

棘托竹荪菌盖蛋白提取及分析

曹 萌^{1,2}, 林陈强², 林戎斌², 陈济琛², 邱宏端^{1*}, 林新坚^{2*}

¹福州大学生物科学与工程学院, 福州 350008; ²福建省农业科学院土壤肥料研究所, 福州 350001

摘要:首次以棘托竹荪菌盖为原料,通过单因素试验和正交试验,研究菌盖蛋白最佳提取工艺;用 SDS-PAGE 测定所提取蛋白的分子量分布。结果表明:提取时间和 pH 是影响竹荪菌盖蛋白提取的主要因数,最佳提取条件为 pH8.0,提取时间 2.5 h,提取温度 55 °C,提取率达 64.07%,提取的竹荪菌盖主要蛋白分子量为 16 kDa 和 38 kDa。棘托竹荪菌盖作为蛋白提取原料是可行的,以其为原料开发蛋白相关产品具有巨大的潜力和广阔的市场前景。

关键词:竹荪菌盖;蛋白;提取

中图分类号:Q946.1;R285

文献标识码:A

Study on Extraction and Analysis of Protein from *Dictyophora echinovolvata* Pileus

CAO Meng^{1,2}, LIN Chen-qiang², LIN Rong-bin², CHEN Ji-chen², QIU Hong-duan^{1*}, LIN Xin-jian^{2*}

¹College of Biological Science and Technology, Fu Zhou University, Fuzhou Fujian 350008, China;

²The Soil and Fertilizer Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou Fujian 350001, China

Abstract: Using *Dictyophora echinovolvata* pileus as the raw material, the optimal extraction process of protein was studied by single factor and orthogonal experiments. The molecular weight distribution of extracted protein was analyzed by SDS-PAGE. The results indicated that the pH and extraction time were the most important factors to the extraction process. The highest extraction yield of 64.07% was obtained at pH 8.5, 55 °C with 2.5 h of extraction. The major molecular weights of extracted protein were 16 kDa and 38 kDa. In conclusion, *D. echinovolvata* pileus is a suitable raw material for extracting proteins with great economic potential and market prospect.

Key words: *Dictyophora echinovolvata* pileus; protein; extraction

竹荪是一种营养丰富的食用菌,研究发现它具有抗氧化、抗菌及抗肿瘤等多种功效^[1]。竹荪中蛋白含量高,氨基酸种类齐全。华阳林等对国内不同地区的竹荪子实体进行测定,发现蛋白占竹荪子实体干重均值的 17% 左右^[2]。屠六邦等通过实验测定竹荪子实体中含有 21 种氨基酸,是食用菌中氨基酸种类最多的一种^[3]。竹荪子实体分为菌盖、菌群、菌柄、菌托四部分^[3]。菌盖鲜重占整个子实体 20% 左右,菌盖上附着有竹荪孢子。研究表明菌盖所含蛋白含量超过竹荪子实体,Jonathan SG 等测定发现竹荪菌盖干品中粗蛋白含量为 25.56%^[4]。然而,目前竹荪菌盖在竹荪采摘过程中被直接丢弃,未加以利用,造成了资源浪费和环境污染。本文通过对竹荪菌盖蛋白提取工艺研究,为提高竹荪资源综

合利用,研发新的健康产品,减少环境污染和竹荪深加工及延伸其产业链提供技术依据。

1 材料与仪器

1.1 主要试剂

NaOH、(NH₄)₂SO₄、HCl,均分析纯,购于国药。蛋白 Marker(10 ~ 200kDa),由 Thermo Scientific 提供。三羟甲基氨基甲烷(Tris)、丙烯酰胺、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺、N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED)、过硫酸铵、SDS、甘氨酸均由上海生工提供。

1.2 主要仪器

320-S pH 计[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];Sigma 3-18K 离心机(德国 Sigma 公司);鼓风干燥箱(瑞士 Salvis LAB);小型垂直电泳系统,凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);KDN-103F 自动凯式定氮仪(上海纤检仪器有限公司)。

收稿日期:2013-12-03 接受日期:2014-02-25

基金项目:福建省公益类科研院所项目(2011R1024-4);福建省科技重点项目(2012Y1003);福建省财政专项项目(2011-975)

