

富硒猴头菌中含硒蛋白提取工艺研究

田敏爵¹ 李好²(¹陕西牛背梁国家级自然保护区,陕西西安 710100; ²安徽农业大学微生物防治省重点实验室)

摘要 以富硒猴头为原料,采用蒸馏水、Tris-HCl、PBS、NaOH 溶液、NaCl、乙醇对富硒猴头中硒蛋白的提取分离工艺进行了初步研究,结果表明,NaOH 溶液的蛋白提取量和硒提取率最优。进而以 NaOH 溶液作为浸提液,对富硒猴头中可溶性硒蛋白的提取工艺进行了系统的研究,通过单因素试验确定的富硒猴头中硒蛋白的提取工艺为:提取温度 60℃,料液比 1:20,碱液浓度 0.100 mol/L,提取时间 10 h,提取 3 次,等电点沉淀蛋白溶液 pH 值调节至 3~4。在单因素试验基础上,进行了 4 因素 3 水平的正交试验,得出了提取的最佳条件为:提取温度 70℃,料液比 1:20,NaOH 溶液浓度 0.07 mol/L,提取时间 8 h,在此条件下硒蛋白质的提取率为 67.47%。

关键词 富硒猴头;硒蛋白;提取工艺;研究

中图分类号 S646.9;TS201.2 **文献标识码** A **文章编号** 1007-5739(2010)19-0320-03

Study on Extracting Technology of Selenium-containing Protein in Se-enrichment *Hericium*TIAN Min-jue¹ LI Hao²(¹ Niubeiliang National Nature Reserve of Shaanxi, Xi'an Shaanxi 710100; ² Anhui Provincial Key Laboratory for Microbial Pest Control, Anhui Agricultural University)

Abstract The experiment was conducted on the method of Se-containing protein extraction process from Se-enriched *Hericium* in different solvent with distilled water, tris-HCl, PBS, NaOH solution, sodium chloride and ethanol. The results showed that soluble selenium-containing protein in *Hericium* extraction technology research base on the NaOH solvent showed a better extraction ratio compared with others. The key factor of extraction was confirmed by single-factor experiment; temperature 60℃, the ration of raw material to water 1:20, base solvent concentration 0.100 mol/L, extraction time was 10 hrs, extraction times was 3, pH value of solution to precipitate protein solution by isoelectric adjusted from 3 to 4. An orthogonal experiment with 4 factors and 3 levels revealed the best condition of extraction as follows: temperature 70℃, the ration of raw material to water 1:20, base solvent concentration 0.07 mol/L, extraction time 8 hrs, under above conditions the Se-containing protein extraction rate was 67.47%.

Key words Se-enrichment *Hericium*; selenium-containing protein; extracting technology; study

硒是人体中重要的微量元素,作为多种酶的活性中心参与人体代谢。具有提高机体免疫能力、抗肿瘤、清除体内自由基、降低某些重金属毒性的生理功能,另外还具有保护心肌和防治克山病、大骨节病、肝病及降低多种癌症发病危险等功能^[1]。在生物体中,硒主要以含硒氨基酸的形式存在^[2-3]。在富硒灵芝中,蛋白质结合的硒占有机硒的 64.6%~69.8%^[4-5],富硒蛹虫草中蛋白硒占总硒的 63.34%(王歆睿,2005 年)。

猴头菌(*Hericium erinaceus* (Bull.:Fr.)Pers.)属担子菌亚门,异隔担子菌纲,无隔担子菌亚纲,无褶菌目,猴头菌科,猴头菌属。含有多肽、多糖和酰胺等高分子化合物,对肿瘤^[6]、溃疡^[7]及神经^[8]疾患具有显著疗效。研究猴头菌硒蛋白的提取工艺,对进一步研究猴头中硒存在形式、硒蛋白的分布和结构以及开发新型高效补硒食品^[9-10]有着重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为富硒猴头菇子实体冻干样品,由安徽农业大学微生物防治重点实验室提供(硒含量(312.02±18.30) μg/g)。

1.2 试验方法

1.2.1 蛋白含量的测定。采用考马斯亮蓝 G-250 法,用标准牛血清蛋白(BSA)作标准品。于 595 nm 处检测吸光度值, $Y=245.4562X-1.9600$,相关系数 $R^2=0.9935$ 。

