

文章编号: 1004-7271(2007)02-0140-04

## 条斑紫菜多糖脱蛋白方法与条件优化

刘 凤, 陶慧卿, 何培民

(上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090)

**摘 要:**对紫菜多糖提取液中的杂蛋白质去除方法和条件优化进行了研究。采用 Sevag 法与三氯乙酸(TCA)法去除紫菜多糖中的游离蛋白质,分别研究了不同溶剂体积比、用量、处理温度 和时间等主要因子对蛋白质去除的影响。结果表明,Sevag 法最佳脱蛋白条件为氯仿:正丁醇=3:1,样品:氯仿-正丁醇=3:1,振荡时间为 30 min;三氯乙酸法(TCA 法)最佳脱蛋白条件为反应温度 80 ℃、三氯乙酸用量 4%、反应时间 30 min。两种脱蛋白方法比较发现:三氯乙酸法去除蛋白质的效果优于 Sevag 法。

**关键词:**Sevag 法; TCA 法; 紫菜; 多糖; 蛋白质去除率

**中图分类号:**S 985.4 **文献标识码:**A

## Protein removing method and condition optimization in the polysaccharide extraction from *Porphyra yezoensis*

LIU Feng, TAO Hui-qing, HE Pei-min

(College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

**Abstract:** In this paper, the protein removing methods and their effect factors on polysaccharide extraction from *Porphyra yezoensis* were studied. Sevag method and TCA method were used to remove protein from *Porphyra* polysaccharide extraction respectively, and effects of different ratios of solvent volume, dosages, treating temperature and time and other main factors on protein removing were studied respectively. The results showed that the optimum conditions of protein removing with Sevag method were: 3:1 ratio of chloroform:n-butanol, 3:1 ratio of sample: chloroform-n-butanol, 30 min stirring time; and the optimum conditions of protein removing with TCA were: 80 ℃ temperature, 30 min treating time, 4% trichloroacetic acid. The comparison between Sevag method and TCA method indicated that protein removing efficiency with TCA method was higher than that with Sevag method.

**Key words:** Sevag method; TCA method; *Porphyra yezoensis*; polysaccharide; protein removing

紫菜属于红藻门(Rhodophyta)、原红藻纲(Protofloridaeophyceae)、红毛菜科(Bangiaceae)、紫菜属(*Porphyra*),在我国沿海皆有分布<sup>[1]</sup>。紫菜多糖是紫菜中的重要组成部分,是含硫酸酯的杂多糖<sup>[2]</sup>。不同的紫菜所含的多糖种类及生物学活性也有所区别<sup>[2]</sup>。大量研究初步表明紫菜多糖具有抗肿瘤<sup>[3]</sup>、抗凝血<sup>[4]</sup>、抗病毒<sup>[5]</sup>等多种生物活性。最近本实验室研究表明,紫菜多糖还具有抗氧化、抗疲劳、提高免

收稿日期:2006-05-18

基金项目:上海科委重点科技攻关计划项目(054319936);上海教委优势(重点)学科资助项目(Y1101)

作者简介:刘 凤(1979-),内蒙古包头人,硕士研究生,专业方向为海藻生物技术。Tel: 021-65711601

通讯作者:何培民, Tel: 021-65710364, E-mail: pmhe@shfu.edu.cn

疫力和促使生殖支持细胞增殖等活性<sup>[6,7]</sup>。为了进一步明确多糖的结构与功能关系,多糖纯化过程中蛋白质去除是制备紫菜多糖的必要步骤,一般去除蛋白质过程中紫菜多糖损失量较大<sup>[8]</sup>,所以有必要对紫菜多糖脱蛋白方法进行研究。本实验在紫菜多糖分离提取研究的基础上<sup>[9]</sup>,进一步采用 Sevag 法与三氯乙酸法去除紫菜多糖提取液中的蛋白质,并对去除蛋白质的影响因子进行了检测和分析,以确定去除蛋白质质的最适条件,为大规模紫菜多糖提取和制备规范工艺奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

