

富硒荷叶离褶伞菌丝体中蛋白质提取工艺优化及氨基酸组成分析

高慧娟, 陈月娟, 杨艳辉, 黄建花, 曹阳, 赵丽, 张楠, 朱子雄, 魏生龙

Process of Extraction Protein from Selenium-enriched *Lyophyllum decastes* Mycelia and Analysis of Its Amino Acid

GAO Huijuan, CHEN Yuejuan, YANG Yanhui, HUANG Jianhua, CAO Yang, ZHAO Li, ZHANG Nan, ZHU Zixiong, and WEI Shenglong

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023040025>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

草莓酵素发酵过程中氨基酸成分分析和蛋白质营养评价

Amino Acid Composition Analysis and Protein Nutrition Evaluation of Strawberry Jiaosu during Fermentation Process

食品工业科技. 2018, 39(17): 64-70,78 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.17.011>

荷叶离褶伞多糖提取工艺优化及抗氧化活性研究

Study on the Optimization of Extraction Technology and Antioxidant Activity of Polysaccharides from *Lyophyllum decastes*(Fr.)Singer

食品工业科技. 2020, 41(9): 155-160,167 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.09.025>

不同品种芡实种仁蛋白质亚基组成及氨基酸分析

The subunit distributions and amino acids analysis of the proteins from different varieties of *Euryale ferox* seed kernels

食品工业科技. 2017(08): 98-102 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.08.011>

不同产地东北林蛙卵胶膜中蛋白质和水解氨基酸含量差异比较

Comparison of protein and hydrolytic amino acids in *Rana dybowskii* jelly coats from different localities

食品工业科技. 2017(20): 312-316 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.20.057>

天然鱼翅翅针中氨基酸和脂肪酸组成分析与评价

Composition Analysis and Evaluation of Amino Acids and Fatty Acids in Natural Shark Fin Cartilage

食品工业科技. 2018, 39(13): 14-18,24 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.13.003>

基于大豆原料蛋白质和氨基酸组成的豆浆甜度预测模型研究

Predictive Model of Soymilk Sweetness Based on Protein and Amino Acid Compositions of Soybean Materials

食品工业科技. 2019, 40(10): 18-23,31 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.10.004>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

高慧娟, 陈月娟, 杨艳辉, 等. 富硒荷叶离褶伞菌丝体中蛋白质提取工艺优化及氨基酸组成分析 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(6): 169–177. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023040025

GAO Huijuan, CHEN Yuejuan, YANG Yanhui, et al. Process of Extraction Protein from Selenium-enriched *Lyophyllum decastes* Mycelia and Analysis of Its Amino Acid[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(6): 169–177. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023040025

· 工艺技术 ·

富硒荷叶离褶伞菌丝体中蛋白质提取工艺优化及氨基酸组成分析

高慧娟^{1,2,3,4}, 陈月娟^{1,+}, 杨艳辉¹, 黄建花¹, 曹 阳¹, 赵 丽¹, 张 楠⁴, 朱子雄⁴, 魏生龙^{2,*}

(1. 河西学院生命科学与工程学院, 甘肃张掖 734000;

2. 甘肃省应用真菌工程实验室, 甘肃张掖 734000;

3. 甘肃省河西走廊特色资源利用重点实验室, 甘肃张掖 734000;

4. 临泽县怡泉新禾农业科技发展有限公司, 甘肃张掖 734200)

摘要: 以 20 L 生物发酵罐培养的富硒荷叶离褶伞菌丝体为原料, 对菌丝体中蛋白提取工艺进行优化, 并分析硒的富集对荷叶离褶伞菌丝体中氨基酸种类和含量的影响。利用单因素实验和 Box-Behnken 中心组合响应面法, 优化了荷叶离褶伞菌丝体中硒蛋白提取工艺, 采用 3,3'-二氨基联苯胺分光光度法测定蛋白质中硒的含量, 并通过氨基酸测定仪分析测定富硒前后的菌丝体蛋白中氨基酸量的变化。结果表明, 荷叶离褶伞菌丝体中硒蛋白的最适提取条件为: 提取温度 64 °C、提取时间 60 min、液料比 200:1 mL/g、提取次数 2 次, 经过验证性试验, 测得蛋白提取率为 75.13%, 菌丝体中富硒量达到 63.87 μg/g。采用氨基酸测定仪分析氨基酸的组成, 并通过氨基酸评分 (AAS)、化学评分 (CS) 指标对富硒荷叶离褶伞菌丝体蛋白质进行初步营养价值评价。富硒荷叶离褶伞菌丝体中蛋白质中氨基酸种类齐全, 人体必需氨基酸含量为 17.20 g/100 g, 较未富硒的高出 19.75%, 必需氨基酸/非必需氨基酸 (EAA/NEAA) 为 0.51, 接近 WHO 提出的推荐值, AAS 和 CS 的值接近于模式蛋白。说明经过工艺优化可以提高蛋白质提取率, 在富硒菌丝体蛋白质中含有硒, 硒促进了氨基酸含量的增加, 富硒菌丝体中蛋白质的营养价值较未富硒菌丝更高, 富硒菌丝体具有潜在的食用和应用价值。

关键词: 荷叶离褶伞, 蛋白质提取工艺, 氨基酸组成, 氨基酸评价

中图分类号: TS219

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2024)06-0169-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023040025



本文网刊:

Process of Extraction Protein from Selenium-enriched *Lyophyllum decastes* Mycelia and Analysis of Its Amino Acid

GAO Huijuan^{1,2,3,4}, CHEN Yuejuan^{1,+}, YANG Yanhui¹, HUANG Jianhua¹, CAO Yang¹, ZHAO Li¹, ZHANG Nan⁴, ZHU Zixiong⁴, WEI Shenglong^{2,*}

(1. College of Life Sciences and Engineering, Hexi University, Zhangye 734000, China;

2. Application of Fungal Engineering Laboratory in Gansu Province, Zhangye 734000, China;

3. Key Laboratory of Hexi Corridor Resources Utilization of Gansu, Zhangye 734000, China;

4. Linze Yiquan Xinhe Agricultural Science & Technology Development Co., Ltd., Zhangye 734200, China)

Abstract: The process of extracting seleno-protein from the selenium enriched *Lyophyllum decastes* mycelia cultured in a 20 L fermentor was optimized, and the effects of selenium enrichment on both types and contents of amino acids in

收稿日期: 2023-04-06 +并列第一作者

基金项目: 甘肃省科技计划资助-中小企业创新基金项目 (22CX3GG019); 甘肃省大学生创新创业训练计划项目 (201710740027); 甘肃省科技计划资助-自然科学基金项目 (22JR11RG226)。

