

# 油茶籽多糖中蛋白质的脱除工艺研究

尹丽敏, 周建平, 姚开波

(湖南农业大学食品科技学院, 湖南长沙 410128)

**摘要:** 本文研究了盐酸-乙醇等电点法脱除油茶籽多糖中蛋白质的方法, 此法在盐酸-等电点法的基础上, 添加一定量的乙醇溶液, 使之更有利于蛋白质的沉淀脱除。通过单因素试验及正交试验, 确定蛋白质脱除的最佳条件为: pH 3.4, 乙醇添加量为 13%, 静止时间为 3 d, 可以使蛋白质脱除率达到 92.68%, 多糖保留率为 61.78%。与传统的三氯乙酸法和 Seville 法进行比较, 此法更有效且更安全。

**关键词:** 茶籽多糖; 等电点法; 蛋白质脱除

文章编号: 1673-9078(2012)11-1519-1522

## Study on Protein Removal Method from Camellia Polysaccharides

YIN Li-min, ZHOU Jian-ping, YAO Kai-bo

(College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

**Abstract:** This paper studied a new type of proteins removal method from camellia polysaccharides, hydrochloric acid-ethanol isoelectric point method. On the basis of hydrochloric acid isoelectric point method, the new method adding a certain amount of ethyl alcohol into suspension is more effective than the traditional methods to precipitate proteins. Through single factor experiments and orthogonal test, the optimum condition was found as follows: pH 3.4, ethyl alcohol adding 13% and standing time 3 days, under which protein removal rate and polysaccharides yield reached 92.68% and 61.78, respectively. Compared with the traditional method of trichloroacetic acid (TDA) and Seville, it was more effective and more safe.

**Key words:** camellia polysaccharides; isoelectric point method; protein removal

油茶是我国特有的木本油料树种, 从南宋年间开始种植至今已有 2300 多年的历史, 素有“东方橄榄油”、“绿色金库”<sup>[1]</sup>、“长寿油”<sup>[2]</sup>等美誉, 与油橄榄、油棕、椰子并称世界四大木本油料的树种<sup>[3]</sup>。近年来, 油茶籽中的茶籽多糖、茶籽蛋白、油茶皂素等活性成分日渐成为人们研究的热点。其中茶籽多糖作为一个对人类健康有重要影响的成分被人们广泛关注, 主要是由于茶籽多糖具有多种有效的生理活性, 刘安军<sup>[4]</sup>等研究发现茶多糖及协同因子茶多酚能降低高血糖小鼠的血糖, 并提高高血糖小鼠的抗氧化能力; 刘茹<sup>[5]</sup>等验证了茶多糖在体外对·OH 有显著的清除作用; 此外, 茶多糖还具有抗凝血、抗血栓等功能<sup>[6]</sup>。要想使茶籽多糖达到理想的生理活性并研究开发保健品, 就必须对其进行分离纯化, 而在茶籽多糖分离纯化过程中, 蛋白质的脱除是一个非常重要的环节, 常用的蛋白质脱除方法主要有三氯乙酸法、Seville 法、盐酸等

收稿日期: 2012-06-30

基金项目: 湖南省科技厅重大专项 (2009FJ1006-3)

作者简介: 尹丽敏(1985-), 女, 硕士研究生, 从事油脂与蛋白质工程方向研究

通讯作者: 周建平(1955-), 男, 教授, 硕士生导师, 从事粮油加工方向研究

电点法, 本文采用一种改进的蛋白质脱除方法: 盐酸-乙醇等电点法。通过单因素实验研究了不同影响因素对蛋白质脱除效果的影响, 用正交试验确定蛋白质脱除的优化条件, 并与常用的三氯乙酸法进行比较。本试验采用蒽酮比色法<sup>[7]</sup>测定多糖含量, 考马斯亮蓝法测定蛋白质的含量。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料和仪器

##### 1.1.1 试验材料

油茶籽粗多糖液由湖南农业大学康奕达油茶研究中心提供。经检测其中多糖含量为 7.18%, 蛋白质含量为 4.72%。

##### 1.1.2 仪器与设备

722S 可见分光光度计; 台式低速离心机 TDZ5, 湖南赫西仪器装备有限公司; E02140 电子分析天平; PHS-3EpH 计, 上海精密科学仪器有限公司; 101A-3ET 电热鼓风干燥箱, 上海实验仪器厂有限公司。

