

刺梨果渣栽培平菇过程中蛋白质含量变化研究

杨勇^{1,2,3}, 杨礼寿^{1,2}, 罗忠圣^{1,2*}

(1. 省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵州医科大学, 贵州贵阳 550025; 2. 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵州贵阳 550014; 3. 北京优和康生物医药科技有限公司, 北京 100176)

摘要 为充分利用刺梨果渣中的氮源, 利用刺梨果渣作为培养基主料栽培平菇, 通过凯氏定氮法, 研究不同阶段下培养基的蛋白质含量变化。结果表明, 刺梨果渣栽培平菇的生物学转化率为 126%, 刺梨果渣、刺梨果渣培养基、菌丝长满后培养基、平菇菌丝、子实体、菌糠的蛋白质含量分别为 8.05%、9.12%、12.68%、20.74%、19.90%、9.89%。证明刺梨果渣中的氮源可以满足平菇生长的需求。

关键词 刺梨果渣; 平菇; 凯氏定氮法; 蛋白质

中图分类号 S646.1⁴ **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2019)21-0051-02

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.21.016



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on the Changes of Protein Content in the Cultivation of *Pleurotus ostreatus* with Roxburgh Rose Fruit Residue

YANG Yong^{1,2,3}, YANG Li-shou^{1,2}, LUO Zhong-sheng^{1,2} (1. State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550025; 2. The Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province and Chinese Academy of Sciences, Guiyang, Guizhou 550014; 3. Beijing YouheKang Biomedical Technology Co., Ltd., Beijing 100176)

Abstract In order to make full use of the nitrogen source in the fructus rosae roxburghii pomace, fructus rosae roxburghii fruit residue was used as the main material to cultivate *Pleurotus ostreatus* in the experiment, and then the protein content variables of the medium under different stages were explored by Kjeldahl method. The results showed that the biological transformation rate of *Pleurotus ostreatus* cultivated *Pleurotus ostreatus* was 126%. The protein contents of fructus rosae roxburghii pomace, fructus rosae roxburghii pomace medium, mycelium overgrown medium, *Pleurotus ostreatus* hyphae, fruit body, bacillus were 8.05%, 9.12%, 12.68%, 20.74%, 19.90%, and 9.89%, respectively. Experiments have shown that the nitrogen source in the fructus rosae roxburghii pomace could meet the growth requirements of *Pleurotus ostreatus*.

Key words Epimedium dregs; *Pleurotus ostreatus*; Kjeldahl method; Protein

贵州刺梨资源丰富, 刺梨中富含维生素与矿物质。何照范等^[1]对刺梨果实的营养成分进行分析, 发现果实中含有多糖、有机酸、单宁等成分。刺梨果渣是刺梨果实经榨汁后, 所余下的固态部分, 包括果皮、果肉、果梗等。贵州省每年榨汁后的刺梨果渣约 1 000 t^[2], 刺梨果渣中剩余的功能性成分含量仍很高, 尤其是脂溶性成分及不溶性成分, 如粗蛋白、纤维素、黄酮类、三萜类等, 有再利用价值。李达等^[3]对刺梨果渣进行了成分分析, 发现刺梨果渣中含有水分 76.70%、灰分 0.86%、总糖 4.67%、单宁 0.16%、粗纤维 11.20%、蛋白质 4.21%。平菇是一种木腐生型的食用菌, 具有适应性强、对生长环境要求不高、营养价值高、生产成本低等优点, 将刺梨果渣用作平菇栽培, 不仅能产生经济效益, 同时能解决刺梨果渣带来的环境问题。

凯氏定氮法作为蛋白定量分析的经典方法, 该方法易于实现、简单可行, 且测试准确度较高, 但该方法存在检测过程较繁琐、费时^[4]、关键点控制不准等缺陷。特别是手动凯氏定氮法, 不仅耗时更长, 准确度与精密度受人为操作的影响较大, 稳定性、重复性与重现性相对较差。半自动或自动凯氏定氮法, 可以减小人为操作误差^[5], 缩短定量分析的时间。笔者使用刺梨果渣栽培平菇, 通过平菇的生物学转化率分析该栽培方式的可行性; 同时用 SKD-100 自动凯氏定氮仪分别对不同生长阶段的平菇及其培养料中蛋白含量进行测定,

