

香菇蛋白的分级纯化和结构分析

李波*, 芦菲, 田燕, 赵森

河南科技学院食品学院, 新乡 453003

摘要:香菇粉经 10 pH 10 的水提取制备香菇蛋白, 得率 13.1%, 其蛋白含量 47.5%, 多糖含量 24.2%。香菇蛋白经 DEAE Sepharose CL-6B 柱层析分级得 5 个级分, 收集级分 F1、F2、F3、F4, 它们都是由蛋白和多糖构成的复合物。Sepharose CL-6B 凝胶色谱显示, F2 和 F4 的分子量分布较为均匀, 且以蛋白为主, 多糖含量很低; F3 主要由两个分子量不同的蛋白级分构成, 含有一定的多糖; F1 中多糖含量较高, 蛋白含量较少, 且多糖分子量分布均匀。香菇蛋白的分子量主要集中在 20 kDa~40 kDa 之间。F1、F3、F4 都属于酸性蛋白质, 含有除色氨酸之外的 7 种必需氨基酸, 除蛋氨酸含量较低外, 其余必需氨基酸含量接近, 且赖氨酸含量较高。红外光谱分析表明, 香菇蛋白的二级结构主要为 α 螺旋和无规卷曲。

关键词:香菇; 蛋白; 分级; 结构

中图分类号: Q946.1; R284.1

文献标识码: A

Fractionation and Structure of Protein from *Lentinus edodes*

LI Bo*, LU Fei, TAN Yan, ZHAO Sen

School of Food Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China

Abstract: Powder of *Lentinus edodes* was treated with water of 10 pH 10 to extract the protein of *Lentinus edodes* (PLE). The yield of PLE was 13.1%, and its protein content was 47.5% and polysaccharide content was 24.2%. PLE was graded into five fractions by chromatography on a DEAE Sepharose CL-6B Column. Fractions F1, F2, F3 and F4 were collected, which all were the complex of protein and polysaccharide. Gel filtration chromatography of Sepharose CL-6B showed that molecular weight (Mw) distribution of F2 and F4 was symmetrical, and they contained mainly protein and little polysaccharide. F3 was composed of two protein fractions with different Mw and contained some polysaccharide. F1 contained more polysaccharide and less protein and its Mw distribution was symmetrical. Mw of PLE was mainly between 20-40 kDa. F1, F2 and F3 were belonged to acidic proteins. They contained seven kinds of essential amino acids except Trp. Besides of Met with less content, other amino acids had almost content and the content of Lys was higher. IR spectra showed that secondary structure of PLE mainly was α -helix and random coil.

Key words: *Lentinus edodes*; protein; fractionation; structure

香菇 (*Lentinus edodes*) 是我国的特色食用菌, 产量居世界第一位。香菇富含多种营养保健成分^[1], 目前国内外对香菇多糖的研究报道较多^[2], 而对香菇中其他功能成分的研究开发很少。根据我们的分析结果, 香菇干粉的蛋白含量为 21.8% (凯氏定氮法)。如果在提取香菇多糖的同时, 能够将蛋白等功能成分一并提取出来, 则能充分利用香菇原料资源, 提高产品的附加值, 促进香菇产业的快速发展。

本文利用香菇蛋白与多糖溶解性的差异, 先将

蛋白提取出来, 残余物用于提取多糖。对提取出的香菇蛋白, 采用离子交换和凝胶过滤柱层析进行了分级纯化, 并对各级分的分子量、氨基酸组成和红外光谱进行了分析。

1 材料与方法

1.1 材料

鲜香菇 (申香 5 号) 购自新乡市李庄村香菇生产基地, 经干燥、粉碎后备用。

Agilent 1100 氨基酸自动分析仪, Bruker TEN-SOR-27 傅立叶变换红外光谱仪, 尤尼柯 7200 可见分光光度计。柱层析系统 (梯度混合仪、恒流泵、紫外检测器、自动收集器、记录仪) 为上海沪西分析仪

收稿日期: 2008-07-23 接受日期: 2008-10-14

基金项目: 河南省高校新世纪优秀人才支持计划项目 (2006HANCET-17); 河南科技学院重点科研项目

*通讯作者 Tel: 86-373-3040977; E-mail: libowuxi@yahoo.com.cn

器厂产品。DEAE Sepharose CL-6B和 Sepharose CL-6B (GE Healthcare Bio-Sciences AB 公司)。透析袋 (8000~12000, 宝信生物科技有限公司)。所用试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 香菇蛋白的提取