* 通讯作者 E-mail: xinjianlin@163.net; hongduanq@163.com

1.3 实验材料

棘托竹荪 (*Dictyophora echinovolvata*), 源自福建省顺昌县。

2 实验方法

2.1 实验材料预处理

新鲜竹荪采摘菌盖, 利用去离子水洗去菌盖上附着的孢子。洗去孢子的菌盖于通风处沥去水分后粉碎, 作为蛋白提取材料。后文中出现的菌盖均指洗去孢子粉碎的棘托竹荪菌盖。

2.2 菌盖含水率测定

菌盖水分测定参考国标^[5], 并略作改进。取菌盖 50.000 g, 放入干燥已称重的表面皿, 置烘箱 105 °C 烘至恒重。三次重复取平均值, 计算菌盖含水率。

2.3 菌盖蛋白提取单因素试验

2.3.1 料液比

250 mL 锥形瓶加入 100 mL 去离子水, 分别按料液比 (w/v) 1:5、1:8、1:10、1:15 加入竹荪菌盖。用 0.1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 至 8.0, 在 55 °C 提取 1 h, 6000 rpm 离心 10 min 取上清液, 测定蛋白含量, 计算蛋白提取率。

2.3.2 pH

250 mL 锥形瓶加入 100 mL 去离子水, 以料液比 1:5 加入竹荪菌盖, 用 0.1 mol/L NaOH 溶液分别调节 pH 至 7.0、8.0、9.0、10.0, 55 °C 提取 1 h。6000 rpm 离心 10 min 取上清液, 测定蛋白含量, 计算蛋白提取率。

2.3.3 提取时间

250 mL 锥形瓶加入 100 mL 去离子水, 以料液比 1:5 加入竹荪菌盖, 用 0.1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 至 9.0, 于 55 °C 分别提取 0.5、1、2、4 h。6000 rpm 离心 10 min 取上清液, 测定蛋白含量, 计算蛋白提取率。

2.3.4 温度

250 mL 锥形瓶加入 100 mL 去离子水, 以料液比 1:5 加入竹荪菌盖, 用 0.1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 至 9.0, 分别于 35、45、55、65 °C 提取 2 h。6000 rpm 离心 10 min 取上清液, 计算蛋白提取率。

2.4 菌盖蛋白提取条件优化

在单因素试验基础上, 考虑 pH 值、时间、温度三个因素, 采用 3 因素 3 水平 $L_9(3^4)$ 正交试验确定最佳提取工艺条件, 因素水平见表 1。

表 1 菌盖蛋白提取正交试验因素水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiments

水平 Level	因素 Factors		
	(A) pH 值 pH value	(B) 时间 Time (h)	(C) 温度 Temperature (°C)
1	8.0	1.5	45
2	8.5	2.0	50
3	9.0	2.5	55

2.5 蛋白测定及提取蛋白分子量分析

2.5.1 菌盖粗蛋白测定及提取液中蛋白含量测定

蛋白测定参照国标^[6], 略作改进。菌盖粗蛋白测定为: 1 g 烘干菌盖粉末, 加入定氮管中, 加入 20 mL 浓硫酸, 6 g 催化剂 ($K_2SO_4 : CuSO_4 \cdot 5H_2O : Se = 100 : 10 : 1$)。消化完全后消化液定容至 100 mL, 取 10 mL 定容后的消化液用自动凯式定氮仪测定蛋白含量。提取液中蛋白测定: 取 20 mL 提取液, 加入 20 mL 浓硫酸, 6 g 催化剂 ($K_2SO_4 : CuSO_4 \cdot 5H_2O : Se = 100 : 10 : 1$)。消化后消化液定容至 100 mL, 取 10 mL 定容后的消化液用自动凯式定氮仪测定蛋白含量。

蛋白提取率计算公式如下:

$$\omega_1 (\%) = \frac{(V_1 - V_2) \times C \times 0.014}{m_1 \times \frac{V_3}{V_4}} \times F \times 100$$

$$m_2 = \frac{(V'_1 - V_2) \times C \times 0.014}{m_1 \times \frac{V'_3}{V'_4} \times \frac{V_5}{V_6}} \times F$$

$$R (\%) = \frac{m_2}{m_3 \times \omega_1 \times (1 - \omega_2)} \times 100$$

ω_1 为竹荪菌盖干品中粗蛋白所占比率, g 粗蛋白/100 g 干菌盖; V_1 为滴定菌盖消化液消耗盐酸标准溶液体积, mL; V_2 为滴定空白时消耗盐酸标准溶液体积, mL; C 为盐酸标准溶液浓度, mol/L; 0.014 为氮的毫克当量数; F 为氮换算成粗蛋白的系数; m_1 为消化时加入的干菌盖质量, g; V_3 为蒸馏时所取菌盖消化液体积, mL; V_4 为菌盖消化液总体积, mL; m_2 为提取液中粗蛋白总质量, g; V'_1 为滴定蛋白提取液消化液消耗盐酸标准溶液体积, mL; V'_3 为蒸馏时所取蛋白提取液消化液体积, mL; V'_4 为蛋白提取液消化液总体积, mL; V_5 为消化时加入的蛋白提取液体积, mL; V_6 为蛋白提取液总体积, mL; R 为竹荪菌盖蛋白提取率; m_3 为蛋白提取时所加入的菌盖质量, g; ω_2 为菌盖含水率。

