

引用本文: 宋可心, 于涵冰, 吴疆, 张彤彤, 叶阳丽, 刘雨涵, 孟爱霞, 陈永. 红毛五加多糖蛋白酶-反胶束法脱色脱蛋白方法的建立与优化 [J]. 离子交换与吸附, 2026, 42(3): 232-240.

Citation: SONG Ke-xin, YU Han-bing, WU Jiang, ZHANG Tong-tong, YE Yang-li, LIU Yu-han, MENG Ai-xia, CHEN Yong. Establishment and Optimization of Proteinase-Reverse Micelle Method for Decolorization and Deproteinization of *Acanthopanax giraldii* Harms Polysaccharide [J]. Ion Exchange and Adsorption, 2026, 42(3): 232-240.

文章编号: 1001-5493(2026)03-0232-09

DOI: 10.16026/j.cnki.iea.2026030232

红毛五加多糖蛋白酶-反胶束法脱色脱蛋白方法的建立与优化*

宋可心¹, 于涵冰¹, 吴疆², 张彤彤¹, 叶阳丽¹, 刘雨涵³, 孟爱霞², 陈永^{2**}

(¹山东第二医科大学生命科学与技术学院, 潍坊 261053; ²山东第二医科大学, 山东省高等学校免疫微环境与炎症性疾病研究特色实验室, 潍坊 261053; ³山东第二医科大学临床医学院, 潍坊 261053)

摘要: 文章探讨了蛋白酶法与反胶束法联合应用于红毛五加粗多糖的脱色和脱蛋白工艺。通过单因素实验, 确定了CTAB浓度、pH值以及多糖溶液与反胶束体积比为主要影响因素。基于这些因素, 采用响应面法进行了工艺条件的优化, 评价指标包括脱蛋白率、脱色率、多糖回收率以及三者的加权综合评分。优化后的工艺条件如下: 首先, 将粗多糖溶液的pH值调至6.5, 随后按照 1.2×10^4 U/mL的浓度加入木瓜蛋白酶, 并在40 °C下酶解1.5 h。酶解完成后, 再次调整多糖溶液的pH值至4.0, 并加入NaCl至0.4 mol/L。然后, 按照4:1的体积比加入反胶束溶液(正己醇、异辛烷、H₂O体积比为5:65:30, 含CTAB 0.12 mol/L), 振荡5 min后离心收集水相。在优化后的工艺条件下, 脱蛋白率高达84.71%, 多糖脱色率达到88.90%, 多糖回收率为80.15%。这一工艺为红毛五加粗多糖的脱色和脱蛋白提供了一种高效且实用的方法。

关键词: 红毛五加, 粗多糖, 蛋白酶法, 反胶束法, 脱色, 脱蛋白

中图分类号: TS201 **文献标志码:** A

1 前言

红毛五加多糖是传统中药红毛五加(*Eleutherococcus giraldii* Harms)的重要活性成分。与许多中草药来源的多糖相似, 采用传统水提醇沉法制备时, 通常会有色素和蛋白等杂质混入, 这对后续多糖结构解析、药理研究以及作用机制的阐明造成障碍。现有的脱色素和脱蛋白方法, 如活性炭法、H₂O₂法、三氯乙酸(Trichloroacetic Acid, TCA)法和Sevage法, 存在耗时、耗力^[1-3]等不足, 或可能引起多糖和生物活性改变^[4]。因此, 急需建立一种高效去除粗多糖中色素和蛋白质杂质的方法。

反胶束是表面活性剂分散在连续的有机相中, 使其浓度超过临界胶束浓度(Critical Micelle

Concentration, CMC)而自发形成的一种纳米尺度的聚集体, 利用其胶束作用, 可将色素杂质从多糖溶液中吸附去除^[5]。反胶束也可用于提取蛋白质、氨基酸和核酸等生物活性物质^[6]。蛋白酶可催化蛋白质分子中肽链断裂, 生成短肽或游离氨基酸^[7-8]。利用酶与底物特异性结合的原理, 酶与蛋白质结合并将其水解, 达到除蛋白的目的^[9]。然而, 关于采用蛋白酶法与反胶束法联用对粗多糖提取物脱蛋白、脱色的研究尚不多见。

本文尝试将蛋白酶与反胶束法联用, 对红毛五加粗多糖进行脱蛋白和脱色, 并采用权重分配法对蛋白酶-反胶束的脱蛋白率、脱色率和多糖回收率进行综合评分。

* 收稿日期: 2025-05-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(项目号81303198); 山东第二医科大学大学生创新创业训练计划(项目号X2023502)。

作者简介: 宋可心(2003—), 生物制药, 本科生。

**通信作者: 陈永, E-mail: chenyc@sdsu.edu.cn。

2 实验部分

2.1 仪器和试剂

仪器: RE-52 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; TH-梯度混合器, 上海精科实业有限公司; V-5000H 可见分光光度计, 上海元析仪器有限公司; HH-60 数显恒温搅拌循环水箱, 常州国华电器有限公司; P901 酸度计, 上海佑科仪器仪表有限公司; HC-3018 高速离心机, 安徽中科中佳科学仪器有限公司; HC-3618R 高速冷冻离心机, 安徽中科中佳科学仪器有限公司。

