

獐子菌蛋白提取及水解蛋白肽抗氧化活性研究

朱中燕 肖欢 许程剑* 周宇 刘阳 林丹
四川旅游学院 食品学院, 中国·四川 成都 610100

摘要:以獐子菌作为原料,采用超声波微波辅助方法提取獐子菌蛋白,将提取的獐子菌蛋白进行酶解,制备蛋白肽,并通过 DPPH 和羟自由基清除率和还原力的测定,研究其抗氧化活性。正交试验设计得出獐子菌蛋白的最佳工艺条件,料液比(W/V)1:30,超声温度 50℃,超声时间 70min, pH11.0,超声功率 100W,微波功率 100W,獐子菌蛋白的得率为 15.22%。蛋白酶解得到蛋白肽,通过还原力的测定,确定獐子菌水解蛋白肽有一定的抗氧化活性, DPPH 和羟自由基($\cdot\text{OH}$)清除测定抗氧化活性对比, DPPH 自由基清除能力较强, $\cdot\text{OH}$ 清除能力比较稳定。

关键词:獐子菌; 蛋白提取; 超声波微波; 水解蛋白肽; 抗氧化活性

Extraction of Saarcodon Imbricatum Karst Protein and Research on Antioxidant Activity of Hydrolyzed Protein Peptides

Zhongyan Zhu Huan Xiao Chengjian Xu* Yu Zhou Yang Liu Dan Lin

Food College of Sichuan Tourism University, Chengdu, Sichuan, 610100, China

Abstract: Saarcodon imbricatum Karst was used as raw material to extract protein by ultrasonic-assisted method. The extracted Saarcodon imbricatum Karst protein was enzymolized to prepare protein peptide, and its antioxidant activity was studied by measuring the scavenging rate of DPPH and hydroxyl free radical and reducing power. The optimal process conditions to produce water Saarcodon imbricatum Karst protein were obtained through orthogonal experimental design. solid-liquid ratio (W/V)1:30, ultrasonic temperature 50℃, ultrasonic time 70 min, pH 11.0, ultrasonic power 100 W, microwave power 100 W, the yield of Saarcodon imbricatum Karst protein was 15.22%. The protein peptide was obtained by enzymolysis. Through the determination of reducing power, it can be determined that the hydrolyzed protein peptide of Saarcodon imbricatum Karst has certain antioxidant activity. Compared with the scavenging ability of DPPH and hydroxyl free radical ($\cdot\text{OH}$), the scavenging ability of DPPH free radical was stronger, and the scavenging ability of $\cdot\text{OH}$ was stable.

Keywords: Saarcodon imbricatum Karst; protein extraction; ultrasonic microwave; hydrolyzed protein peptide; antioxidant activity

1 引言

獐子菌又名翘鳞肉齿菌、仲帽、獐头菌、黑虎掌菌,生长于高山针叶林中,属于一种树木的生菌根^[1]。中国分布于云南、西藏、甘肃、新疆、青海等地区,四川主要分布在甘孜地区,国外在德国和日本分布范围较广^[2]。獐子菌含钾,磷,硫,铁和钙等矿物质较高,是一种高蛋白,低脂肪的营养食品,并且含有人体必需的 7 种氨基酸,总量可达 208.7g/kg^[3-5]。獐子菌不仅味道鲜美,而且富含氨基酸、蛋白质、维生素、膳食纤维及多糖等生物活性物质,具有免疫调节、抗菌、抗氧化、抗肿瘤、解毒、清除自由基和降血糖等多种功能,是一种具有良好经济价值和开发前景的食用菌^[6-9]。

水解蛋白肽是活性肽的一种,具有特殊人体生理功能的肽类物质,这种肽相比与蛋白质,其结构小,且利于消化和吸收^[10,11];蛋白酶解物及其活性肽类物质,能作为氨基酸供体,并且在体内可作为生物调节剂,在体内参与机体的免疫调节,具有降血压和抗血栓等作用^[12]。目前,关于蛋白酶解物及活性肽的产品研究、开发比较深入,越来越多的生