本实验材料为条斑紫菜(*Porphyra yezoensis* Ueda),2005 年 1-3 月采自江苏吕泗紫菜栽培海区,经阴干密封后放入 -20 ℃ 冰箱中保存。

### 1.2 紫菜粗多糖提取方法

紫菜洗净,用高速组织捣碎机捣碎,乙醇回流去脂肪,在 100 ℃ 恒温水浴 3 h,收集提取液,剩余部分重复提取步骤,合并两次提取液。将提取液蒸发浓缩至原体积的 1/3,离心(5 000 r/min,10 min),取上清液,放入 4 ℃ 冰箱中备用。

### 1.3 脱蛋白方法及实验设计

脱蛋白方法采用 Sevag 法<sup>[10]</sup>和三氯乙酸法<sup>[11]</sup>。Sevag 法实验设计:氯仿与正丁醇混合液体积比分别为 2:1、3:1、4:1、5:1 等 4 个梯度;样品溶液与氯仿-正丁醇混合液体积比分别为 2:1、3:1、4:1、5:1 等 4 个梯度;振荡时间分别为 10 min、20 min、30 min、40 min 等 4 个时间梯度。每个实验设置 3 个平行。三氯乙酸法(TCA 法)实验设计:设置不同反应温度 20 ℃、45 ℃、60 ℃、70 ℃、80 ℃、90 ℃ 等 6 个梯度;设置三氯乙酸浓度为 1%、2%、3%、4%、5% 等 5 个梯度;设置 10 min、20 min、30 min、40 min、50 min 等 5 个时间梯度。每个实验设置 3 个平行。

### 1.4 测定方法

多糖含量的测定方法为苯酚-硫酸法<sup>[12]</sup>,多糖损失率 =  $(M1 - M2)/M1$  ( $M1$ :去除蛋白质前原液中多糖的含量, $M2$ :去除蛋白质后原液中多糖的含量)。蛋白质含量测定采用 Brodford 法<sup>[13,14]</sup>,蛋白质的去除率 =  $(N1 - N2)/N1$  ( $N1$ :去除蛋白质前原液中蛋白质的含量, $N2$ :去除蛋白质后原液中蛋白质的含量)。

## 2 结果

### 2.1 Sevag 法去除紫菜多糖提取液中蛋白质的条件优化

#### 2.1.1 氯仿与正丁醇体积比对蛋白质去除的影响

表 1 为不同氯仿与正丁醇体积比对蛋白质去除及其多糖损失进行比较。由表 1 得知,当氯仿与正丁醇比率为 2:1 或 3:1 时,经 4 次 Sevag 法脱蛋白后,多糖提取液均能基本去除游离蛋白质。但当比率为 2:1 时,多糖损失较大,故 3:1 为最佳。

#### 2.1.2 样品与氯仿-正丁醇混合液体积比对蛋白质去除的影响

表 2 为不同样品与氯仿-正丁醇混合液体积比对蛋白质去除效果和 多糖损失的影响比较。由表 3 数据分析可知,虽然样品与氯仿-正丁醇混合液比率为 2:1 或 3:1 时,多糖损失率相近且均有较好去除游离蛋白质的效果,但比率为 3:1 所耗费有机溶剂用量少、较为经济,因此 3:1 为最佳选择。

#### 2.1.3 振荡时间对蛋白质去除的影响

表 3 为样品与氯仿-正丁醇混合液体积为 3:1 时不同振荡时间对蛋白质去除效果的影响。由实验结果可知,在振荡时间达到 30 min 后,再增加时间对蛋白质去除已无明显提高效果,故每次振荡时间为 30 min 时效果最好。

表1 不同氯仿-正丁醇混合液体积比  
对蛋白质去除率的影响(n=3)