试剂: 红毛五加茎皮, 购于北京同仁堂集团有限公司; 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB), 购于索瑞生物科技有限公司; 中性蛋白酶, 购于合肥博美生物科技有限责任公司; 碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶, 购于北京索莱宝科技有限公司; 丙酮、无水乙醇, 购于烟台远东精细化工有限公司; 正丙醇、硫酸, 购于国药集团化学试剂有限公司; 正己醇, 购于天津博迪化工股份有限公司; 异辛烷, 购于天津市富宇精细化工有限公司; 盐酸 (HCl)、葡萄糖, 购于莱阳经济技术开发区精细化工厂; 氯化钠 (NaCl), 购于天津市华东试剂厂; 过氧化氢 (H_2O_2), 购于天津市大茂化学试剂厂; 苯酚, 购于深圳市福林仪器科技有限公司。以上试剂均为分析纯。

2.2 实验方法

2.2.1 粗多糖的制备

将干燥的红毛五加茎皮粉末在 $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下用蒸馏水提取 80 min, 超声功率为 85 W。收集提取液, 加入 4 倍体积的乙醇, 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下沉淀过夜; 8000 r/min 离心 20 min 收集沉淀, 依次用无水乙醇、丙酮、乙醚脱水, 减压干燥, 得到干燥的棕色红毛五加粗多糖粉末^[10]。使用前, 将红毛五加粗多糖用蒸馏水配成 10 mg/mL 溶液。

2.2.2 蛋白酶-反胶束法脱色脱蛋白

用 0.5 mol/L HCl 溶液将粗多糖溶液 pH 调至蛋白酶最适 pH, 加入 $1.2\times 10^4\text{ U/mL}$ 的蛋白酶, 并在其最佳温度下水解 2.0 h, 沸水浴 10 min 后终止反应。再用 0.5 mol/L HCl 溶液将酶解后的粗多糖溶液 pH 调至 4.0, 加入 NaCl 至 0.1 mol/L 。将反胶束溶液 (正己醇、异辛烷、 H_2O 的体积比为 5:65:30, 含 0.1 mol/L CTAB) 与粗多糖溶液以体积比 1:7 混合, 剧烈振荡 5 min 后静置

10 min, 5000 r/min 离心 10 min, 收集水相。

2.2.3 单因素实验

单因素实验分别考察了蛋白酶类型 (木瓜蛋白酶、中性蛋白酶和碱性蛋白酶)、酶量 (0.8×10^4 、 1.2×10^4 、 1.6×10^4 、 2.0×10^4 、 $2.4\times 10^4\text{ U/mL}$)、酶解时间 (0.5、1.5、2.5、3.5 h)、CTAB 浓度 (0.01、0.05、0.10、0.20、0.25 mol/L)、NaCl 浓度 (0.05、0.10、0.20、0.40、0.60 mol/L)、多糖溶液-反胶束体积比 (3:1、4:1、5:1、6:1、7:1) 和 pH 值 (2、3、4、5、6、7、8、9)。

2.2.4 响应面法

基于上述单因素实验结果, 选取 CTAB 浓度 (X_1)、pH 值 (X_2)、多糖溶液-反胶束体积比 (X_3) 为考察因素, 以 Y 值为响应值, 进一步进行响应面优化实验。响应面实验的因素与水平见表 1。

表 1 Box-Behnken 设计中 3 个变量的编码和实际水平。
Table 1 Coded and actual levels of three variables in Box-Behnken design.

因素	编号	水平		
		-1	0	1
CTAB 浓度 (mol/L)	X_1	0.05	0.1	0.15
pH	X_2	3	4	5
多糖溶液-反胶束 体积比 (V:V)	X_3	4:1	5:1	6:1

2.2.5 统计分析

每项实验设置 3 个重复。数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm\text{SD}$) 表示, 采用单因素方差分析, 并通过 Duncan 多重极差检验进行组间比较。 $p<0.05$ 时, 认为差异具有统计学意义。所有统计分析均采用 SPSS statistics 21.0、Expert design 8.0 和 SAS 9.3 进行。

2.3 数据分析

2.3.1 脱蛋白率的测定

采用 Bradford 方法, 以牛血清白蛋白 (BSA) 为标准品, 测定蛋白质浓度^[11]。数据以 $\bar{x}\pm\text{SD}$ 表示 ($n=3$)。按式 (1) 计算脱蛋白率 R_A :

$$R_A = \frac{C_0V_0 - C_eV_e}{C_0V_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中: C_0 和 V_0 分别为蛋白酶-反胶束处理前溶液的蛋白浓度 (mg/mL) 和体积 (mL); C_e 和 V_e 分别为蛋白酶-反胶束处理后溶液的蛋白浓度 (mg/mL) 和体积 (mL)。

2.3.2 多糖脱色率的测定

将粗多糖溶液于 300~900 nm 波长范围内进

行全波长扫描,在最大吸收波长 480 nm 处测定吸光度^[12]。数据以 $\bar{x} \pm SD$ 表示 ($n=3$)。按式 (2) 计算多糖脱色率 R_B :

$$R_B = \frac{A_0 - A_c}{A_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中: A_0 和 A_c 分别为蛋白酶-反胶束处理前后溶液的吸光度值。