分析其蛋白质含量的动态变化。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 刺梨果渣(贵州奇昂生物科技有限公司提供), 平菇栽培种(天然产物化学重点实验室提供); 普钙(过磷酸钙与石膏混合物)、石膏、尾矿、石灰粉、重质碳酸钙、玉米面、玉米芯、小麦、马铃薯、麸皮、麦秸秆、阔叶树木屑、棉籽壳; 浓硫酸(优级纯)、硼砂(优级纯)、硼酸、氢氧化钠、甲基红、溴甲酚氯、30%双氧水、硫酸铜、硫酸钾等试剂均为国产分析纯。

酸式滴定管(北京朋利驰科技有限公司), JKXZ06-20B 恒温消煮仪(上海能共实业有限公司), SKD-100 自动凯氏定氮仪(上海沛欧分析仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 平菇栽培。分别以通用培养基刺梨果渣培养基分别接种平菇栽培种, 平菇栽培方法参照单津津等^[6]的方法, 栽培出菇后计算平菇的生物学转化率^[7]。

1.2.2 蛋白质含量测定

1.2.2.1 试剂配制。试剂配制参照 GB/T 5009.5—2010《食品中蛋白质的测定》。

1.2.2.2 0.02 mol/L 硫酸标准溶液的滴定。采用减重法。准确称量干燥至恒重的优级纯硼砂约 100.0 mg, 置于 100 mL 锥形瓶中, 加 20 mL 水溶解, 滴加 2 滴甲基红指示液, 用硫酸溶液滴定至粉红色刚出现, 小心煮沸溶液至红色褪去^[8], 冷却至室温。继续缓慢滴定、煮沸、冷却, 直至刚出现的微红色在再加热时不褪色为止。平行测定 9 组, 取平均值作为硫酸标准溶液浓度。

1.2.2.3 样品消解。为保证 3 种样品消化完全且检测结果

基金项目 贵州省科技重大专项“刺梨资源高值化利用技术集成及产业化-刺梨高值化新产品研制及示范”(黔科合重大专项字[2013]6006-4)。

作者简介 杨勇(1989—), 男, 侗族, 贵州贵阳人, 硕士, 从事药物化学研究。*通信作者, 副主任药师, 从事健康产品研究与开发。

收稿日期 2019-04-23

能达到凯氏定氮法的最低检出限,精密称取干燥至恒重的供试品粉末各 2.00 g^[9],而称取 0.5 g 平菇菌丝与平菇粉末,分别置于消化管中,加入优级纯浓硫酸 10 mL,再加入催化剂粉末(硫酸铜 0.05 g,硫酸钾 1.5 g),适当摇匀,每个样品平行测定 9 组。并另取 3 支消解管,加入等量催化剂和 10 mL 放入消煮仪中,每一个消解管上放置一个小漏斗,350 ℃ 消解(从 100 ℃ 升温至 350 ℃,防止消解液暴沸),直至消解液澄清略带蓝绿色^[10]且无碳化物(约 4 h)后,加 30% H₂O₂^[11]冲洗消解管管壁,继续消化 20~30 min^[12],关闭消煮仪,冷却,用少量水冲洗漏斗^[13]和消解管,待测定。

1.2.2.4 蒸馏和吸收。检查凯氏定氮仪的蒸馏水桶和碱液桶水位(若不足,需补充蒸馏水和 400 g/L NaOH 溶液),打开冷凝水。取一支消解管,加入适量蒸馏水,放入凯氏定氮仪规定位置,并在吸收导管处放置加蒸馏水的吸收瓶,导管插入液面以下。设置蒸馏时间 4 min,加碱时间 0 s,冲洗^[14]管路 4 min,结束后,消解管的温度会降低,吸收瓶的蒸馏水会倒吸入消解管,则证明该管路气密性良好,可以进行蒸馏。

把装有样品的消解管放入凯氏定氮仪规定位置,并在吸收导管处放置盛有 40 mL 硼酸溶液的锥形瓶作为吸收瓶(加混合显色剂的硼酸作为吸收液),注意导管要接触硼酸液面

或液面以下。设置蒸馏时间 4 min,加碱时间 9 s。当蒸馏时间剩下 30 s 时,将吸收导管移除吸收液液面(防止吸收液倒吸),继续蒸馏至时间结束。蒸馏结束后,取下消解管和吸收瓶,用少量水冲洗吸收导管下端(没入液面以下部分),洗液一并并入吸收液中,冷却,待滴定。

测试完一种样品,应冲洗一次管路,防止上次试验残留的 NH₄⁺ 干扰^[15]下次测试样品的试验结果。

1.2.2.5 滴定。用标定过的硫酸标准溶液滴定吸收液,直至蓝色完全消失,略带灰色为滴定终点。记录消耗硫酸体积,计算蛋白质含量。蛋白质含量计算公式:

$$X = \frac{2(V_1 - V_2)c \times 14}{1000 m} \times F \times 100\% \quad [16]$$

式中, X 为蛋白质含量,%; c 为标准硫酸溶液浓度, mol/L; V₁ 为消耗盐酸的体积, mL; V₂ 为空白消耗盐酸的体积, mL; m 为称取样品的质量, g; F 为氮换算为蛋白质的系数 6.25。