作者简介: 高慧娟 (1977-), 女, 硕士, 研究方向: 食品微生物, E-mail: gaohuijuan2007@126.com。

陈月娟 (1996-), 女, 本科, 研究方向: 食品微生物, E-mail: 2571593540@qq.com。

* 通信作者: 魏生龙 (1962-), 男, 本科, 研究方向: 食用菌学、微生物学, E-mail: zyws0281@163.com。

Lyophyllum decastes mycelia were analyzed. Single factor tests and Box-Benhnken central combined response surface test were used to optimize process of extracting seleno-protein from *Lyophyllum decastes* mycelia. The content of protein was determined by 3,3'-diaminobenzidine spectrophotometry. The types and contents of amino acids in mycelia protein before and after selenium enrichment were compared by means of amino acid analyzer. The results showed that the optimal conditions of extracting seleno-protein from mycelia of *Lyophyllum decastes* were extraction temperature of 64 °C, extraction time of 60 min, liquid-solid ratio of 200:1 g/mL, and extraction times of 2. The protein extraction rate was 75.13%, and the content of selenium in mycelia was 63.87 µg/g. The amino acid composition were analyzed by means amino acid score (AAS) and chemical score (CS), and the nutritional value of the protein in the selenium-enriched *Lyophyllum decastes* mycelia was evaluated. The varieties of amino acids in the selenium-enriched *Lyophyllum decastes* mycelia were abundant and the content of essential amino acids for human body was 17.20 g/100 g, 19.75% higher than that in the non-selenium-ecriched *Lyophyllum decastes* mycelia. The ratio of EAA/NEAA was 0.51, close to the recommended value proposed by WHO, and the values of both AAS and CS were close to the those in the model protein. In summary, the protein extraction rate could be improved by optimizing the extraction process, and there was selenium in the protein from selenium-enriched mycelia, which promoted the increase of amino acid content. The nutritional value of protein in selenium-enriched mycelia was higher than that in non-selenium-riched mycelia, and selenium-enrichec mycelia had potential edible and application value.

Key words: *Lyophyllum decaste*; protein extraction technology; amino acid composition; amino acid evaluation

硒是生物体必需的微量矿质元素^[1],对人类健康有着极其重要的作用。人体硒的主要来源是通过食物摄入^[2],但是人们很难从本土自然食物中摄入硒以达到补硒的目的。人工外源施硒培养技术可以提高食物中硒的含量。食用菌具有从生长底物中吸收硒的能力,通过菌丝体的代谢,将无机硒转化为有机硒,有机硒主要以硒蛋白质、硒多糖、硒核酸、含硒多肽、硒黄酮等形式存在,其中又以含硒蛋白为主^[3]。食用菌经富硒处理后不仅提升了本身的营养功效,还能更好地被人体吸收^[4],可以用于生产高硒新型食品补充剂^[5]。

近年来,随着人们生活水平提高及对健康的重视,味道鲜美、营养丰富、绿色健康的食用菌及其制品越来越受到消费者的喜爱。荷叶离褶伞(*Lyophyllum decastes*)被称作香味松口蘑或美味玉蕈,是离褶伞属一种市场前景较好的珍稀食用菌^[6],也是一种药用真菌^[7]。蛋白质营养是衡量食物营养的重要组成部分^[8],也是对食用菌营养学评价的一个重要方面,也是氨基酸种类和含量评价的重要指标。研究表明,荷叶离褶伞菌丝体中蛋白质含量大于20%,蛋白质的均衡性优于子实体,营养价值比子实体更高,极具生产和食用价值^[9]。此外,荷叶离褶伞还具有较强的富硒能力^[10],硒在摄入人体后可以增加机体中硒蛋白含量^[11],提升其营养价值。目前国内外有关荷叶离褶伞硒蛋白的报道还很少,有必要对富硒荷叶离褶伞菌丝体中蛋白质提取工艺进行优化。

因此,本试验以富硒的荷叶离褶伞菌丝体为原料,采用超声辅助提取,对蛋白的提取工艺进行优化,并对蛋白质中硒的含量进行测定,以氨基酸分析测定仪检测荷叶离褶伞菌丝体富硒前后,蛋白质中的氨基酸种类和数量的变化,了解硒对荷叶离褶伞菌丝体中氨基酸的影响,为进一步研发食用菌富硒菌丝蛋白质保健品提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

荷叶离褶伞 1022 菌株 甘肃省应用真菌工程实验室提供;标准牛血清蛋白(分析纯)、硒粉(化学纯 CP)、3,3'-二氨基联苯胺(化学纯 CAS) 国药集团化学试剂有限公司;其它试剂均为分析纯;玉米粉、大豆蛋白粉 甘肃张掖新乐超市。

V-1200 型可见光分光光度计 上海美谱达仪器有限公司;TDL-50 大容量低速离心机金坛市亿能实验仪器场;LGJ-18 真空冷冻干燥机 北京松源华科技发展有限公司;RE-2000A 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂;KQ-250B 型超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司;L-8900 氨基酸分析测定仪 日本日立公司;氨基酸柱 安米诺西斯公司生产。

1.2 实验方法

1.2.1 菌丝体中蛋白质的提取工艺 荷叶离褶伞菌丝体→活化→加硒→摇瓶发酵→加入 20 L 发酵罐→发酵→得到富硒菌丝体→干燥→粉碎→加碱液搅拌→超声辅助提取→离心→上清液→调节 pH 直至等电点→离心→回溶→冷冻干燥→蛋白样品

操作要点:在 20 L 生物发酵罐中加入玉米粉和大豆蛋白粉水解液的培养基,灭菌冷却后接入 8.5% 种子液(将活化的荷叶离褶伞菌丝体菌块接入 PDA 培养基中,在摇床发酵 8 d 的发酵液),发酵至第 3 d,在发酵液中加入 Na₂SeO₃ 溶液,使发酵液中硒含量为 4 µg/mL,待发酵至第 8 d 时,终止发酵,过滤并清洗菌丝体,放入真空干燥机中干燥,磨粉制成 100 目标标准粉^[12],称取 0.5 g 该标准粉,加入浓度为 0.05 mol/L NaOH 溶液,使用超声辅助提取后,然后在 3000 r/min 转速下离心 15 min,然后调节上清液至等电点,再次离心得蛋白沉淀,最后将蛋白沉淀加入少量蒸馏水调节至 pH7.0 回溶。放在真空冷冻干

干燥机中干燥得蛋白样品。

1.2.2 蛋白质等电点的测定 按照文献 [13] 方法测定蛋白质等电点,略作修改。将富硒荷叶离褶伞菌丝体与 0.05 mol/L 的 NaOH 溶液以 55:1 液料比进行混合,置于磁力搅拌器中 53 ℃ 提取 2 h,冷却至室温后离心(3000 r/min, 15 min)取上清液。分别取 30 mL 上清液于 8 个 50 mL 的烧杯中,分别用 1 mol/L 的 HCl 溶液调节 pH 为 2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0,室温下静置 2 h 后离心(8000 r/min, 10 min),测定上清液蛋白质含量。