2.3.3 多糖回收率的测定

使用葡萄糖作为标准品,通过苯酚硫酸法测量多糖的浓度^[13]。数据以 $\bar{x} \pm SD$ 表示 ($n=3$)。按式 (3) 计算多糖回收率 R_C :

$$R_C = \frac{C_c V_c}{C_0 V_0} \times 100\% \quad (3)$$

式中: C_0 、 C_c 与 V_0 、 V_c 分别是蛋白酶-反胶束处理前后溶液的多糖浓度 (mg/mL) 与体积 (mL)。

2.3.4 权重分配法综合评分

引入 Y 值来评估蛋白酶-反胶束的纯化效果^[14]。数据以 $\bar{x} \pm SD$ 表示 ($n=3$)。 Y 值按式 (4) 计算:

$$Y = \frac{A_n - A_{\min}}{A_{\max} - A_{\min}} \times 35\% + \frac{B_n - B_{\min}}{B_{\max} - B_{\min}} \times 35\% + \frac{C_n - C_{\min}}{C_{\max} - C_{\min}} \times 30\% \quad (4)$$

式中: A_n 、 $A_{\max}$ 、 $A_{\min}$ 分别为脱蛋白率的实际值、最大值、最小值; B_n 、 $B_{\max}$ 、 $B_{\min}$ 分别为脱色率的实际值、最大值、最小值; C_n 、 $C_{\max}$ 、 $C_{\min}$ 分别为多糖回收率的实际值、最大值、最小值。

3 结果与讨论

3.1 单因素实验

3.1.1 蛋白酶类型对 Y 值的影响

将相同酶活单位 (1.2×10^4 U/mL) 的 3 种蛋白酶 (木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶) 加入红毛玉加粗多糖溶液中,分别在其最佳条件下反应 2.0 h。如图 1 所示,木瓜蛋白酶的 Y 值最高,为 63.94%,碱性蛋白酶为 45.49%,中性蛋白酶为 57.93%。因此,木瓜蛋白酶被选择用于进一步研究。

3.1.2 蛋白酶量对 Y 值的影响

研究某一单一变量时,其他变量固定如下:酶解时间为 1.5 h, CTAB 浓度为 0.10 mol/L, NaCl 浓度为 0.40 mol/L, 多糖溶液-反胶束体积比为 5:1, pH 值为 4.0。如图 2(a) 所示,当酶量在 $0.8 \times 10^4 \sim 2.4 \times 10^4$ U/mL 范围内时, Y 值随酶量的增加而增大,在 1.2×10^4 U/mL 处达到峰值;

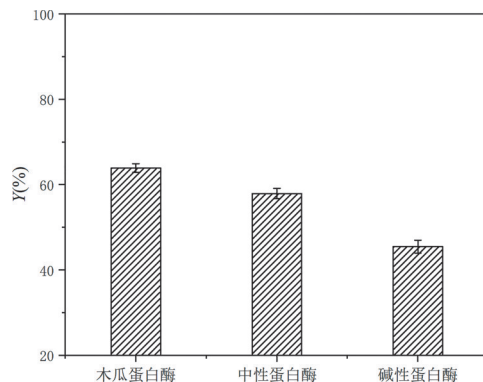


图1 蛋白酶类型对 Y 值的影响。

Figure 1 Effect of proteinase types on Y value.

此后继续增大酶量, Y 值则缓慢降低。这可能是因为木瓜蛋白酶在水解蛋白质的同时,将蛋白质水解物重新合成为类蛋白质^[15],从而影响蛋白质去除率。因此, 1.2×10^4 U/mL 被认为是最佳酶量 ($p < 0.05$)。

3.1.3 酶解时间对 Y 值的影响

如图 2(b) 所示,其他条件固定时, Y 值在酶解时间 0.5~1.5 h 范围内逐渐升高;当酶解时间超过 1.5 h 后, Y 值降低。这可能与过量蛋白酶引起的空间位阻导致酶活性降低有关^[16]。因此,酶解时间 1.5 h 为 Y 值的最优条件 ($p < 0.05$)。

3.1.4 CTAB 浓度对 Y 值的影响

如图 2(c) 所示,其他条件固定时,在 0.01~0.10 mol/L 范围内, Y 值随 CTAB 浓度的增加而增大。CTAB 浓度超过 0.10 mol/L 之后, Y 值缓慢降低。这可能是因为表面活性剂浓度越高,则反胶束体系的黏度越高,乳化程度越高,多糖回收率随之降低^[17]。此外,还会形成相对复杂的聚集体,降低杂质去除率^[18]。因此,CTAB 的最佳浓度为 0.10 mol/L。

3.1.5 NaCl 浓度对 Y 值的影响

如图 2(d) 所示,其他条件相同时,在 0.05~0.40 mol/L 范围内, Y 值随 NaCl 浓度的增加而增大。当 NaCl 浓度超过 0.40 mol/L 时, Y 值下降。这是因为当多糖溶液中加入过量的盐时,会削弱蛋白质、色素与反胶束之间的静电吸引力^[19],从而降低脱蛋白和脱色效果。因此,选择 0.40 mol/L 的 NaCl 浓度进行后续实验 ($p < 0.05$)。

3.1.6 pH 值对 Y 值的影响

如图 2(e) 所示,其他条件相同时, Y 值随着 pH 值的增加而增加,并在 pH 值为 4.0 时达到峰值 ($p < 0.05$)。然而,当 pH 值超过 4.0 时, Y 值降

低。水相pH值对蛋白质和色素去除效果的影响主要体现在其改变两者表面电荷和解离状态的能力上, 调节pH可以使蛋白质和色素分子与反胶束体系之间的静电排斥作用发生改变, 从而影响杂质的去除率^[20]。因此, 选择pH=4.0用于进一步研究。

3.1.7 多糖溶液-反胶束体积比对Y值的影响

如图2(f)所示, 其他条件相同时, 当多糖溶液与反胶束体积比在3:1~5:1范围内时, Y值不断增大 ($p<0.05$)。然而, 随着体积比的继续增加, Y值变化不再明显。从经济的角度来看, 5:1 (V:V) 为最佳体积比。