Tab. 1 Effect of the ratio of chloroform volume to n-Butanol volume in their mixed solution on rate of protein removing (n=3)

氯仿与正丁醇 体积比 (v/v)	脱蛋白次数 (次)	蛋白质去除率 (%)	多糖损失率 (%)
2:1	3	49.8 ± 0.8	44.3 ± 0.21
	4	58.4 ± 0.29	54.9 ± 0.24
	5	-	56.3 ± 0.17
3:1	3	46.9 ± 1.45	39.0 ± 0.11
	4	57.9 ± 0.55	46.9 ± 0.37
	5	-	50.7 ± 0.25
4:1	3	42.7 ± 0.49	34.1 ± 0.49
	4	52.4 ± 1.29	41.4 ± 0.55
	5	57.9 ± 0.63	44.7 ± 0.33
5:1	3	37.5 ± 0.70	28.8 ± 0.11
	4	46.7 ± 1.34	34.9 ± 0.08
	5	53.7 ± 1.18	38.8 ± 0.49

注: - 表示没有蛋白析出

表2 样品溶液与氯仿-正丁醇混合液体积比  
对蛋白质去除率的影响(n=3)

Tab. 2 Effect of the ratio of sample volume to chloroform n-Butanol solution volume on rate of protein removing (n=3)

氯仿与 正丁醇体积比 (v/v)	脱蛋白次数 (次)	蛋白质去除率 (%)	多糖损失率 (%)
2:1	2	50.9 ± 0.44	42.9 ± 0.40
	3	57.9 ± 0.14	48.2 ± 0.34
	4	58.6 ± 0.17	49.3 ± 0.16
3:1	2	41.2 ± 0.16	35.0 ± 0.53
	3	57.5 ± 0.24	47.5 ± 0.28
	4	58.3 ± 0.51	48.5 ± 0.33
4:1	2	33.7 ± 0.21	28.5 ± 0.48
	3	46.7 ± 0.55	39.0 ± 0.26
	4	57.7 ± 0.23	47.8 ± 0.40
5:1	2	27.9 ± 0.86	24.0 ± 0.20
	3	38.8 ± 0.36	32.9 ± 0.47
	4	49.6 ± 0.70	41.6 ± 0.29

## 2.2 三氯乙酸法(TCA法)去除多糖提取液中蛋白的最佳条件选择

### 2.2.1 反应温度对蛋白质去除率的影响

图1为加入了浓度为3%三氯乙酸的提取液,在不同反应温度下静置20min后,测得的蛋白质去除率。由实验数据可知,去除率随温度升高而升高。当温度低于50℃时蛋白质基本上没有被去除,当温度高于60℃时,容易去除。当温度超过80℃后,蛋白质基本大部分被去除,故反应温度以80℃为宜。

### 2.2.2 三氯乙酸用量对蛋白质去除的影响

图2为提取液中加入不同浓度三氯乙酸,在80℃下静置20min后对蛋白质去除效果的影响。从图2中可以看出,三氯乙酸用量对去除蛋白质的影响主要有两个方面:增加三氯乙酸的用量可以提高蛋白质去除率;另一方面随着用量的增加,多糖的损失也在同时上升。在此实验中当三氯乙酸浓度达到4%时,蛋白质去除率增加缓慢,多糖的损失率仍在增加;因此,4%的三氯乙酸浓度较为适宜。

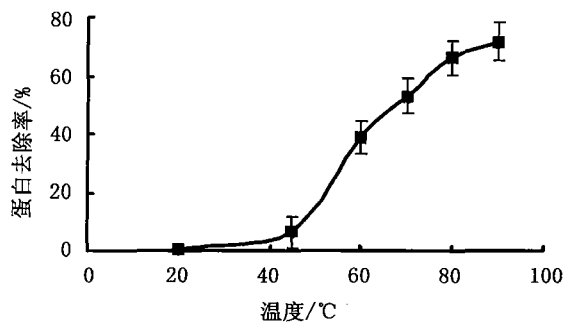


图1 不同反应温度对蛋白质去除率的影响(n=3)

