

甘蔗叶多糖除蛋白工艺研究

侯小涛^{1,2,3}, 赵超超², 邓家刚^{1,2,3,*}

(1.广西医科大学药学院,广西南宁 530021;

2.广西中医药大学药学院,广西南宁 530001;

3.广西中药药效研究重点实验室,广西南宁 530001)

摘要:目的:筛选甘蔗叶多糖除蛋白的最佳工艺。方法:以蛋白质清除率、多糖保留率为指标,比较Ⅱ型ZTC1+1天然澄清剂法、Sevage法、三氯乙酸法(TCA法)、三氯乙酸-Sevage法清除甘蔗叶多糖中蛋白质的效果,并通过正交实验优化出最佳工艺。结果:Ⅱ型ZTC1+1天然澄清剂能有效纯化甘蔗叶多糖,且除蛋白最佳工艺为澄清剂用量为6%/3%(B/A),温度为30℃,多糖溶液浓度为3%,时间为1h/1h。结论:Ⅱ型ZTC1+1天然澄清剂能有效清除甘蔗叶多糖中的蛋白质,且澄清效果与温度和澄清剂用量有关。

关键词:甘蔗叶,天然澄清剂,多糖,除蛋白

Study on deproteinization-technology of polysaccharides in sugarcane leaf

HOU Xiao-tao^{1,2,3}, ZHAO Chao-chao², DENG Jia-gang^{1,2,3,*}

(1.School of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;

2.School of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China;

3.Guangxi Key Laboratory of Pharmacodynamic Studies of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

Abstract: Objective: To select deproteinization-technology of polysaccharides in sugarcane leaf. Methods: These different ways to removing protein from polysaccharides in sugarcane leaf contain natural clarifying agents, Sevage method, TCA and TCA-Sevage method, and that were compared with the clearance rate of protein and the polysaccharide retention as indexes, and the technology was optimized by orthogonal experiment. Results: Type II ZTC1+1 natural clarifying agents could effectively purify sugarcane leaf polysaccharides, and the optimum condition of deproteinization with type II ZTC1+1 natural clarifying agents were as follows: the adding amount of natural clarifying agents (i.e B and A) were 6% and 3% respectively, the clarifying temperature was 30℃, concentration of polysaccharides was 3% (m/v), the clarifying time (i.e B and A) were 1h and 1h respectively. Conclusion: Type II ZTC1+1 natural clarifying agents could effectively remove protein of sugarcane leaf polysaccharides, which was related to the amount of clarifying agents and temperature.

Key words: sugarcane leaf; natural clarifying agents; polysaccharides; deproteinization

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2012)20-0240-06

甘蔗叶是禾本科植物甘蔗 *Saccharum sinensis* Roxb. 的叶。甘蔗广泛种植于热带、亚热带地区, 全世界有100多个国家种植甘蔗, 中国蔗区主要分布在广西、广东等地。甘蔗叶作为甘蔗丰收后的副产品, 每年产量颇高, 却未得到充分利用, 除少部分作为动物饲料外, 大部分被蔗农就地焚烧, 造成资源浪费、污染环境。另外, 中药资源面临着严峻的可持续发展问题, 对这样既有药用价值同时又是农作物的资源进行研究, 发现其新用途, 对于资源保护和开发具有重要意义。据报道, 甘蔗叶含有大量叶绿素、氨基酸、多

糖和黄酮等物质, 其嫩叶和蔗梢含过氧化物酶等物质, 具有抗氧化、抗菌、降血糖、抗肿瘤^[1-6]等药理作用。甘蔗叶多糖为甘蔗叶的有效成分, 但世界范围内对其研究极少, 仅见一般提取工艺研究的报道^[7]。目前多糖的提取多采用水提醇沉法, 水提液经醇沉处理时, 沉淀中除含有多糖类物质, 同时还含蛋白质等杂质, 影响多糖的纯度, 因此有待进一步纯化, 除去多糖中蛋白质等杂质。Ⅱ型ZTC1+1天然澄清剂是从食品中提取的天然高分子物质, 是替代聚丙烯酰胺、聚合铝等人工合成絮凝剂的理想品种。它主要用于除去鞣质、蛋白质、树胶、蜡质等胶体不稳定成分, 而中药有效成分如黄酮、生物碱、皂苷类、苷类、萜类、多糖、氨基酸、多肽、矿物质等小分子物质不受影响^[8]。本实验以多糖保留率和蛋白质清除率为指标, 比较研究天然澄清剂法、Sevage法、三氯乙酸法(TCA法)、三氯乙酸-Sevage法等4种不同除蛋白方法, 并采用正