物活性肽已被发现、分离并确定其结构。在日本以活性肽为功能因子,已经开发了各种低抗原食品,如流动食品、婴儿食品、运动食品、促钙吸收食品、降压食品等一系列的产品,取得了良好的社会效益、经济效益^[13,14]。

目前,国内外关于獐子菌蛋白的提取与抗氧化肽制备的研究较少,本研究通过碱溶酸沉的原理,采用超声波微波辅助提取的方法,对獐子菌蛋白进行提取,通过单因素和正交实验确定最佳提取条件,最大程度的提高獐子菌蛋白的得率。獐子菌蛋白通过碱性蛋白酶酶解得到獐子菌水解多肽,分析其抗氧化活性。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

原料:人工栽培的獐子菌,购自四川省甘孜州。

试剂:氯仿、正丁醇、2,2 联苯基-1,1- 苦基肼基(DPPH)、维生素 C、无水乙醇、ABTS 溶液、过硫酸钾、盐酸、磷酸缓冲液、硫酸亚铁、过氧化氢、水杨酸、碱性蛋白酶(酶活 200000u/g)、考马斯亮蓝、牛血清蛋白、铁氰化钾、磷

酸氢二钠、磷酸二氢钠。

2.2 仪器与设备

FW177 中草药粉碎机, 天津市泰斯特仪器有限公司; XH-300B 微波-超声波组合萃取仪, 北京祥鹤科技发展有限公司; HC-3018R 高速冷冻离心机, 安徽中科中佳科学仪器有限公司; RE-2000B 旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂。SCIENTZ-12N 冷冻干燥机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; UV6100S 扫描型紫外风光光度计, 上海美谱仪器有限公司。

2.3 实验方法

2.3.1 獐子菌蛋白的提取工艺

獐子菌子实体烘干、粉碎并过 80 目筛, 按料液比 1 : 30 的混合均匀, 1mol/L NaOH 调节 pH 为 10.0, 在超声功率 200W, 微波功率 150W, 温度为 50℃条件下, 超声时间为 1h。离心取上清液用 1mol/L HCl 调节 pH 为 4.3, 离心得到沉淀, 反复水洗 3 次后将得到的獐子菌蛋白冷冻干燥, 得到獐子菌蛋白粉末。

2.3.2 獐子菌蛋白的提取单因素实验

以獐子菌蛋白得率为指标, 设定料液比 1 : 30、超声功率 200W、微波功率 150W、提取温度 50℃、提取时间 60min、pH10.0 为基准条件, 固定其他因素及相应水平, 考察料液比 (1 : 10g/mL、1 : 20g/mL、1 : 30g/mL、1 : 40g/mL、1 : 50g/mL)、微波功率 (100W、150W、200W、250W、300W)、超声功率 (100W、150W、200W、230W、280W)、提取温度 (20℃、30℃、40℃、50℃、60℃) 和提取时间 (40min、50min、60min、70min、80min)、pH (8、9、10、11、12) 对獐子菌蛋白得率的影响。

2.3.3 正交实验

根据单因素实验结果, 以料液比、提取温度、提取时间、pH 值、超声功率、微波功率为自变量, 以蛋白得率为指标, 确认最佳提取工艺, 正交实验因素水平设计见表 1。

表 1 正交实验因素水平设计表

水平	因素					
	A 料液比 (g/mL)	B 温度 (℃)	C 时间 (min)	D pH	E 超声功率 (W)	F 微波功率 (W)
1	1:20	20	40	10	100	100
2	1:30	50	70	11	230	200
3	1:40	60	80	12	280	250

2.3.4 蛋白质含量的确定^[15]

取 0.5mL 待测液, 加水 0.5mL, 加入 5mL 考马斯亮蓝 G-250 溶液摇匀, 放置 2min, 于波长 595nm 处测吸光度值, 以牛血清蛋白(BSA)为标准溶液。按式(1)计算蛋白质含量:

$$X = \frac{(c - c_0) \times V}{m \times 1 \times 1000} \times 100 \quad (1)$$

式中, X 为试样中蛋白质的含量, 单位为克每百克 (g/100g); c 为从标准曲线中得到的蛋白质浓度, 单位为

毫克每毫升 (mg/mL); c_0 为空白试验中蛋白质浓度, 单位为毫克每毫升 (mg/mL); V 为最终液样定容体积, 单位为毫升 (mL); m 为测试所用试样质量 (g)。