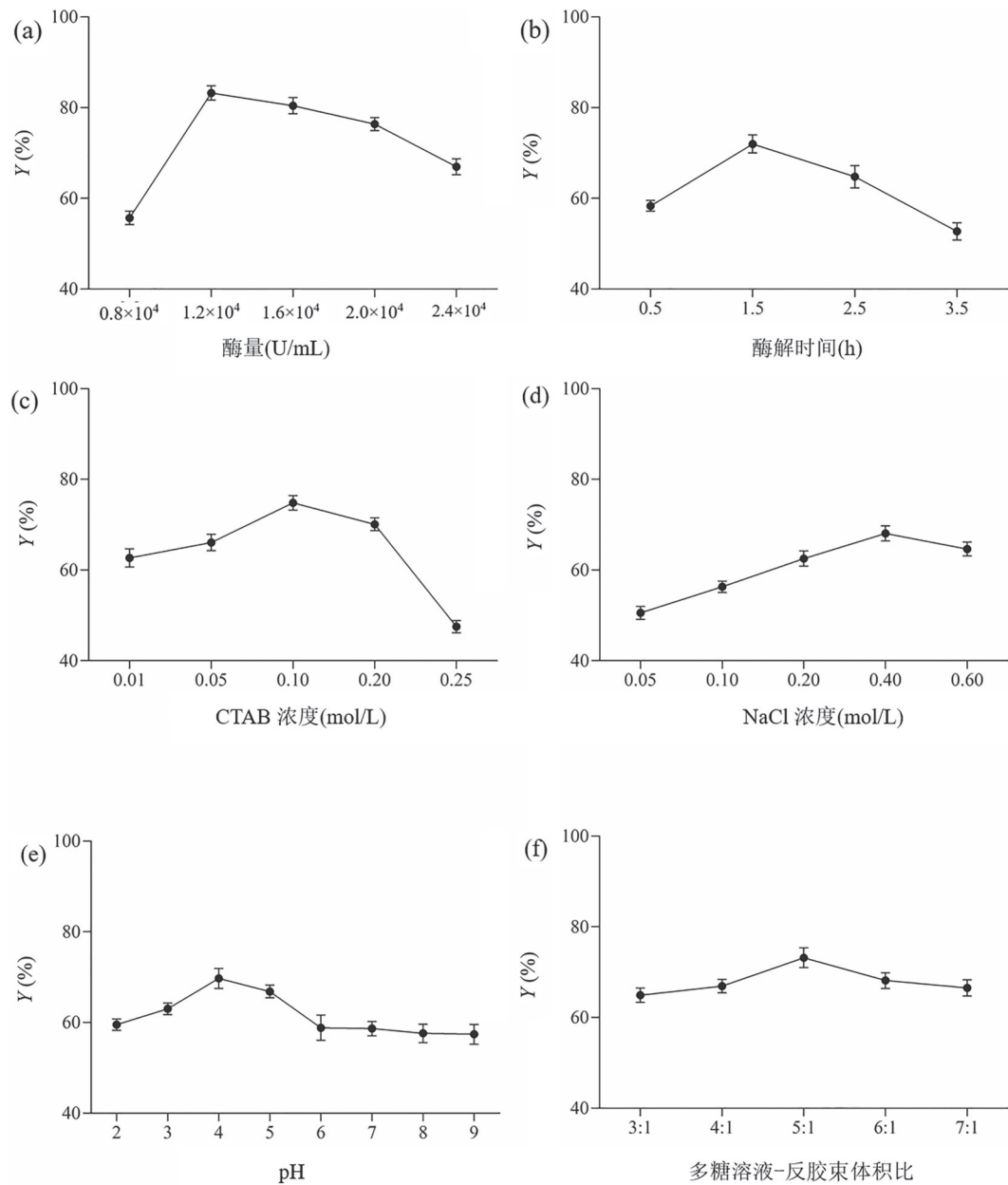


图2 不同因素对蛋白酶-反胶束法Y值的影响: (a) 酶量; (b) 酶解时间; (c) CTAB 浓度; (d) NaCl 浓度; (e) pH 值; (f) 多糖溶液-反胶束体积比。

Figure 2 Effect of different factors on Y value of proteinase-reverse micelle method: (a) Enzyme quantity; (b) Enzymatic hydrolysis time; (c) CTAB concentration; (d) NaCl concentration; (e) pH value; (f) Volume ratio of polysaccharide solution to reverse micelles.

3.2 响应面和SAS分析

基于单因素实验结果, 发现CTAB 浓度、多

糖溶液-反胶束体积比、pH 值3个因素对因变量Y 值影响最大, 因此采用Design-Expert 8.0 软件

对这3个因素进行响应面分析。在3个水平上使用Box-Behnken设计进行研究,以Y值为响应值。实验方案和结果见表2。

表2 Y值的Box-Behnken实验设计和结果。

Table 2 Box-Behnken experimental design and results for the Y value.