2 结果与分析

2.1 平菇生物学转化率 由表 1 可知,刺梨果渣栽培平菇菌丝长势良好,平菇生物学转化率为 126%,高于通用培养基对照组的生物学转化率 108%。因此,证明应用刺梨果渣中的碳氮源能满足平菇的生长需求,同时能带来较高经济效益^[17]。

表 1 刺梨果渣栽培平菇的生物学转化率

Table 1 Bioaccumulation rate of *Pleurotus ostreatus* cultivated by epimedium dregs

品种 Varieties	每袋料平均干重 Average dry weight per bag/g	每袋平均产量 Average yield per bag/g	菌丝长满时间 Mycelium growth time/d	菌丝日均生长量 Daily growth of mycelium/cm	生物学转化率 Biological conversion rate/%
平菇(通用培养基) Mushroom (General medium)	340±5	367±5	28±1	0.62±0.05	108
平菇(刺梨果渣培养基) Mushroom (Roxburgh rose pulp medium)	340±5	428±5	25±1	0.69±0.05	126

2.2 平菇不同生长阶段的蛋白质含量 由图 1 可知,刺梨果渣、刺梨果渣培养基、菌丝长满时刺梨果渣培养基、菌丝体、平菇、完全出菇过后菌糠的粗蛋白含量分别为 8.05%、9.12%、12.68%、20.74%、19.90%、9.89%。其中二级种原种蛋白质含量最高,药渣中蛋白质含量最低。由于二级种、菌丝、菌糠与栽培底料混合在一起,因此其蛋白质含量与栽培底料的蛋白质含量有直接关系。菌丝的生长需要大量氮源^[18],出菇之后,氮源的需求量减少,可适当调低氮源所占百分比,同时调高碳源的百分比,有利于实现平菇的增产。平菇利用药渣中的氮源,但降解利用之后,菌糠的蛋白质含量并未变低,说明食用菌降解药渣并不能显著改变培养基质物料的蛋白质含量,但药渣的总质量发生了显著改变,说明平菇生长过程中,碳源需求量远高于氮源。

3 结论

刺梨果渣作为一种可循环利用的中药资源,不仅可应用于农业生产,还可以应用于饲料加工、污水处理^[19]、有机肥生产等工业方面,具有广泛的应用前景。该试验以刺梨果渣栽培平菇的生物学转化率为 126%,平菇蛋白质含量为 19.90%,营养价值与产率均较高,说明利用刺梨果渣栽培平菇是可行的。此方法不仅实现了对刺梨果渣资源的二次利用,

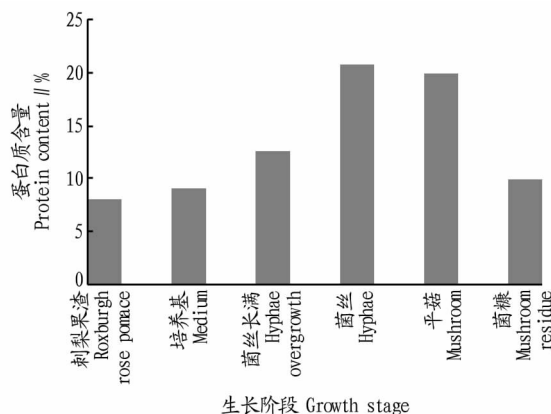


图 1 刺梨果渣栽培平菇不同生长阶段的蛋白质含量

Fig. 1 Protein content in the different growth stages of *Pleurotus ostreatus*

而且可以获得较高的经济效益,既降低了其带来的环境污染,也降低了平菇的生产成本,是一种高效的生态农业^[20]模式。

刺梨果渣、刺梨果渣培养基、菌丝长满时刺梨果渣培养基、菌丝体、平菇、完全出菇过后菌糠的粗蛋白含量分别为 8.05%、9.12%、12.68%、20.74%、19.90%、9.89%,说明菌丝(下转第 57 页)

