

低共熔溶剂法优化葛根蛋白的提取工艺及其美白功效评价

黄宇玫* 余芳 郭建业 董焕阔 吴丽芝 熊艳情 袁泉 吴红静

南昌大学科学技术学院 江西 九江 332020

摘要:目的:本研究以葛根为原料,找到采用低共熔溶剂提取葛根蛋白的最佳提取工艺并考察其美白功效。方法:建立考马斯亮蓝测定蛋白含量的方法,考察四种低共熔溶剂确定最佳溶剂的摩尔比浓度,通过单因素试验对温度、时间、料液比三个因素条件进行筛选,再利用正交法根据蛋白得率筛选出最佳提取条件;建立斑马鱼胚胎模型,给与葛根蛋白溶液治疗48h,通过定量分析黑色素光密度对葛根蛋白的美白作用进行评价。结果:葛根蛋白最佳提取工艺条件为低共熔溶剂(氯化胆碱-乳酸)组分摩尔比为1:20、提取温度60℃、提取时间为60min、料液比1:30(g/ml),在此条件下经过三次平行实验得到葛根蛋白得率为1.666%,明显高于传统的提取方法。与空白对照组比较,葛根蛋白浓度为60μg/mL时可显著抑制斑马鱼黑色素生成。结论:本提取工艺既可以促进绿色溶剂对中药提取的发展,又可以降本增效、降低环境污染,并能为葛根的综合利用提供新的思路。

关键词:葛根蛋白;低共熔溶剂法;正交实验;斑马鱼

1 实验材料与仪器

1.1 试剂

葛根,江西葛有秘密食养有限公司;牛血清白蛋白,索莱宝公司;考马斯亮蓝,上海蓝季科技发展有限公司;氯化胆碱,山东科源生化有限公司;乳酸、丙三醇、乙二酸,西陇科学股份有限公司。

1.2 仪器

SZX10 体式显微镜,日本奥林巴斯公司;紫外可见分光光度计,屹谱仪器制造(上海)有限公司;高速多功能粉碎机,永康市红太阳机电有限公司;台式高速离心机,湖南可成仪器设备有限公司;电热鼓风干燥箱,天津市泰斯特仪器有限公司。

2 方法

2.1 考马斯亮蓝标准曲线的绘制

将各离心管中溶液混匀,室温静置3min,设置波长595nm,以第7管调零,记录各浓度吸光度,以标准蛋白质浓度(μg/mL)为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线。

2.2 低共熔溶剂(DES)的制备

将一定摩尔比的氯化胆碱和HBD置于烧杯中,80℃水浴至形成澄清透明状液体(搅拌时间会随低共熔溶剂组成成分的摩尔比改变),倒入磨口瓶中保存。DES名称及对应的HBD见表1。

表1 不同低共熔溶剂组成成分

DES 编号	HBD 名称	DES 编号	HBD 名称
DES-1	乳酸	DES-3	丙三醇
DES-2	乙二醇	DES-4	1, 2-丙二醇

2.3 低共熔溶剂的优选

称取0.5g葛根粉,加入离心管中,按1:30(g/mL)的液料比加入不同摩尔比的低共熔溶剂DES-1、DES-2、DES-3和DES-4,60℃水浴搅拌60min后8000r/min离心15min,取适量上清液用0.9%NaCl加至1.0mL,加考马斯亮蓝染液4.0mL,混匀,室温静置3min后于波长595nm测定吸光度,根据标准曲线计算葛根蛋白含量。比较不同DES对葛根蛋白得率的影响。

葛根蛋白得率计算公式如下:

$$Z = \frac{m}{M} \times 100\%$$

式中,Z:葛根蛋白得率,m:葛根蛋白质量,M:称取的葛根质量。

2.4 单因素实验的设计

统一在DES-1组分摩尔比为1:20、料液比1:30(g/mL)、60℃下提取时间60min的基本条件下通过改变单因素(温度、时间、料液比)进行单因素试验,依次研究各个因素对葛根蛋白得率的影响。

2.5 提取葛根蛋白的正交实验设计

以单因素实验的结果为基础,利用正交法通过设计三因素三水平的对低共熔溶剂法提取葛根蛋白的工艺展开优化。(因素和水平见表2)