Fig. 1 Effect of temperature on rate of protein removing (n=3)

表3 不同振荡时间对蛋白质去除率的影响(n=3)

Tab. 3 Effect of treating time on rate of protein removing (n=3)

处理时间 (min)	脱蛋白次数 (次)	蛋白质去除率 (%)
10	1	9.9 ± 0.10
	2	19.1 ± 0.42
	3	28.0 ± 0.34
20	1	16.6 ± 0.11
	2	32.2 ± 0.44
	3	49.4 ± 0.78
30	1	23.3 ± 0.07
	2	43.4 ± 0.22
	3	58.2 ± 0.22
40	1	26.9 ± 0.24
	2	47.0 ± 0.24
	3	58.4 ± 0.10

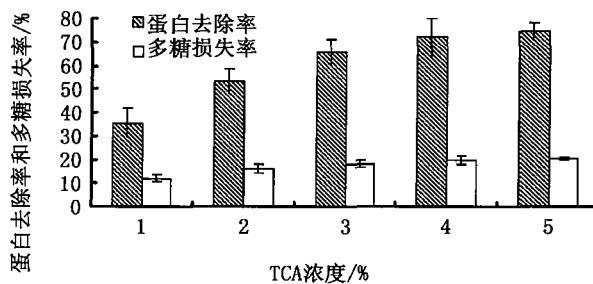


图2 不同三氯乙酸用量对蛋白质去除率  
和多糖损失率的影响(n=3)

Fig. 2 Effect of the amount of TCA on rate of protein removing and on rate of polysaccharide lost (n=3)

### 2.2.3 反应时间对蛋白质去除的影响

图 3 为加入浓度 4% 三氯乙酸提取液,在 80 °C 静置不同时间后,测得的蛋白质去除率。从图 3 可看出,蛋白质去除率随反应时间增加而上升。但当时间达到 30 min 后,蛋白质去除率提高较缓慢,反应时间为 30 min 时较佳。

## 3 讨论

影响 Sevag 法脱蛋白的外界因素主要有振摇时间、氯仿与正丁醇体积比、样品溶液与氯仿-正丁醇混合液体积比因素<sup>[15,16]</sup>。用 Sevag 法脱蛋白,除了达到去除蛋白质的目的外还需尽量缩短去除时间,选择适当的振荡时间具有一定意义<sup>[8]</sup>。氯仿与正丁醇的比率与蛋白质去除率及多糖损失率的关系极大,需选择合适的比率<sup>[16]</sup>。另外,样品溶液与氯仿-正丁醇混合液体积比不能忽略,试剂用量大,溶在其中的糖就多,会影响糖的定量测定和多糖的收率,但样品体积过大,又会影响蛋白质去除效果<sup>[8]</sup>。本实验通过对上述影响因子的研究,选择出 Sevag 法最佳脱蛋白条件为:振荡时间为 30 min,氯仿:正丁醇=3:1,样品氯仿:正丁醇=3:1。

影响三氯乙酸法(TCA 法)脱蛋白的外界因素主要有反应温度、三氯乙酸用量、反应时间因素<sup>[16]</sup>,用三氯乙酸脱蛋白时发现,温度过低,不能除去蛋白质,并且随着三氯乙酸用量、反应时间的不同,脱蛋白效果也显著不同。通过对上述影响因子的研究,选择出三氯乙酸法(TCA 法)最佳脱蛋白条件为:反应温度 80 °C、三氯乙酸用量 4%、反应时间 30 min。

通过对两种方法的比较(表 4),可以发现 TCA 法脱蛋白的去除率高、多糖损失量小,而 Sevag 法所需时间长、有机溶剂消耗多,故三氯乙酸法去除蛋白质的效果优于 Sevag 法。

