

响应面法优化黑根霉胞外多糖脱蛋白工艺研究

秦国正^{1,2,3}, 琚勇¹, 张明芮¹, 李萍^{1,2,3}, 柳春燕^{2,3}, 唐保露¹, 薛信磊¹, 王国栋^{1,2,3*}

¹皖南医学院药学院; ²安徽省多糖药物工程技术研究中心; ³活性生物大分子研究安徽省重点实验室, 芜湖 241002

摘要: 采用单因素实验结合 Box-Behnken 中心组合设计方法, 以蛋白质脱除率和综合指数为指标, 考察木瓜蛋白酶浓度、酶解温度和酶解时间对黑根霉胞外多糖酶-Sevag 法脱蛋白工艺的影响。经过响应面实验优化, 确定最优条件为木瓜蛋白酶浓度 425 U/mL、酶解温度 62 °C、酶解时间 90 min, 经三次重复实验验证, 蛋白质脱除率与综合指数均值分别为 54.08% 和 2.07。

关键词: 黑根霉; 胞外多糖; 脱蛋白; 酶-Sevag 法; 响应面法

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.10.023

Optimization of Deproteinization Process of Exopolysaccharides from *Rhizopusnigricans* by Response Surface Methodology

QIN Guo-zheng^{1,2,3}, JU Yong¹, ZHANG Ming-rui¹, LI Ping^{1,2,3}, LIU Chun-yan^{2,3},

TANG Bao-lu¹, XUE Xin-lei¹, WANG Guo-dong^{1,2,3*}

¹School of Pharmacy, Wannan Medical College; ²Anhui Provincial Engineering Research Center for Polysaccharide Drugs; ³Anhui Province Key Laboratory of Active Biological Macro-molecules, Wuhu 241002, China

Abstract: The effects of papain concentration, enzymolysis temperature and time on the deproteinization of extracellular polysaccharide from *Rhizopusnigricans* in Enzyme-Sevag process were investigated by single-factor experiment combining with central composite design method of Box-Behnken. The optimal process parameters were determined based on the deproteinization rate and comprehensive index. After optimizing by response surface methodology, the optimal process parameters were confirmed as follows: papain concentration of 425 U/mL, enzymolysis temperature of 62 °C and time of 90 min. Following repeated experiments three times, the average deproteinization rate and comprehensive index were determined as 54.08 % and 2.07, respectively.

Key words: *Rhizopusnigricans*; exopolysaccharides; deproteinization; enzyme-sevag process; response surface methodology

黑根霉 (*Rhizopusnigricans*) 是一种接合菌类丝状真菌。从黑根霉发酵液中提取并纯化得到的均一胞外多糖经体外研究发现能够抑制多种肿瘤细胞的增殖和诱导其细胞凋亡^[1,2], 具有良好的生物药物或功能食品开发前景。

胞外多糖的体外、体内实验对多糖药品的需求量大, 而胞外粗糖产量低、分离纯化困难, 常会导致实验样本不足, 使胞外多糖的深入研究进展缓慢。特别是脱蛋白工艺阶段, 少量多糖随脱蛋白工艺一

并脱除, 进一步降低了胞外多糖的提取率。目前, 对多糖脱蛋白的方法主要有 Sevag 法、三氟三氯乙烷法、酶法、酶-Sevag 法、树脂法等^[3-6]。其中, 酶-Sevag 法利用蛋白酶将粗多糖中的蛋白质水解或部分水解, 然后再用 Sevag 试剂脱除未被完全消化的杂质蛋白以及引入的酶蛋白。酶-Sevag 法条件温和、多糖活性损失小, 在高效脱除蛋白质的情况下, 能最大限度地减小多糖的损失, 是现在普遍采用的一种活性多糖分离纯化手段^[7-9]。