1.2.3 蛋白提取率的测定 按照文献 [14] 中双缩脲法测定蛋白质的提取率。

1.2.3.1 蛋白质标准品溶液 准确称取 1.0 g 牛血清白蛋白,用水配制成含量为 10 mg/mL 的标准蛋白溶液,分别取出 0、1、2、3、4 和 5 mL,转入 6 支比色管,各加入 20 mL 双缩脲试剂,并分别加水补足到 25 mL,室温下反应 30 min,以蒸馏水为空白,于 550 nm 测定吸光度值,然后以蛋白质含量为横坐标(mg/mL),吸光值为纵坐标,得回归方程 $Y=0.1985X+0.0665$,决定系数 $R^2=0.9990$ 。

1.2.3.2 样品中蛋白质提取率的测定 取 5 mL 超声提取后离心的上清液,加入 20 mL 双缩脲试剂,并加水补足到 25 mL,充分混匀后,室温下放置 30 min,在 550 nm 下测定吸光值。

$$\text{蛋白提取率}(\%) = \frac{C \times V_1 \times V_0}{V_2 \times m \times 1000} \times 100$$

式中, C: 从标准曲线查得样品的吸光值所对应的蛋白质浓度(mg/mL); V_1 : 反应体系的总体积(mL); V_2 : 用于显色的样品体积(mL); V_0 : 样品稀释后总体积(mL); m: 样品中蛋白质(由等电点处沉淀的蛋白质冻干所得)的质量(g)。

1.2.4 富硒荷叶离褶伞菌丝体中蛋白提取单因素实验

1.2.4.1 提取温度对蛋白提取率的影响 准确称取富硒的样品 0.5000 g,选择不同提取温度(50、60、70 和 80 ℃),碱液浓度为 0.05 mol/L,液料比为 150:1 g/mL,提取时间为 20 min,提取 1 次的条件下超声搅拌提取,提取后在 3000 r/min 下离心 15 min,测定蛋白质含量,研究提取时间对菌丝体蛋白提取率的影响。

1.2.4.2 提取时间对蛋白提取率的影响 准确称取富硒的样品 0.5000 g,在 1.2.3.1 最优提取温度下,选择不同提取时间(20、40、60、80 和 100 min),碱液浓度为 0.05 mol/L,液料比为 150:1 g/mL,提取时间为 60 min,提取次数为 1 次的条件下超声搅拌提取,提取后在 3000 r/min 下离心 15 min,测定蛋白提取率,研究提取时间对菌丝体蛋白提取率的影响。

1.2.4.3 液料比对蛋白提取率的影响 准确称取富硒的样品 0.5000 g,选择 1.2.3.1 中最优提取时间,在

60 ℃ 水浴中,碱液浓度为 0.05 mol/L,选择不同液料比(150:1、200:1、250:1、300:1 和 400:1 g/mL),提取 1 次的条件下超声搅拌提取,提取后在 3000 r/min 下离心 15 min,测定蛋白提取率,研究液料比对菌丝体蛋白提取率的影响。

1.2.4.4 提取次数对蛋白提取率的影响 准确称取富硒的样品 0.5000 g,选择最优提取时间、液料比和提取温度,在不同提取次数(1、2、3 和 4 次)下,于 0.05 mol/L 碱液中超声搅拌提取,提取后在 3000 r/min 下离心 15 min,测定蛋白提取率,研究提取时间对菌丝体蛋白提取率的影响。

1.2.5 富硒菌丝体中蛋白质提取工艺的响应面实验 根据单因素实验结果,运用 Design-expert 8.0 软件系统,采用 Box-Behnken 响应面设计法^[15],以蛋白提取率为响应值,选取提取温度(A)、提取时间(B)、液料比(C)和提取次数(D)四个因素,设计 4 因素 3 水平试验,因素水平表见表 1。

表 1 响应面实验因素与水平设计
Table 1 Factors and levels of response surface methodology

因素	编码	变量水平		
		-1	0	1
提取温度(℃)	A	50	60	70
提取时间(min)	B	50	60	70
液料比(mL/g)	C	150:1	200:1	250:1
提取次数	D	1	2	3

1.2.6 蛋白样品中硒含量测定 根据文献 [16] 方法稍作修改测定蛋白样品中硒含量。

1.2.6.1 硒标准曲线的绘制 精确称取 0.10 g 硒标准品溶解于 2 mL 浓硝酸中,低温下(65~70 ℃)加热溶解至蒸干,用体积比为 1:1 的浓盐酸溶解,定容至 1 L,使用时用蒸馏水稀释至 1 μg/mL 制得硒标准溶液。准确吸取 0.0、1.0、2.0、4.0、6.0 和 8.0 mL 的硒标准溶液(1.0 μg/mL),分别置于 125 mL 分液漏斗中,加水定容至 25 mL,分别加入 5% EDTA-2Na 溶液 1 mL,用体积比为 1:1 的浓 HCl 调节溶液至 pH2~3,再加入 0.5% 3,3'-二氨基联苯胺溶液 4 mL,摇匀,置暗处 20 min 后,用 10% NaOH 溶液调节至 pH7~7.5,加入 10 mL 甲苯振荡 2 min 静置分层,弃水层,甲苯层用比色皿于 420 nm 处测其吸光值。以硒含量(μg/mL)为横坐标,以吸光度为纵坐标,得回归方程为 $Y=0.0151X-0.0014$,决定系数 $R^2=0.9996$ 。

1.2.6.2 样品的处理及硒含量测定 准确称取 0.05 g 样品溶于 2 mL 浓硝酸,在电热炉中加热(控制温度 160~180 ℃)消化,至样品完全溶解,溶液呈澄清,停止加热并冷却至 70 ℃,加入体积比为 1:1 浓 HCl 定容至 10 mL,备用。准确移取上述备用溶液 0.2 mL,用水定容至 25 mL 转入 125 mL 分液漏斗中,此时若有白色沉淀物(可能是硅胶)应用滤纸过滤,分别加

入 5% EDTA-2Na 溶液 1 mL 后步骤同 1.2.6.1 中标准曲线的制作方法。根据样品溶液测得的吸光值,结合硒标准曲线查找、计算相应的硒含量。

$$\text{样品中硒的含量}(\mu\text{g/g}) = \frac{C \times V_1 \times n}{m}$$

式中, C: 从标准曲线查得样品的吸光值所对应的硒浓度(mg/mL); V_1 : 反应体系的总体积; n: 样品稀释倍数; m: 菌丝体样品中蛋白质的质量(g)。