2.3.5 獐子菌蛋白酶解工艺条件

将獐子菌蛋白粉末按照 1.5% 浓度复溶, 用 0.1mol/L 的 NaOH 调节至 pH 为 9.0, 添加碱性蛋白酶 (4000u/g), 在 50℃酶解下进行超声酶解 2h 时间, 沸水浴灭酶 10min, 冷却后, 在 5000r/min 离心 15min, 得到水解蛋白肽溶液。

2.3.6 水解度测定^[16]

取 8.0mL 的蛋白酶解液, 加入 60mL 蒸馏水, 0.05mol/L 的 NaOH 调节 pH 为 8.2, 加入 10mL 甲醛溶液, 用 0.5mol/L 的 NaOH 调节 pH 为 9.2, 记录消耗的 0.5mol/L 的 NaOH 的体积为 V。取未酶解的相同浓度的蛋白质溶液重复以上步骤, 记录消耗的 0.5mol/L 的 NaOH 的体积为 V_0 。

$$DH(\%) = C \times (V - V_0) \times \frac{0.014}{N} \times 100\% \quad (2)$$

式中, C——氢氧化钠标准溶液的浓度;

V——酶解液消耗氢氧化钠标准溶液的体积 (mL);

V_0 ——空白消耗氢氧化钠标准溶液的体积 (mL);

0.014——氮的毫克当量;

N——底物样品总氮含量 (g)。

2.3.7 水解蛋白肽的抗氧化活性

① DPPH 自由基清除^[17]。

取不同浓度的样品溶液 1mL 与 1mL 0.1mmol/L 的 DPPH 溶液混合、振荡, 在温室下避光放置 30min, 然后在波长 517nm 处测定吸光度值, 以维生素 C 作为阳性对照。

DPPH 自由基清除率计算公式如下:

$$DPPH \text{ 自由基清除率}(\%) = \left[1 - \frac{(A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}})}{A_{\text{空白}}} \right] \times 100\% \quad (3)$$

式中, A_c 为对照组吸光值; A_i 为样品组吸光值; A_j 为空白组吸光度值。

② 羟自由基 ($\cdot OH$) 清除^[18]。

取 0.5mL 9mmol/L 的 $FeSO_4$ 溶液和 1.0mL 8.8mmol/L H_2O_2 溶液混合, 使其发生 Fenton 反应, 生成 $\cdot OH$ 。取 1.0mL 不同浓度样品溶液加入 Fenton 反应体系中, 再加入 9mmol/L 水杨酸溶液 1mL, 混合均匀, 37℃水浴 1h, 于 510nm 处测定吸光度。以维生素 C 作对照, 按下式计算 $\cdot OH$ 清除率:

$$\cdot OH \text{ 清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0} \right) \times 100 \quad (4)$$

式中, A_0 为对照组的吸光度; A_1 为样品组的吸光度; A_2 为空白溶液的吸光度。

③ 还原能力^[19]。

不同浓度的样品溶液与 2.5mL 磷酸缓冲溶液 (0.2m, pH 为 6.6), 再加入 1% 铁氰化钾 2.5mL, 50℃水浴中反应 20min, 冷却至室温, 加入 10% 三氯乙酸溶液 2.5mL。取

2.5mL 反应液，再加入 2.5mL 蒸馏水和 0.1% 氯化铁溶液 0.5mL，波长 700nm 处测定吸光度，以抗坏血酸作为对照。

2.3.8 统计分析

采用 Origin 8.5 软件作图，IBM SPSS Statistics 26.0 进行正交试验设计，采用 Design Expert 13 软件进行响应面分析。

3 结果分析

3.1 蛋白提取单因素实验结果

3.1.1 料液比对蛋白得率的影响

由图 1 可知，随着料液比的升高，獐子菌蛋白的得率整体呈上升趋势后下降的趋势，料液比较低时，样液浓度高，蛋白质溶出率较低，故而降低了蛋白的得率。随着料液比增加，样液浓度下降，蛋白的溶出率提高，在 1 : 30 时达到最高 11.58%，此时溶质的扩散动力最大，易于从原料扩散到提取液中，当大于此范围时，蛋白已基本溶出，继续增加料液比，会使蛋白质部分结构被破坏，致使蛋白的提取率降低。