收稿日期: 2012-04-24 * 通讯联系人

作者简介: 侯小涛(1969-), 女, 博士, 教授, 主要从事中药活性成分及质量控制方面的研究。

基金项目: 广西壮族自治区中医药管理局中医药科技专项(GZKZ09-9); 广西科技厅技术与开发项目(桂科攻10124008-11)。

交实验法优选 II 型 ZTC1+1 天然澄清剂除蛋白的工艺, 期望制备出高纯度的甘蔗叶多糖, 为后续研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

甘蔗叶(新台糖22号) 采集于广西甘蔗研究所, 经该所许树宁高级农艺师鉴定为禾本科甘蔗属植物甘蔗 (*Saccharum sinensis* Roxb.) 的叶; II 型 ZTC1+1 天然澄清剂 由 A 剂和 B 剂组成, 从食品中提取的天然高分子物质, 天津振天成科技有限公司; D-无水葡萄糖标准品 中国药品生物制品检定所, 批号: 110833-200503; 牛血清白蛋白标准品 Sigma; 考马斯亮蓝 G-250 上海源叶生物科技有限公司; 苯酚、浓硫酸、三氯乙酸(TCA)、氯仿、正丁醇 均为国产分析纯。

UV-160A 紫外-可见分光光度计 日本岛津公司; Sartorius BP211D 电子天平 北京赛多利斯天平有限公司; HHS4 数显恒温水浴锅 金坛市医疗仪器厂; LDZ4-1.2 离心机 北京医用离心机厂; B3500S-MT 超声波清洗器 必能信超声上海有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 甘蔗叶多糖的制备 取甘蔗叶粗粉 335kg, 置于 1t 提取罐中, 加 30 倍量纯水于 100℃ 浸提 3 次, 每次 2h, 过滤, 合并滤液, 并浓缩至饱和状态, 加无水乙醇至浓度达到 80%, 静置 12h, 离心, 沉淀依次用无水乙醇、丙酮、乙醚反复洗涤数次, 抽滤, 真空干燥后得甘蔗叶粗多糖粉末。

1.2.2 葡萄糖标准曲线的制备 称取干燥至恒重的葡萄糖标准品 25.30mg, 置于 25mL 容量瓶中, 加蒸馏水溶解、稀释至刻度, 配制成质量浓度为 1.012mg/mL 的母液。精密吸取母液 5.0mL 置 100mL 容量瓶中, 加蒸馏水稀释至刻度作为贮备液, 吸取贮备液 2.0mL, 苯酚-硫酸法^[8]显色, 在 400~800nm 波长范围内扫描光谱, 确定 λ_{\max} 。然后精密吸取贮备液 1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0mL 分别置于具塞试管中, 加蒸馏水补至 2.0mL, 苯酚-硫酸法显色, 另以蒸馏水 2.0mL 同上操作作为空白对照, 于 λ_{\max} 处测定吸光度, 绘制标准曲线, 求出回归方程。

1.2.3 蛋白质标准曲线的制备 称取干燥至恒重的牛血清白蛋白标准品 12.44mg, 置 100mL 容量瓶中, 加蒸馏水溶解, 稀释至刻度, 配制成质量浓度为 124.4 μ g/mL 的贮备液。吸取贮备液 1.0mL, 根据考马斯亮蓝 G-250 法^[9](考马斯亮蓝试剂配制参照李如亮^[10]的方法), 在 400~800nm 波长范围内扫描光谱, 确定 λ_{\max} 。然后吸取 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL 贮备液, 加蒸馏水补至 1.0mL, 加入考马斯亮蓝 G-250 试剂 5mL, 摇匀, 以蒸馏水为空白, 10min 后于 λ_{\max} 处测定吸光度, 绘制标准曲线, 求出回归方程。

1.2.4 色素表征吸收^[11] 取甘蔗叶多糖配成适宜浓度的溶液, 在 400~800nm 波长范围内进行扫描, 确定色素表征吸收。

1.2.5 除蛋白方法比较

1.2.5.1 多糖溶液的配制 称取甘蔗叶粗多糖 10g, 加入 200mL 蒸馏水超声溶解, 离心, 配制质量浓度为

5% 的甘蔗叶多糖溶液, 备用。

1.2.5.2 澄清剂的配制 根据 II 型 ZTC1+1 天然澄清剂说明书所示, 配制方法如下:

A 组分: 称取澄清剂 A 组分 1g, 用 10mL 蒸馏水溶解, 并搅拌成糊状, 再加入剩余 90mL 蒸馏水, 不断搅拌, 使其充分溶解, 溶胀 24h, 配成 1% 黏胶液(用前摇匀) 100mL, 即得。