##### 1.1.3 试剂

蒽酮、浓硫酸、95% 乙醇、无水乙醇、牛血清蛋白、考马斯亮蓝 G250、葡萄糖, 以上试剂均为分析纯。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 盐酸-乙醇等电点法最佳条件的确定

#### 1.2.1.1 pH对蛋白质脱除的影响

准确称取 30 g 茶籽多糖液 6 份, 分别置于离心管中, 用 0.1 mol/L HCl 分别调 pH 为 3.0, 3.2, 3.4, 3.6, 3.8, 4.0, 并缓慢加入 5 mL 无水乙醇, 边加边搅拌, 置于 4 °C 冰箱中静置过夜, 次日取出于离心机中 5000 r/min 离心 20 min, 取上清液测多糖及蛋白质的含量, 每种处理做三组平行试验。

#### 1.2.1.2 乙醇添加量对蛋白质脱除的影响

准确称取 30 g 茶籽多糖液 6 份, 分别置于离心管中, 用 0.1 mol/L HCl 调 pH 为 3.4, 加入无水乙醇使最终溶液中乙醇浓度分别为 5%, 7%, 9%, 11%, 13%, 15%, 边加边搅拌, 搅拌均匀后置于 4 °C 冰箱中静置过夜, 次日取出于离心机中 5000 r/min 离心 20 min, 取上清液测多糖及蛋白质的含量, 每种处理做三组平行试验。

#### 1.2.1.3 静置时间对蛋白质脱除的影响

准确称取 30 g 茶籽多糖液 5 份, 分别置于离心管中, 用 0.1 mol/L HCl 调 pH 为 3.4, 加入无水乙醇使最终溶液中乙醇浓度为 13%, 分别放置于 4 °C 冰箱中 1 d、2 d、3 d、4 d、5 d, 以下操作同 1.2.1(1)。

### 1.2.2 正交试验

在单因素试验的基础上, 选取 pH(A), 乙醇添加量(B), 静止时间(C)三个因素进行正交试验设计, 每个因素选三个水平, 以蛋白质脱除率和多糖保留率为考察指标, 选用正交试验表  $L_9(3^3)$  进行正交试验<sup>[8]</sup>, 每种组合做两次重复, 取平均值。试验因素水平设计见表 1。

#### 1.2.3 三氯乙酸法对比试验

准确称取 30 g 茶籽多糖液 5 份, 分别加入 20 mL 4%、8%、12%、16%、20% 的三氯乙酸溶液, 使混合液中三氯乙酸的浓度分别为 2%、4%、6%、8%、10%, 混合均匀后置于 4 °C 冰箱中静置过夜, 以下操作同 1.2.1(1)。

#### 1.2.4 Sevage 法对比试验

准确称取 30 g 茶籽多糖液 6 份, 分别做 1、2、3、4、5、6 次 Sevage 试剂脱蛋白处理, 每次加入 Sevage 试剂(正丁醇: 氯仿=1:4) 5 mL, 于摇床上震荡 20 min, 取出后离心机中 5000 r/min 离心 20 min, 去掉下层蛋白质层及有机溶剂层, 取上清液测定多糖及蛋白质的含量, 每种处理做三组平行试验。