### 参考文献:

- [1] 曾呈奎,王素娟,刘思俭,等.海藻栽培学[M].上海:上海科学技术出版社,1984:135-137.
- [2] 周慧萍,陈琼华.紫菜多糖的提取、分离和鉴定[J].中国药科大学学报,1989,20(3):70-171.
- [3] 张伟云,周建峰,陈 颖,等.紫菜多糖对免疫细胞及肿瘤细胞生长的影响[J].生命科学研究,2002,6(2):167-170.
- [4] 周慧萍,陈琼华.紫菜多糖的抗凝血和降血脂作用[J].中国药科大学学报,1990,21(6):358-360.
- [5] 肖美添,杨军玲,林海英,等.紫菜多糖的提取及抗流感病毒活性研究[J].福州大学学报(自然科学版),2003,31(5):631-635.
- [6] Tingting Guo, Jiawen Gu, Luxi Zhang, et al. Mice's anti-fatigue experiment with crude polysaccharide from *Porphyra yezoensis* [C]// Proceedings of 10th International Symposium on the Efficient Application and Preservation of Marine Biological Resources. Yeosu University, Korea, 2005:81-87.
- [7] 郭婷婷,张陆曦,顾佳雯,等.条斑紫菜多糖对淋巴细胞和支持细胞增殖作用[J].生物技术通讯,2006,17(2):359-361.
- [8] 倪德江,谭少波.脱蛋白工艺对多糖提取率及蛋白质含量的影响[J].中国茶叶,2002,24(4):6-7.
- [9] 刘 凤,顾中恺,何培民.几种因子对紫菜多糖粗提的影响[J].上海水产大学学报,2005,14(1):26-29.
- [10] Staub A M. Removal of Proteins (Sevag Method) [J]. Method in Carbohydrate Chemistry (V), 1965, 5:5-6.
- [11] 张文超.金针菇子实体多糖的提取、分离、及鉴定研究[D].华南理工大学硕士论文,2001.
- [12] 张惟杰.复合多糖生化研究技术[M].上海:上海科学技术出版社,1987:124-128.
- [13] 郭敏亮,姜永明.考马斯亮蓝显色液组分对蛋白质测定的影响[J].生物化学与生物物理进展,1996,23(6):558-561.
- [14] 王多宁,赵雁武,田芙蓉.考马斯亮蓝微盘比色法测定蛋白质含量[J].第四军医大学学报,2001,22(6):528-529.
- [15] 李 津,俞咏霆.生物制药设备和分离纯化技术[M].北京:化学工业出版社,2002:390-391.
- [16] 齐慧玲,高 波. Sevag 法去除白及多糖中蛋白的研究[J].天津化工,2000,(3):20-22.

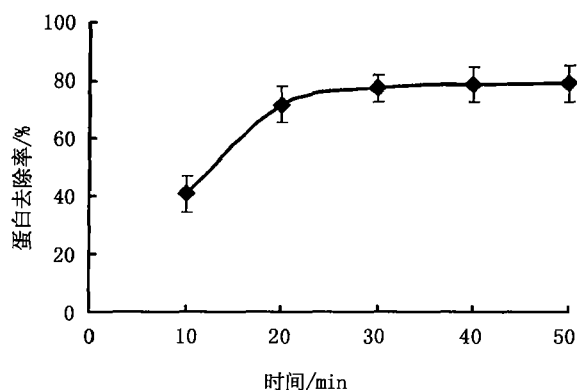


图 3 不同反应时间对蛋白质去除率的影响(n=3)

Fig. 3 Effects of reaction time on the rate of protein removing (n=3)

表 4 Sevag 法与 TCA 法脱蛋白的比较  
Tab.4 Comparison between Sevag and TCA method for protein removing

参数	Sevag 法	TCA 法
蛋白质去除率 (%)	58.3	76.8
多糖损失率 (%)	48.5	22.3
处理时间 (h)	3	0.5
有机溶剂用量	较多	较少