1.2.2 硒含量的测定^[11]。采用 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色法。在酸性条件下,硒与 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)反应,形成稳定的 Se-DAB 黄色络合物,在中性及碱性时,通过甲苯萃取,有机层中络合物最大吸收波长为 420 nm。在 100

mL 凯氏烧瓶中加入 10 mL 消化液,随后加入 5 mL 提取液,瓶口放置小漏斗,低温消化至样液呈无色透明为止。冷却后,加蒸馏水稀释至 40 mL,用 40%的 NaOH 溶液调节值 pH 至 2.2,加入 4 g 盐酸羟胺、10 mL 5% EDTA-2Na 溶液,摇匀;加入 2 mL 0.5% DAB 溶液,置于暗处反应 50 min,取出,用 10%和 5%的 NaOH 调节 pH 值至 7.0~7.3;准确加入 10 mL 甲苯,振荡 2 min,静置分层,吸取甲苯层置于分光光度计波长 420 nm 处测其吸光度。硒含量标准曲线为 $y=0.0067x+0.0001$,相关系数 $R^2=0.9909$ 。

2 结果与分析

2.1 不同提取液对蛋白量提取的影响

选择蒸馏水、Tris-HCl(0.05 mol/L, pH 值 8.0)、PBS (0.2 mol/L, pH 值 8.0)、NaOH 溶液(0.1 mol/L NaOH)、0.5 mol/L NaCl 溶液、75%乙醇等溶剂,在 60℃下浸提 8 h,提取料液比为 1:2,所得产物过滤除去沉渣,用考马斯亮蓝法测上清中的蛋白质含量。结果如图 1 所示。

以蛋白质总量为判断标准,在试验选择的 6 种溶剂中,NaOH 溶液和乙醇的提取效果最好。水、缓冲溶液、盐溶液提取效果较差(图 1)。推测猴头蛋白中偏酸性蛋白较多,使蛋白在亲核性离子较多的溶液中有较好的溶解效果。

2.2 不同溶剂对硒提取率的影响

将不同溶剂提取后所得的含硒蛋白溶液,用 1.2.2 所述方法测定其硒含量,根据溶液体积计算所提取物中的硒含量,结果如表 1 所示。由表 1 可知,在相同提取条件下,不同溶剂对富硒猴头中蛋白质提取率为:NaOH 溶液>乙醇溶液>Tris-HCl>PBS>NaCl>水。硒的提取率为:NaOH 溶液>乙醇溶液>PBS>Tris-HCl>NaCl>水。

收稿日期 2010-08-27

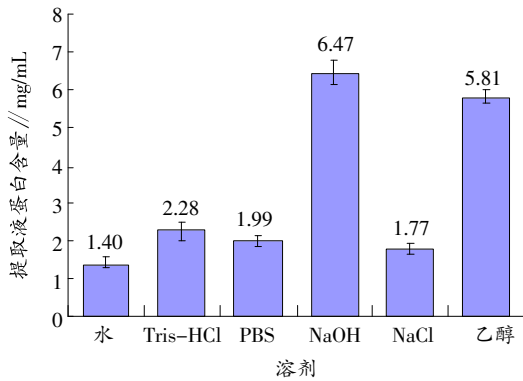


图 1 不同溶剂对富硒猴头头蛋白的提取效果
表 1 不同溶剂提取的蛋白硒量和硒提取率

溶剂	蛋白质 mg	蛋白硒量 μg	蛋白质提取率 %	硒提取率 %
水	280.00±1.35	1 253.90±3.65	10.94	40.19
Tris-HCl	456.00±2.28	1 361.00±2.26	17.81	43.62
PBS	398.00±1.06	1 362.20±3.49	15.55	43.66
NaOH	1 294.00±2.11	1 542.70±1.88	50.55	49.44
NaCl	354.00±0.54	1 355.70±2.92	13.83	43.45
乙醇	1 162.00±1.96	1 390.70±1.41	45.39	44.57

2.3 蛋白质等电点的测定

称取 10 g 猴头菌粉,用 0.1 mol/L NaOH 溶液,在 60 °C 下料液比 1:20(w/v)浸提 8 h,然后离心过滤除去沉渣,采用 1:10 的 HCl 调节提取液的 pH 值至 2.5、3.0、3.5、4.0、4.5 和 5.0,在 12 000 r/min 下离心 10 min 沉淀蛋白,然后取其上清液,用考马斯亮蓝法检测其中蛋白质含量。上清中残留量最小的点确认为蛋白质的等电点。由图 2 可知,pH 值在 3.5 左右时,吸光值最小,表明上清液中蛋白质残留浓度最低,推测猴头中大部分含硒蛋白的等电点在 3.5 左右。