1.2.7 富硒菌丝体中蛋白质氨基酸种类和含量测定

1.2.7.1 蛋白样品的前处理 称取提取的蛋白质 0.1000 g 置于水解管中,加入 10~15 mL 6 mol/L 的盐酸,将封口严密的水解管放在(110±1)℃ 的恒温干燥箱内水解 22 h 后,取出冷却。打开水解管,将水解液全部转入 25 mL 容量瓶中,用去离子水定容至刻度,取滤液 1 mL 置于 25 mL 小烧杯中,在 40~50 ℃ 的真空干燥箱中烘干(如有残留物,用 1~2 mL 去离子水溶解,再干燥),加入 5 mL 0.02 mol/L 的盐酸溶液溶解作为待测液。

1.2.7.2 测定分析条件 氨基酸柱;单样品分析周期为 30 min。分离柱的条件为:洗脱液的流速 0.40 mL/min,柱温 70 ℃,柱压 8.627 MPa;反应柱的条件为:茚三酮及茚三酮缓冲液的流速 0.35 mL/min,柱温 135 ℃,柱压 0.982 MPa,检测波长:440 nm/570 nm 双波长同时检测;反应温度:135 ℃;分别取标准溶液及试样 20 μL 进样^[17]。

1.2.8 营养价值评价 采用化学评分(chemical score, CS)、氨基酸评分(amino acid score, AAS)对富硒荷叶离褶伞菌丝体进行营养价值评价^[18]。

1.3 数据处理

实验中的每组数据均为 3 次重复的平均值,采用 Design-Expert 13 软件进行响应面设计和统计分析,采用 Origin 2018 进行图表处理。

2 结果与分析

2.1 蛋白质等电点的确定

如图 1 所示,上清液中蛋白质的含量,随着 pH 增加呈现凹形, pH 从 2.5~3.5,随着 pH 增加,上

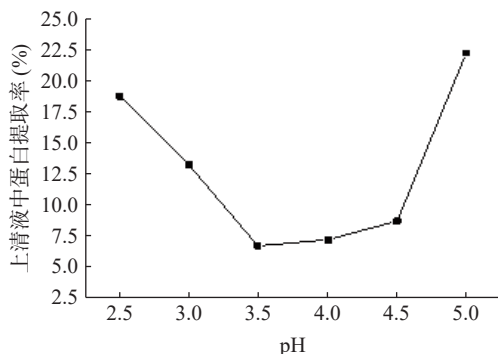


图 1 蛋白质等电点的测定

Fig.1 Determination of protein isoelectric point

清液中蛋白质含量在急剧降低,从 3.5 以后开始又缓慢增加,4.5 以后迅速增加,在 5.0 时达到最大值 22.5%。说明提取液上清中蛋白质在 pH3.5~4.5 的溶解度较低,在此范围之外,蛋白含量均较大。pH 在 3.5~4.5 范围内,上清液中蛋白质残留浓度较低,而在 3.5 处蛋白质所带电荷为零,溶解度最低,推测富硒荷叶离褶伞菌丝体中蛋白质的等电点在 3.5 左右,这和王梓杭等^[18]对香菇中蛋白质的提取工艺中等电点的测定值(3.8)相接近。

2.2 单因素实验结果

2.2.1 提取温度对富硒菌丝体中蛋白提取率的影响

如图 2 所示,随着提取温度的升高,蛋白提取率也在增加,提取温度越高,碱提效果也越好。但提取温度超过 60 ℃ 以后,蛋白提取率随提取温度变化的趋势减小,并且有文献 [19] 报道,蛋白的变性温度为 70~80 ℃,由此确定实际提取温度为 60 ℃。这与田敏爵等^[20]对富硒猴头菌中硒蛋白提取工艺的研究中的结论相似。

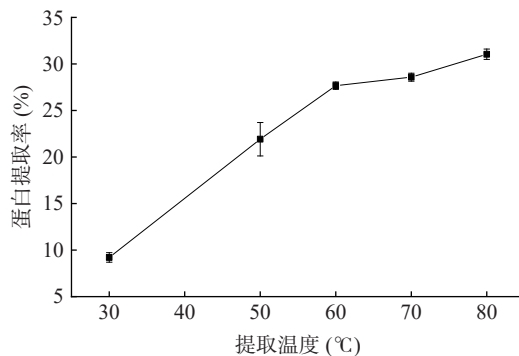


图 2 提取温度对富硒菌丝体中蛋白提取率的影响

Fig.2 Effect of extraction temperature on protein extraction rate in selenium-rich mycelia

2.2.2 提取时间对富硒菌丝体中蛋白提取率的影响

如图 3 所示,随提取时间的增加,蛋白提取率不断增加,在提取时间为 60 min 时,达到最大 43.69%。提取时间超过 60 min 后,随着提取时间延长,蛋白提取率呈现缓慢下降趋势,可能是提取时间增加后,蛋白质溶出量已饱和,因此选择 60 min 为优化试验条件。

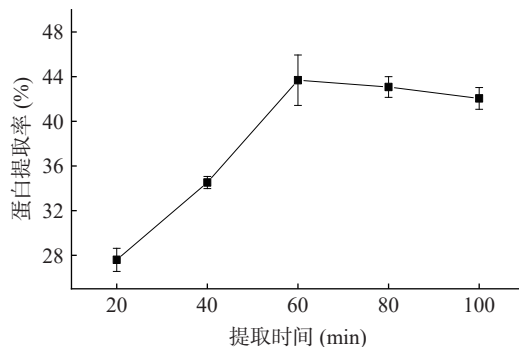


图 3 提取时间对富硒菌丝体中蛋白提取率的影响

Fig.3 Effect of reaction time on protein extraction rate in selenium-rich mycelia

2.2.3 液料比对对富硒菌丝体中蛋白提取率的影响

由图 4 可知,随着液料比的增大,蛋白质提取率也在增加,液料比 200:1 mL/g 时达到 44.95%,之后随液料比的增加,蛋白质提取率的提高不明显。可能是因为随着溶剂的增加,固液相中的浓度差增大,溶质溶出速度增大^[21],使得蛋白提取率增加。但是液料比过大会给随后的浓缩步骤造成负担,考虑工艺过程中溶剂使用量和降低生产成本方面的考虑,确定液料比为 200:1 mL/g。

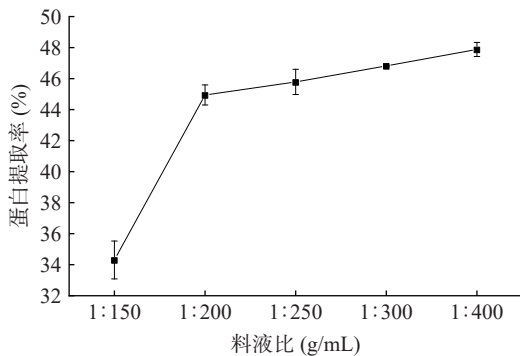


图 4 液料比对富硒菌丝体中蛋白提取率的影响

Fig.4 Effect of liquid to material ratio on protein extraction rate in selenium-rich mycelia

