

玉米须多糖中蛋白质脱除的 Sevag 与酶法联用工艺优化

周鸿立^{1,2}, 杨晓虹^{1,*}

(1. 吉林大学药学院, 吉林 长春 130021; 2. 吉林化工学院化学与制药工程学院, 吉林 吉林 132022)

摘 要: 采用 Sevag 与酶法联用优化玉米须多糖脱蛋白的工艺。以脱蛋白率和多糖剩余率及综合评分为考察指标。结果表明, 最佳工艺为酶底比 2.5(mg/L)、温度 50℃、振荡时间 8min、脱蛋白次数 2 次。最终多糖纯度由 21.88% 提高为 37.77%, 脱蛋白率 69.97% 多糖, 剩余率 94.51%。此方法可用于玉米须多糖中蛋白质的脱除。

关键词: 玉米须; 多糖; Sevag 试剂; 木瓜蛋白酶; 脱蛋白

Removal of Proteins from Corn Silk Polysaccharide by A Combined Enzymatic-Sevag Method

ZHOU Hong-li^{1,2}, YANG Xiao-hong^{1,*}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, China; 2. School of Chemical and Pharmaceutical Engineering, Jilin Institute of Chemical Technology, Jilin 132022, China)

Abstract: Enzymatic hydrolysis followed by Sevag treatment was used to develop a combined method for removing proteins in crude corn silk polysaccharide. The enzyme used was papain. Its hydrolysis conditions were optimized by single factor and orthogonal array design methods based on deproteinization rate and the recovery of polysaccharides. The number of repeated Sevag treatment was also investigated. The optimal conditions for deproteinizing crude corn silk polysaccharide were as follows: enzyme-to-substrate ratio of 2.5 (mg/L), temperature of 50 °C, oscillation time of 8 min and number of repeated Sevag treatment of 2. Under such conditions, the purity of crude corn silk polysaccharide was increased from 21.88% to 37.77%, and the deproteinization rate and polysaccharide recovery were 69.97% and 94.51%, respectively.

Key words: corn silk; polysaccharide; Sevag; papain; deproteinization

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)08-0129-04

玉米须(corn silk, *Stigma maydis*)是禾本科植物玉蜀黍的花柱和柱头, 味淡、性平, 玉米须多糖具有调节免疫功能、抗肿瘤、降糖^[1]、利尿^[2]、解热、利胆等作用, 且毒性低, 具有良好的科研价值及市场开发前景。但多糖中常含有一定量的蛋白质, 会吸附多糖给分离带来困难。最重要的是蛋白质具有热源性, 如何除去蛋白成为多糖纯化的一个重要问题。由于单纯的 Sevag 方法脱蛋白需要进行多次^[3-4], 并存在废液处理问题; 酶法除蛋白反应温和, 操作相对简单, 但成本高且经过沸水加热会有蛋白残余^[5-7]。本实验探讨 Sevag 和酶法联用脱玉米须多糖中蛋白工艺, 旨在为玉米须资源高效开发提供参考。

1 材料与方法

收稿日期: 2010-08-11

基金项目: 吉林大学博士后基金项目(801070660432); 吉林省教育厅“十一五”科学技术研究项目(2010 第 175 号)

作者简介: 周鸿立(1967—), 女, 副教授, 博士, 主要从事天然产物的研究与开发。E-mail: zhl67@126.com

* 通信作者: 杨晓虹(1954—), 女, 教授, 博士, 主要从事新药合成研究。E-mail: xiaohongyang88@126.com

1.1 材料与试剂

玉米须药材 2009 采自吉林省吉林市郊区, 由吉林大学王广树教授鉴定为甜粘 1 号。木瓜蛋白酶(酶活力 6000U/mg, Sigma 分装) 广西南宁杰沃利生物有限公司; 考马斯亮蓝 G-250(进口分装, 081208) 中国惠氏生化试剂有限公司; 牛血清白蛋白(F20080603) 国药集团化学试剂有限公司; 葡萄糖、氯仿、苯酚、浓硫酸、正丁醇等均为分析纯。

1.2 仪器与设备

SHB-III A 型循环水多用真空泵 郑州长城科技工贸有限公司; LDZ5-2 型台式离心机 北京医用离心机有限公司; 752 型紫外-可见分光光度计 山东高密彩虹分析仪器有限公司; W2-100S 型恒温水浴锅 江苏省金坛市正基仪器有限公司; ZF-6020 真空干燥箱 上海一恒科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 粗多糖的制备