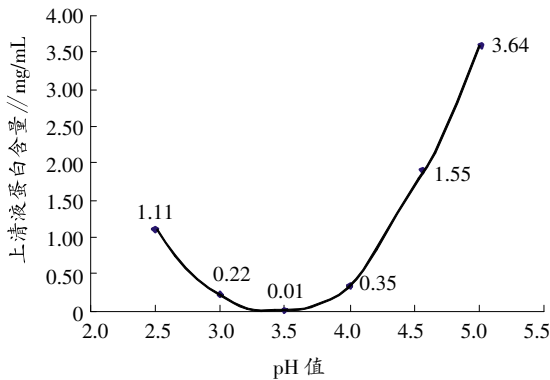


图 2 猴头硒蛋白等电点的测定

2.4 单因素试验

2.4.1 碱液浓度对蛋白量提取的影响。称取猴头样品 10 g,在 60 °C 温度下以料液比 1:20(w/v)提取 8 h。所用 NaOH 溶液浓度分别为 0.025、0.050、0.075、0.100、0.125、0.150 mol/L,所得产物过滤除去沉渣,上清液用考马斯亮蓝法检测蛋白质含量。由图 3 可知,随着 NaOH 溶液浓度的增加,提取液中蛋白质含量不断提高;但是当 NaOH 溶液浓度超过 0.100 mol/L,提取液中的蛋白质含量不再继续升高。因此,提取时 NaOH 溶液浓度在 0.100 mol/L 时最佳。

2.4.2 温度对蛋白量提取的影响。称取猴头样品 10 g,以料液比 1:20 加入 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液,分别选择 40、50、60、70 °C 提取,提取时间为 8 h,滤除去沉渣,上清液用考马

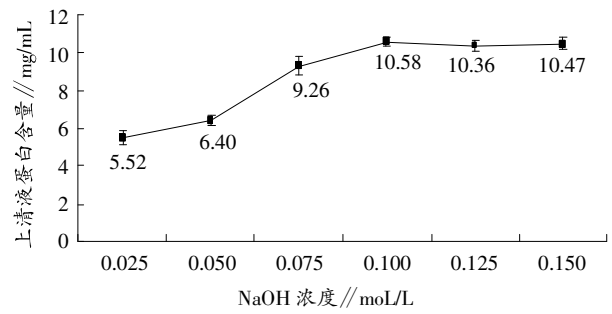


图 3 NaOH 溶液浓度对硒蛋白提取量的影响

斯亮蓝法检测蛋白质含量结果。由图 4 可知,温度越高,碱提效果越好。但温度超过 60 °C 以后,蛋白质的含量随温度变化的趋势减小,并且蛋白质的活性在高温下降低。确定实际提取温度以 60 °C 为宜。

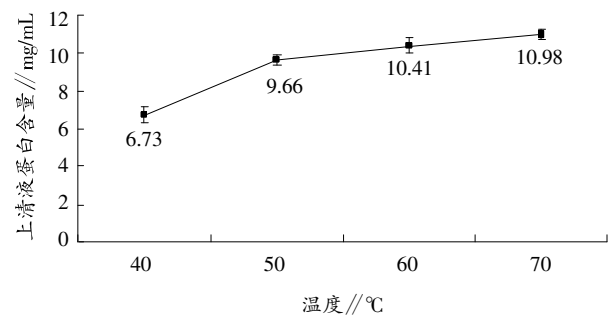


图 4 温度对硒蛋白提取量的影响

2.4.3 料液比对蛋白量提取的影响。称取猴头样品 10 g,以 0.1 mol/L 的 NaOH 为溶剂,在 60 °C 的温度下提取 8 h。各组料液比(w/v)分别为 1:10、1:20、1:30、1:40,所得产物过滤除去沉渣,上清液用考马斯亮蓝法检测蛋白质含量。由图 5 可知,开始时随料液比的增加,提取出的蛋白质含量不断提高,但在 1:20 以后,随料液比的增加蛋白质的含量提高不明显,并且料液比过大会给随后的浓缩步骤造成负担,故确定料液比为 1:20。