试验号	编码变量			Y (%)
	X_1	X_2	X_3	
1	-1	0	1	83.37
2	1	0	-1	78.89
3	0	-1	1	86.74
4	0	1	1	84.19
5	0	0	0	79.81
6	-1	1	0	77.09
7	0	0	0	79.78
8	0	0	0	79.90
9	1	1	0	74.95
10	1	-1	0	68.21
11	-1	-1	0	89.80
12	0	1	-1	75.95
13	0	0	0	82.87
14	0	0	0	77.30
15	0	-1	-1	71.76
16	1	0	1	75.97
17	-1	0	-1	77.71

通过SAS 9.3软件对表2数据进行分析,得到如下二次响应面回归模型: $Y=88.91+4.16X_1-0.45X_2-0.53X_3+1.42X_1X_2+0.045X_1X_3+0.13X_2X_3-3.22X_1^2-1.02X_2^2+0.89X_3^2$ 。

如表3所示,在 $\alpha=0.05$ 的条件下,回归模型有意义,模型拟合度显著。回归模型的决定系数(R^2)为0.9642,表明Y值总变异的96.4%可以用模型来解释,模型可用于估计Y值。线性项和二次项表明单因素及其自身平方效应对Y值有显著影响,而交叉项表明两因素之间的相互作用对Y值的影响不显著。

如表4所示,各因素对Y值的影响程度依次为:CTAB浓度>多糖溶液-反胶束体积比>pH值。

从表5可以看出,这3个因子的特征值分别为正、负,表明第二个响应面是不存在极值的鞍形曲面。因此,最优的工艺参数不能直接从第二个响应面获得,需要做进一步的岭脊分析。

表3 二次响应面回归模型的方差分析。

Table 3 ANOVA of the regression model of quadratic response surface.

回归	自由度	平方和	R^2	F值	$P_{r>F}$
线性项	3	142.33	0.68	44.19	0.0001
二次项	3	51.52	0.25	16.03	0.0016
交叉项	3	8.20	0.04	2.55	0.1392
总回归	9	202.05	0.96	20.91	0.0003
残差	自由度	平方和	均方	F值	$P_{r>F}$
缺少拟合	3	7.39	2.46	76.63	0.0006
纯误差	4	0.13	0.03		
总误差	7	7.52	1.07		

表4 因素的方差分析。

Table 4 ANOVA of factors.

因素	自由度	平方和	均方	F值	$P_{r>F}$
X_1	4	190.35	47.59	44.32	0.0001
X_2	4	14.16	3.54	3.30	0.0807
X_3	4	5.68	1.42	1.32	0.3495

表5 典型分析。

Table 5 Canonical analysis.

特征值	X_1	X_2	X_3
0.89	0.01	0.04	0.99
-0.80	0.28	0.96	-0.04
-3.43	0.96	-0.28	-0.01

表6为岭脊分析结果,在编码半径为1时获得最大响应值。当CTAB浓度为0.12 mol/L、pH值为4.02、多糖溶液-反胶束体积比为4.12:1时,估计响应值为89.46。

考虑到实验的可操作性,最佳的脱色和脱

表6 岭脊分析。

Table 6 Ridge analysis.

编码半径	响应值	标准错误	X_1	X_2	X_3
0.0	86.56	0.56	0.10	4.00	5.00
0.1	87.04	0.56	0.10	3.99	4.98
0.2	87.43	0.56	0.11	3.99	4.96
0.3	87.75	0.56	0.11	3.99	4.92
0.4	88.01	0.55	0.12	4.01	4.84
0.5	88.24	0.55	0.12	4.01	4.72
0.6	88.46	0.55	0.12	4.02	4.59
0.7	88.69	0.57	0.12	4.03	4.47
0.8	88.93	0.60	0.12	4.03	4.35
0.9	89.18	0.64	0.12	4.03	4.23
1.0	89.46	0.71	0.12	4.02	4.12

蛋白工艺确定如下: CTAB 浓度 0.12 mol/L, pH 4.0, 多糖溶液-反胶束体积比为 4:1。

3.3 模型验证

为了验证模型的准确性, 在优化工艺条件 ($n=3$) 下进行了验证实验。从表 7 可以看出, 该工艺下脱蛋白率、脱色率、多糖回收率和 Y 值相对稳定, 分别为 $84.71\% \pm 0.68\%$ 、 $88.90\% \pm 2.06\%$ 、 $80.15\% \pm 1.21\%$ 和 $81.89\% \pm 2.62\%$, 重现性较好。此外, 红毛五加多糖溶液在纯化前后的照片 (图 3(b)) 直观显示了蛋白酶-反胶束的优良脱色效果。

3.4 红毛五加多糖红外光谱分析

为了验证蛋白酶-反胶束法是否影响红毛五加多糖的官能团, 对蛋白酶-反胶束法和 *Sevage* 法纯化后的红毛五加多糖^[21]进行 FT-IR 光谱分

表7 验证实验结果。

Table 7 Verify experimental results.

批次	脱蛋白率 (%)	脱色率 (%)	多糖回收率 (%)	Y (%)
1	85.11	88.61	80.46	82.38
2	84.96	90.85	80.93	84.02
3	84.05	87.23	79.06	79.25
平均值	84.71 ± 0.68	88.90 ± 2.06	80.15 ± 1.21	81.89 ± 2.62

析。如图 3(a) 所示, 传统 *Sevage* 法和蛋白酶-反胶束法纯化红毛五加多糖的 FT-IR 谱无显著差异。FT-IR 光谱中, 3415 cm^{-1} 附近的羟基 (—OH) 特征峰、 1619 cm^{-1} 处碳氧双键 (C=O) 的不对称吸收峰和 1141 cm^{-1} 处糖苷结构 C—O—C 的强特征峰均保持不变, 证明蛋白酶-反胶束法未破坏多糖的主要官能团结构。