B 组分: 先配制 1% 醋酸 (v/v), 称取澄清剂 B 组分 1g, 用 10mL 1% 醋酸溶解, 并搅拌成糊状, 加入余下的 90mL 1% 醋酸, 充分搅拌使其溶解, 溶胀 24h, 配成 1% 黏胶液(用前摇匀) 100mL, 即得。

1.2.5.3 II 型 ZTC1+1 天然澄清剂法 取 5% 甘蔗叶多糖溶液, 按澄清剂用量 (B/A) 为 8%/4%, 在 60℃ 下, 保温 2h/1h (每隔半小时搅匀一次), 过滤, 定容, 分别测定多糖、蛋白质含量。

1.2.5.4 TCA 法 取 5% 甘蔗叶多糖溶液, 按体积比为 1:1 的比例, 加入 10% 三氯乙酸溶液, 充分振摇, 置于 4℃ 冰箱, 静置 2h, 离心, 上清液用 5% NaOH 中和, 定容, 分别测定多糖、蛋白质含量。

1.2.5.5 Sevage 法 取 5% 甘蔗叶多糖溶液, 按照多糖溶液: 氯仿: 正丁醇 = 25:5:1 (v:v:v) 的比例, 先后加入氯仿、正丁醇, 剧烈振摇 15min, 待其静置分层, 得上层水层, 同上操作, 重复 6 次实验, 离心, 取上清液定容, 分别测定多糖、蛋白质含量。

1.2.5.6 TCA Sevage 法 取 5% 甘蔗叶多糖溶液, 先按照体积比为 1:1 的比例, 加入 10% 三氯乙酸溶液, 充分振摇, 置于 4℃ 冰箱, 静置 2h, 离心, 上清液用 5% NaOH 中和, 然后按多糖溶液: 氯仿: 正丁醇 = 25:5:1 (v:v:v) 的比例, 先后加入氯仿、正丁醇, 剧烈振摇 15min, 离心, 取上清液定容, 分别测定多糖、蛋白质含量。

1.2.6 单因素实验

1.2.6.1 澄清剂用量对除蛋白效果的影响 固定多糖溶液浓度为 5%, 温度为 60℃, 时间 2/1 (B/A, h/h), 分别加入澄清剂, 用量 (B/A) 为 4%/2%、6%/3%、8%/4%、10%/5%, 进行澄清处理。

1.2.6.2 温度对除蛋白效果的影响 固定多糖溶液浓度为 5%, 澄清剂用量 (B/A) 为 6%/3%, 时间 2/1 (B/A, h/h), 分别在温度为 20、40、60、80℃ 条件下进行澄清处理。

1.2.6.3 多糖浓度对除蛋白效果的影响 固定温度为 40℃, 澄清剂用量 (B/A) 为 6%/3%, 时间 2/1 (B/A, h/h), 分别取浓度为 2%、4%、6%、8%、10% 的甘蔗叶多糖溶液进行澄清处理。

1.2.6.4 时间对除蛋白效果的影响 固定多糖浓度为 2%, 澄清剂用量 (B/A) 为 6%/3%, 温度为 40℃, 在保温时间分别为 0.5/0.5、0.5/1、1/1、2/1、2/2 (B/A, h/h) 的条件下进行澄清处理。

1.2.7 样品溶液测定 精密吸取除蛋白前后的多糖溶液, 根据标准工作曲线下方法分别测定多糖、蛋白质含量和色素 A_{400} 。

1.2.8 指标的确定 以多糖保留率、蛋白质清除率和脱色率为考察指标, 兼顾多糖保留率(权值为 0.4)、蛋白质清除率(权值为 0.5)和脱色率(权值为 0.1), 采

用加权法进行综合评分。多糖保留率($\%$)= $M_2/M_1 \times 100$ ；蛋白质清除率($\%$)= $(N_1-N_2)/N_1 \times 100$ ；脱色率($\%$)= $(A_1-A_2)/A_1 \times 100$ ；综合评分= $0.1 \times$ 脱色率 $+0.4 \times$ 多糖保留率 $+0.5 \times$ 蛋白质清除率(式中, M_1 、 M_2 分别为处理前后的多糖含量； N_1 、 N_2 分别为处理前后的蛋白质的含量； A_1 、 A_2 分别为处理前后色素 A_{400})。

1.2.9 正交实验因素水平表 选择澄清剂用量、温度、多糖浓度、时间四个因素,按 $L_9(3^4)$ 安排正交实验,因素水平表见表1。

表1 因素水平表

Table 1 Factors and levels table

| 水平 | 因素 | | | |
|----|--------------|----------------------------|----------------|-----------|
| | A 澄清剂用量(B/A) | B 温度($^{\circ}\text{C}$) | C 多糖浓度(w/v)(%) | D 时间(h/h) |
| 1 | 4%/2% | 30 | 2 | 1/1 |
| 2 | 6%/3% | 40 | 3 | 2/1 |
| 3 | 8%/4% | 50 | 4 | 2/2 |