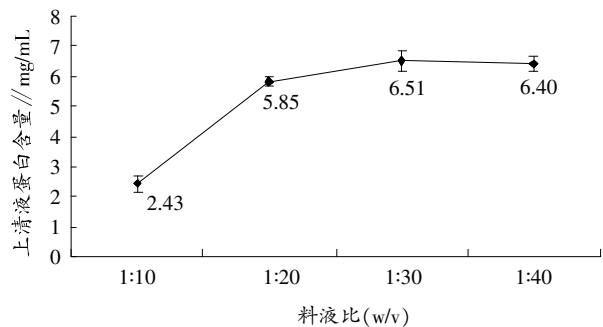


图 5 料液比对硒蛋白提取量的影响

2.4.4 提取时间对蛋白提取量的影响。称取猴头样品 10 g,在 NaOH 浓度为 0.1 mol/L、温度为 60 °C、料液比为 1:20 的条件下,分别选择 4、6、8、10、12、14 h 进行提取,所得产物过滤除去沉渣,上清液用考马斯亮蓝法检测蛋白质含量。由图 6 可知,随提取时间的增加,提取出的蛋白质含量逐渐增加。但 10 h 之后,提取量随时间的增加趋于平缓。因此,选择 10 h 为提取时间的提取工艺最为高效。

2.4.5 提取次数对蛋白提取量的影响。称取猴头样品 10 g,

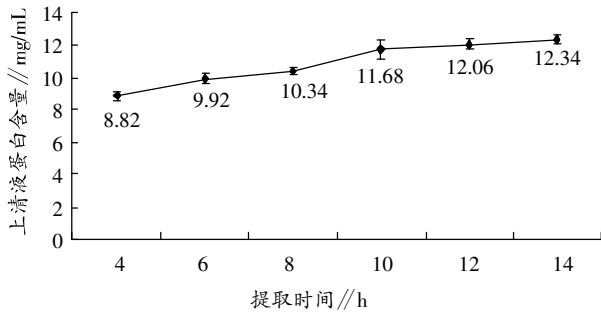


图6 提取时间对硒蛋白提取量的影响

在 NaOH 浓度 0.1 mol/L、料液比 1:20、温度 60 ℃条件下进行提取,第1次提取 4 h 过滤收集上清,沉渣加入 10 倍体积的 0.1 mol/L NaOH 溶液。60 ℃下再次提取 2 h,取其上清液。用考马斯亮蓝法检测蛋白质含量。以后每次均在上次残渣中加入 10 倍体积的 0.1 mol/L NaOH 溶液 60 ℃下再次提取 2 h,检测上清蛋白质含量。由图 7 可知,提取 3 次可以有效地将蛋白基本提取出来,3 次以后上清中蛋白质含量极少。而多次提取将增加后期浓缩的工作量,因此提取 3 次最好。

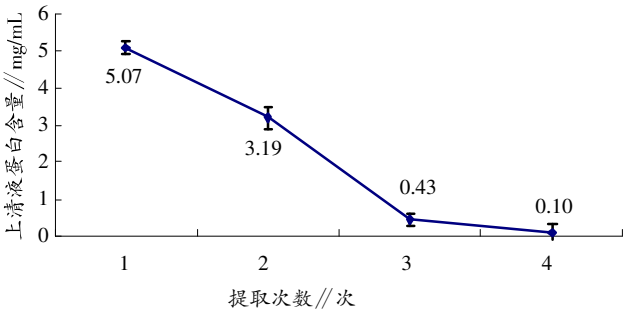


图7 提取次数对硒蛋白提取量的影响

2.5 正交试验

根据单因素分析的试验结果,采用正交试验进行组合设计,考察提取体系中提取时间、料液比、温度和碱液浓度对富硒猴头中硒蛋白提取的影响。为了得到最佳的提取效果,以蛋白的提取率为指标,对单因素试验中得到的工艺参数进行正交优化试验。采用正交表 L₉(3⁴)作正交试验,以硒蛋白提取率为参考指标,确定猴头硒蛋白提取的最佳工艺条件。正交试验因素水平见表 2。

表2 正交试验因素水平

水平	因素			
	时间(A)//h	料液比(B)	温度(C)//℃	NaOH 浓度(D)//mol/L
1	6	1:10	50	0.07
2	8	1:20	60	0.10
3	10	1:30	70	0.13