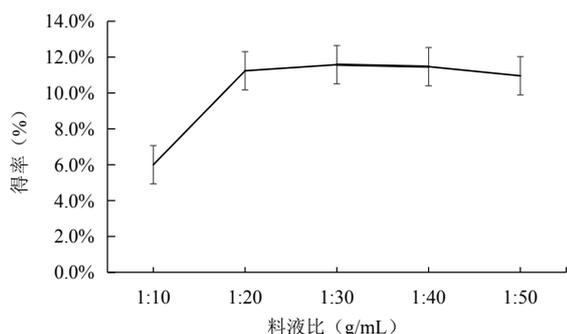


图 1 料液比对蛋白得率的影响

3.1.2 提取温度对蛋白得率的影响

提取温度对蛋白得率的影响如图 2 所示，在 40℃ ~60℃ 的范围内，蛋白质得率随着提取温度的升高先增大再减小，在浸提温度 50℃ 时，到达最大得率 11.13%。由于提取温度的升高，有利于蛋白质分子和水分子的相互作用，增加了蛋白质的溶解性，从而提高了蛋白质的得率；但提取温度过高会导致蛋白质受热变性，使部分已溶出的蛋白质发生交联和聚合，降低蛋白质的溶解度，使提取率下降^[20]。

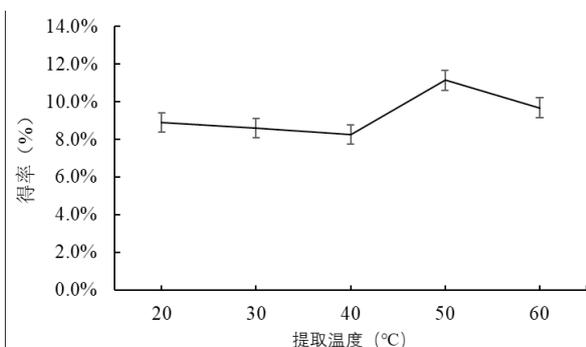


图 2 提取温度对蛋白得率的影响

3.1.3 提取时间对蛋白得率的影响

如图 3 所示，随着浸提时间增加，獐子菌蛋白得率缓慢升高后又明显降低，在浸提时间为 70min 时，蛋白得率达到最大为 11.28%。浸提时间较短獐子菌蛋白未充分溶解；随着浸提时间逐渐增加，獐子菌蛋白的溶出率增加，蛋白得率增加；而当浸提时间过长时獐子菌蛋白得率降低，是因为蛋白质出现凝聚沉淀^[21]。

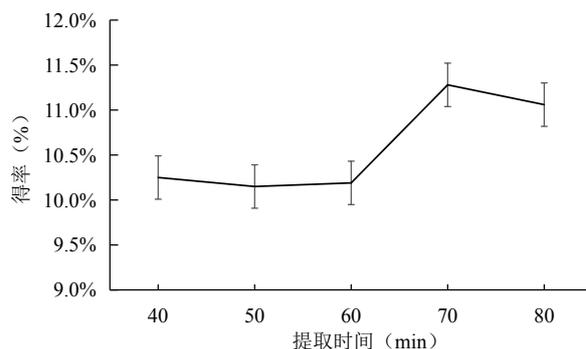


图 3 提取时间对蛋白得率的影响

3.1.4 pH 对蛋白得率的影响

pH 对獐子菌蛋白提取率的影响如图 4 所示，随着 pH 的增加，獐子菌蛋白的得率也缓慢升高，在 pH 为 11.0 时蛋白质的得率达到最大 10.30%，这是由于高浓度碱液破碎了獐子菌的细胞壁，使内部大量的蛋白分子溶出；pH 大于 11.0 后，蛋白得率反而降低，可能因为 pH 过高破坏蛋白质结构，使蛋白质变性或水解，从而使蛋白沉淀，降低蛋白得率。