## 2 结果与分析

### 2.1 pH对蛋白质脱除的影响

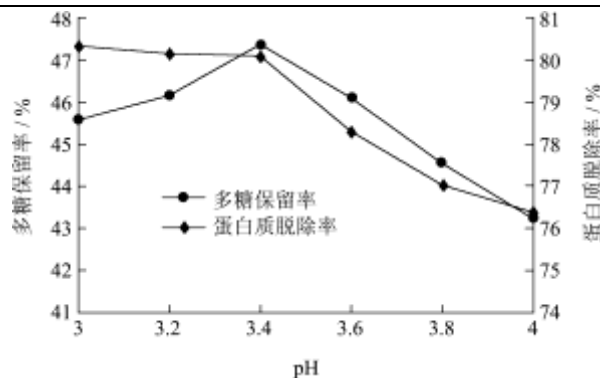


图 1 pH对蛋白质脱除效果的影响

Fig.1 The effect of pH on protein removing rate

图 1 结果表明, 随 pH 升高, 蛋白质的脱除率整体呈降低趋势。而多糖的保留在 pH 3.0~3.4 之间显著上升, 在 3.4 时达到最高, 随后在 pH 3.4~4.0 时多糖的保留率显著下降, 这说明随着 pH 的降低, 酸性增强, 越来越接近蛋白质的等电点, 从而有利于蛋白质的沉淀而离心分离除去, 但是 pH 在 3.4~3.0 之间时, 多糖保留率逐渐降低, 可能是由于在酸性条件下多糖部分水解。综合考虑蛋白质的脱除率和多糖保留率这两个因素, 得出在 pH 3.4 时为最佳 pH 条件, 此时多糖保留率为 47.35%, 蛋白质脱除率为 80.09%。

### 2.2 乙醇加入量对蛋白质脱除的影响

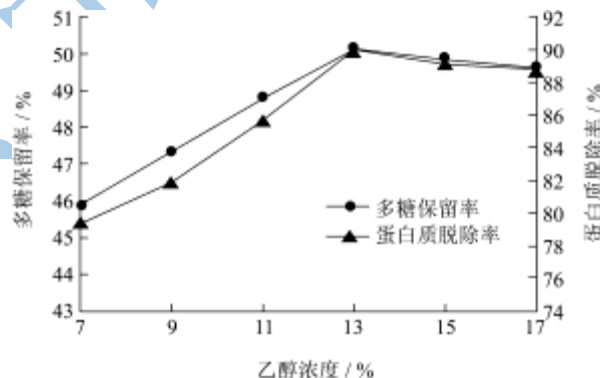


图 2 乙醇添加量对蛋白质脱除效果的影响

Fig.2 The effect of adding ethanol on protein removing rate

如图 2 所示, 随着乙醇添加浓度比的增大, 蛋白质脱除率和多糖的保留率显著升高, 到乙醇浓度为 13% 时达到最高, 此时多糖保留率为 50.12%, 蛋白质脱除率为 89.92%。此后随乙醇浓度增大, 蛋白质脱除率升高而多糖保留率下降, 可能是由于乙醇的加入浓度过大造成多糖沉淀。

### 2.3 静置时间对蛋白质脱除的影响

如图 3 所示, 随着静置时间的增长, 蛋白质脱除率呈逐渐上升的趋势, 多糖的保留率在 1~3 d 时缓慢上升, 在第 3 d 以后逐渐下降, 前期是由于随着时间的延长, 蛋白质的相互结合作用增强, 更有利于蛋白质的沉淀, 从而得到的上清液越多, 后期可能原因是

蛋白质的相互作用逐渐饱和,而多糖在放置过程中被微生物利用或分解而有所下降,因此综合考虑蛋白质脱除率和多糖保留率两因素,得出最佳静置时间为 3 d,此时多糖保留率为 61.53%,蛋白质脱除率为 89.68%。

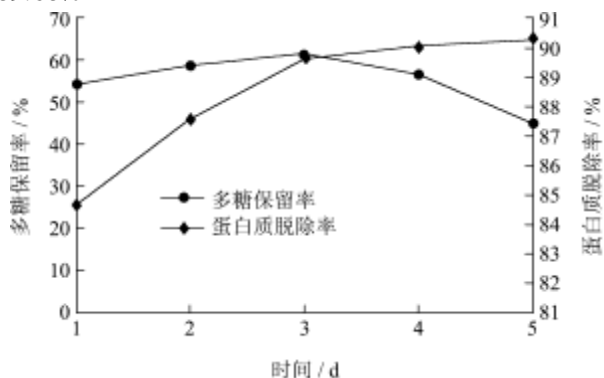


图3 静置时间对蛋白质脱除效果的影响

Fig.3 The effect of standing time on protein removing rate

2.4 正交试验因素水平表

根据单因素试验结果,设计正交试验的因素水平表见表1。

表1 优化蛋白质脱除条件的正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal test for optimal protein removal conditions