表2 提取葛根蛋白正交实验因素水平表

水平	因素		
	温度℃	时间 min	料液比 g/mL
1	40	30	1:20
2	50	60	1:30
3	60	90	1:40

2.6 葛根蛋白对斑马鱼美白活性的测定

收集 24hpf 健康斑马鱼胚胎，设空白组与样品组，随机分配每组 3 复孔（10 尾 / 孔）于 24 孔板。吸弃孔内缓冲水，空白组加 2mL 胚胎培养液，样品组葛根蛋白浓度为 60 μg/mL，并加胚胎培养液补足 2mL。28.5℃ ± 0.5℃ 孵育 48h 后，每孔随机选取至少 5 尾斑马鱼，4% 甲基纤维素固定，体式显微镜下观察拍照。用 Image J64 软件分析黑色素积累部位光密度值（OD），OD 值越小表明美白活性越好。

$$\text{黑色素抑制率} = \frac{\text{OD}_{\text{空白对照组}} - \text{OD}_{\text{样品处理组}}}{\text{OD}_{\text{空白对照组}}} \times 100\%$$

2.7 数据处理

以上数据结果全部使用 SPSS 软件进行统计学分析，数据采用独立样本 t 检验，P < 0.05 表示具有显著性差异。

3 结果与分析

3.1 最佳溶剂体系的筛选

由图 1 可知：不同 DES 均可以提取葛根蛋白，其中 DES-1 的提取效果最佳。因此，DES-1（氯化胆碱—乳酸）摩尔比为 1:20 作为后续研究的溶剂体系。

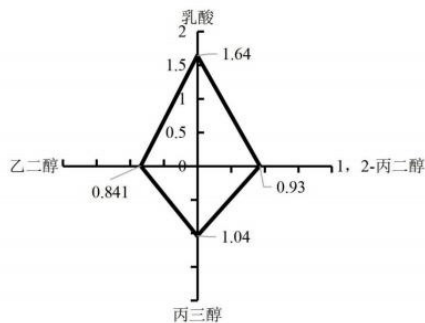


图 1 不同 DES 的摩尔比最高得率对比

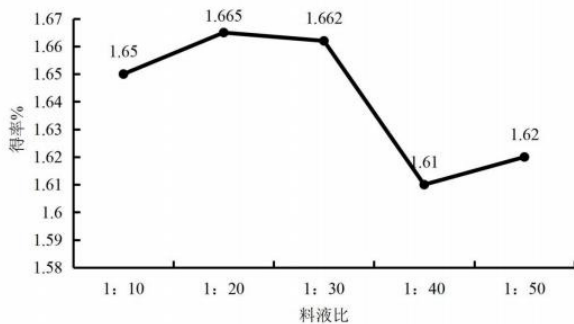


图 2 不同液料比对葛根蛋白得率的影响

如图 2 可知：料液比增加使葛根蛋白成分的提取量先增后减，当料液比 1:20(g/mL) 时，得率达峰值。综上所述，正交优化实验选择 1:20、1:30、1:40g/mL 作为料液比水平。

3.2 提取温度对葛根蛋白得率的影响

温度显著影响提取率，过低可能会导致葛根蛋白溶

解不足，过高可能会破坏有效成分。因此，优化温度对于低共熔溶剂提取极为重要。

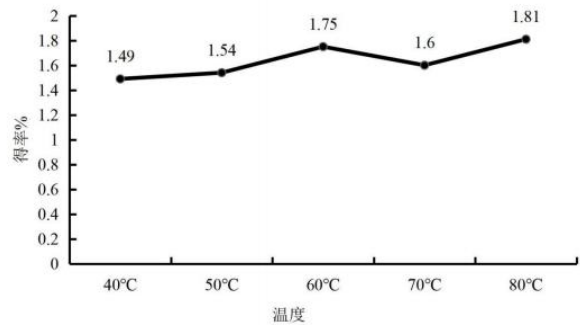


图 3 不同提取温度对葛根蛋白得率的影响

由图 3 可知：温度为 80℃ 时得率最高，但葛根蛋白因变性损耗较大，且温度对葛根蛋白功能特性影响较大。因此，正交优化实验选择 40、50、60℃ 作为温度水平。