取 100 g 香菇粉, 加 pH 10 的水 1000 mL, 在 10 提取 30 min, 离心分离 (3000 r/min, 15 min), 收集上清液 (沉淀可用于提取香菇多糖)。上清液减压浓缩后, 加乙醇至 83% 乙醇浓度, 4 放置过夜。离心分离, 沉淀依次用乙醇、丙酮洗涤沉淀后, 于 40 烘干, 得香菇蛋白。

1.2.2 香菇蛋白的分级纯化

取 0.5 g 香菇蛋白, 用 50 mL 磷酸盐缓冲液 (pH 7, 0.02 mol/L) 溶解后, 离心 (4000 r/min, 20 min), 取上清液, 经 DEAE Sepharose CL-6B 柱 (2.6 × 20 cm) 层析, 用磷酸盐缓冲液 (pH 7, 0.02 mol/L) 洗脱出第一个级分后, 进行 0.2~1.0 mol/L NaCl 磷酸缓冲液 400 mL 线性梯度洗脱, 最后用 2 mol/L NaCl 磷酸缓冲液 200 mL 进行洗脱。洗脱液流速为 1 mL/min, 每管收集 9 mL。以苯酚 硫酸法检测多糖 (490 nm)^[3], 紫外 280 nm 检测蛋白。

洗脱液透析脱盐浓缩后, 冷冻干燥, 得离子交换各级分。各级分用磷酸盐缓冲液溶解后, 经 Sepharose CL-6B 柱 (1.6 × 100 cm) 层析, 用 0.1 mol/L 的 NaCl 磷酸缓冲液 (pH 7, 0.02 mol/L) 洗脱。洗脱液流速为 15 mL/h, 每管收集 4 mL。

1.2.3 分子量测定

Sepharose CL-6B 柱 (1.6 × 100 cm) 层析方法, 用已知分子量的标准蛋白制作标准曲线, 0.1 mol/L 的 NaCl 磷酸缓冲液 (pH 7, 0.02 mol/L) 洗脱。

1.2.4 氨基酸组成分析

样品经 6 mol/L 盐酸在 110 水解 24 h, 用氨基酸自动分析仪测定。

1.2.5 红外光谱分析

采用 KBr 压片法。

1.2.6 蛋白含量测定

香菇蛋白中的蛋白质含量测定采用凯氏定氮法。

2 结果与讨论

2.1 香菇蛋白的提取

100 g 香菇粉经提取制备, 可得香菇蛋白 13.1 g, 其蛋白含量为 47.5%, 多糖含量为 24.2%。同时, 可得到香菇多糖 5.6 g, 其多糖含量为 69.5%, 蛋白含量为 18.3%。

2.2 香菇蛋白的分级纯化

香菇蛋白溶解后, 用阴离子交换色谱 DEAE Sepharose CL-6B 进行分级。样品经磷酸盐缓冲液洗脱出级分 F1, 然后经 0.2~1.0 mol/L NaCl 线性梯度洗脱出级分 F2、F3、F4, 最后经 2 mol/L NaCl 洗脱出级分 F5 (图 1)。由于 F5 含量很少, 所以仅收集了 F1、F2、F3、F4 这四个级分。由图可看出, 在蛋白出峰的位置也存在多糖的峰, 表明这四个级分的蛋白和多糖是以结合形式存在的, 这可能也是香菇蛋白中含有 24% 多糖的原因之一。F1 多糖含量较高, F4 蛋白含量较高。