1.3 验证实验

为考察工艺的稳定性,配制质量浓度为3%的多糖溶液三份,根据最佳工艺条件处理后,分别测定的多糖、蛋白质含量和色素表征吸收,计算出多糖保留率、蛋白质清除率、脱色率及RSD。

2 结果与分析

2.1 葡萄糖标准曲线

吸取葡萄糖贮备液,显色后进行光谱扫描,如图1所示,确定 λ_{max} 为487nm。以葡萄糖浓度 $C(\mu\text{g/mL})$ 为横坐标,吸光度 A_{487} 为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程: $A_{487}=0.0133C+0.0136$, $r=0.9956$,表明葡萄糖浓度在25.30~50.60 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,具有良好的线性关系(见图2)。

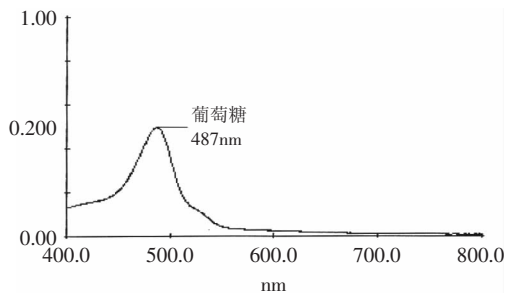


图1 葡萄糖扫描光谱图

Fig.1 Glucose by visible wavelength

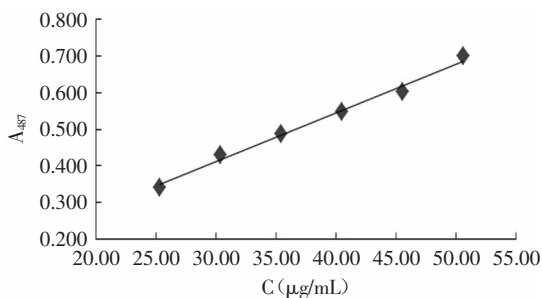


图2 葡萄糖标准曲线

Fig.2 The standard curve of glucose

2.2 蛋白质标准曲线

吸取牛血清白蛋白贮备液,显色后进行光谱扫描,如图3所示,确定 λ_{max} 为593nm。以牛血清白蛋白浓度 $C(\mu\text{g/mL})$ 为横坐标,吸光度 A_{593} 为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程: $A=0.0055C+0.0396$, $r=0.9992$,表明牛血清白蛋白浓度在24.88~124.4 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,呈良好的线性关系(见图4)。

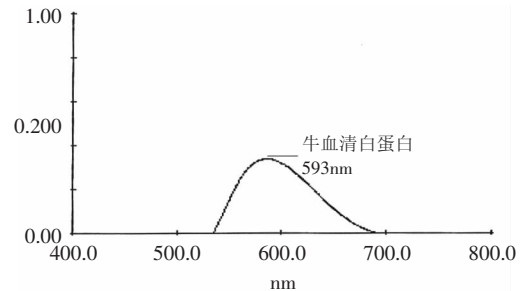


图3 蛋白质扫描光谱图

Fig.3 Protein by visible wavelength

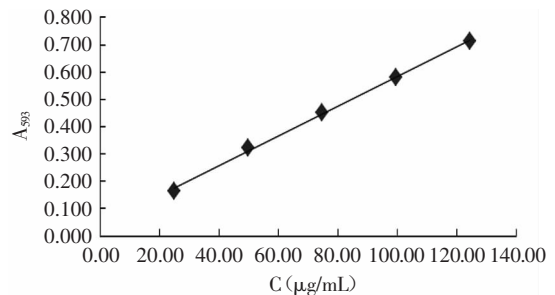


图4 蛋白质标准曲线

Fig.4 The standard curve of protein

2.3 色素表征吸收

将多糖溶液在400~800nm波长范围内进行扫描,如图5所示,由此选择400nm处吸光值(A_{400})表征色素含量。

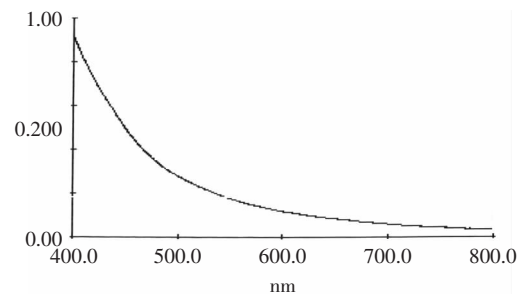


图5 多糖溶液扫描光谱图

Fig.5 Polysaccharides solution by visible wavelength

2.4 除蛋白效果比较

如表2所示,甘蔗叶多糖采用Sevage法除蛋白,反复处理6次后多糖损失相对较少,蛋白质的清除率较高,该法条件温和,在避免多糖降解方面有较好效果,但该法效率低,且需消耗大量有毒有机试剂,易残留;三氯乙酸法除蛋白效果明显,与Sevage法相比,多糖损失相差不大,但由于其酸性较强,容易导致多糖的降解;天然澄清剂在除蛋白过程中优势明显,多糖损失少,蛋白质清除率相对较高,且经过澄清处理后的多糖溶液具有颜色浅、易过滤、无残留的特点。故