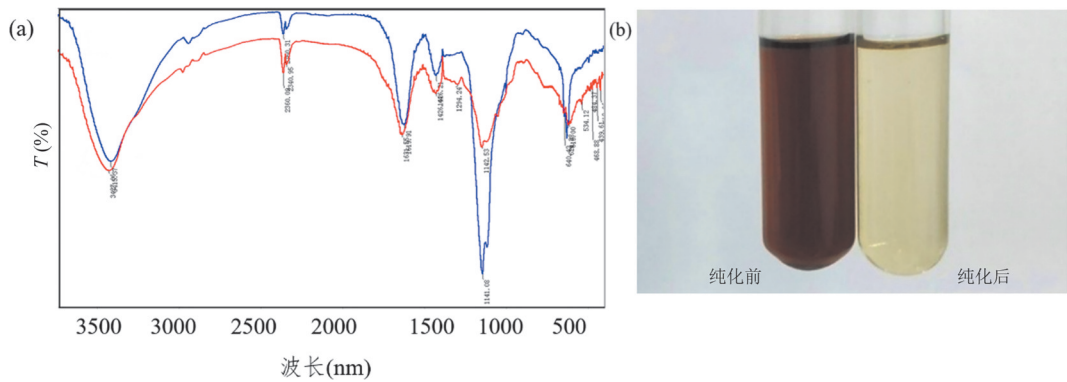


图3 *Sevage*法和蛋白酶-反胶束法脱色前后红毛五加多糖FT-IR光谱 (a) 和脱色前后对比 (b)。
Figure 3 FT-IR Spectra of AHP purification by *Sevage* and proteinase-reversed micelle (a), and photograph of AHP purification before and after by proteinase-reversed micelle (b).
注: 图a中红线为 *Sevage*法, 蓝线为蛋白酶-反胶束法。

3.5 不同方法的脱色和脱蛋白比较

为了验证蛋白酶-反胶束法的优越性, 将其与传统脱色和脱蛋白方法进行比较。如图 4(a) 所示, 蛋白酶-反胶束法的脱色率 (88.90%) 和多糖回收率 (80.15%) 均高于 H_2O_2 法和活性炭法。如图 4(b) 所示, 与传统脱蛋白方法相比, 蛋白酶-反胶束法的脱蛋白率 (84.71%) 和多糖回收率高于 *Sevage* 试剂和 TCA 试剂。

4 结 论

本研究成功地为植物多糖纯化中蛋白和色素杂质的去除建立了一种新的方法。通过将蛋白酶与反胶束萃取技术相结合, 实现了对红毛五加粗多糖的高效脱色和脱蛋白, 得到了最佳

工艺条件: 木瓜蛋白酶 $1.2 \times 10^4\text{ U/mL}$, $40\text{ }^\circ\text{C}$ 酶解 1.5 h, 然后调节溶液 pH 值为 4.0, 并加入 NaCl 至 0.4 mol/L, 再按 4:1 的体积比加入反胶束溶液 (正己醇、异辛烷、 H_2O 的体积比为 5:65:30, 含 CTAB 0.12 mol/L) 振荡 5 min, 离心收集水相。在该条件下, 脱蛋白率为 84.71%, 多糖脱色率 88.90%, 多糖回收率为 80.15%。

这一性能显著优于先前报道的类似方法, 如宋道等^[26]采用的反胶束法脱色率为 80.25%, 李倩倩等^[27]采用木瓜蛋白酶法的蛋白去除率为 77.07%。这表明本研究所提方法不仅杂质去除率高, 而且能够同时实现脱色和脱蛋白的双重目的, 在红毛五加粗多糖纯化中具有重要的应用前景。

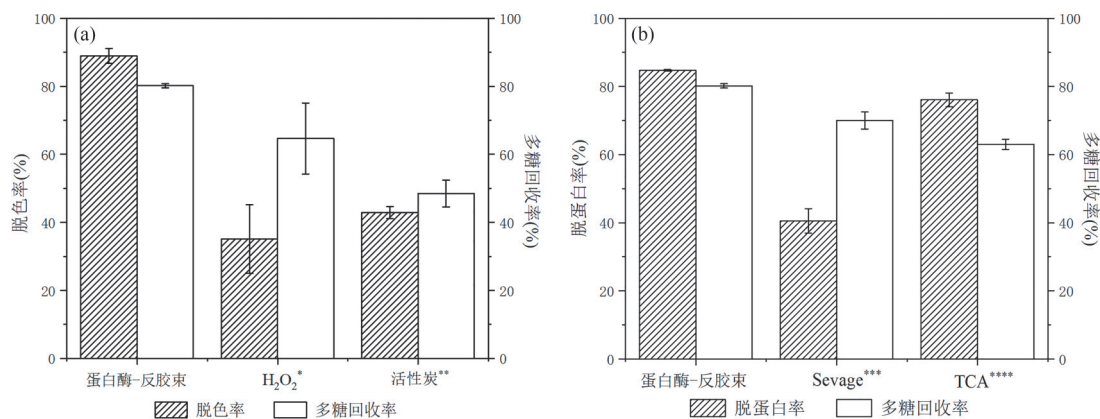


图4 蛋白酶-反胶束法与不同方法的脱色率(a)和脱蛋白率(b)比较。

Figure 4 Comparison of proteinase-reverse micelle method, other decoloration method and deproteinization method for decoloration (a) and deproteinization (b).

