2)

多糖损失率(%)=(原糖液中糖含量-脱蛋白后糖含量)/原糖液中糖含量 $\times 100$ 式(3)

抗氧化性损失率(%)=(原糖液抗氧化性-脱蛋白后抗氧化性)/原糖液抗氧化性 $\times 100$ 式(4)

1.2.6 仙人掌粗多糖的脱蛋白实验

1.2.6.1 三氯乙酸(TCA)法 参照文献[15]中的方法,取0.5%粗多糖溶液20mL分别加入等体积质量浓度为3%、6%、9%、12%、15%三氯乙酸溶液,搅拌均匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 静置12h,8000r/min离心15min去沉淀,上清液用NaOH调pH至中性,定容。重复操作3次。分别测多糖、蛋白质含量和抗氧化性。

1.2.6.2 Sevag法 参照文献[16]中的方法,0.5%粗多糖溶液25mL与5mL Sevag试剂(氯仿:正丁醇=5:1)混合,剧烈振荡30min,8000r/min离心15min,弃去中间沉淀和下层有机相,收集水相,定容。重复操作3次。测多糖、蛋白质含量和抗氧化性。分别处理1、2、3、4、5、6、7次。

1.2.6.3 蛋白质等电点法 参照文献[17]中的方法,取20mL 0.5%粗多糖溶液,分别用乙酸调节pH至2.5、3.0、3.5、4.0和4.5,搅拌均匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 静置12h,8000r/min离心15min,上清液定容,重复操作3次。测多糖、蛋白质含量和抗氧化性。

2 结果与分析

2.1 三氯乙酸(TCA)法

由图1可知,三氯乙酸浓度较小时,蛋白脱除率较高,但随着浓度的增加,蛋白脱除率逐渐降低并趋于稳定,而多糖损失率相应减小,这可能是由于三氯乙酸与蛋白质结合生成的沉淀吸附了部分多糖导致的,而三氯乙酸并未将多糖降解为单糖。抗氧化性损失率随浓度的增加呈大致上升趋势,说明三氯乙酸浓度增加,对多糖降解越厉害,对其结构破坏越强。三氯乙酸浓度过低,也不能有效的沉淀蛋白。当三氯乙酸浓度为3%时,蛋白脱除率为80.28%,多糖

损失率为5.98%,抗氧化性损失率为34.56%,此时,脱蛋白效果最好。

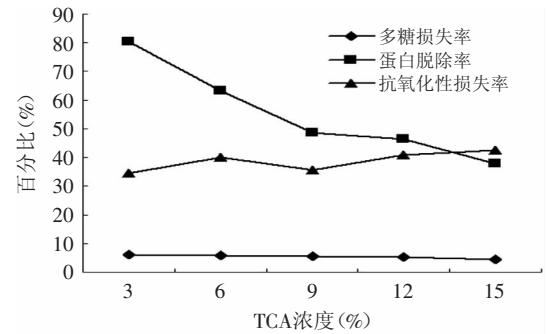


图1 三氯乙酸法脱蛋白对多糖质量的影响

Fig.1 Effect of trichloroacetic acid method on the quality of the polysaccharide

2.2 Sevag法

由图2可以看出,随着脱蛋白次数的增加,蛋白脱除率呈上升趋势,但总的来说脱蛋白效果不是很好,进行7次脱蛋白处理,蛋白脱除率才达到58.30%。多糖损失率也随之升高,达到了36.92%,这是因为每次脱蛋白处理都会造成一定的多糖损失。抗氧化性损失率基本上保持不变,但也较高。蛋白脱除率低于三氯乙酸法,抗氧化性损失率也略高于三氯乙酸法。由于Sevag法使用的试剂是氯仿和正丁醇,氯仿有毒,会造成多糖活性的下降,而且溶剂会有残留,因此不宜用Sevag法脱蛋白。