水平	因素		
	A (pH)	B (乙醇添加量/%)	C (静置时间/d)
1	3.2	11	2
2	3.4	13	3
3	3.6	15	4

2.5 正交试验结果及分析

由表3方差分析表明,pH和乙醇添加量对蛋白质脱除率及多糖保留率影响显著,且pH是影响蛋白质脱除率和多糖保留率的主要因素,其次是乙醇添加量,最后是静置时间,此方法是利用了蛋白质在其等电点处溶解度最低,必须首先要达到蛋白质的等电点,而乙醇起到了增大极性作用,有助于蛋白质分子之间结合形成沉淀从而可以离心分离出去。根据K值大小及3个影响因素个水平的比较得到利用盐酸-乙醇等电点法脱除茶籽多糖中蛋白质的三个影响因素最佳组合为A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>,即pH 3.4,乙醇添加量为13%,静置时间为3 d。在此最佳组合条件下做验证试验,蛋白质脱除率为92.68,多糖保留率为61.78。

2.6 三氯乙酸浓度对蛋白质脱除的影响

如图4所示,随着三氯乙酸添加浓度的提高,蛋白质脱除率呈上升趋势,多糖保留率在2%~6%时迅速上升,到6%时达最大,随后多糖得率缓慢下降,可能原因是由于多糖分子本身是一种糖蛋白,在蛋白质

脱除的同时,多糖也随之被脱除,因此最佳三氯乙酸的浓度为6%,此时多糖保留率为48.79%,蛋白质脱除率为89.47%。

表2 L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>)正交试验设计及结果

Table 2 Design and result of the L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>) orthogonal test

试验号	A	B	C	空列	蛋白质脱除率/%	多糖保留率/%	综合评分
1	1	1	1	1	80.71	55.07	86.77
2	1	2	2	2	88.01	57.22	92.38
3	1	3	3	3	93.36	52.58	91.57
4	2	2	1	3	91.62	62.57	98.54
5	2	3	2	2	92.06	60.05	96.78
6	2	1	3	1	84.49	63.24	95.25
7	3	3	1	2	82.71	61.64	91.96
8	3	1	2	1	83.36	55.23	88.31
9	3	2	3	3	85.14	60.67	93.57
K <sub>1j</sub>	270.72	270.33	277.27	270.33			
K <sub>2j</sub>	290.57	284.49	277.47	281.12			T=835.13
K <sub>3j</sub>	273.84	280.31	280.39	283.68			
k <sub>1j</sub>	90.24	90.11	92.42	90.11			
k <sub>1j</sub>	96.86	94.83	92.49	93.71			278.377
k <sub>1j</sub>	91.28	93.44	93.46	94.56			
R <sub>j</sub>	6.62	3.89	1.04	4.45			
因素主次	A	B	C				
优方案	A <sub>2</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>				

注:本试验采用综合加权评分法<sup>[9]</sup>,权重系数均为0.5,分别把两项中最大的指标定为100分,其他各号按下式评分:综合评分=(蛋白质脱除率/93.36)×100×0.5+(多糖保留率/63.24)×100×0.5。

表3 方差分析表

Table 3 Variance analysis of the results

变异来源	SS	df	MS	F	Fa
A	75.96	2	37.980	74.471*	
B	35.29	2	17.645	34.598*	F <sub>(0.05)</sub> =19
C	2.03	2	1.015	1.990	F <sub>(0.01)</sub> =99
误差	1.02	2	0.510		
总变异	114.30	8			

2.7 Sevage法脱蛋白质结果

如图5所示,随着Sevage试剂脱蛋白次数的增加,蛋白质脱除率逐渐增大,但是脱除效果明显不及盐酸-乙醇等电点法及三氯乙酸法,蛋白质脱除率最高不超过50%,而多糖保留率随着Sevage试剂脱除次数的增加显著下降,且Sevage试剂使用的有机溶剂氯仿有剧毒,易造成溶剂残留,因此茶籽多糖脱除蛋白质不宜