注: *H₂O₂法:用氨水调节粗多糖溶液pH值,加入30% H₂O₂至终浓度为1%,40℃水浴15 min^[22]。 **活性炭法:向粗多糖溶液中加入1.0%活化后的活性炭,超声15 min^[23]。 ***Sevage法:粗多糖溶液与Sevage试剂按体积比5:1混合,剧烈振荡后离心获得水相^[24]。 ****TCA法:向粗多糖溶液加入10% TCA溶液调节pH至3.0并过夜,离心去除沉淀^[25]。数据以 $\bar{x} \pm SD$ 表示($n=3$)。

本研究通过单因素实验和响应面法,优化了蛋白酶-反胶束法的脱色与脱蛋白工艺。实验结果表明,CTAB浓度、多糖溶液-反胶束体积比以及pH值是影响该工艺性能的主要因素。其中,CTAB浓度对多糖脱色效果的影响尤为显著。高浓度的CTAB会增大反胶束体系的乳化程度,这可能降低多糖保留率,也可能改变反胶束团的形状^[28],形成复杂的聚集体,进而降低杂质的去除率。因此在实际应用中,需要综合考虑各种因素,确定合适的CTAB浓度,以获得最佳的纯化效果。

与传统的离子交换法、H₂O₂法、吸附树脂法、活性炭吸附法等多糖脱色方法^[29],以及

TCA法、酶解法、Sevage法、HCl法、NaCl法、重金属离子沉淀法、三氟三氯乙烷法等脱蛋白方法^[30]相比,蛋白酶-反胶束法展现出更高的效率、更低的溶剂消耗、更短的处理时间和更环保的反应条件。此外,该方法在处理过程中不会对多糖的结构造成破坏,有利于保持多糖的生物活性和功能性。这些优势使得蛋白酶-反胶束法在多糖纯化领域具有广泛的应用前景。

未来,将进一步研究该方法在其他植物多糖纯化中的应用,通过技术创新和参数优化,提高该方法在多糖纯化领域的效率并拓展其应用范围。此外,还将探讨如何降低该方法的成本,以实现其在工业领域的推广应用。

参考文献

- 1 王乐, 靳学远, 霍智文. 桑枝多糖酶法脱蛋白工艺优化及理化特性研究 [J]. 中国食品添加剂, 2022, 33(7): 136-143.
- 2 曾杰, 房海灵, 梁呈元, 等. 无花果粗多糖脱色工艺优化及其吸附性能研究 [J]. 中成药, 2022, 44(2): 537-542.
- 3 Zhong W T, Yang C M, Zhang Y Z, et al. Effects of different deproteinization methods on the antioxidant activity of polysaccharides from *Flos Sophorae Immaturus* obtained by ultrasonic microwave synergistic extraction [J]. *Agronomy*, 2022, 12(11): 2740-2740.
- 4 郭慧静, 张伟达, 陈国刚. 蒲公英多糖脱色脱蛋白方法及其降血糖活性研究 [J]. 食品研究与开发, 2020, 41(3): 24-28.
- 5 李自霖, 陈贵元. 中药多糖提取物脱色工艺研究进展 [J]. 安徽农学通报, 2023, 29(13): 37-40.
- 6 孙雪, 赵晓燕, 朱运平, 等. 反胶束对植物蛋白的结构、功能性和应用的影响研究进展 [J]. 中国粮油学报, 2020, 35(1): 196-202.
- 7 Xu B, Anderson M B, Mountford J S, et al. Cathepsin X deficiency alters the processing and localisation of cathepsin L and impairs cleavage of a nuclear cathepsin L substrate [J]. *Biological Chemistry*, 2024, 405(5): 1-12.