3.3 提取时间对葛根蛋白得率的影响

提取时间是葛根蛋白提取的关键因素，时间过短会导致提取不充分，时间延长会导致蛋白质、多糖等的溶出，本实验研究了提取时间对蛋白提取效率的影响。

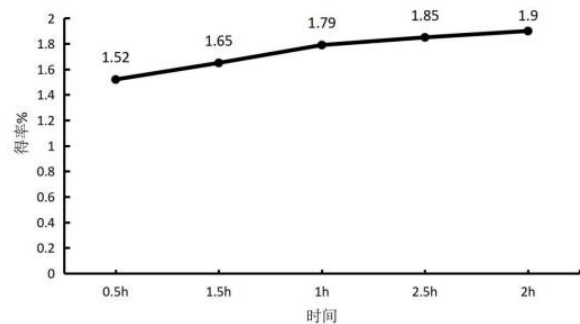


图 4 不同提取时间对葛根蛋白得率的影响

由图 4 可知：葛根蛋白得率随着时间的增加而增加，但会受提取效率影响。因此，正交优化实验选择 30、60、90min 作为时间水平。

3.4 正交试验

通过表 3 和表 4 可知，最佳水平为：温度为 60℃、时间为 90min、料液比为 1:30g/mL，时间的 3 号水平（90min）和 2 号水平（60min）的 K 值和 Kavg 值相差不多，故选择时间的 2 号水平进行验证实验。

根据表 4 极差 R 可知，低共熔溶剂提取葛根蛋白影响能力大小为温度 > 时间 > 料液比。

3.5 验证实验

利用 SPSS 软件进行正交实验分析，优化葛根蛋白 DES 提取条件为 DES 摩尔比 1:20、温度 60℃、时间 90min、料液比 1:30 (g/mL) 时得率相对最高。考虑可操作性，将工艺调整为温度 60℃、时间 60min、料液比 1:30 (g/mL)、DES 摩尔比 1:20，经 3 次平行实验得到葛根

表3 正交设表

编号	温度	时间	料液比	得率 (%)
1	1	1	1	1.36
2	1	2	3	1.45
3	1	3	2	1.52
4	2	1	3	1.52
5	2	2	2	1.53
6	2	3	1	1.58
7	3	1	2	1.57
8	3	2	1	1.66
9	3	3	3	1.54



图5 空白组斑马鱼黑色素分布图

蛋白得率为 1.666%，与预测值接近，此工艺条件可靠。

3.6 葛根蛋白在斑马鱼模型的美白活性评价

如 5、图 6 所示，空白组拥有较高的黑色素含量，而使用 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 葛根蛋白处理的样品组黑色素含量明显减少，黑色素抑制率高达 37.3%。

表4 极差分析表格

项	水平	温度	时间	料液比
K 值	1	4.33	4.45	4.6
	2	4.63	4.64	4.62
	3	4.77	4.64	4.51
K avg 值	1	1.44	1.48	1.53
	2	1.54	1.55	1.54
	3	1.59	1.55	1.5
最佳水平		3	3	2
R		0.15	0.06	0.04
水平数量		3	3	3
每水平重复数 r		3	3	3

图6 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 样品组斑马鱼黑色素分布图

4 讨论

本研究将绿色溶剂 DES-1 溶剂（氯化胆碱-乳酸）成功应用于葛根中蛋白质的提取，为葛根的进一步利用以及新型溶剂提取蛋白质提供了思路；同时促进了绿色溶剂在中草药有用成分提取中的应用和发展。

参考文献：

[1] 唐婷范, 杨杰, 黄芳丽, 等. 不同产地葛根蛋白质提取工艺及其功能性研究 [J]. 食品研究与开发, 2020,

41(09):32-37.

[2] 陈梦星, 王涛, 赵金, 等. 天然低共熔溶剂高效提取金耳多糖的研究 [J]. 中国食品添加剂, 2024, 35(09):52-57.

基金项目：九江市社会科学基金项目（25YB125）；南昌大学科学技术学院院级课题（2024-KJ-02）；2025年江西省党建研究会课题《健全大学生创新人才发现、选拔、培养机制研究——以生物工程专业学生为例》

作者简介：黄宇玫（1983-），女，汉族，教授，主要从事天然药物提取及药效研究。