

凯氏定氮法测定松杉灵芝子实体水溶性多糖中蛋白质含量

陈凤清^{1,2}, 梁忠岩¹

(1. 东北师范大学, 吉林 长春 130024; 2. 白城师范学院, 吉林 白城 137000)

摘要:从松杉灵芝 (*Ganoderma tsugae* Murr) 子实体中提取出水溶性粗多糖 FA, 进一步纯化得 FA₂; 以凯氏定氮法测定其中蛋白质含量, 分别为 19.03% 和 4.07%。

关键词:凯氏定氮法; 蛋白质; 松杉灵芝子实体
中图分类号:Q51 **文献标识码:**A

蛋白质是复杂的含氮有机化合物, 分子量很大, 大部分高达数万至数百万, 分子的长链从数纳米至 100nm, 它们由 20 种氨基酸通过酰胺键以一定的方式结合, 并具有一定的空间结构, 所含的主要化学元素为 C、H、O、N, 在某些蛋白质中还含有 P、Cu、Fe、I 等元素, 但氮的相对丰度基本稳定, 是区别于其它有机化合物的主要标志。不同蛋白质的氨基酸构成比例及方式不同, 所以各种蛋白质其含氮量也不同。一般蛋白质含氮量平均为 16%, 即 1 份氮素相当于 6.25 份蛋白质, 此即蛋白质系数。我们利用蛋白质的这一特性, 主要采用微量凯氏定氮法测定松杉灵芝子实体水溶性多糖中蛋白质含量。

灵芝属真菌, 多为食、药两用大型真菌, 其子实体及菌丝体中含有的主要成分可分为十大类: 多糖类、核苷类、呋喃类、生物碱类、氨基酸及蛋白质类、三萜类、油脂类、甾醇类、无机离子、有机锗。目前有关灵芝化学成分的最新研究主要集中在多糖、三萜类及蛋白质上。研究认为, 多糖类化合物是灵芝中主要的活性成分之一, 具有抑制肿瘤细胞生长, 调节、提高人体免疫力, 降低胆固醇等功能^[1]。松杉灵芝 (*Ganoderma tsugae* Murr) 在我省长白山一带有广泛的分布, 我们对松杉灵芝子实体水溶性多糖进行结构研究 (结果另行发表) 时发

现, 在粗多糖和纯化后的单一级份多糖中都含有一定含量的蛋白质, 本文主要研究松杉灵芝子实体水溶性多糖中蛋白质含量的测定, 以进一步了解松杉灵芝的功能、药用价值、作用机理, 并为充分开发和利用长白山天然资源提供理论基础。

1 材料和试剂

1.1 材料

以采自于吉林省长白山的松杉灵芝为原材料, 从其子实体中提取出水溶性粗多糖 FA (由长春中医学院提供)。

1.2 试剂

硫酸钾、硫酸铜、氢氧化钠、甲基红、溴甲酚绿、浓硫酸、盐酸。均为分析纯、国产试剂。

1.3 实验仪器

凯氏定氮装置: 碱式滴定管、电子天平 (北京赛多利斯天平有限公司)、电热套 (武汉精华科教有限公司)、101—A 型数显式恒温干燥箱 (上海阳光实验仪器有限公司)、754 紫外分光光度计 (上海第二分析仪器厂)。

2 实验方法

2.1 粗多糖的分级与纯化^[2,3]

按照文献 [2, 3] 报道的方法, 将 FA 反复冻融后, 分别以 47%、57%、63% 的乙醇进行分级, 相应

收稿日期: 2005 - 03 - 10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39870847)

作者简介: 陈凤清 (1962 -), 女, 汉族, 吉林省白城市人, 讲师, 主要从事多糖生化研究工作。

得到三个级份,其中以 57%乙醇分级所得沉淀为主要级份,进一步纯化;经 Sevage 法脱蛋白、脱色素、Sephadex G-100 凝胶过滤,得 FA₂。

754 紫外分光光度仪在波长 280nm 处分别检测 FA 和 FA₂ 是否有光吸收。

2.2 凯氏定氮法测定多糖中蛋白质含量^[4]