2.5.2 菌盖提取蛋白分子量分析

菌盖蛋白提取液用硫酸铵沉淀,6000 rpm,离心10 min 搜集沉淀,用 PBS 缓冲液将沉淀溶解后,透析。透析操作参照王家郑的方法^[7]。透析后采用真空冷冻干燥,获得蛋白粉。利用 SDS-PAGE 测定菌盖蛋白分子量,电泳参照辛普生的方法^[8]。

2.6 统计分析

所有提取及分析过程重复三次,利用 DPS v7.05 软件对实验数据进行处理,作图采用 Origin90SR2 软件。

3 结果与分析

3.1 菌盖蛋白提取单因素分析

3.1.1 料液比

由图 1A 可以看出,料液比较高时,蛋白质的提取率较低。随着料液比的降低,蛋白提取率增加。这与固液传质理论相符合,料液比越小固体物质与液体接触面积越大,有利于物质溶出。但是,料液比的减少造成加入溶剂量增加,对于溶液后续的浓缩和干燥不利。在 1:5 的料液比时,粗蛋白的提取率是 52.14%,当料液比减少至 1:15 时蛋白提取率为 56.22%。溶剂量增加两倍,粗蛋白提取率仅增加 4.08%。这使得在后期蛋白分离和干燥上耗费大量的人力物力,在经济上得不偿失。所以在后面的试验中料液比选择 1:5。

3.1.2 pH 值

由图 1B 可以看出,随着 pH 上升,蛋白质的提取率上升,当 pH 升至 9.0 时,蛋白质提取率最大达 58.02%,随后 pH 上升蛋白提取率反而下降,这可能是由于竹荪中大部分氨基酸为酸性氨基酸,在碱性条件下容易溶解。但是碱性较强时破坏了蛋白质的性质,使维持蛋白质空间结构的氢键等非共价键遭受破坏,疏水基团暴露,使蛋白质变性,影响蛋白溶出,从而使粗蛋白提取率下降。而且常规的强碱法提取蛋白,容易造成氨基酸特别是赖氨酸的损失,产生一些有毒副产物,增加美拉德反应,这对蛋白的提取率有影响^[9]。所以在后面单因素试验中 pH 确定为 9.0,正交试验因素水平选用 pH8.0~9.0。

3.1.3 提取时间

由图 1C 可以看出,在 2 h 内随着时间的延长,蛋白提取率明显上升,2 h 达最大,2 h 后蛋白提取率基本保持不变。当提取时间小于 2 h 时,随着提取时间的增加,竹荪细胞内部温度不断升高,水分汽

化产生的压力使细胞膜及细胞壁破碎,有利于溶剂进入细胞,使蛋白容易溶出。当提取时间超过 2 h 时,大部分蛋白已经溶出,提取率基本稳定。所以在后面单因素试验中提取时间确定为 2 h,正交试验因素水平选用 1.5~2.5 h。

3.1.4 温度

由图 1D 可以看出,35~45℃之间蛋白的提取率增加显著,从 45℃开始,随着温度的升高,蛋白的提取率增幅明显趋缓。大多数蛋白质的溶解度在 0~40℃范围内随着温度的上升而升高,竹荪菌盖蛋白在 35~45℃之间的溶解度变化也符合上诉理论。随着温度上升,由于高温使疏水基团暴露,从而使蛋白质发生变性^[10]。蛋白质变性往往失去溶解度,因此在 45℃之后蛋白提取率基本稳定。正交试验因素水平选用 45~55℃。