表2 除蛋白效果比较 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 The comparison of deproteinization effect ($\bar{x}\pm s, n=3$)

| 指标 | II型ZTC1+1天然澄清剂法 | TCA法 | Sevage法 | TCA-Sevage法 |
|-----------|-----------------|------------|------------|-------------|
| 除蛋白次数 | 1 | 1 | 6 | 1 |
| 多糖保留率(%) | 95.77±0.11 | 71.80±0.05 | 77.27±0.15 | 92.06±0.14 |
| 蛋白质清除率(%) | 56.92±0.15 | 59.01±0.11 | 43.06±0.11 | 17.67±0.12 |

本实验选用 II 型ZTC1+1天然澄清剂用于去除甘蔗叶多糖中蛋白质,并通过正交实验优化其除蛋白工艺。

2.5 除蛋白单因素实验结果

2.5.1 澄清剂用量对除蛋白效果的影响 如图6所示,随着澄清剂用量的增加,除蛋白效果呈现先升后降的趋势,说明澄清剂用量并非越大越好,可能是澄清剂体系内高分子与蛋白质结合已经达到饱和,剩余澄清剂产生的絮凝物吸附作用使多糖损失增加。

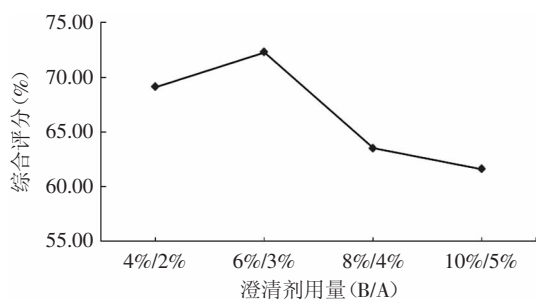


图6 澄清剂用量对除蛋白效果的影响

Fig.6 Effect of the amount of clarifying agents on deproteinization effect

2.5.2 温度对除蛋白效果的影响 如图7所示,随着温度的升高,澄清剂除蛋白效果趋势先升后降,可能是因为温度低,澄清剂体系内粒子热运动不剧烈,絮凝作用不充分,效果差;温度过高,澄清剂体系内高分子活性受限制,影响絮凝作用。

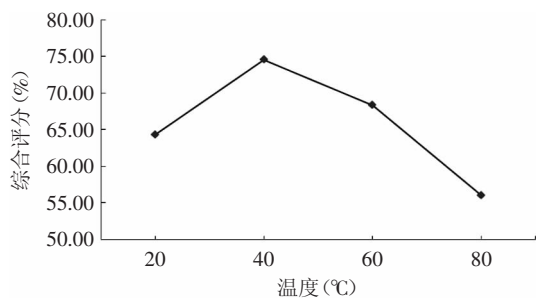


图7 温度对除蛋白效果的影响

Fig.7 Effect of temperature on deproteinization effect

2.5.3 多糖浓度对除蛋白效果的影响 从图8可以看出,随着多糖浓度增加,澄清剂除蛋白效果呈现下降的趋势,可能是由于多糖浓度过大,使得澄清剂在药液中分散不均匀,且浓的药液在澄清时所产生的大量絮凝物可能会夹杂目标成分,从而影响有效成分含量。

2.5.4 时间对除蛋白效果的影响 从图9可以得知,随着澄清时间延长,综合评分并没有显著上升,且基本保持在75%以上,待2h后有所下降,可能是由于澄清剂产生的絮凝物长时间吸附作用,影响澄清效果。根据澄清剂说明书所示,加入澄清剂后保温1~2h即可。