2.2.4 提取次数对对富硒菌丝体中蛋白提取率的影响

由图 5 可知,随着提取次数增多,蛋白提取率增加,碱提 2 次的蛋白提取率为 61.39%,之后随着提取次数增加,蛋白提取率增加幅度缓慢,说明碱提 2 次可以有效地将蛋白充分提出,考虑到提取效率,选择 2 次为最佳提取次数。

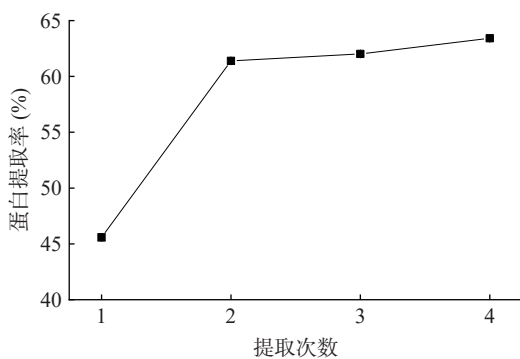


图 5 提取次数对富硒菌丝体中蛋白提取率的影响

Fig.5 Effect of reaction times on protein extraction rate in selenium-rich mycelia

2.3 响应面试验结果

根据 Box-Behnken 的中心组合设计原理,试验中对 4 因素各取 3 水平,设计了 29 个试验点的响应面分析试验,结果见表 2。经 Design-Expert 统计分析软件进行多元回归分析,所得的方差分析结果见表 3。

利用软件 Design Expert8.0 对实验结果进行分

表 2 响应面试验设计和结果

Table 2 Design and results of response surface analysis

实验号	因素				Y ₁ 蛋白提取率(%)
	A 提取温度	B 提取时间	C 液料比	D 提取次数	
1	1	-1	0	0	66.99
2	0	-1	0	-1	19.41
3	0	-1	-1	0	46.12
4	0	1	0	1	54.80
5	0	0	0	0	78.58
6	-1	0	0	1	51.84
7	0	0	-1	1	65.32
8	-1	0	1	0	54.37
9	1	0	-1	0	59.01
10	0	-1	0	1	52.52
11	-1	0	-1	0	39.47
12	0	0	0	0	77.44
13	0	0	0	0	71.84
14	0	0	0	0	70.44
15	0	1	1	0	57.22
16	1	1	0	0	62.23
17	0	1	-1	0	49.82
18	1	0	0	1	67.37
19	-1	-1	0	0	49.33
20	-1	1	0	0	50.02
21	1	0	1	0	51.64
22	0	0	1	1	52.58
23	0	0	0	0	72.85
24	0	0	-1	-1	30.24
25	0	1	0	-1	34.85
26	0	-1	1	0	62.76
27	0	0	1	-1	41.13
28	-1	0	0	-1	22.74
29	1	0	0	-1	44.80

表 3 响应面试验的方差分析结果

Table 3 ANOVA results of factors and model in the response surface experiment

来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	6002.31	14	428.74	13.42	<0.0001	**
A	591.79	1	591.79	18.53	0.0007	**
B	11.62	1	11.62	0.36	0.5560	
C	73.61	1	73.61	2.30	0.1512	
D	1906.63	1	1906.63	59.70	<0.0001	**
AB	7.43	1	7.43	0.23	0.6371	
AC	123.99	1	123.99	3.88	0.068	
AD	10.66	1	10.66	0.33	0.5726	
BC	21.34	1	21.34	0.67	0.4273	
BD	43.30	1	43.30	1.36	0.2638	
CD	139.59	1	139.59	4.37	0.0553	
A ²	534.74	1	534.74	16.74	0.0011	**
B ²	756.18	1	756.18	23.68	0.0002	**
C ²	694.29	1	694.29	21.74	0.0004	**
D ²	2430.15	1	2430.15	76.09	<0.0001	**
残差	447.13	14	31.94			
失拟项	395.93	10	39.59	3.09	0.1439	
纯误差	51.21	4	12.8			
总差	6449.44	28				

注: *表示P<0.05达到差异显著水平; **表示P<0.01达到差异极显著水平。

析得到多元二次回归方程: $Y_1=74.23+7.02A+0.98B+2.48C+12.61D-1.36AB-5.57AC-1.63AD-2.31BC-3.29BD-5.91CD-9.08A^2-10.80B^2-10.35C^2-19.36D^2$ 。

由表3可知,模型项显著, $P < 0.0001$, 失拟项不显著, $P = 0.1439 > 0.05$, 决定系数 $R^2 = 0.9307$, 说明模型可用, 回归拟合程度较好。A、D、 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 对响应值的影响均达到极显著水平 ($P < 0.01$), B、C、AB、AC、AD、CD、BD、BC 对响应值的影响均不显著。由 F 值可知, 影响蛋白提取率主要因素依次为 $D > A > C > B$, 即提取次数 > 提取温度 > 液料比 > 提取时间。利用 Design Expert 8.0 软件可以得两两因子交互作用的响应面图。响应面坡面的陡峭程度及等高线的疏密、形状可反映出交互作用对响应值影响的强弱, 响应面坡度陡峭, 等高线密集且趋于椭圆表示两因素交互作用对响应值的影响显著, 而响应面坡度平缓, 等高线稀疏且趋于圆形则与之相反。图6反

映两因素交互作用对富硒荷叶离褶伞中蛋白提取率的影响, 图中响应面坡度较平缓, 等高线稀疏且趋于圆形, 说明提取时间、提取温度、提取次数和液料比的两两交互作用对蛋白质提取率影响不显著, 这与方差分析结果一致。

2.4 验证试验

Design-Expert 8.0 统计分析软件进行数据分析, 得到荷叶离褶伞菌丝体硒蛋白的最佳提取工艺条件: 提取温度 $63.81\text{ }^\circ\text{C}$ 、提取时间 59.80 min 、液料比 $196.36:1\text{ g/mL}$ 、提取次数 2.32 次, 理论上蛋白提取率为 77.50% 。考虑到实验的可行性, 将最佳条件调整为提取温度 $64\text{ }^\circ\text{C}$ 、提取时间 60 min 、液料比 $200:1\text{ g/mL}$ 、提取次数 2 次。在此条件下, 对荷叶离