率、蒸腾速率和气孔导度均呈负相关,这与赵永平^[17]在甜叶菊光合特性和产量品质中的研究结果一致。

各糖苷含量与产量的相关性分析结果表明,干叶产量与RA含量、RA/总苷、总苷含量呈正相关,与STV含量、RC含量呈负相关,这与石岩等^[19]研究结果不一致,可能是因为检测方法和材料不同所致;RA含量与STV含量表现为极显著负相关($r=0.957$),这与杨文婷等^[13]和石岩等^[19]的研究结果一致,可能是因为STV和RA性状连锁,且这2种物质在流动相中的相对保留时间相差较短,出现此消彼长的趋势,因此难以同时提高二者含量,又因为STV和RA的特性应用于不同领域,因此可用来选育专用型品种。

该研究根据市场需求和育种目标仅对含量较高的3种糖苷RA、STV和RC进行了检测,但该研究结果明确了这3种糖苷之间的关系,可以为选育食品添加剂领域的高RA品种和医药行业的高STV品种提供指导。为进一步系统、准确地阐明甜叶菊产量与品质之间的关系,检测其余几种糖苷含量并进行分析是下一步的研究工作。

通过Pearson相关系数分析各性状间的相关性。甜叶菊一级分枝数、单株鲜叶产量和单株干叶产量与干叶产量呈极显著正相关;净光合速率与蒸腾速率呈极显著正相关;干叶产量与各糖苷含量的相关性因糖苷种类而异,与RA呈正相关,与STV和RC呈负相关,均未达显著水平;光合生理指标与糖苷含量的关系中,RC含量与胞间CO₂浓度和叶绿素总量呈显著负相关,总苷含量与胞间CO₂浓度呈极显著负相关,其余指标间相关性不显著。

参考文献

[1] 林明睿. 甜叶菊高密度遗传图谱构建及其分子标记筛选[D]. 杭州:浙

江农林大学,2018.

- [2] 胡献丽,董文宾,郑丹,等. 甜菊及甜菊糖研究进展[J]. 食品研究与开发,2005,26(1):36-38.
- [3] 赵秀玲. 我国甜味剂甜菊糖苷发展状况[J]. 中国调味品,2009(5):110-113.
- [4] 吴则东,张文彬,吴玉梅,等. 世界甜叶菊发展概况[J]. 中国糖料,2016,38(4):62-65.
- [5] 彭涛,宋巧,张喜萍,等. 浅谈甜叶菊在食品中的应用[J]. 食品安全导刊,2017(30):141-142.
- [6] 赵磊,迟茜,林文轩,等. 甜叶菊废渣提取物的抗氧化和抗炎作用[J]. 中国食品学报,2018,18(8):8-15.
- [7] RIZWAN F, RASHID H U, YESMINE S, et al. Preliminary analysis of the effect of Stevia (*Stevia rebaudiana*) in patients with chronic kidney disease (stage I to stage III) [J]. Contemporary clinical trials communications, 2018, 12: 17-25.
- [8] 刘琼,潘芸芸,吴卫. 甜叶菊化学成分及药理活性研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2018,30(6):1085-1091.
- [9] 孔智伟,张强,陈荣强,等. 甜叶菊废渣发酵饲料对巴彘肉猪肌肉营养成分的影响[J]. 中国猪业,2018,13(7):60-62.
- [10] 张正鹏. 浅谈甜叶菊副产品的开发利用[J]. 中国糖料,2015,37(6):79-80.
- [11] 衡亚蓉,李晓,贺利,等. 基于上部叶片叶绿素荧光参数的小麦产量预测与评价[J]. 麦类作物学报,2018,38(6):701-709.
- [12] 李卫明. 不同品种谷子生育期、品质性状、光合特性与产量的关系研究[D]. 太谷:山西农业大学,2016.
- [13] 杨文婷,吴卫,蔡乾蓉,等. 甜叶菊新品系的主要农艺性状及糖苷含量比较[J]. 中国糖料,2011,33(3):26-29.
- [14] 杨振华,王致和. 甜叶菊引种鉴定试验[J]. 中国糖料,2013,35(3):57-58.
- [15] 谢忠清,何友萍,王致和. 甜叶菊覆膜精量点播机的研制[J]. 中国糖料,2016,38(3):52-54.
- [16] 谢忠清,逯晓敏,王致和,等. 河西地区甜叶菊扦插育苗技术[J]. 黑龙江农业科学,2018(11):175-178.
- [17] 赵永平. 灌溉和施肥对甜叶菊光合特性和产量品质的调控[D]. 兰州:甘肃农业大学,2014.
- [18] 郑本川,崔成,张锦芳,等. 甘蓝型油菜育种亲本单株产量与农艺性状相关性分析[J]. 植物遗传资源学报,2019,20(1):113-121.
- [19] 石岩,孙景文,邢海根. 甜叶菊高效栽培技术与实践[M]. 北京:中国农业出版社,2013:1-12.