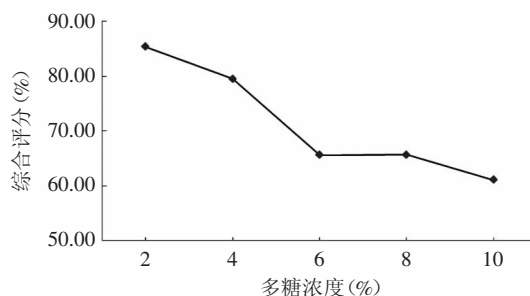


图8 多糖浓度对除蛋白效果的影响

Fig.8 Effect of polysaccharides concentration on deproteinization effect

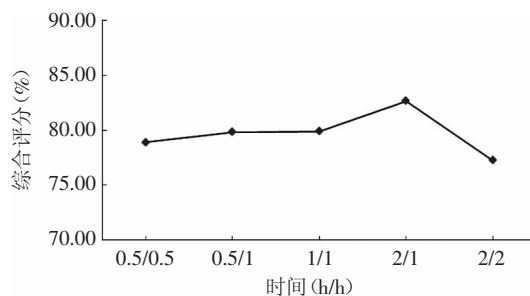


图9 时间对除蛋白效果的影响

Fig.9 Effect of time on deproteinization effect

2.6 正交实验结果分析

由表3可知,各因素对脱色率和多糖保留率的影响顺序为: B>A>C>D; 对蛋白质清除率的影响顺序为: B>C>A>D。

由表4可知,以多糖保留率为指标,温度对多糖保留率有显著影响,澄清剂用量有一定影响,其他因素几乎没有影响;以脱色率和蛋白质清除率为指标,温度对溶液澄清度和蛋白质清除率都有显著影响,其他因素几乎没有影响。温度是具有显著影响的因素,故选择反应温度为30°C;澄清剂用量是有一定影响的因素,根据直观分析结果,结合本实验研究目的,选择澄清剂用量为6%/3%;多糖浓度和时间是几乎没有影响的因素,以综合评分为指标,根据极差分析结果,选择多糖浓度为3%;从节约能源、提高效率的角度出发,选择处理时间为1/1 (h/h);故筛选出最佳工艺:配制质量浓度为3%的多糖溶液,在温度为30°C、澄清剂用量为6%/3%的条件下,加入B组分加热1h,然后加入A组分加热1h。

2.7 验证实验结果

验证实验结果如表5所示,在该工艺条件下,各指标RSD均小于3%,说明该工艺稳定、可行。

3 结论

比较几种脱蛋白方法可知, II 型ZTC1+1天然澄清剂清除蛋白效果最佳,且多糖损失少、色泽浅,蛋

表3 $L_9(3^4)$ 正交试验结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 3 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal test ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 实验号 | A | B | C | D | 脱色率 (%) | 多糖保留率 (%) | 蛋白质清除率 (%) | 综合评分 (%) |
|----------|--------|--------|--------|--------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 51.33±0.02 | 90.77±0.18 | 61.52±0.09 | 72.20±0.09 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 53.01±0.04 | 84.88±0.15 | 66.91±0.19 | 72.71±0.04 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 49.34±0.02 | 89.29±0.12 | 59.82±0.03 | 70.56±0.06 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 57.34±0.02 | 89.11±0.13 | 68.81±0.04 | 75.78±0.04 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 54.98±0.02 | 84.53±0.14 | 65.86±0.06 | 72.24±0.09 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 59.34±0.08 | 88.12±0.15 | 69.45±0.08 | 75.91±0.09 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 53.30±0.02 | 83.63±0.13 | 62.56±0.17 | 70.06±0.05 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 65.54±0.07 | 82.65±0.12 | 66.98±0.10 | 73.10±0.05 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 61.75±0.02 | 81.41±0.16 | 70.92±0.15 | 74.20±0.09 |
| K_1 | 153.68 | 284.88 | 176.21 | 168.06 | | | | |
| K_2 | 171.66 | 173.53 | 172.10 | 165.65 | | | | |
| K_3 | 180.59 | 170.43 | 157.62 | 172.22 | | | | |
| R | 26.91 | 114.45 | 18.59 | 6.57 | | | | |
| K'_1 | 264.94 | 441.42 | 261.54 | 256.71 | | | | |
| K'_2 | 261.76 | 252.06 | 255.40 | 256.63 | | | | |
| K'_3 | 247.69 | 258.82 | 257.45 | 261.05 | | | | |
| R' | 17.25 | 189.36 | 6.14 | 4.42 | | | | |
| K''_1 | 188.25 | 328.28 | 197.95 | 198.30 | | | | |
| K''_2 | 204.12 | 199.75 | 206.64 | 198.92 | | | | |
| K''_3 | 200.46 | 200.19 | 188.24 | 195.61 | | | | |
| R'' | 15.87 | 128.53 | 18.40 | 3.31 | | | | |
| K'''_1 | 215.47 | 369.19 | 221.21 | 218.64 | | | | |
| K'''_2 | 223.93 | 218.05 | 222.69 | 218.68 | | | | |
| K'''_3 | 217.36 | 220.67 | 212.86 | 219.44 | | | | |
| R''' | 8.46 | 151.14 | 9.83 | 0.80 | | | | |