- 351-365.
- 8 Du K, Tian S Q, Chen H, et al. Application of enzymes in the preparation of wheat germ polypeptides and their biological activities [J]. *Frontiers in Nutrition*, **2022**, 9: 943950.
 - 9 何美佳, 刘晓, 唐翠翠, 等. 多糖脱蛋白方法的研究进展 [J]. *中国海洋药物*, **2019**, 38(3): 82-86.
 - 10 Chen Y, Zhang J, Li Q Q, et al. Response surface methodology for optimizing the ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from *Acanthopanax giraldii* [J]. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **2018**, 66(8): 785-793.
 - 11 Azin R, Georg L, Markus D, et al. Determination of soluble wheat protein fractions using the Bradford assay [J]. *Cereal Chemistry*, **2021**, 98(5): 1059-1065.
 - 12 王松柏, 秦雪梅, 郭小青, 等. 树脂对防风粗多糖脱色效果 [J]. *应用化学*, **2005**(12): 1308-1311.
 - 13 刘爱萍, 任珍芸, 刘倩, 等. 6B 型肺炎球菌荚膜多糖-破伤风类毒素结合物中游离多糖测定方法的建立 [J]. *中国新药杂志*, **2017**, 26(24): 2937-2942.
 - 14 Zhong H X, Wang L H, Zhao J Y, et al. Fermentative production of chiral acetoin by wild-type *Bacillus* strains [J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, **2020**, 50(2): 116-122.
 - 15 张桂娟. 响应面法优化酶法去除龙芽楸木多糖中蛋白工艺的研究 [J]. *食品工业*, **2014**, 35(9): 130-133.
 - 16 Zhang D H, Yuwen L X, LI C, et al. Effect of poly (vinyl acetate-acrylamide) microspheres properties and steric hindrance on the immobilization of *Candida rugosa* lipase [J]. *Bioresource Technology*, **2012**, 124: 233-236.
 - 17 文静熊, 陈翔, 汤俊, 等. 川紫菀多糖脱色工艺研究 [J]. *中国药师*, **2022**, 25(3): 395-400.
 - 18 Wang L M, Liu K L, Chen F S, et al. Size changes of reverse micelles after extraction of peanut protein and their forward extraction rates [J]. *Grain & Oil Science and Technology*, **2018**, 1(1): 32-39.
 - 19 符家良, 李春莲, 张红杨, 等. 响应面法优化紫花芸豆凝集素的反胶束萃取工艺 [J]. *食品工业*, **2021**, 42(11): 152-156.
 - 20 Chuong S C, Norfahana A, Hamidah S M, et al. Reverse micelle extraction of antibiotics using an eco-friendly sophorolipids biosurfactant [J]. *Scientific Reports*, **2018**, 8(1): 477.
 - 21 张勇, 周丽明, 黄章平. 比清除率衡量 Seville 法脱茶籽多糖蛋白的效果 [J]. *南方农业学报*, **2016**, 47(1): 107-111.
 - 22 秦亚东, 汪荣斌, 周娟娟. 白芍多糖脱色工艺研究 [J]. *中成药*, **2015**, 37(12): 2783-2787.
 - 23 杨申明, 熊正军, 王振吉, 等. 响应面法优化地参多糖脱色工艺及其抗氧化活性研究 [J]. *粮食与油脂*, **2022**, 35(1): 111-115.
 - 24 Feng Q X, Yan H J, Feng Y, et al. Characterization of the structure, anti-inflammatory activity and molecular docking of a neutral polysaccharide separated from American ginseng berries [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **2024**, 174: 116521.
 - 25 Samrot V A, Kudaiyappan T, Bisjarah U, et al. Extraction, purification, and characterization of polysaccharides of *Araucaria heterophylla* L. and *Prosopis chilensis* L. and utilization of polysaccharides in nanocarrier synthesis [J]. *International Journal of Nanomedicine*, **2020**, 15: 7097-7115.
 - 26 宋道, 赵鹏, 段玺, 等. 穿山龙多糖脱色方法的研究 [J]. *时珍国医国药*, **2016**, 27(9): 2122-2126.
 - 27 李倩倩, 陈贵元. 响应面法优化木瓜蛋白酶对刺梨果多糖脱蛋白工艺 [J]. *生命科学仪器*, **2021**, 19(6): 79-86.
 - 28 张永松, 丁真真, 陈辛杰, 等. 反胶束提取扁桃仁蛋白工艺优化及理化特性比较 [J]. *现代食品科技*, **2024**, 40(8): 252-262.
 - 29 张米帅, 邹雨佳, 刘如明. 戴氏虫草水提多糖和碱提多糖的活性炭脱色工艺优化 [J]. *食品工业科技*, **2022**, 43(24): 216-224.
 - 30 朱燕舞, 余李涛, 陈静. 白术多糖提取分离、结构表征及生物活性研究进展 [J]. *中华中医药学刊*, **2024**, 42(10): 70-79.

Establishment and Optimization of Proteinase-Reverse Micelle Method for Decolorization and Deproteinization of *Acanthopanax giraldii* Harms Polysaccharide

SONG Ke-xin¹, YU Han-bing¹, WU Jiang², ZHANG Tong-tong¹, YE Yang-li¹,

LIU Yu-han³, MENG Ai-xia², CHEN Yong^{2*}

(¹School of Life Science and Technology, Shandong Second Medical University, Weifang 261053, China; ²Key Laboratory of Immune Microenvironment and Inflammatory Disease Research in Universities of Shandong Province, Shandong Second Medical University, Weifang 261053, China; ³School of Basic Medical Sciences, Shandong Second Medical University, Weifang 261053, China)

Abstract This study aimed to establish a proteinase-reversed micelle method for simultaneous deproteinization and decolorization of crude *Acanthopanax giraldii* Harms polysaccharides (cAHP). According to the results of single-factor test, CTAB concentration, pH value and polysaccharide solution-reverse micelle volume efficiency were determined as the optimized conditions, and response surface methodology was then used to evaluate the interaction of several experimental parameters. The weight assignment method was applied to balance the deproteinization efficiency, decolorization efficiency and polysaccharide recovery efficiency of proteinase-reversed micelle. The process of decolorization and deproteinization of crude *Acanthopanax giraldii* Harms polysaccharides with proteinase-reverse micelle was obtained. The crude polysaccharide solution was adjusted to pH 6.5, and papain of concentration of 1.2×10^4 U/mL was added. After enzymatic hydrolysis at 40 °C for 1.5 h, the solution was adjusted to pH 4.0 and NaCl was added to concentration of 0.4 mol/L. And then, the reverse micelle solution (*n*-hexanol:isooctane: H₂O = 5:65:30, $V : V$, containing CTAB of concentration of 0.12 mol/L) was added in a ratio of 4 : 1 ($V : V$). After shock for 5 min, the water phase was collected by centrifugation. Under the optimal conditions, the decolorization efficiency was 84.71%, the decolorization efficiency was 88.90% and the polysaccharide recovery efficiency 80.15%. This process provides an efficient and practical method for the decolorization and deproteinization of *Acanthopanax giraldii* Harms polysaccharides.

Keywords *Acanthopanax giraldii* Harms, Crude polysaccharide, Proteinase, Reversed micelle, Decolorization and deproteinization

* Corresponding author: CHEN Yong, E-mail: Cheny@sdsu.edu.cn.