我们以黑根霉胞外粗多糖为材料, 以酶-Sevag 法为脱蛋白方法, 采用单因素实验结合 Box-Behnken 中心组合设计方法优化木瓜蛋白酶浓度、酶解温度和酶解时间三个因素的组合, 以获得黑根霉胞外多糖的稳定、高效的脱蛋白工艺条件, 为黑根霉胞外多糖抗肿瘤活性与机制研究和以黑根霉胞外多糖为主要原料的生物药物或功能食品开发提供原材料保

收稿日期: 2017-05-02 接受日期: 2017-06-16

基金项目: 安徽高校自然科学研究项目 (KJ2016A723, KJ2015A199, KJ2017A257); 安徽省自然科学基金 (1508085M H191); 皖南医学院中青年科研基金 (WK201517, WK201601, WK201610); 大学生创新创业训练计划 (201510368017, 201510368119, 201610368120)

* 通信作者 E-mail: guodong201@163.com

障。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

PDA、PDB 培养基, 青岛海博生物技术有限amp;公司; 木瓜蛋白酶, 上海源叶生物科技有限amp;公司; 牛血清白蛋白, 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限amp;公司; 其他试剂均为分析纯, 国药集团化学试剂有限amp;公司; 超纯水, 实验室自制。黑根霉胞外粗多糖为前期从黑根霉发酵液中醇沉获得^[2]。

1.2 仪器与设备

752 紫外分光光度计, 上海精科实业有限amp;公司; 电子分析天平, 梅特勒-托利多(上海)仪器有限amp;公司; AXTG16G 台式高速离心机, 上海赵迪生物科技有限amp;公司; RE-3000A 旋转蒸发器上海亚荣生化仪器厂; 实验室超纯水系统, 合肥科宁特水处理设备有限amp;公司。

1.3 方法

1.3.1 粗多糖溶液的制备

黑根霉液体深层发酵 120 h, 放罐, 8 层纱布过滤, 4500 rpm 离心 5 min, 收集发酵液, 减压浓缩(浓缩倍数 $m = 5$)后用 3 倍体积无水乙醇沉淀, 4 °C 静置过夜, 离心弃上清得黑根霉胞外粗多糖。将粗多糖质量体积比 1:50 复溶, 减压蒸发残留乙醇, 超纯水补齐溶剂损失, 冷却至室温备用。

1.3.2 木瓜蛋白酶溶液的制备

精确称量木瓜蛋白酶结晶, 溶于 100 mL 超纯水, 使酶浓度为 2000 U/mL, pH6.0。

1.3.3 分析方法与评价指标

1.3.3.1 标准曲线的绘制

黑根霉胞外粗多糖含量的测定: 苯酚-硫酸法^[10]。精确吸取 0.04、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6 mL 100 μg/mL 的葡萄糖溶液于试管中, 并用蒸馏水将其补至 2.0 mL。加入质量分数 6% 苯酚 1.0 mL, 迅速滴加浓硫酸 5.0 mL, 摇匀振荡均匀后于沸水浴中 15 min, 冷却 5 min, 在 490 nm 处测定吸光度。以 2.0 mL 蒸馏水按照相同显色操作(作为空白试验)。绘制标准曲线, 用最小二乘法计算得到回归方程: $Y = 0.3881X + 0.0103$ ($R^2 = 0.9901$), 线性关系良好。

蛋白质含量的测定: Folin-酚法^[11]。准确吸取 0.0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 0.15 mg/mL 的牛血清蛋白溶液于试管中, 加水稀释至 1 mL, 向各管中加入 Folin-酚甲试剂 5.0 mL, 混匀, 于 20 ~ 25 °C

放置 10 min; 加 Folin-酚乙试剂 0.5 mL, 迅速混匀, 于 30 °C 水浴保温 30 min, 在 640 nm 处测定吸光度, 以 1.0 mL 蒸馏水按照相同显色操作(作为空白试验)。绘制标准曲线, 用最小二乘法计算得到回归方程: $Y = 0.5625X + 0.0215$ ($R^2 = 0.9907$), 线性关系良好。