表4 方差分析

Table 4 Analysis of variance

| 指标 | 方差来源 | 偏差平方和 | 自由度 | 方差 | F值 | 显著性 |
|--------|-------|----------|-----|----------|---------|-----|
| 脱色率 | A | 125.24 | 2 | 62.62 | 1.77 | |
| | B | 18331.31 | 2 | 9165.66 | 258.42 | * |
| | C | 63.57 | 2 | 31.79 | 0.90 | |
| | D(误差) | 7.36 | 2 | 3.68 | 0.10 | |
| 多糖保留率 | A | 56.18 | 2 | 28.09 | 5.21 | ⊕ |
| | B | 41826.79 | 2 | 20913.39 | 3880.49 | * |
| | C | 6.51 | 2 | 3.26 | 0.60 | |
| | D(误差) | 4.26 | 2 | 2.13 | 0.40 | |
| 蛋白质清除率 | A | 46.04 | 2 | 23.02 | 0.79 | |
| | B | 23531.57 | 2 | 11765.79 | 401.92 | * |
| | C | 56.48 | 2 | 28.24 | 0.96 | |
| | D(误差) | 2.06 | 2 | 1.03 | 0.04 | |
| 综合评分 | A | 13.15 | 2 | 6.57 | 0.70 | |
| | B | 29588.14 | 2 | 14794.07 | 1568.64 | * |
| | C | 18.73 | 2 | 9.36 | 0.99 | |
| | D(误差) | 0.14 | 2 | 0.07 | 0.01 | |

注: $F_{0.05}(2, 2)=19$; $F_{0.01}(2, 2)=99$; $F_{0.25}(2, 2)=3$; *: 代表显著, $p < 0.01$; ⊕: 代表有一定影响, $p < 0.25$ 。

白质清除率较高,且经过处理后的多糖溶液清澈透

表5 验证实验结果

Table 5 Results of process verification

| 组号 | 多糖保留率 (%) | 蛋白质清除率 (%) | 脱色率 (%) | 综合评分 (%) |
|---------|-----------|------------|---------|----------|
| 1 | 88.55 | 71.41 | 58.42 | 76.97 |
| 2 | 88.22 | 70.97 | 58.21 | 76.59 |
| 3 | 88.38 | 71.24 | 58.26 | 76.80 |
| RSD (%) | 0.19 | 0.31 | 0.19 | 0.13 |

亮、色泽浅、易过滤、无异味。采用正交实验优化除蛋白工艺为澄清剂用量为6%/3% (B/A),温度为30℃,多糖溶液浓度为3%,时间为1/1 (h/h)。在该工艺条件下,多糖保留率平均为88.38%,蛋白质清除率平均为71.21%,脱色率平均为58.30%,综合评分平均为76.79%,RSD均小于3%,说明该工艺稳定、可行。可见,II型ZTC1+1天然澄清剂能有效纯化甘蔗叶多糖。

在纯化工艺中,温度对澄清剂有显著影响,可能

(下转第247页)

2.4 酶解条件正交实验

根据单因素实验结果,选择三个因素的三个水平对酶解条件进行正交实验以优化实验方案。正交实验结果见表2及表3。

表2 酶解正交实验结果及直观分析表

Table 2 The results of orthogonal experiment and intuitive analysis

| 实验号 | A | B | C | 空白组 | 多肽得率(%) |
|----------------|-------|-------|-------|-------|---------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 7.924 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 8.323 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 8.152 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 9.382 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 8.763 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 9.643 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 9.675 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 9.455 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 10.042 |
| k ₁ | 8.133 | 8.994 | 9.007 | 8.910 | |
| k ₂ | 9.263 | 8.847 | 9.249 | 9.214 | |
| k ₃ | 9.724 | 9.279 | 8.863 | 8.996 | |
| R | 1.591 | 0.432 | 0.386 | 0.304 | |

表3 酶解正交实验结果方差分析表

Table 3 The variance analysis of the orthogonal experiment results

| 因素 | 偏差平方和 | 自由度 | F比 | F临界值 | 显著性 |
|----|-------|-----|--------|--------|-----|
| A | 4.020 | 2 | 27.347 | 19.000 | * |
| B | 0.290 | 2 | 1.973 | 19.000 | |
| C | 0.228 | 2 | 1.551 | 19.000 | |
| 误差 | 0.15 | 2 | | | |

注:*表示影响显著($p < 0.05$)。

由表2中极差R可知,三个因素对酶解效果的影响程度顺序为:料液比>酶用量>酶解时间,酶解提取最佳组合条件为A₃B₃C₂,提取得率为10.042%。由表3酶解实验结果方差分析可知,料液比对酶解条件在5%置信度有显著性影响。最佳酶解条件为:料液比1:45、酶