玉米须干燥后粉碎, 过40目筛。准确称取100g, 用石油醚脱脂后, 放入5000mL圆底烧瓶中, 加20倍量的水, 浸泡过夜, 加蒸馏水约至3000mL, 于90℃水浴提取1h, 提取液过滤, 第2次加水2000mL, 提取30min, 过滤; 合并2次滤液浓缩至总体积的1/5, 加无水乙醇至体积分数70%以上, 静置24h, 3500r/min离心5min, 回收乙醇, 沉淀部分真空干燥得粗多糖, 备用。

粗多糖溶液的配制: 精密称取粗多糖0.1g置50mL容量瓶中, 配制多糖溶液, 离心、过滤, 备用^[8]。

1.3.2 分析方法

按常规苯酚-硫酸法测多糖含量, 在490nm波长处以葡萄糖为对照品, 60~140μg/mL范围内测吸光度, 得回归方程: $A=5.945C-0.0377(n=5)$, $r=0.9995$ 。用考马斯亮蓝G-250方法测蛋白质含量, 在595nm波长处以标准小牛血清蛋白为对照品, 0.12~0.25mg/mL范围内测吸光度, 得回归方程: $A=5.4954C-0.2806(n=5)$, $r=0.9997$ 。

多糖剩余率/% = 脱蛋白后多糖含量 / 脱蛋白前多糖含量 × 100

蛋白去除率/% = (脱蛋白前蛋白含量 - 脱蛋白后蛋白含量) / 脱蛋白前蛋白含量 × 100

综合评分 = (每次脱蛋白率 / 每组最高脱蛋白率) × 0.5 × 100 + (每次多糖剩余率 / 每组最高多糖剩余率) × 0.5 × 100^[9-11]

1.3.3 单因素试验

木瓜蛋白酶脱玉米须多糖中蛋白质的单因素最佳pH5.0、酶解时间1h^[8], 沸水浴5min灭酶, 冷却至室温后, 5000r/min离心, 加入的顺序以先加入酶水解蛋白, 后用Sevag试剂(氯仿-正丁醇体积比为5:1, 样液与试剂体积比为2:1)除蛋白效果好^[7]。前面因素固定后, 分别用木瓜蛋白酶与样液的酶底比(0、1.0、1.5、2.0、2.5mg/L)、水浴温度(40、50、60、70℃)、振荡时间(0、2、5、8、11min)、脱蛋白次数(0、1、2、3、4次)4个因素做单因素试验^[11-14], 计算脱蛋白率、多糖剩余率和综合评分。

1.3.4 正交试验

根据单因素确定的最优条件, 设计正交试验因素水平(表1)。

表1 脱蛋白正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels in orthogonal array design

水平	A 酶底比(mg/L)	B 水浴温度/℃	C 振荡时间/min	D 脱蛋白次数
1	1.5	40	5	2
2	2.0	50	8	3
3	2.5	60	11	4

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 酶底比对脱蛋白的影响

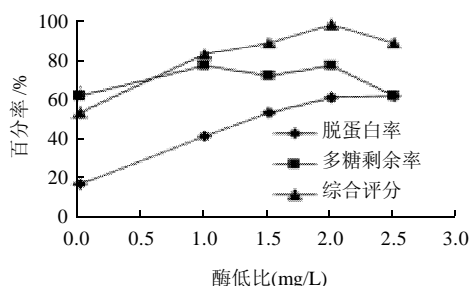


图1 酶底比对脱蛋白的影响

Fig.1 Effect of enzyme-to-substrate ratio on deproteinization rate and polysaccharide recovery

由图1可知, 当样液与木瓜蛋白酶酶底比为2.0时, 脱蛋白率和多糖剩余率都较高, 且综合评分最高。再增加酶用量, 不但蛋白去除效果降低, 而且多糖剩余率也减少了。分析原因, 一是多糖溶液中蛋白质, 即木瓜蛋白酶作用底物含量有限, 酶和底物的结合位点全部参与反应后, 再增加酶的用量不仅对反应没有明显影响, 而且酶加入量过大会增加成本。二是酶作为外加的蛋白质, 可以水解多糖中蛋白质, 同时, 也具有从蛋白质的水解物再合成蛋白质类物质的能力。因此, 加入蛋白酶应适量, 不宜过多, 故确定2.0(mg/L)为最佳酶底比。

2.1.2 水浴温度对脱蛋白的影响

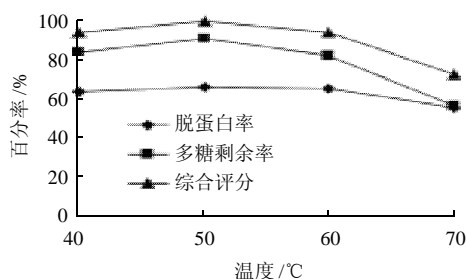


图2 温度对脱蛋白的影响

Fig.2 Effect of temperature on deproteinization rate and polysaccharide recovery

由图2可知, 酶活力随温度的升高而增加, 超过50℃后, 活力降低。温度过低, 不利于分子热运动进行, 降低效率; 温度过高则会导致酶失活。虽然木瓜蛋白酶耐温性较好, 但多糖随着温度的升高会分解。因在50℃时脱蛋白率和多糖剩余率都较高, 且综合评分最高, 故确定50℃为最佳脱蛋白温度。