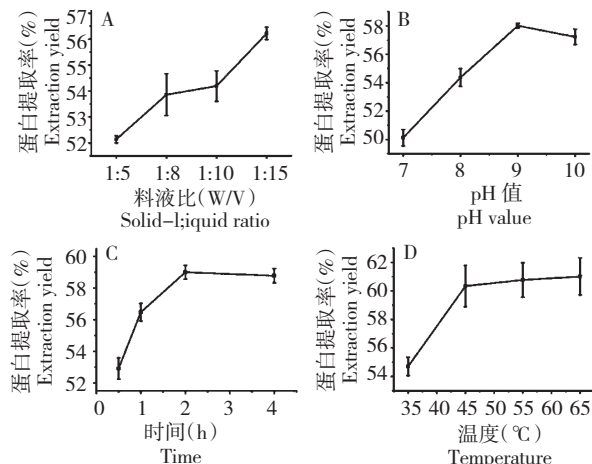


图 1 料液比(A)、pH(B)、时间(C)及温度(D)对竹荪菌盖蛋白提取率的影响

Fig. 1 Effect of solid-liquid ratio (A), pH (B), time (C) and temperature (D) on extraction yield of protein

3.2 菌盖蛋白提取正交试验分析

由单因素试验得出料液比虽然影响竹荪菌盖蛋白的提取率,但是从实验溶剂及实验费用的消耗等考虑,料液比宜控制在相对较大的范围。为此在正交试验中料液比固定为 1:5,未对料液比进行研究。

正交试验结果见表 2,由极差分析可得,3 个因数的极差大小顺序为 $R_B > R_A > R_C$,影响菌盖提取工艺的主要因数是提取时间,其次是 pH,温度对其影响最小。方差分析结果表明提取时间对菌盖蛋白提取影响极显著($P < 0.01$),pH 对菌盖蛋白提取影响显著($P < 0.05$),温度对菌盖蛋白提取影响不显著。最优提取条件为 $A_2B_3C_3$,即:pH8.5,提取时间

2.5 h, 提取温度 55 ℃。经实验验证, 该条件下提取率达到 64.07%。

表 2 竹荪菌盖蛋白提取正交试验结果

Table 2 The result of orthogonal test of extraction techniques

实验编号 No.	因素 Factors			提取率 Extraction yield(%)
	(A) pH 值 pH value	(B) 时间 Time (h)	(C) 温度 Temperature (℃)	
1	1	1	1	53.26
2	1	2	2	59.12
3	1	3	3	61.32
4	2	1	2	57.88
5	2	2	3	61.75
6	2	3	1	63.12
7	3	1	3	56.61
8	3	2	1	58.64
9	3	3	2	62.64
K1	173.70	167.75	175.02	
K2	182.75	178.51	179.64	
K3	177.89	187.08	179.68	
k1	57.90	55.92	58.34	
k2	60.92	59.84	59.88	T = 534.34
k3	59.30	62.36	59.89	
R	3.02	6.44	1.55	
F	49.31	228.05	17.25	
P	0.0199*	0.0044**	0.0548	

注: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

Note: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

3.3 菌盖蛋白分子量测定

样品蛋白浓度 10 mg/mL, 用 15% 的分离胶, 采用银染方案对凝胶进行染色。利用 Bio-Rad 凝胶成像仪分析竹荪菌盖蛋白的分子量, 结果见图 2。主

要蛋白分子量为 16 和 38 kDa, 分子量为 12、23、32、70、90 kDa 的蛋白含量相对较少。在 23 ~ 32 kDa、38 ~ 70 kDa 之间还有一些非常暗的条带, 由于条带不明显, 无法判断其分子量。

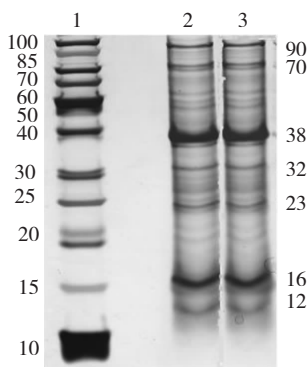


图 2 竹荪菌盖蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 The polypeptide profiles based on SDS-PAGE analysis

注: 1: Marker; 2, 3: 样品蛋白条带。

Note: 1: protein weight standard marker; 2, 3: protein of *D. echinvolvata* pileus.

4 结论

本实验通过单因数试验和正交试验对竹荪菌盖蛋白的提取工艺进行探索和优化, 确定了竹荪菌盖总蛋白最佳提取条件为: pH 8.5, 提取时间 2.5 h、温度 55 ℃, 菌盖蛋白提取率 64.07%。提取的蛋白经 SDS-PAGE 测定, 发现菌盖蛋白分子量分布为 12 ~ 90 kDa, 其中 16 kDa 和 38 kDa 的蛋白为主要蛋白, 其他分子量蛋白含量相对较少。