(上接第52页)

体生长至出菇前,需要大量的氮源合成生物酶类^[21],在此阶段菌丝体细胞新陈代谢旺盛^[22],调整合理氮源比例,有利于提高菌丝的生长速度^[23]和平菇药用活性成分含量^[24],同时降低木霉菌感染^[25]的风险,为科学合理地利用植物废渣栽培平菇提供理论依据。

参考文献

- [1] 何照范,熊绿芸,国兴明,等. 刺梨果实的营养成分[J]. 营养学报,1988(3):262-266.
- [2] 樊卫国,夏广礼,罗应春,等. 贵州省刺梨资源开发利用及对策[J]. 西南农业学报,1997,10(3):109-115.
- [3] 李达,姜楠. 刺梨果渣成分分析及发酵前后不同成分含量的变化[J]. 农产品加工,2016(2):35-36,39.
- [4] 张佳程,褚庆环. 干酪中含氮物的快速测定方法[J]. 中国乳品工业,2004(7):26-29.
- [5] 周跃男,王湛,赵小川,等. 浅谈蛋白质含量的定量检测方法[J]. 食品研究与开发,2014,35(7):127-130.
- [6] 单金津,李伟,李齐激,等. 不同药渣对平菇多糖含量及抗氧化活性的影响[J]. 贵州农业科学,2015,43(7):151-154,158.
- [7] 张宇. 不同碳源对平菇生物学转化率的影响[J]. 安徽农业科学,2012,40(20):10403-10404.
- [8] 郭丰梅. 用于药物包衣材料的水性脲溶型聚丙烯酸树脂的合成和研究[D]. 济南:齐鲁工业大学,2014.
- [9] 李晴媛,徐晓娜. 饲料中粗蛋白含量的测定方法[J]. 中国畜牧兽医文摘,2013(2):197,190.
- [10] 冯媛. 用体外模拟法研究日粮氮硫比对绵羊瘤胃内环境参数、产气性能和养分降解率的影响[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2016.

- [11] 田春丽,介晓磊,刘曦,等. 硒锌与富啡酸施肥对紫花苜蓿产量、营养成分及氨基酸组成的影响[J]. 草业学报,2014,23(2):66-75.
- [12] 马丹. 凯氏定氮法测定食品中蛋白质含量[J]. 计量与测试技术,2008,35(6):57-58.
- [13] 张利霞. 黄淮麦玉两熟区小麦植株氮素吸收转运对氮肥及种植密度的响应[D]. 新乡:河南师范大学,2015.
- [14] 张庆波. 新型磷氮阻燃剂SPDAPT的合成及应用[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2009.
- [15] 袁炳秋,吕媛,马钰,等. 尿素、氯化铵、碳酸铵对牛奶样品微量凯氏定氮法的干扰[J]. 湖南师范大学自然科学学报,2010,33(1):66-70,128.
- [16] 章平泉,金殿明,杜秀敏,等. 自动凯氏定氮仪测定烟草及其制品中的总氮[J]. 烟草科技,2011(3):43-45.
- [17] 陈世昌,侯殿明,吴文祥,等. 梨园套种平菇对土壤生物活性及果实品质的影响[J]. 果树学报,2012,29(4):583-588.
- [18] 钟思敏,杜梅,陈往滨,等. 蛹虫草菌丝产虫草素液体培养条件的研究[J]. 菌物学报,2011,30(2):229-234.
- [19] 刘东燕,冯国建,罗云菊,等. 含水量对垃圾土中有机物降解的影响[J]. 地球与环境,2010,38(1):26-30.
- [20] 何露,闵庆文,张丹. 农业多功能性多维评价模型及其在应用研究:以浙江省青田县为例[J]. 资源科学,2010,32(6):1057-1064.
- [21] 盛占武,郑丽丽,高锦合,等. 香蕉纤维酶解脱胶工艺及脱胶纤维性能[J]. 农业工程学报,2014,30(10):277-284.
- [22] 张引芳,刘遐,陈建华,等. 杏鲍菇工厂化生产工艺研究[J]. 食用菌学报,2003,10(2):36-39.
- [23] 裴丽娟. 碱提松木层孔菌菌丝体多糖的结构及活性研究[D]. 长春:东北师范大学,2010.
- [24] 秦萌. 香菇多糖口服液的制备[D]. 长春:吉林农业大学,2015.
- [25] 曹现涛. 香菇菌棒腐烂病相关木霉鉴定与发生规律初步研究[D]. 武汉:华中农业大学,2015.