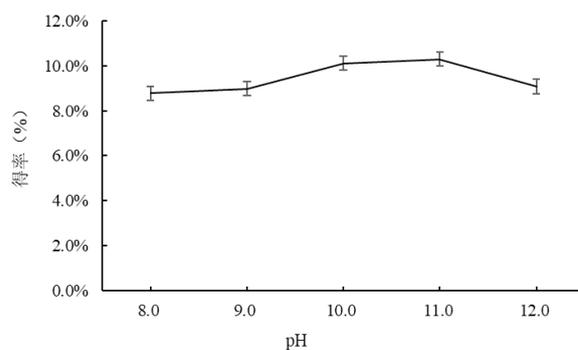


图 4 pH 对蛋白得率的影响

3.1.5 超声功率对蛋白得率的影响

如图 5 所示，蛋白质得率随超声功率的增大先增加后降低，在超声功率为 230W 时，蛋白得率达到最大 14.63%。由于超声波可直接作用于分子，随着超声功率的增大，样液中的各分子运动加剧，快速破坏细胞壁，使蛋白质能更迅速的被分离出来。当超声功率过大时，蛋白质溶解度降低，可能是因为过度展开的 SPI 分子之间通过疏水相互作用，形成部分不溶性的聚集体，进而导致蛋白溶解度的下降^[22]，从而影响蛋白得率。

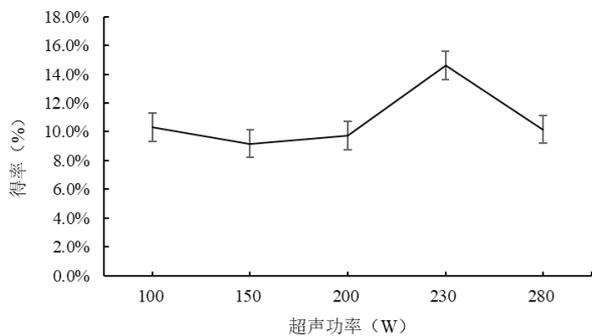


图 5 超声功率对蛋白得率的影响

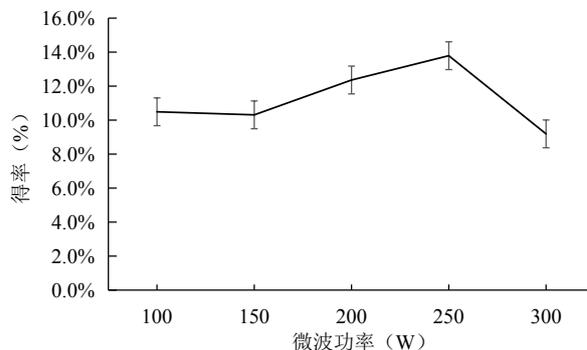


图 6 微波功率对蛋白得率的影响

3.1.6 微波功率对蛋白得率的影响

微波功率对獐子菌蛋白得率的影响如图 6 所示，蛋白质得率随微波功率的增大呈先增加后降低的趋势，在微波功率 250W 时，蛋白得率达到最大 13.79%。在微波的作用下，蛋白分子中的肽键和某些氨基酸侧链等极性基团会产生相关、有序地振动，使蛋白质的结构变得松散，有利于蛋白质的溶出，使蛋白得率增加。但随着微波功率的增加，蛋白质变性程度加深，疏水基团暴露出来，疏水残基相互作用形成网络结构，使蛋白质溶解度降低；进而使蛋白得率降低^[23]。

3.2 正交实验结果及分析

在单因素实验结果的基础上，采用正交实验确定獐子菌蛋白最佳提取工艺，正交实验结果与分析见表 2。

经极差分析可知， $R_D > R_C > R_E > R_F > R_A > R_B$ ，因此影响蛋白提取得率大小的因素依次为： $D > C > E > F >> A > B$ ，即 pH 值 > 提取时间 > 微波功率 > 超声功率 > 料液比 > 提取温度。提取獐子菌蛋白质的最佳条件为 $A_2B_2C_2D_2E_1F_1$ ，即料液比 (W/V) 1 : 30，超声温度 50℃，超声时间 70min，pH 为 11.0，超声功率 100W，微波功率 100W。经验证实验，该处理条件下，提取獐子菌蛋白的最高得率为 15.22%，为最佳提取工艺条件。