1.3.3.2 评价指标

蛋白质脱除率 = $(A_0 - A_1) / A_0 \times 100\%$, A_0 为脱蛋白前样品中蛋白质浓度, A_1 为脱蛋白后样品中蛋白质浓度。

胞外多糖损失率 = $(B_0 - B_1) / B_0 \times 100\%$, B_0 为脱蛋白前样品中多糖浓度, B_1 为脱蛋白后样品中多糖浓度。

综合指数 = 蛋白质脱除率 / 胞外多糖损失率

1.3.4 单因素实验

1.3.4.1 木瓜蛋白酶浓度对蛋白质脱除率和胞外多糖损失的影响。

参考文献报道设置单因素实验的初始条件^[12]。精确量取等量的粗多糖液, 加入木瓜蛋白酶液使酶浓度分别为 100、200、300、400、500、600 U/mL, 体积差用超纯水补齐, pH 6.0, 60 °C 酶解 1.5 h, 经 3 次, 每次 1/2 体积氯仿正丁醇溶液脱蛋白处理。重复实验 3 次, 取均值, 考察不同酶解温度对蛋白质脱除率和胞外多糖损失的影响。

1.3.4.2 酶解温度对蛋白质脱除率和胞外多糖损失的影响。

精确量取等量的粗多糖液, 加入木瓜蛋白酶使浓度为 400 U/mL, 分别在温度 40、50、60、70、80 °C 条件下, pH 6.0, 酶解 1.5 h, 经 3 次, 每次 1/2 体积氯仿正丁醇溶液脱蛋白处理。重复实验 3 次, 取均值, 考察不同酶解温度对蛋白质脱除率和多糖损失的影响。

1.3.4.3 酶解时间对蛋白质脱除率和胞外多糖损失率的影响。

精确量取等量的粗多糖液, 加入木瓜蛋白酶使浓度为 600 U/mL, 温度 60 °C, pH 6.0 条件下, 分别酶解 0.5、1、1.5、2、2.5 h, 经 3 次, 每次 1/2 体积氯仿正丁醇溶液脱蛋白处理。重复实验 3 次, 取均值, 考察不同酶解温度对蛋白质脱除率和胞外多糖损失的影响。

1.3.5 酶-Sevag 法脱蛋白的响应面分析

由单因素实验确定响应面分析法实验设计的因素和水平, 即选取木瓜蛋白酶浓度(A)、酶解温度

(B)、酶解时间(C)为考察因素,根据 Box-Behnken 的中心组合实验设计原理,以各实验单因素最优取值点为中心,上下区域各取 1 个水平值作为响应面实验设计水平,以蛋白质脱除率和综合指数(即蛋白质脱除率/胞外多糖损失率)为评价指标,设计三因素三水平 15 个实验点的响应面分析,其中零点实验重复 3 次,以估计误差。采用 Design-Expert 8.0.6.1 统计软件对实验结果进行响应面回归分析。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 木瓜蛋白酶浓度对蛋白质脱除率和胞外多糖损失率的影响。

实验结果见图 1,当 pH 6.0,60 °C 酶解 90 min 条件下,小于 300 U/mL 时,随酶量的增加蛋白质脱除率提高;大于 300 U/mL 时,随酶量的增加蛋白质脱除率有减小的趋势。相同条件下,小于 400 U/mL 时,随酶量的增加胞外多糖损失率提高;大于 400 U/mL 时,随酶量的增加胞外多糖损失率有减小的趋势。胞外多糖的损失率与脱蛋白率密切相关,胞外多糖会随着蛋白质的脱除而损失。大于 300 U/mL 时,可能由于木瓜蛋白酶也是蛋白质,大量酶蛋白添加到体系中,使脱蛋白负担加重,相同脱蛋白次数条件下,脱蛋白率实测值变小。