由表 3 可知,处理 5 试验条件得出的蛋白质含量最高。由极差分析可知,A₂B₂C₃D₁ 是最好的组合,即提取时间 8 h、料液比为 1:20、温度为 70 ℃、碱液浓度为 0.07 mol/L 时,为可溶性蛋白的最佳提取条件。4 个因素对于得率的影响程度是:B>D>C>A,即料液比对猴头含硒蛋白提取率影响最大,其次是 NaOH 溶液浓度,然后是温度和提取次数。蛋白得率随着提取时间的加长而上升,这与单因素试验中 10 h 以上趋于稳定有所不同,但并不矛盾,多因素试验中,因素间往往具有强烈的搭配效果;碱液浓度在 0.13 mol/L 时得率最

表3 正交试验结果

处理	因素				蛋白质得率/%
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	41.31±3.35
2	1	2	2	2	52.75±8.17
3	1	3	3	3	47.32±2.21
4	2	1	2	3	33.62±3.65
5	2	2	3	1	67.47±4.25
6	2	3	1	2	51.69±9.50
7	3	1	3	2	47.66±2.38
8	3	2	1	3	46.75±0.53
9	3	3	2	1	54.72±0.97
K ₁	47.13	40.86	46.58	53.50	
K ₂	49.93	54.66	48.53	50.70	
K ₃	49.71	51.24	53.15	42.56	
R	2.80	13.80	6.57	10.94	

小;料液比和碱液浓度的波动范围都比较大,可以认为二者对于得率有着显著的影响;提取 8 h 有相对较高的得率,其波动范围并不是很大,因此看出,提取时间并不是影响得率的最主要的因素;提取温度在 70 ℃时,得率相对较高。因此,在猴头含硒蛋白的提取工艺中,适宜的料液比和 NaOH 溶液浓度最为关键。高温虽可以使蛋白的提取率增高,但在高温条件下蛋白结构常常受到破坏,使其活性降低或失活,因此应根据生产或试验的具体要求选择合适的提取温度,选择尽量低的温度保持含硒蛋白的活性。

3 结论

通过对蛋白提取效率和硒提取率的考察,从 6 种溶剂中选择蛋白提取量最高,硒提取率最高的 NaOH 溶液进行提取工艺优化。通过单因素试验分析,得出猴头含硒蛋白的最佳提取工艺为:提取时间为 10 h,料液比为 1:20,提取温度为 60 ℃,碱液浓度为 0.1 mol/L,提取次数为 3 次。在此基础上进行正交试验,对提取参数进行优化,并确定富硒猴头硒蛋白提取的最佳工艺条件为:提取时间为 8 h,料液比为 1:20,提取温度为 70 ℃,碱液浓度为 0.07 mol/L,提取次数为 3 次,该法提取的蛋白含量达到样品总蛋白的 67.47%。

4 参考文献

- [1] ROTRUCK J T, POPE A L. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase[J]. Science, 1973(179): 588-590.
- [2] 雷绍荣, 杨定清, 周娅. 硒的总量及形态分析综述[J]. 中国测试, 2009(5): 1-6.
- [3] 陈晓霞, 邓仕任, 夏林波, 等. 富硒丹参中硒氨基酸含量的测定[J]. 信阳师范学院: 自然科学版, 2010(1): 141-143.
- [4] 陈庆榆, 孙玉军, 尹锋. 富硒灵芝中硒和多糖含量的测定[J]. 中国林副特产, 2010(2): 16-18.
- [5] 赵镭, 杜明, 张美莉, 等. 硒在富硒灵芝中的分布[J]. 中国食品学报, 2005, 5(4): 119-123.
- [6] 唐庆九, 张劲松, 潘迎捷, 等. 几种药用真菌粗提物免疫调节和肿瘤抑制作用的筛选[J]. 食用菌学报, 2003, 10(3): 1-6.
- [7] 周中银. 猴头菌提取物改善胃溃疡愈合质量的研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2009, 18(3): 260-262.
- [8] KAWAGISHI H, SHIMADA A, HOSOKAWA S, et al. Erinacines E, F, and G, stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mycelia of Hericium erinaceum[J]. Tetrahedron Lett, 1996, 37(41): 7399-7402.
- [9] 许伟, 许洪霞, 潘丽媛, 等. 猴头磨硒多糖对正常小鼠免疫功能影响的实验研究[J]. 中国中医药科技, 2009(3): 199.
- [10] 唐清秀. 虫草、猴头多糖及其硒络合剂对小鼠免疫功能的影响[J]. 甘肃医药, 1997(6): 329-330.
- [11] 王莲芳, 窦春霞, 张连富, 等. 有机物中微量元素硒的测定[J]. 食品与机械, 2007, 23(1): 115-117, 147.