2.1.3 振荡时间对脱蛋白的影响

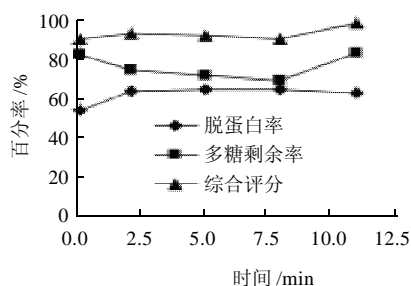


图3 振荡时间对脱蛋白的影响

Fig.3 Effect of oscillation time on deproteinization rate and polysaccharide recovery

由图3可知,在振荡时间11min脱蛋白率和多糖剩余率都较高,且综合评分最高,故确定11min为最佳振荡时间。单纯Sevag法振荡时间大约20min,脱蛋白率不高,有时多糖损失率却很高^[7,9,12-13],而酶水解后振荡时间的缩短,相对节约了生产成本。

2.1.4 脱蛋白次数对脱蛋白的影响

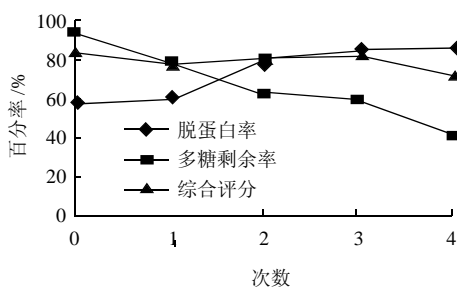


图4 脱蛋白次数的影响

Fig.4 Effect of number of repeated Sevag treatment on deproteinization rate and polysaccharide recovery

由图4可知,随着Sevag试剂脱蛋白次数增加,脱蛋白率升高但多糖剩余率却在下降,参考综合评分,确定最佳脱蛋白次数为3次。黄洁^[7]、李苹苹^[10]、吴海玥^[15]等报道单纯Sevag法需反复多次,但与酶联用后比较可知,Sevag法3次即可达到理想的除蛋白效果,且多糖损失亦较少(表2)。如果多次处理后,还有一定蛋白,可能含有糖蛋白缀合物^[13]。

表2 文献中两种方法比较

Table 2 Comparisons of deproteinization rates and polysaccharide recoveries of combined enzymatic-Sevag methods reported in literature

文献	脱蛋白次数	脱蛋白率/%	多糖剩余率/%
黄洁 ^[7]	Sevage法6次	99.06	59.45
	Sevag+酶法4次	99.16	64.17
李苹苹 ^[10]	Sevag法6次	63.2	61.3
	Sevag+酶法3次	78.5	74.9
吴海玥 ^[15]	Sevage法7次	90.3	41.6
	Sevag+酶法2次	91.7	44.1

2.2 正交试验结果

表3 玉米须多糖中蛋白质脱除的Sevag与酶法联用正交试验设计及结果

Table 3 Scheme and experimental results of orthogonal array design

试验号	A	B	C	D	脱蛋白率/%	多糖剩余率/%	综合评分
1	1	1	1	1	64.19	92.41	92.46
2	1	2	2	2	67.71	88.30	92.63
3	1	3	3	3	65.51	77.99	85.64
4	2	1	2	3	72.99	77.43	90.36
5	2	2	3	1	63.60	89.24	90.37
6	2	3	1	2	62.27	82.11	85.67
7	3	1	3	2	70.48	83.12	91.71
8	3	2	1	3	74.55	82.96	94.36
9	3	3	2	1	63.10	93.51	92.32
k_1	90.24	91.51	90.83	91.72			
k_2	88.80	92.45	91.77	90.00			
k_3	92.80	87.88	89.24	90.12			
R	4.00	4.57	2.53	1.72			
优水平	A_3	B_2	C_2	D_1			

表4 综合评分方差分析表

Table 4 Variance analysis for comprehensive weighted evaluation of deproteinization rate and polysaccharide recovery

方差来源	平方和	自由度	均方	F值
A	24.58	2	12.29	4.47
B	35.04	2	17.52	6.37
C	9.82	2	4.91	1.79
D	5.50	2	2.75	
误差	5.50	2	2.75	
总和	74.94			