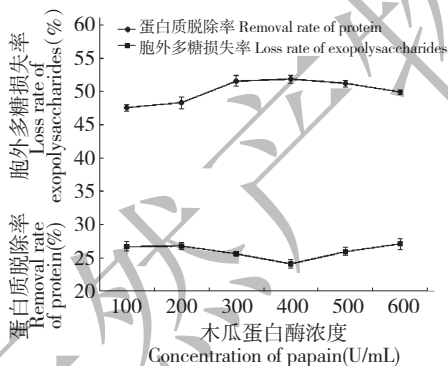


图 1 木瓜蛋白酶浓度对蛋白质脱除率和胞外多糖损失率的影响

Fig. 1 Effects of papain concentration on removal rate of protein and loss rate of exopolysaccharides

2.1.2 酶解温度对蛋白质脱除率和胞外多糖损失率的影响。

实验结果见图 2,当酶量 400 U/mL,pH 6.0,酶解 90 min 条件下,40 ~ 60 °C 范围,蛋白质脱除率随温度的提高而增大,且斜率较大;60 ~ 80 °C 范围,蛋白质脱除率与温度的关系复杂,可能与木瓜蛋白酶

部分活力下降或失活有关。该实验中,胞外多糖损失率较为稳定,且呈现小幅上升趋势,与蛋白质脱除率逐步提高的趋势相一致。

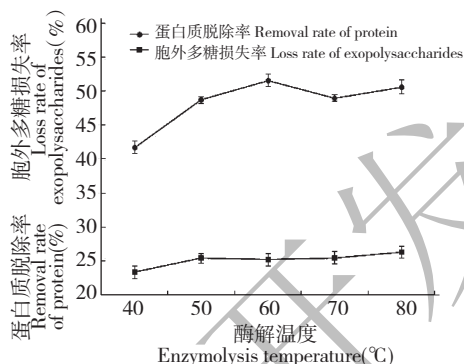


图 2 酶解温度对蛋白质脱除率、多糖损失率的影响

Fig. 2 Effects of enzymolysis temperature on removal rate of protein and loss rate of exopolysaccharides

2.1.3 酶解时间对蛋白质脱除率和胞外多糖损失率的影响。

实验结果见图 3,当酶量 400 U/mL,pH 6.0,60 °C 条件下,90 min 之前,蛋白质脱除率随温度的提高而增大;90 min 之后,蛋白质脱除率基本不变。该实验中,胞外多糖损失率稳定在 26% 左右,变化趋势不明显。

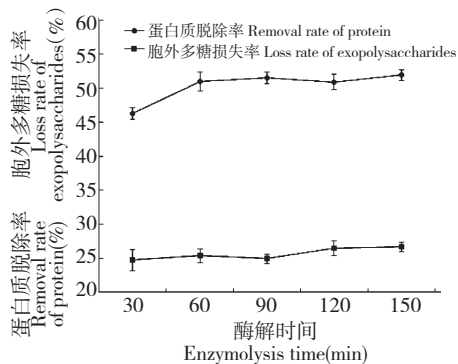


图 3 酶解时间对蛋白质脱除率、多糖损失率的影响

Fig. 3 Effects of enzymolysis time on removal rate of protein and loss rate of exopolysaccharides

2.2 酶-Sevag 法脱蛋白的响应面分析

2.2.1 各因素的水平值的设定

综合分析单因素实验结果,中心组合实验方案选取的因素及水平见表 1。

2.2.2 回归模型的建立及其分析

采用 Design-Expert 8.0.6.1 统计软件对实验结果进行响应面回归分析,中心组合实验设计方案及蛋白质脱除率和综合指数响应值见表 2。

表1 中心组合实验设计的因素及水平

Table 1 Factors and their levels used in the Box-Behnken design

因素 Factor	代码 Code	水平 Level		
		-1	0	1
木瓜蛋白酶浓度 Papain concentration (U/mL)	A	200	400	600
酶解温度 Enzymolysis temperature (°C)	B	55	60	65
酶解时间 Enzymolysis time (min)	C	60	90	120