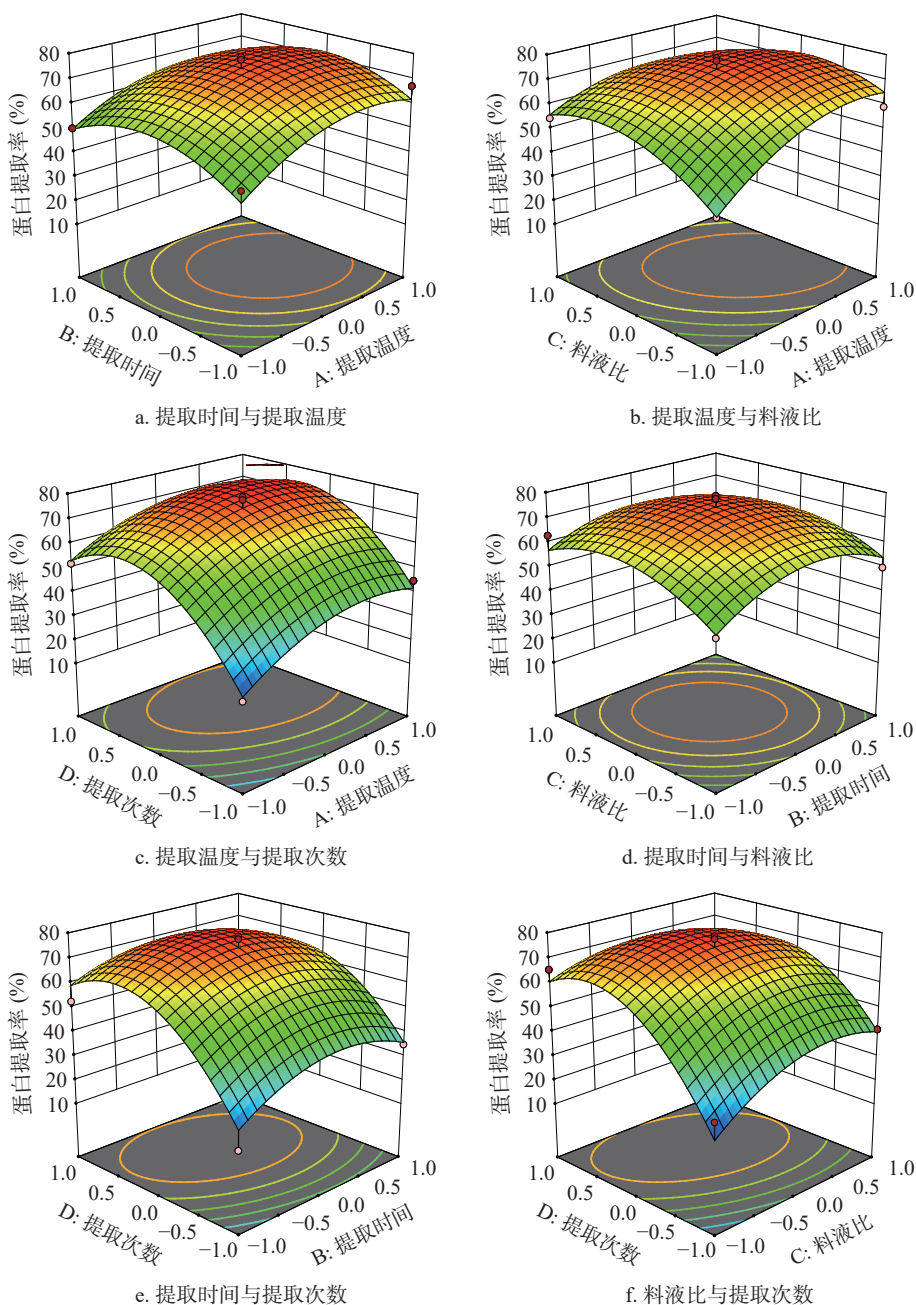


图6 各因素交互作用对富硒荷叶离褶伞菌丝体蛋白提取率的响应面图

Fig.6 Response surface of the interaction of various factors on the protein extraction rate of selenium-rich *Lyophyllum decastes* mycelia

褶伞菌丝体硒蛋白进行提取, 通过 3 次平行试验, 测得蛋白提取率为 75.13%, 相对误差为 2.36%, 证明优化的荷叶离褶伞菌丝体硒蛋白的最适提取工艺条件可行, 这与王莲芳等^[21] 研究富硒食用菌中蛋白得率为 30.17% 的结果不同, 在优化条件相同的同等条件下, 未富硒菌丝体中蛋白质提取率为 52.11%, 说明未富硒菌丝体中含有的蛋白含量低, 富硒能够提高菌丝体中的蛋白质含量^[23]。

2.5 富硒荷叶离褶伞菌丝体蛋白质中硒含量测定

富硒荷叶离褶伞菌丝体蛋白中硒含量为 63.87±4.18 μg/g。推测荷叶离褶伞菌丝体发酵过程中加入无机硒, 可以通过生物转化进入蛋白质中。

2.6 富硒菌荷叶离褶伞菌丝体蛋白质中氨基酸色谱分析

实验所测得氨基酸混合标准品的色谱图见图 7, 17 种氨基酸在选定的分离条件下, 可以达到很好的分离效果。荷叶离褶伞菌丝体富硒前后的蛋白质中均含有 14 种氨基酸(色氨酸在水解过程中遭到破坏), Cys 和 Lie 两种氨基酸含量未检出。富硒后菌丝体蛋白质中的氨基酸, 除 Pro 外, 其他氨基酸含量均比未富硒菌丝体中含量高, 其中 Ala 和 Lys 两种氨基酸含量较未富硒的菌丝体中含量高出一倍以上(表 4)。

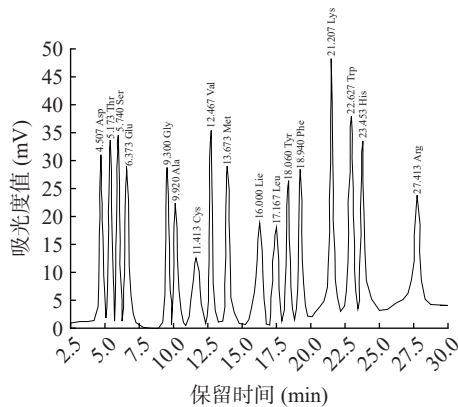


图 7 氨基酸标准品色谱图

Fig.7 Chromatogram of amino acid standard

富硒菌丝体蛋白中总氨基酸含量(TAA)和人体必需氨基酸的含量(EAA)分别为 51.18 和 17.20 g/100 g, 较未富硒中的含量高 20.33% 和 19.75%,

表 5 富硒前后荷叶离褶伞菌丝体蛋白质中必需氨基酸组成评价

Table 5 Analysis of AA content of protein in mycelia of *Lyophyllum decastes* before and after selenium enrichment

必需氨基酸种类	占总氨基酸的质量分数(%)			CS		AAS	
	FAO/WHO参考值(%)		FAO/WHO参考值(%)	未富硒菌丝体蛋白	富硒菌丝体蛋白	未富硒菌丝体蛋白	富硒菌丝体蛋白
	未富硒菌丝体蛋白	富硒菌丝体蛋白					
Thr	6.00	5.75	4.0	86.61	83.07	150.05	143.75
Leu	9.84	10.90	7.0	111.80	123.86	140.54	155.72
Val	8.0	7.30	5.0	110.93	100.99	160.40	146.00
Lys	3.14	4.37	5.5	49.03	68.31	51.95	72.35
Ile	0.00	0.00	4.0	0	0	0	0
Phe+Tyr	8.97	8.95	6.0	60.38	60.30	149.43	149.17
Met+Cys	2.29	2.03	3.5	41.66	36.90	65.46	58.00