表 2 提取条件优化正交实验结果与分析

序号	A 料液比 (g/ml)	B 温度 (°C)	C 时间 (min)	D pH	E 超声功率 (W)	F 微波功率 (W)	得率
1	1	1	1	1	1	1	0.0929
2	1	1	2	1	2	3	0.1111
3	1	2	1	3	3	2	0.1199
4	1	2	3	3	1	3	0.1283
5	1	3	2	2	3	1	0.1297
6	1	3	3	2	2	2	0.0834
7	2	1	2	3	3	2	0.1242
8	2	1	3	3	2	1	0.1484
9	2	2	1	2	2	3	0.0349
10	2	2	2	2	1	1	0.1522
11	2	3	1	1	1	2	0.1401
12	2	3	3	1	3	3	0.117
13	3	1	1	2	3	3	0.1112
14	3	1	3	2	1	2	0.1161
15	3	2	2	1	2	2	0.1326
16	3	2	3	1	3	1	0.1376
17	3	3	1	3	2	1	0.1352
18	3	3	2	3	1	3	0.1482
K1	0.111	0.117	0.106	0.122	0.13	0.133	
K2	0.119	0.118	0.133	0.105	0.108	0.119	
K3	0.13	0.126	0.122	0.134	0.123	0.108	
R	0.019	0.009	0.027	0.029	0.022	0.025	
SS	0.001	0	0.002	0.003	0.002	0.002	
排序	$D > C > F > E > A > B$						

3.3 獐子菌蛋白水解蛋白肽

蛋白的水解度为 11.72%，水解度与酶种类、添加量、酶解时间、酶解温度、pH 等因素有关。蛋白质水解度越大，样液中的水解蛋白肽越多，可用于开发具有抗氧化、降压、抗菌等改善生物功能的营养食品或功能性食品。

3.4 獐子菌蛋白的抗氧化能力的测定

由图 7 可知，随着獐子菌蛋白溶液浓度增大，对 DPPH 自由基的清除率、羟自由基的清除率增加。因为獐子菌蛋白溶液浓度增大，水解度越大，这时具有抗氧化作用的活性肽段不断的暴露出来，DPPH 自由基和羟自由基清除能力增强，即抗氧化作用增强。还原力曲线呈现缓慢上升状态，说明獐子菌蛋白溶液浓度越大，吸光度值越大。而样品吸光值与样品的总还原力呈正相关，同样也与样品抗氧化性呈正相关。因此，可以推测水解蛋白肽含量越多，总还原力越强，而抗氧化性也越强。由 DPPH 自由基清除、·OH 自由基清除和还原力试验可知，獐子菌水解蛋白肽具有一定的抗氧化活性。