用量4%、酶解时间4h,多肽的得率达到最大10.042%。

3 结论

通过单因素和正交实验对葵花籽粕中蛋白肽的提取研究,得出料液比、酶用量、酶解时间三个因素对得率的影响程度为:料液比>酶用量>酶解时间。料液比对酶解得率影响最显著。正交实验结果分析得出最佳提取工艺:料液比1:45、酶解时间4h、酶用量4%,在此条件下,多肽的提取得率为10.042%。

参考文献

- [1] 王蕾,张海悦,白雪丽. 葵花籽资源在食品工业中的新开发[J]. 食品科技专题论述,2007(10):7-9.
- [2] R K Gupta, Gopika Arora, Rajiv Sharma. Aerodynamic properties of sunflower seed *Helianthus annuus* L.[J]. Journal of Food Engineering,2007,79:899-904.
- [3] 陈洁. 葵花蛋白提取及酶法改性的研究[D]. 无锡:江南大学,2000.
- [4] 刘刚,王春燕,宋阳成. 葵花籽粕中蛋白质提取工艺的优化[J]. 长春师范学院学报:自然科学版,2011,30(3):82-85.
- [5] 孙冀平,沈蓓英. 蛋白肽饮料的醒酒机理和制备工艺的探讨[J]. 食品与发酵工业,1999,25(4):64-66.
- [6] 廖斌,李建科,王慧玲,等. 大豆肽的特性及制备方法研究[J]. 粮食与饲料工业,2012(1):25-27.
- [7] 郭敏亮,陈军,姜涌明,郑杰军. 用豆粕生产大豆蛋白肽饮料[J]. 食品科学,1992(10):1-3.
- [8] 薛照辉. 菜籽肽的制备及其生物活性的研究[D]. 武汉:华中农业大学,2004.
- [9] 杜国军,任健,杨勇. 风味蛋白酶对脱脂葵花粕酶解条件的研究[J]. 粮油加工,2010(2):12-14.
- [10] 白羽,李次力,张根生. 酶法制备葵花籽肽的研究[J]. 科研开发,2007,23(5):53-55.
- [11] 赵新准,冯志彪. 大豆蛋白水解物水解度测定的研究[J]. 东北农业大学学报,1995,26(2):178-181.
- [12] 侯小涛,邓家刚,李爱媛,等. 甘蔗叶不同提取物对3种糖尿病模型的降血糖作用[J]. 华西药学杂志,2011,26(5):451-453.
- [13] 邓家刚,郭宏伟,侯小涛,等. 甘蔗叶提取物的体外抗肿瘤活性研究[J]. 辽宁中医杂志,2010,37(1):1-3.
- [14] 李朝兴. 新一代纯天然澄清剂(ZTC系列天然澄清剂)[J]. 离子交换与吸附,1994,10(6):565-568.
- [15] 侯小涛,郭振旺,马丽娜,等. 甘蔗叶不同生长期多糖含量的动态累积研究[J]. 药物分析杂志,2011,31(5):888-891.
- [16] 曲春香,沈颂东,王雪峰,等. 用考马斯亮蓝测定植物粗提液中可溶性蛋白质含量方法的研究[J]. 苏州大学学报:自然科学版,2006,22(2):82-85.
- [17] 李如亮. 生物化学实验[M]. 武汉:武汉大学出版社,1998.
- [18] 龚桂珍,张学俊. 杜仲叶多糖脱色的研究[J]. 贵州农业科学,2010,38(3):42-45.
- [19] 孟祥海,朱骤海,张琳,等. II型ZTC1+1天然澄清剂在虎杖多糖纯化中的作用[J]. 中华中医药杂志,2010,25(12):2140-2142.

(上接第244页)

是温度对体系内粒子热运动、高分子生物活性有影响^[12],从而影响其絮凝作用。澄清剂用量对除杂效果有一定影响,一定范围内澄清剂用量越大,溶液越澄清,蛋白质含量越低,但是多糖也会相应减少,故需要合理选择澄清剂的用量。有关多指标优选II型ZTC1+1天然澄清剂用于甘蔗叶多糖纯化工艺研究还未见报道,因此本实验对絮凝技术应用用于甘蔗叶多糖的纯化有一定指导意义,同时为制备高纯度甘蔗叶多糖提供技术支持。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:411.
- [2] 刘昔辉,杨荣仲,区惠平,等. 甘蔗叶多糖的提取与含量测定[J]. 安徽农业科学,2007,35(34):11035.
- [3] 吴建中,欧仕益,汪勇. 甘蔗叶中黄酮类物质的提取及抗氧化性研究[J]. 现代食品科技,2009(2):165-167.
- [4] 侯小涛,邓家刚,马建凤,等. 甘蔗叶提取物的体外抑菌作