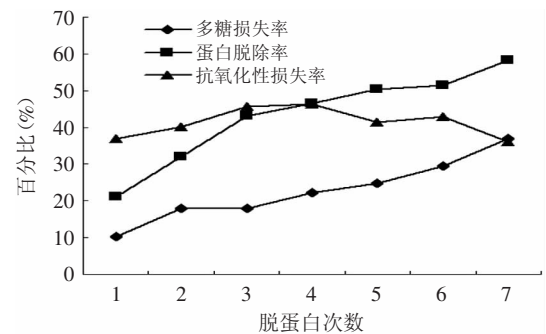


图2 Sevag法脱蛋白对多糖质量的影响

Fig.2 Effect of Sevag method on the quality of the polysaccharide

2.3 蛋白质等电点法

由图3可以看出,随着糖液pH的升高,糖液中蛋白质脱除率逐渐增加然后降低,多糖损失率逐渐降低然后增加,抗氧化性损失率逐渐增加。用乙酸调节糖液pH为3.5时,蛋白质脱除率最高,达60.86%,说明pH3.5是仙人掌多糖中杂蛋白的等电点,此时多糖损失率达到最低,为1.67%,抗氧化性损失率为30.09%。抗氧化性损失低于Sevag法和三氯乙酸法,可能是由于其反应较温和,对多糖结构破坏较小。

2.4 3种方法中最佳脱蛋白方法的比较

由图4可知,Sevag法脱蛋白多糖损失率最高,脱蛋白效果一般,抗氧化性损失率也略高于其他方法;三

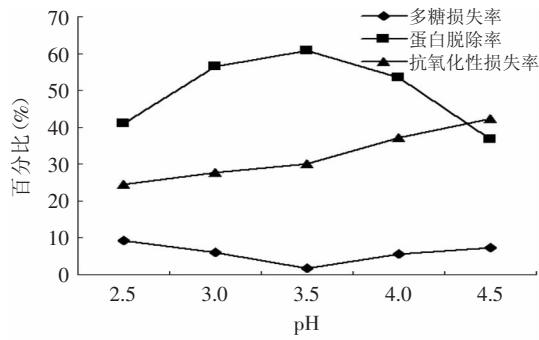


图3 蛋白质等电点法对多糖质量的影响

Fig.3 Effect of the protein isoelectric point method on the quality of the polysaccharide

氯乙酸法和等电点法多糖损失率都较小,虽三氯乙酸法抗氧化性损失率略高于等电点法,但其脱蛋白效果却远高于等电点法。因此,可选择三氯乙酸法脱蛋白。

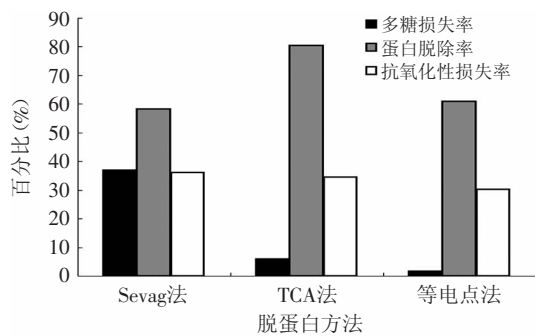


图4 三种脱蛋白方法效果的比较

Fig.4 Effect of the comparison of three deproteinization methods

3 结论

实验对比了三氯乙酸法、Sevag法和等电点法对仙人掌多糖脱蛋白的效果,其中,Sevag法需要重复多次操作,而且多糖损失较大,达到了36.92%;三氯乙酸法脱蛋白效率高,当浓度为3%时,蛋白脱除率为80.28%,多糖损失不明显,只有5.98%,抗氧化性损失也不高;蛋白质等电点法脱蛋白效果一般,最佳效果只达到60.86%,多糖损失较小,而抗氧化性损失最小。对比以上方法,采用3%的三氯乙酸进行脱蛋白。