表 4 富硒前后荷叶离褶伞菌丝体蛋白质中氨基酸组成及含量

Table 4 Analysis of AA content of protein in mycelia of *Lyophyllum decastes* before and after selenium enrichment

氨基酸种类	未富硒菌丝体蛋白质中氨基酸含量(g/100 g)	富硒后菌丝体蛋白质中氨基酸含量(g/100 g)	增加量(%)
Asp	5.03	5.39	7.16
Thr*	2.41	2.75	13.76
Ser	1.84	2.36	28.58
Glu	6.53	7.82	19.78
Pro	4.55	4.05	-11.04
Gly	2.77	3.07	10.78
Ala	3.11	5.00	60.98
Cys	0.00	0.00	0.00
Val*	3.22	3.49	8.62
Met*	0.92	0.97	4.96
Ile*	0.00	0.00	0.00
Leu*	3.95	5.21	31.79
Tyr	1.00	1.59	58.16
Phe*	2.60	2.69	3.68
Lys*	1.26	2.09	65.62
His	0.97	1.33	36.89
Arg	2.38	3.38	42.05
氨基酸总量(TAA)	42.53	51.18	20.33
必需氨基酸含量(EAA)	14.36	17.20	19.75
非必需氨基酸含量(NEAA)	28.17	33.98	
EAA/NEAA	0.51	0.51	

注: *号表示人体必需氨基酸。

EAA/TAA 的值为 33.61, EAA/NEAA 的值为 0.51, 与 FAO/WHO 提出的理想蛋白的标准进行判断, 荷叶离褶伞菌丝体富硒前后蛋白接近该标准, 说明荷叶离褶伞菌丝体富硒前后均具有一定的营养价值, 且硒能促进荷叶离褶伞菌丝体中大部分氨基酸的合成, 这和富硒姬松茸^[24]、松杉灵芝^[25] 菌丝体蛋白质中氨基酸含量变化的研究结果一致。

由表 4 可知, 富硒荷叶离褶伞菌丝体中必需氨基酸的含量为 33.61%, 和不富硒的菌丝体中必需氨基酸含量相当。由表 5 可知, 必需氨基酸 Thr、Leu、Phe+Tyr 占总氨基酸的质量分数比 FAO/WHO 提出的理想蛋白标准的高, Lys 和 Met+Cys 的质量分数比标准低。CS 越接近 100 分, 表明样品与鸡蛋蛋白越接近; AAS 越接近 100 分, 表明样品与 WHO/FAO

模式蛋白越接近。Lys、Phe+Tyr 和 Met+Cys 的 CS 较低,其他必需氨基酸均在 80 分以上,因此荷叶离褶伞菌丝体蛋白的限制性氨基酸为 Lys、Phe+Tyr 和 Met+Cys; Lys 和 Met+Cys 的 AAS 较低,其他必需氨基酸均超过 100,说明菌丝体具有良好的营养价值,且富硒菌丝体的营养价值更高一些。

3 结论

该研究采用目前在食用菌蛋白质提取中常采用的超声辅助碱提取蛋白法,通过单因素实验和 Box-benhkn 中心组合响应面试验法,对富硒荷叶离褶伞菌丝体中蛋白质进行了优化试验,确定了最佳提取工艺条件:提取时间 60 min、提取温度 60 ℃、液料比 200:1 g/mL、提取次数为 2 次,蛋白提取率为 76.90%。并且采用 3,3'-二氨基联苯胺分光光度法测定菌丝体蛋白质中的硒含量为 63.87 μg/g,通过添加无机硒进行发酵生产菌丝体,可以使硒进入菌丝体蛋白中。分析发现,富硒菌丝体中有 17 种氨基酸,其中必需氨基酸含量占 33.61%,和非必需氨基酸的比值为 0.5,氨基酸组成较为合理,荷叶离褶伞菌丝体富硒前后均具有很高的营养价值,富硒的营养价值更高,是一种优质的蛋白来源,且其中含有一定量的硒,大大提高菌丝体的营养价值和利用价值,这为富硒荷叶离褶伞菌丝体的进一步开发利用提供了可靠的理论依据,具有广阔的应用前景。

参考文献

[1] YE R H, HUANG J Q, WANG Z X, et al. Trace element selenium effectively alleviates intestinal diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 11708.

[2] 钟鸣,张月,马慧,等. DAN 荧光法等 3 种测定蛹虫草菌丝体中硒含量的方法比较[J]. *光谱实验室*, 2011, 28(2): 866-869. [ZHONG M, ZHANG Y, MA H, et al. Comparison of DAN fluorescence and two other analytical methods for determination of selenium content in cordyceps *Milit aris*[J]. *Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory*, 2011, 28(2): 866-869.]

[3] 赵旭,郝洁,何傲月,等. 硒蛋白硫氧还蛋白还原酶 2(TXN-RD2)在肿瘤组织中的表达及其对生存预后的影响[J]. *暨南大学学报(自然科学与医学版)*, 2023, 44(1): 1-13. [ZHAO X, HAO J, HE A Y, et al. The expression of selenoprotein thioredoxin reductase 2 (TXNRD2) in tumor tissues and its survival prognosis[J]. *Journal of Jian University (Natural Science & Medicine Edition)*, 2023, 44(1): 1-13.]

[4] 吕欣成,赵文文,孔祥辉. 富硒食用菌最新研究进展[J]. *现代食品*, 2022, 28(13): 29-33. [LÜ X Y, ZHAO W W, KONG X H. The latest research progress on selenium-enriched edible fungi[J]. *Modern Food*, 2022, 28(13): 29-33.]

[5] MARTIN A J, SIMPSON S, FAWCETT S, et al. Biogeochemical mechanisms of selenium exchange between water and sediments in two contrasting lentic environments[J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(7): 2605-2612.

[6] 戴玉成,周丽伟,杨祝良,等. 中国食用菌名录[J]. *菌物学报*, 2010, 29(1): 1-21. [DAI Y C, ZHOU L W, YANG Z L, et al. A revised checklist of edible fungi in China[J]. *Mycosystema*, 2010, 29(1): 1-21.]

[7] 刘娜,张敏,张鹏,等. 野生荷叶离褶伞菌株的鉴定及其生物

学特性研究[J]. *北方园艺*, 2023(9): 119-125. [LIU N, ZHANG M, ZHANG P, et al. Study on identification and biological characteristics of Wild *Lyophyllum decastes*[J]. *Northern Horticulture*, 2023(9): 119-125.]