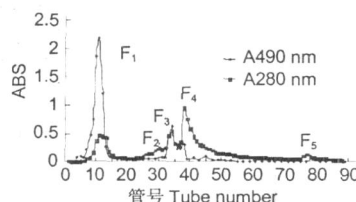


图 1 香菇蛋白的 DEAE Sepharose CL-6B 柱层析

Fig. 1 Chromatogram of PLE on a DEAE Sepharose CL-6B column

凝胶过滤色谱可根据蛋白分子的大小和形状不同而将其进行分离。级分 F1-F4 的 Sepharose CL-6B

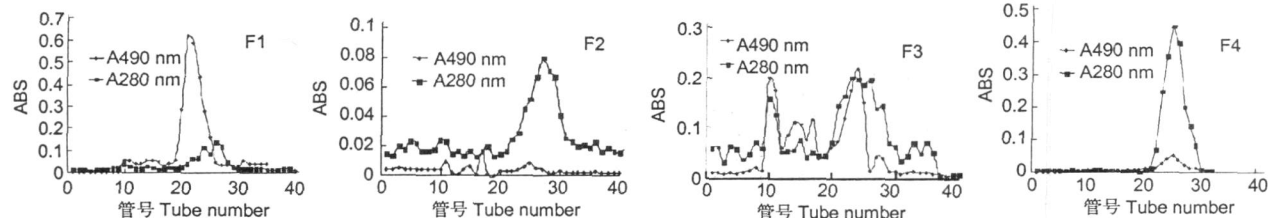


图 2 级分 F1~F4 的 Sepharose CL-6B 柱层析

Fig. 2 Chromatogram of fractions F1-F4 on a Sepharose CL-6B column

柱色谱(图2)显示,F4和F2的分子量分布较为均匀,且以蛋白为主,多糖含量很低;F3主要由两个分子量不同的蛋白级分构成,含有一定的多糖;F1中多糖含量很高,而蛋白含量较少,且多糖分子量分布均匀。

2.3 不同级分的分子量

经 Sepharose CL-6B 凝胶柱层析测定,F1的分子量为 26515 Da, F2为 22683 Da, F3为 42355和 322329 Da, F4为 30996 Da。结果显示,香菇蛋白的分子量主要集中在 20~40 kDa之间,另有1级分分子量较大,超过 300 kDa。

2.4 不同级分的氨基酸组成

表1显示,三种级分中天冬氨酸和谷氨酸含量较高,它们属于酸性氨基酸。二者之和与赖氨酸、精氨酸、组氨酸(均为碱性氨基酸)之和的比值分别为:F1=1.664, F3=2.587, F4=3.474。因此,三种级分都属于酸性蛋白质,且在 pH 7时蛋白质所带负电荷的大小为 F4>F3>F1,所以在阴离子交换柱层析时 F1最先被洗脱出来,F4最后被洗脱出来。三种级分中丝氨酸和苏氨酸含量较高,二者易与糖链形成 O糖苷键的连接,这可能是香菇蛋白中结合有较多糖链的一个原因。三种级分含有除色氨酸之外的7种必需氨基酸,除蛋氨酸含量较低外,其余必需氨基酸含量接近,且赖氨酸含量较高,而赖氨酸是大米、小麦等谷物食品的第一限制氨基酸。因此香菇蛋白对平衡膳食中的氨基酸比例具有重要意义。

2.5 不同级分的红外光谱

蛋白质在红外区有若干特征吸收带,其中酰胺带(1600~1700 cm⁻¹)的谱峰指认目前比较成熟,1650~1658 cm⁻¹为 α 螺旋,1610~1640 cm⁻¹为 β 折叠,1660~1700 cm⁻¹为 β 转角,1640~1650 cm⁻¹为无规卷曲^[4,5]。香菇蛋白的红外光谱(图3)在酰胺

表1 级分 F1、F3、F4的氨基酸组成

Table 1 Amino acid composition of F1, F3 and F4

氨基酸 Amino acid	质量分数 /% w/w		
	F1	F3	F4
Asp	1.387	0.743	2.100
Glu	1.721	0.817	2.816
Ser	0.859	0.422	0.918
His	0.310	0.094	0.268
Gly	0.800	0.310	0.849
Thr	0.709	0.391	0.708
Ala	0.926	0.275	0.787
Arg	0.742	0.223	0.455
Tyr	0.417	0.138	0.221
Val	0.716	0.283	0.565
Met	0.117	0.010	0.075
Phe	0.470	0.183	0.318
Ile	0.542	0.247	0.391
Leu	0.813	0.371	0.604
Lys	0.816	0.286	0.692
Pro	0.453	0.409	0.904
Cys	0.014	0.036	0.091

带呈现很强的吸收峰,各级分在酰胺 I带的谱峰为:F1—1656、1648、1642 cm⁻¹; F2—1657、1649、1641 cm⁻¹; F3—1650 cm⁻¹; F4—1659、1653、1647 cm⁻¹。据此分析,F1的二级结构为 α 螺旋和无规卷曲,且后者比例稍多;F2与 F1类似;F3只有一个 1650 cm⁻¹峰,恰恰位于 α 螺旋与无规卷曲的交界处,暗示 F3的二级结构可能比较均一;F4也存在 α 螺旋和无规卷曲,且前者比例稍多。