表2 中心组合实验设计方案及考察指标响应值

Table 2 Box-Behnken design and response of index

编号 No.	水平 Level			蛋白质脱除率 Removal rate of protein	综合指数 Composite index
	A (U/mL)	B (°C)	C (min)		
1	400	55	90	54.21	2.08
2	400	60	60	52.40	2.03
3	600	55	60	50.62	1.92
4	400	50	60	51.87	1.98
5	200	60	90	49.33	1.85
6	400	50	120	51.04	1.93
7	200	55	60	49.69	1.77
8	400	60	120	52.48	2.09
9	200	50	90	48.73	1.67
10	600	50	90	49.35	1.93
11	400	55	90	54.17	2.04
12	600	60	90	51.71	1.88
13	600	55	120	50.62	1.93
14	200	55	120	49.73	1.76
15	400	55	90	53.93	2.08

建立胞外多糖脱蛋白工艺参数回归模型,获得评价指标响应值对自变量 A、B、C 二次多项式回归方程:

$$\text{蛋白质脱除率} = 54.10 + 0.60 \times A + 0.62 \times B - 0.089 \times C + 0.44 \times A \times B - 0.01 \times A \times C + 0.23 \times B \times C - 3.05 \times A^2 - 1.27 \times B^2 - 0.89 \times C^2$$

$$\text{综合指数} = 2.07 + 0.076 \times A + 0.042 \times B + 0.001250 \times C - 0.057 \times A \times B + 0.005 \times A \times C + 0.028 \times B \times C - 0.20 \times A^2 - 0.036 \times B^2 - 0.023 \times C^2$$

对该模型进行方差分析及模型系数进行显著性检验,以蛋白质脱除率为评价指标的结果见表3。回归模型极显著 ($P=0.0001 < 0.01$),说明模型有意义;失拟项 $P=0.1591 > 0.05$,不显著,说明模型

拟合度好,模型的残差可能是随机误差产生。由方差分析结果可知,对回归方程进行检验,模型的校正决定系数 $R^2=0.9911$,说明此模型能解释 99.11% 响应值的变化,实验误差小。

通过分析回归模型系数显著性检验结果并作出相应的曲面图,见图4,在所选取的各因素水平范围内,按照对响应值的影响顺序为:酶解温度(B) > 木瓜蛋白酶浓度(A) > 酶解时间(C),其中木瓜蛋白酶浓度、酶解温度对蛋白质脱除率的影响极显著。木瓜蛋白酶浓度、酶解温度交互作用响应面图坡度较陡,对蛋白质脱除率的影响显著 ($P=0.0289 < 0.05$);木瓜蛋白酶浓度、酶解时间及酶解温度、酶解时间交互作用响应面图坡度平缓,对蛋白质脱除率的影响不显著 ($P > 0.05$)。

表 3 基于蛋白质脱除率的回归模型方差分析

Table 3 Analysis of variance in regression model based on removal rate of protein

方差来源 Source	平方和 Square sum	自由度 df	均方 Mean square	F	P
模型 Model	46.62	9	5.18	61.61	0.0001
A	2.90	1	2.90	34.54	0.0020
B	3.04	1	3.04	36.13	0.0018
C	0.063	1	0.063	0.75	0.4263
AB	0.77	1	0.77	9.21	0.0289
AC	0.0004	1	0.0004	0.004757	0.9477
BC	0.21	1	0.21	2.46	0.1774
A ²	34.41	1	34.41	409.25	< 0.0001
B ²	5.96	1	5.96	70.87	0.0004
C ²	2.89	1	2.89	34.42	0.0020
残差 Residual	0.42	5	0.084	-	-
失拟项 Lack of Fit	0.37	3	0.12	5.44	0.1591
净误差 Pure Error	0.046	2	0.023	-	-
总离差 Cor Total	47.05	14	-	-	-

注: $P < 0.05$ 为显著性差异; $P < 0.01$ 为极显著性差异。

Note: $P < 0.05$ significant difference; $P < 0.01$ extremely significant difference.