参考文献

[1] Bohm H. "Opuntia dillenii"-An interesting and promising

cactaceae taxon[J]. J PACD, 2008(10): 148-170.
 [2] Yang N, Zhao M M, Zhu B H, et al. Anti-diabetic effects of polysaccharides from Opuntia megacantha cladode in normal and streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2008(9): 570-574.
 [3] Zhao L Y, Huang W, Yuan Q X, et al. Hypolipidemic effects and mechanisms of the main component of Opuntia dillenii Haw. polysaccharides in high-fat emulsion-induced hyperlipidemic rats[J]. Food Chemistry, 2012, 134: 964-971.
 [4] 梁蓓蓓, 刘华钢, 曹俊涛. 仙人掌果多糖对S180荷瘤小鼠抑癌作用的实验研究[J]. 癌症, 2008, 27(6): 580-584.
 [5] Huang X J, Li Q, Guo L J, et al. Protection of cactus polysaccharide against H₂O₂-induced damage in the rat cerebral cortex and hippocampus differences in time of administration[J]. Neural Regen Res, 2008, 3(1): 14-18.
 [6] Schepetkin I A, Xie G, Kirpotina L N, et al. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from Opuntia polyacantha[J]. International Immunopharmacology, 2008, 8(10): 1455-1466.
 [7] 喻宁华, 曾富华, 饶力群. 仙人掌多糖对小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国生化药物杂志, 2009, 30(4): 255-258.
 [8] 袁清霞, 赵龙岩, 李子娇, 等. 酸法提取仙人掌多糖工艺[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(3): 42-45.
 [9] 赵龙岩, 袁清霞, 李子娇, 等. 仙人掌多糖的双酶法提取及含量测定方法优化[J]. 中国医药工业杂志, 2011, 42(2): 96-100.
 [10] 梁艳, 应苗苗, 吕英华, 等. 微波辅助提取仙人掌多糖的工艺研究[J]. 农业工程学报, 2006, 22(7): 159-162.
 [11] Zhao L Y, Lan Q J, Huang Z C, et al. Antidiabetic effect of a newly identified component of Opuntia dillenii polysaccharides[J]. Phytomedicine, 2011(18): 661-668.
 [12] 钱松祥, 石森林, 潘水珍. 苯酚-硫酸法测定固元胶囊中多糖[J]. 中草药, 2006, 37(8): 1180-1181.
 [13] 王文平, 郭祀远, 李琳, 等. 考马斯亮蓝法测定野木瓜多糖中蛋白质的含量[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(1): 115-117.
 [14] 孟宪军, 刘晓晶, 孙希云, 等. 蓝莓多糖的抗氧化性与抑菌作用[J]. 食品科学, 2010, 31(17): 110-114.
 [15] 黄生权. 赤灵芝多糖的提取分离、结构分析与生物活性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2010.
 [16] 董英, 张艳芳, 孙艳辉. 水飞蓟粗多糖脱蛋白方法的比较[J]. 食品科学, 2007, 28(12): 82-84.
 [17] 李强, 唐微, 郑伟, 等. 杜仲粗多糖脱蛋白方法的对比研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(3): 315-317.

(上接第218页)

producing α -amylase of the thermophilic actinomycetes, Thermomonospora curvata[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1993, 39: 31-35.
 [13] 廖显泓, 涂桂洪, 赵德刚. 西方许旺酵母 α -淀粉酶基因的克隆及其在大肠杆菌中的分泌表达[J]. 生物技术, 2006, 16(2): 21-23.
 [14] 牛丹丹, 徐敏, 马俊双. 地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶基因的克隆和及其启动子功能鉴定[J]. 微生物学报, 2006, 46(4): 576-580.
 [15] You L, Arnold F H. Directed Evolution of Subtilisin E in

Bacillus Subtilis to Enhance Total Activity in Aqueous Dimethylformamide[J]. Protein Eng, 1996, 9: 77-83.
 [16] 郑斌, 詹希美. 信号肽序列及其在蛋白质表达中的应用[J]. 生物技术通讯, 2005, 16(3): 296-298.
 [17] 李金霞, 蔡恒, 路福平. 地衣芽孢杆菌耐高温 α -淀粉酶基因在大肠杆菌中的克隆、表达及其产物的分泌[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(3): 70-73.
 [18] 朱卫民, 吴宁一. 枯草芽孢杆菌 α -淀粉酶基因在大肠杆菌中的表达及其产物的分泌[J]. 微生物学报, 1992, 32(4): 296-298.