注: $F_{0.05(2,2)}=19$; $F_{0.01(2,2)}=99$ 。

由表3可得,正交试验的4因素中,引入综合评分做极差分析,影响关系大小依次为 $B > A > C > D$,极差最优条件为 $A_3B_2C_2D_1$,即酶底比2.5(mg/L),温度50℃,振荡时间8min,脱蛋白次数2次。如果用脱蛋白率做极差分析,则D因素影响最大,所以工艺研究有必要考察损失率,以节约成本使实验条件更接近产业化。

2.3 验证实验

取正交试验最佳因素组合 $A_3B_2C_2D_1$ 做3次验证实验,即酶底比2.5(mg/L)、温度50℃、振荡时间8min、脱蛋白2次,样液量扩大为100mL(原为5mL),结果3次脱蛋白率分别为70.43%、69.42%、70.06%,平均值69.97%,RSD 0.73% < 1.5%;多糖剩余率为93.58%、94.20%、95.75%,平均值94.51%,RSD 1.12% < 1.5%,综合评分97.46;多糖纯度由21.88%提高为37.77%。表明实验所确定的工艺条件为最优条件,并稳定可行。

Sevag法利用有机溶剂使蛋白质变性成不溶状态的

原理脱蛋白,随着脱蛋白次数的增加,脱蛋白率逐渐增加,多糖损失率也在增加;酶法较 Sevag 法相比操作条件简单、温和,利于保持多糖的活性、避免使用有机溶剂,但酶底比较高时,有残留蛋白^[7];Sevag 与酶法联用脱蛋白,粗多糖经酶处理后,大部分游离蛋白质水解,经过 2 次 Sevag 法脱蛋白处理,即可达到理想的脱蛋白效果,比单用酶法酶的用量减少了^[8],既节约了成本又提高了脱蛋白率,所以此法是一种值得推广的方法^[13-15]。

3 结 论

Sevag 与酶法联用脱蛋白最佳工艺条件酶为底比 2.5(mg/L)、温度 50℃、振荡时间 8min、脱蛋白次数 2 次,脱蛋白率 69.97%,多糖剩余率 94.51%,多糖纯度由 21.88% 提高为 37.77%。玉米须为资源丰富、价格低廉、易于采集、有待全面开发利用的药用资源,具有广阔的研究与开发前景。其多糖具有很多的药理作用,故对多糖纯化研究有很高的应用价值。

参考文献:

- [1] LI W L, ZHENG H C, BUKURU J, et al. Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2004, 92(1): 1-21.
- [2] VELAZQUEZ D V O, XAVIER H S, BATISTA J E M, et al. *Zea mays* L. extracts modify glomerular function and potassium urinary excretion in conscious rats[J]. Phytomedicine, 2005, 12(5): 363-369.
- [3] YOU Xuejiao, XIE Chunyan, LIU Kunlun, et al. Isolation of non-starch polysaccharides from bulb of tiger lily (*Lilium lancifolium* Thunb.) with fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 81(1): 35-40.
- [4] QIN Chuanguang, HUANG Kaixun, XU Huibi. Isolation and characterization of a novel polysaccharide from the mucus of the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*[J]. Carbohydrate Polymers, 2002, 49(3): 367-371.
- [5] WANG Chiachi, CHANG Shyhchung, CHEN Binghui. Chromatographic determination of polysaccharides in *Lycium barbarum* Linnaeus [J]. Food Chemistry, 2009, 116(2): 595-603.
- [6] WANG Xia, YUAN Yong, WANG Kainai, et al. Deproteinization of gellan gum produced by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461[J]. Journal of Biotechnology, 2007, 128(2): 403-407.
- [7] 黄洁, 徐文倩, 郎玉娇, 等. 石花多糖脱蛋白工艺研究[J]. 医学导报, 2008, 27(6): 689-692.
- [8] 周鸿立, 肖振晶, 张丽杰, 等. 玉米须多糖的提取及脱蛋白研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(34): 10782-17084.
- [9] 孙晓雪, 孙卫东, 史德芳, 等. 仙人掌多糖提取过程中脱蛋白方法的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(1): 117-119.
- [10] 李苹苹, 丁霄霖. 紫贻贝多糖除蛋白质方法的研究[J]. 上海水产大学学报, 2006, 15(3): 328-332.
- [11] 贾淑珍, 王成忠, 丁功明, 等. 香菇多糖脱蛋白工艺的研究[J]. 中国酿造, 2008(5): 24-26.
- [12] 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): 48-50.
- [13] 毛英丽, 王忠民, 李瑾瑜, 等. 葡萄糖多糖脱蛋白方法的研究[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(4): 42-44.
- [14] 孔凡利, 张名位, 于淑娟, 等. 荔枝粗多糖脱蛋白方法的研究[J]. 食品科技, 2008(10): 142-144.
- [15] 吴海玥. 红枣多糖沉淀特性及脱蛋白质工艺研究[J]. 食品与药品, 2008, 10(3): 21-23.