本文首次以棘托竹荪菌盖为原料研究了蛋白提取工艺, 证明了棘托竹荪菌盖用于提取蛋白的可行性。通过 SDS-PAGE 测定了菌盖蛋白分子量, 初步了解菌盖蛋白的组成, 为竹荪资源合理利用、竹荪新产品开发及提高农产品附加值提供了依据。棘托竹

荪菌盖蛋白的结构分析,生理生化性质正在进一步的研究之中。

参考文献

- 1 Oyetayo VO, Dong CH, Yao YJ. Antioxidant and antimicrobial properties of aqueous extract from *Dictyophora indusiata*. *Open Mycol J*, 2009, 3: 20-26.
- 2 Hua YL(华洋林), Gao Q(高擎), Tang J(唐健), et al. Study on comparison of nutritional components in fruiting bodies of *Dictyophora indusiata* from different regions. *SciTech Food Ind*(食品工业科技), 2011(10): 418-420.
- 3 Tu LB(屠六邦), Li CR(李昌荣). *Dictyophora indusiata*. *J Bamboo Res*(竹类研究), 1991, 11: 10-32.
- 4 Jonathan SG, Odebo AC. Studies on collection and proximate compositions of *Phallus indusiatus*, a Nigerian higher fungus. *World J AgricSci*, 2008, 4: 18-22.
- 5 Ministry Of Health P. R. China(中华人民共和国卫生部). National food safety standard; Determination of moisture in

- foods(食品安全国家标准食品中水分的测定). Beijing: China Standards Press, 2010.
- 6 Ministry Of Health P. R. China(中华人民共和国卫生部). National Food Safety Standard; Determination of Protein in Foods(食品安全国家标准食品中蛋白质的测定). Beijing: China Standards Press, 2010.
- 7 Wang JZ(王家政), Fan M(范明). Protein Technical Manuals(蛋白质技术手册). Beijing: Science Press, 2000. 72-76.
- 8 Simpson RJ. Proteins and Proteomics: A Laboratory Manual. Beijing: Science Press, 2003. 39-59.
- 9 Ravin G, Hettiarachchy NS. Protein concentrates from unstabilized and stabilized rice bran; preparation and properties. *J Food Sci*, 1995, 60: 1066-1074.
- 10 Hao RF(郝瑞芳), Liu YX(刘翼翔), Fang R(方茹), et al. Effect of temperature on the extract, content and anti-oxidation of sugar and protein of *Lentinus Edodes*(Shiitake). *Sci Tech Food Ind*(食品工业科技), 2009, 30: 125-129.

(上接第 631 页)

- 52 Dobrzyn A, et al. Polyunsaturated fatty acids do not activate AMP-activated protein kinase in mouse tissues. *Biochem Biophys Res Co*, 2005, 332: 892-896.
- 53 Yang YA, et al. Activation of fatty acid synthesis during neoplastic transformation; role of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Exp Cell Res*, 2002, 279: 80-90.
- 54 Pohl J, et al. FAT/CD36-mediated long-chain fatty acid uptake in adipocytes requires plasma membrane rafts. *Mol Biol Cell*, 2005, 16: 24-31.
- 55 Soslow RA, et al. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer*, 2000, 89: 2637-2645.
- 56 Liu L(刘兰), et al. The WHO/FAO new viewpoint; the recommendations intake of the total fat and fatty acid dietary. *China Health Standard Management*(中国卫生标准管理), 2010, 1: 67-71.
- 57 Aronson WJ, et al. Modulation of omega-3/omega-6 polyun-

- saturated ratios with dietary fish oils in men with prostate cancer. *Urology*, 2001, 58: 283-288.
- 58 Chung FL, et al. Formation of trans-4-hydroxy-2-nonenal and other enal-derived cyclic DNA adducts from ω -3 and ω -6 polyunsaturated fatty acids and their roles in DNA repair and human p53 gene mutation. *Mutat Res*, 2003, 531: 25-36.
- 59 Collett ED, et al. n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids differentially modulate oncogenic Ras activation in colonocytes. *Am J Physiol*, 2001, 280: C1066-1075.
- 60 Gago-Dominguez M, et al. Opposing effects of dietary n-3 and n-6 fatty acids on mammary carcinogenesis: The Singapore Chinese Health Study. *Brit J Cancer*, 2003, 89: 1686-1692.
- 61 Pmkris-Etherton, et al. Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States. *Am J Chn Nutr*, 2000, 71: 179-188.
- 62 Burdge GC, et al. Eicosapentaenoic and docosapentaenoic acids are the principal products of alpha-linolenic acid metabolism in young men. *Br J Nutr*, 2002, 88: 355-364.