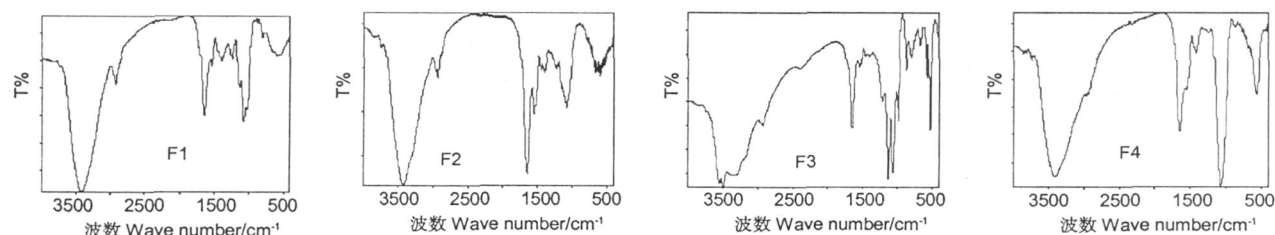


图3 香菇蛋白各级分的红外光谱

Fig. 3 IR spectra of PLE fractions

3 结论

100 g香菇粉经 10 pH 10的水提取,可得香

菇蛋白 13.1 g,其蛋白含量为 47.5%,多糖含量为 24.2%。香菇蛋白经 DEAE Sepharose CL-6B 柱层析分级,可得5个级分。收集级分 F1、F2、F3、F4,它

们都是由蛋白和多糖构成的复合物,蛋白和多糖之间存在较强的结合作用力。

Sephacrose CL-6B 凝胶色谱显示, F4和 F2的分子量分布较为均匀,且以蛋白为主,多糖含量很低; F3主要由两个分子量不同的蛋白级分构成,含有一定的多糖; F1中多糖含量较高,蛋白含量较少,且多糖分子量分布均匀。香菇蛋白的分子量主要集中在 20~40 kDa之间,另有 1级分分子量较大,超过 300 kDa。

级分 F1、F3、F4都属于酸性蛋白质,天冬氨酸和谷氨酸含量较高。三种级分含有除色氨酸之外的 7种必需氨基酸,除蛋氨酸含量较低外,其余必需氨基酸含量接近,且赖氨酸含量较高。红外光谱分析表明,香菇蛋白的二级结构主要为 α 螺旋和无规卷曲。

参考文献

- 1 Zhang RG(张润光), Su DH(苏东华), Zhang XC(张小翠). Nutritional functions and products development of *Lentinus edodes*. *Food Res Dev* (食品研究与开发), 2004 (4): 125-128.
- 2 Luo W(罗炜), Li D(李东). Research advances in *Lentinan*. *Food Femen Indus* (食品与发酵工业), 2000, 26 (4): 63-67.
- 3 Zhang WJ(张惟杰). Biochemistry Technology of Glycoconjugates(糖复合物生化研究技术). Hangzhou: Zhejiang University Press, 1999. 11-12.
- 4 Ge ZC(戈志成), Zhang YP(张燕萍). Studying the secondary structure of modified gluten by FTIR. *J Chin Cereals and Oils Association* (中国粮油学报), 2006, 21 (3): 36-38.
- 5 Zhou W(周文), Chen X(陈新), Shao ZZ(邵正中). Conformation studies of silk proteins with infrared and raman spectroscopy. *Progress in Chem* (化学进展), 2006, 18: 1514-1522.
- 1 Zhang RG(张润光), Su DH(苏东华), Zhang XC(张小翠). Application of chicken chorioallantoic membrane as a model for study of effects of Chinese medicine on angiogenesis. *Chin J Basic Med in Tradit Chin Med* (中国中医基础医学杂志), 1999, 5: 16-19.
- 2 Zheng L, Zheng J, Zhao Y, et al. Three anti-tumor saponins from *Albizia julibrissin*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 16: 2765-2768.
- 3 Zou K, Zhao Y, Tu G, et al. Two diastereomeric saponins with cytotoxic activity from *Albizia julibrissin*. *Carbohydr Res*, 2000, 324: 182-188.
- 4 Zou K, Zhao YY, Tu GZ, et al. A triterpenoid saponin from *Albizia julibrissin*. *J Asian Nat Prod Res*, 1999, 1: 313-318.
- 5 Gasparini G, Harris AL. Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma much more than a new prognostic tool. *J Clin Oncol*, 1995, 13: 765.
- 6 DeLisser HM, Christofidou-Solomidou M, Strieter RM, et al. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am J Pathol*, 1997, 151: 671-677.

(上接第 218页)