[8] 张航,宋卿,林佳,等. 氨基酸自动分析仪法测定云南新鲜羊肚菌中 16 种氨基酸的含量[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(22): 7564-7569. [ZHANG H, SONG Q, LIN J, et al. Determination of 16 amino acids in fresh *Morchella esculenta* of Yunnan Province by amino acid automatic analyzer[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2019, 10(22): 7564-7569.]

[9] 席亚丽,茹爱丽,王晓琴,等. 荷叶离褶伞子实体、菌丝体及发酵液蛋白质营养价值评价[J]. *菌物学报*, 2010, 29(4): 603-607. [XI Y L, RU A L, WANG X Q, et al. Assessment for protein nutrition of fruit bodies, mycelia and fermentation broth of *Lyophyllum decastes*[J]. *Mycosystema*, 2010, 29(4): 603-607.]

[10] CHEN Xujun, LI Shuyi, CONG Xin, et al. Optimization of bacillus cereus fermentation process for selenium enrichment as organic selenium source[J]. *Nutrition and Food Science Technology*, 2020(9): 543873.

[11] 张承旭,张驰. 富硒蛹虫草的生物活性及产品应用研究进展[J]. *北方园艺*, 2022, 505(10): 124-129. [ZHANG C X, ZHANG C. Research progression biological activity and product application of selenium enriched *Cordyceps militaris*[J]. *Northern Horticulture*, 2022, 505(10): 124-129.]

[12] 高慧娟,冯九海,韩玉琦,等. 富硒荷叶离褶伞菌丝体中硒多糖提取工艺的优化及红外光谱分析[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(3): 151-158. [GAO H J, FENG J H, HAN Y Q, et al. Optimization of extraction technology and IR spectroscopy of Sepolyasaccharide from selenium-enriched *Lyophyllum decastes* mycelium[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2018, 44(3): 151-158.]

[13] 骆杨庆,吴增林,李升福,等. 响应面法优化玉米浸液蛋白提取工艺及单细胞蛋白发酵的研究[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(10): 231-237. [LUO Y Q, WU Z L, LI S F, et al. Study on extraction process of corn steep liquor protein by response surface methodology and single cell protein fermentation[J]. *Science and Technology of Food industry*, 2022, 43(10): 231-237.]

[14] 李理,朱璐,林国栋,等. 富硒乳酸菌的筛选及富硒发酵乳抗氧化活性研究[J]. *中国乳品工业*, 2022, 50(8): 9-14. [LI L, ZHU J, LIN G D, et al. Screening of selenium-enriched lactic acid bacteria and evaluation of antioxidant activity in selenium-enriched fermented milk[J]. *China Dairy Industry*, 2022, 50(8): 9-14.]

[15] 储烟阁,王德勤,匡艳辉,等. 基于 Box-Behnken 响应面设计结合熵权法优选当归四逆汤挥发油提取工艺[J]. *沈阳药科大学学报*, 2023, 40(7): 927-934. [CHU Y T, WANG D Q, KUANG Y H, et al. Optimization of volatile oil extraction process of Danggui Sini decoction based on Box-Behnken response surface design and entropy weight method[J]. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University*, 2023, 40(7): 927-934.]

[16] 张苏平,邱伟强,卢祺,等. 全自动氨基酸分析仪法测定 4 种贝类肌肉中谷胱甘肽和游离氨基酸含量[J]. *食品科学*, 2017, 38(4): 170-176. [ZHANG S P, QIU W Q, LU Q, et al. Determination of glutathione and free amino acids in muscles of four shellfish species by automatic amino acid analyzer[J]. *Food Science*, 2017, 38(4): 170-176.]

[17] 陈文,王湘君,赵阳,等. 酸水解-全自动氨基酸分析仪测定方格星虫中氨基酸[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(3): 299-304. [CHEN W, WANG X J, ZHAO Y, et al. Determination of amino acids from *Sipunculus nudus* by acid hydrolysis-automatic amino acid

- analyzer[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(3): 299-304.]
- [18] 王梓杭, 范秀芝, 姚芬, 等. 香菇蛋白的提取工艺优化、功能特性及氨基酸评价[J]. 现代食品科技, 2023, 39(6): 186-194. [WANG Z H, FAN X Z, YAO F, et al. Optimization of extraction, functional characteristic, and amino acid evaluation of *lentinula edodes* protein[J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(6): 186-194.]
- [19] YDEMIR L Y, YEMENICIOGLU A. Potential of Turkish Kabuli type chickpea and green and red lentil cultivars as source of soy and animal origin functional protein alternatives[J]. LWT-Food Science and Technology, 2013(50): 686-694.
- [20] 田敏爵, 李好. 富硒猴头菌中含硒蛋白提取工艺研究[J]. 现代农业科技, 2010(19): 320-322. [TIAN Minjue, LI Hao. Study on extracting technology of selenium-containing protein in selenium-enrichment *Hericium*[J]. Mod Agric Sci Technol, 2010(19): 320-322.]
- [21] 张倩, 张文博, 陈滢竹, 等. 榛蘑蛋白提取工艺的优化研究[J]. 中国调味品, 2023, 48(5): 118-124. [ZHANG Q, ZHANG W B, CHEN Y Z, et al. Optimization of extraction technology of protein from *Armillaria mellea*[J]. China Condiment, 2023, 48(5): 118-124.]
- [22] 王莲芳, 窦春霞, 张连富, 等. 富硒食用菌中硒蛋白提取工艺研究[J]. 食品与发酵工业, 2007(1): 122-126. [WANG L F, DOU C X, ZHANG L F, et al. Study on selenium containing protein extracting technology from selenium-enriched edible fungi[J]. Food and Fermentation Industries, 2007(1): 122-126.]
- [23] REZVAN R, HAMID R P, SHARAREH R et al. Interactive effects of selenium, zinc, and iron on the uptake of selenium in mycelia of the culinary-medicinal winter mushroom *Flammulina velutipes* (Agaricomycetes)[J]. Int J Med Mushrooms, 2023, 25(11): 75-87.
- [24] 杨淑云, 陈如登, 陈仁财, 等. 姬松茸富硒液体发酵条件优化及其菌丝营养成分分析[J]. 保鲜与加工, 2017, 17(3): 103-106. [YANG S Y, CHEN R D, CHEN R C, et al. Optimization of liquid fermentation conditions and analysis of mycelium nutrients of selenium-enriched *Agaricus blazei* Murill[J]. Storage and Process, 2017, 17(3): 103-106.]
- [25] 李昀峰. 亚硒酸钠对松杉灵芝生长发育及富硒效应的影响[J]. 辽宁林业科技, 2022, 312(2): 17-19, 78. [LI Yunfeng. Effects of sodium selenite on growth and selenium enrichment of *Ganoderma tsugae*[J]. Liaoning Forestry Science & Technology, 2022, 312(2): 17-19, 78.]