使用 Sevage 法。

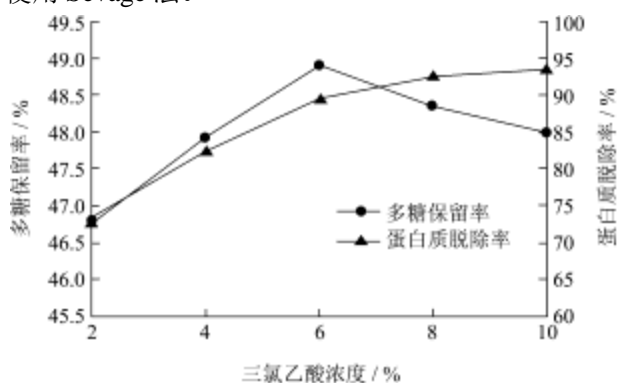


图4 三氯乙酸浓度对蛋白质脱除效果的影响

Fig.4 The effect of concentration of TDA on protein removing

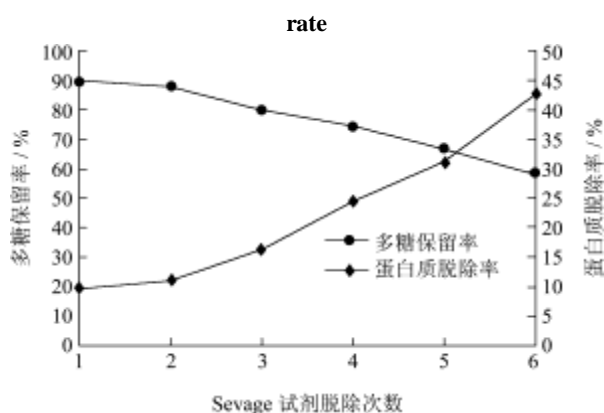


图5 Sevage 法脱蛋白结果

Fig.5 The results of Sevage method for protein removing

### 3 结论

3.1 使用 Sevage 法反复脱色 5 次蛋白质脱除效果仍不佳，且多糖损失较大；三氯乙酸法脱除蛋白质效果虽好，但是该反应剧烈，可能会造成多糖的降解及溶剂残留，盐酸-等电点法由于其脱蛋白效果不如前两种好，所以应用较少。本试验将盐酸-等电点法加以改进，

即添加一定浓度的乙醇，增强体系极性，从而有利于蛋白质的沉淀。

3.2 对于多糖的研究主要是利用多糖的抗肿瘤、抗氧化等生理活性来开发保健品，这就要求所提取的多糖必须符合食品安全的要求。Sevage 法和三氯乙酸法由于添加了氯仿及三氯乙酸等有毒的试剂故所提取的多糖存在着一定的安全隐患，而本研究采用的方法所提取的茶籽多糖完全符合食品级的要求。

3.3 通过单因素试验和正交试验确定盐酸-乙醇等电点法去除茶籽多糖中蛋白质的最佳条件为 pH 3.4，乙醇添加量为 13%，静置时间为 3 d，可以使蛋白质脱除率达到 92.68%，多糖保留率为 61.78%。

### 参考文献

- [1] 高瑞龙,姚克平,陈鼎源.油茶优良无性系栽培技术研究[J].经济林研究,2006,14(2):30-34
- [2] 兰祥光.茶油-食用油的佳品[J].中国检验检疫,1999,4:14
- [3] 龙学为,游国庆.锦屏县油茶产业现状及发展对策探讨[J].贵州林业科技,2007,35(2):62-65
- [4] 刘安军,邓颖,王雅静.茶多糖及协同因子的降血糖作用研究[J].现代食品科技,2012,28(2):139-142
- [5] 刘茹,马森.茶多酚和茶多糖清除羟基自由基的效果[J].安徽农业科学,2012,40(3):1463-1464
- [6] 王淑茹,王丁刚.茶叶多糖的抗凝血及抗血栓作用[J].中草药,1992,23(5):254-256
- [7] 付学鹏,杨晓杰.蒲公英多糖的提取及含量测定[J].现代食品科技,2007,23(5):37-40
- [8] 章银良.食品与生物实验设计与数据分析[M].北京:中国轻工业出版社,2010,4:75-93
- [9] 贾淑珍,王成忠,于功明.香菇多糖脱色方法的研究[J].食品科技,2007,7:113-115