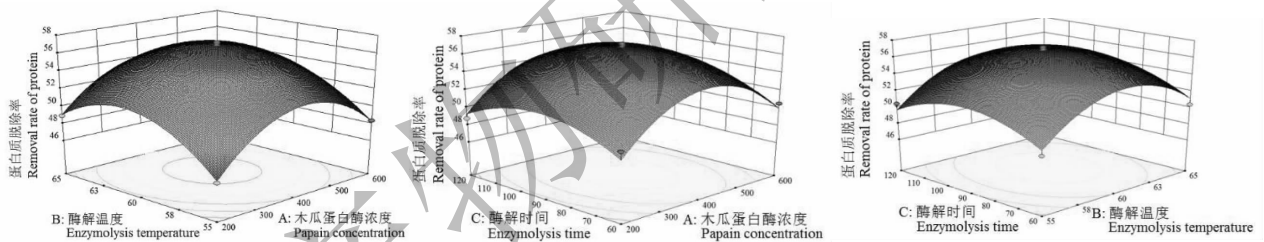


图 4 木瓜蛋白酶浓度、酶解温度和时间对蛋白质脱除率的交互作用响应面图

Fig. 4 Response surface plots of papain concentration, enzymolysis temperature and time on protein removal rate

以综合指数为评价指标的结果见表 4。回归模型极显著 ($P = 0.0001 < 0.01$), 说明模型有意义; 失拟项 $P = 0.6835 > 0.05$, 不显著, 模型的校正决定系数 $R^2 = 0.9912$, 通过分析回归模型系数显著性检验结果并作出相应的曲面图, 见图 5, 按照对响应值的影响顺序为: 木瓜蛋白酶浓度 (A) > 酶解温度 (B) > 酶解时间 (C), 其中木瓜蛋白酶浓度、酶解温度对蛋白质脱除率的影响极显著。木瓜蛋白酶浓度、酶解温度交互作用响应面图坡度陡峭, 对综合指数的影响极显著 ($P = 0.0022 < 0.01$); 酶解温度、酶解时间交互作用响应面图坡度较陡, 对综合指数的影响显著 ($P = 0.04 < 0.05$); 木瓜蛋白酶浓度、酶解时间交互作用响应面图坡度平缓, 对综合指数的影响不显著 ($P > 0.05$)。

综上分析, 并结合 Design-Expert 8.0.6.1 统计软件对数据处理和响应值预测, 在本实验研究因素水平范围内, 胞外多糖脱蛋白最优工艺为: 木瓜蛋白酶浓度 426.46 U/mL、酶解温度 61.68 °C、酶解时间 91.66 min, 在此条件下的理论蛋白质脱除率 54.21%, 综合指数 2.08, 通过计算可知多糖损失率为 26.06%。为方便实验操作, 将最佳工艺修正为木瓜蛋白酶浓度 425 U/mL、酶解温度 62 °C、酶解时间 90 min, 经三次重复实验验证, 蛋白质脱除率均值 54.08%, 综合指数均值 2.07, 与该实验预测值误差极小, 证明了回归模型较为准确可靠, 优化出的最优脱蛋白工艺条件重复性好。本研究中蛋白质脱除率依然较低, 分析可能与 Sevag 法脱蛋白次数较少有关, 下一步拟增加 Sevag 法脱蛋白次数, 并通过正交