2.2.1 消化 准确称取 300mg 糖样品定容至 50mL,从中取 5mL 放入 500mL 凯氏烧瓶中,加入混合催化剂(硫酸钾:硫酸铜=3:1),烧瓶置于电热套中加热进行消化,同时以蒸馏水做空白试验。

2.2.2 蒸馏 将凯氏烧瓶按蒸馏装置连好,取 10mL 2%硼酸和 1~2 滴指示剂,从漏斗中加入 30%NaOH 溶液 10mL,边加边摇动凯氏烧瓶,至烧瓶内液体变为深蓝色(再加入 5mL 蒸馏水),加热蒸馏至氨全部蒸出。

2.2.3 滴定 将上述馏出液用 0.01036mol/L 盐酸标准溶液滴定至蓝色变为微红色即为终点,记录盐酸溶液的用量,同时做一试剂空白。

2.2.4 蛋白质含量计算方法 计算公式为:

$$\text{蛋白质}(\%) = \frac{C \times (V_1 - V_2) \times M_N / 1000}{m} \times F \times 100$$

式中 C:盐酸溶液的浓度:mol/L;

V₁:滴定样品吸收液时消耗盐酸标准溶液的体积(mL);

V₂:滴定空白吸收液时消耗盐酸标准溶液的体积(mL);

F:蛋白质系数;

M_N:氮的摩尔质量(14.01g/mol);

m:样品质量(g)。

3 结果与讨论

松杉灵芝具有食用价值,作为食品,对其进行蛋白质含量的测定,是食品分析的主要内容之一,也是蛋白质结构分析的基础。凯氏定氮法是目前仍被广泛采用的测定生物样品中蛋白质含量的经典方法。本文采用的凯氏定氮法属于半微量定量测定蛋白质含量,是食品中蛋白质含量测定的国家标准^[5]。

本研究中,FA 经冻融、乙醇分级后,取其中以 57%乙醇分级所得沉淀为主要级份,进一步纯化,得 FA₂,754 紫外分光光度仪在 280nm 检测 FA 和 FA₂ 均有紫外吸收。凯氏定氮法测得 FA 中蛋白质含量是 19.03%,FA₂ 中蛋白质含量是 4.07%。

FA₂ 是由 FA 分级后纯化而得,在纯化中进行反复脱蛋白,仍能检测到 FA₂ 中蛋白质的存在;经苯酚-硫酸法测定 FA₂ 的糖分布,发现 FA₂ 中所含蛋白质的分布与糖相同,表明 FA₂ 中的蛋白质为结合蛋白质。

有关松杉灵芝子实体水溶性多糖中蛋白质的结构与氨基酸组成的分析有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 徐锦堂. 中国药用真菌学[M]. 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1997,501.
- [2] 梁忠岩,张翼伸. 斜顶菌中水溶性多糖的研究[J]. 高等学校化学学报,1983,4(3):364~365.
- [3] 梁忠岩. 树舌水溶性多糖 CF₂ 结构确定[J]. 生物化学杂志,1992,8(4):497.
- [4] 北京师范大学生物系. 基础生物化学实验[M]. 北京:高等教育出版社,1982,91~97.
- [5] 中华人民共和国国家标准. 食品卫生检验方法理化部分[S]. 北京:中国标准出版社,1996,21~22.

Determination of the protein content in a water - soluble polysaccharide of caput - medusa of *Ganoderma tsugae* Murr by Kjeldahl method

CHEN Feng - qing^{1,2}, LIANG Zhong - yan¹

(1. Northeast Normal University, Changchun 130024, P. R. China; 2. Baicheng Normal College, Baicheng 137000, P. R. China)

Abstract: A crude water - soluble polysaccharide FA isolated from the caput - medusa of *Ganoderma tsugae* Murr has been fractionated, so FA₂ was obtained by purification further. The protein content of FA and FA₂ were determined determination. One was 19.03% and another was 4.07%.

Key words: Kjeldahl method; protein; caput - medusa of *Ganoderma tsugae* Murr