表4 基于综合指数的回归模型方差分析

Table 4 Analysis of variance in regression model based on composite index

方差来源 Source	平方和 Square sum	自由度 df	均方 Mean square	F	P
模型 Model	0.22	9	0.025	62.57	0.0001
A	0.047	1	0.047	116.77	0.0001
B	0.014	1	0.014	36.28	0.0018
C	0.0000125	1	0.0000125	0.031	0.8663
AB	0.013	1	0.013	33.20	0.0022
AC	0.0001	1	0.0001	0.25	0.6376
BC	0.003025	1	0.003025	7.59	0.0400
A ²	0.15	1	0.15	364.62	< 0.0001
B ²	0.004741	1	0.004741	11.90	0.0182
C ²	0.00201	1	0.00201	5.05	0.0746
残差 Residual	0.001992	5	0.0003983	-	-
失拟项 Lack of Fit	0.000925	3	0.0003083	0.58	0.6835
净误差 Pure Error	0.001067	2	0.0005333	-	-
总离差 Cor Total	0.23	14	-	-	-

注: $P < 0.05$ 为显著性差异; $P < 0.01$ 为极显著性差异。

Note: $P < 0.05$ significant difference; $P < 0.01$ extremely significant difference.

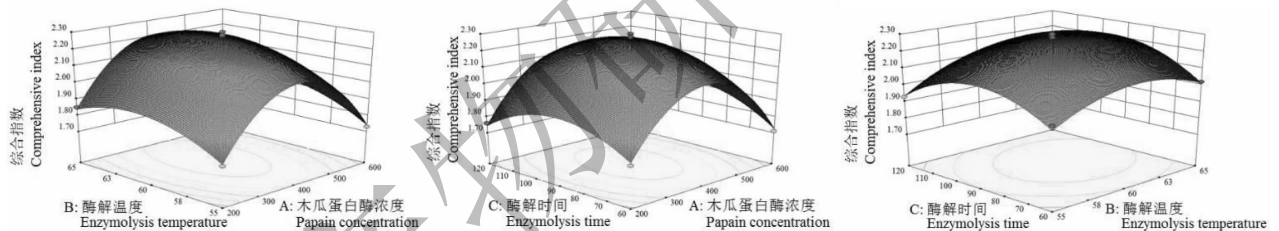


图5 木瓜蛋白酶浓度、酶解温度和时间对综合指数的交互作用响应面图

Fig. 5 Response surface plots of papain concentration, enzymolysis temperature and time on comprehensive index

实验或响应面法继续考察脱蛋白次数对综合指数的影响。

3 结论

微生物胞外多糖研究是目前活性生物大分子研究的一个热点,微生物胞外多糖的生物活性,特别是一些胞外多糖的抗肿瘤活性已经得到证实。微生物胞外多糖来源于微生物液体深层发酵的发酵液,发酵液中除少量胞外多糖外还含有大量的蛋白质以及其他杂质,胞外多糖分离纯化难度大,特别是蛋白质的免疫原性直接干扰胞外多糖的动物模型实验。因此,胞外多糖的脱蛋白工艺是其开发利用过程的关键环节,如何在保证较高蛋白质脱除率的前提下尽力减少胞外多糖的损失,一直是课题组关心的重要问题。

本文运用响应面分析法探讨黑根霉胞外多糖的酶-Sevag 法脱蛋白工艺,获得了最优条件组合:木瓜蛋白酶浓度 425 U/mL、酶解温度 62 °C、酶解时间 90 min。在此条件下,蛋白质脱除率均值 54.08%,综合指数均值 2.07,且实验重复性好。该实验条件的获得有利于高效制备黑根霉胞外多糖,为其抗肿瘤活性与机制研究和以其为主要原料的生物药物或功能食品开发提供原材料保障。

参考文献

- 1 Chen GC, Zhang PY, Huang TT, et al. Polysaccharides from *Rhizopus nigricans* mycelia induced apoptosis and G2/M arrest in BGC-823 cells. *Carbohydr Polym*, 2013, 97: 800-808.

(下转第 1784 页)