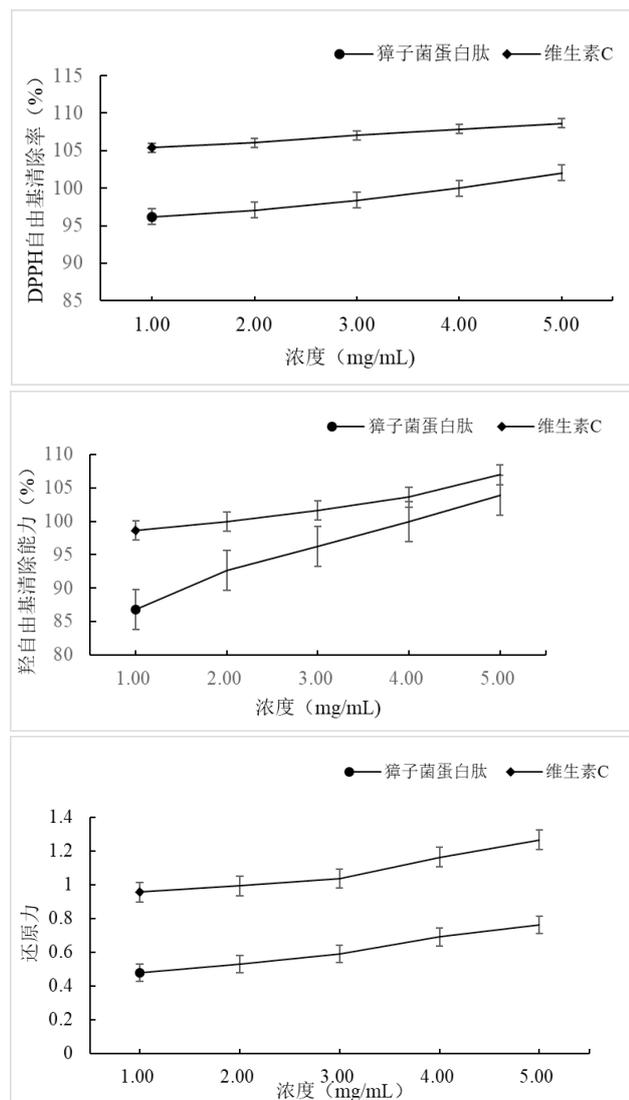


图 7 不同浓度獐子菌蛋白肽溶液对抗氧化能力测定

4 结语

采用碱溶酸沉超声-波微波辅助方法提取獐子菌蛋白，以獐子菌蛋白得率为指标，通过单因素和正交实验确定了最佳工艺条件为：料液比（W/V）1 : 30，超声时间 70min，超声温度 60℃，pH 为 12.0，超声功率 280W，微波功率 100W。在此条件下制得獐子菌蛋白。将提取的獐子菌蛋白用碱性蛋白酶进行酶解得到蛋白肽，通过 DPPH 自由基清除率、羟自由基（·OH）清除能力和还原力的测定，发现水解蛋白肽具有抗氧化活性。研究獐子菌水解蛋白肽并将其应用于食品工业，为食品行业提供一种新的可利用资源。

参考文献:

- [1] 丁祥,侯怡铃,秦航,等.翘鳞肉齿菌多糖的分离纯化及抗氧化活性的研究[J].西南师范大学学报(自然科学版),2015,40(6):37-42.
- [2] 刘影,丁祥,侯怡铃.獐子菌多糖SIK-1的结构鉴定及其生物活性研究[J].生物技术,2020,30(5):465-472.
- [3] 冯颖,赵雨芳,陈晓鸣,等.翘鳞肉齿菌营养成分分析及价值评价[J].林业科学研究,1998(5):4.
- [4] 张丙青,陈健.黑虎掌菌营养成分的测定与评价[J].食品科学,2011,32(9):299-302.
- [5] 赵雨霁,王琦.翘鳞肉齿菌化学成分和药理活性研究概况[J].食用菌学报,2014(3):77-82.
- [6] 吴智艳,闫训友.灰树花生理活性物质的研究进展[J].食用菌,2006(6):1-2.
- [7] MENG Q R, CHEN Z H, CHEN F, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides from *Hemerocallis citrina* and the antioxidant activity study[J]. Journal of Food Science,2021,86(7):3082-3096.
- [8] 李聪,王稳航.食用菌膳食纤维研究的新进展[J].中国食品添加剂,2015,140(10):159-164.
- [9] Barros L, Baptista P, Correia D M, et al. Fatty acid and sugar compositions and nutritional value of fine wild edible mushrooms from Northeast Portugal[J]. Food Chem,2007,105(1):140-145.
- [10] 彭晨.酶解鲫鱼蛋白制备生物活性肽的研究[D].天津:天津科技大学,2013.
- [11] 李艳红.鹰嘴豆蛋白酶解物的制备及其抗氧化肽的研究[J].江南大学,2008.
- [12] 艾冰花,李秉钧.蛋白酶解物抗氧化活性及其作用机理研究进展[J].齐鲁渔业,2015(1):4.
- [13] 孔祥珍,华欲飞,张彩猛.酶法水解制备植物蛋白肽粉的研究[J].中国油脂,2013,38(1):16-19.
- [14] 翟晓娜,裴海生,梁亮,等.菜籽肽的酶法制备,分离纯化及生物功能特性研究进展[J].河南工业大学学报(自然科学版),2022(4):43.
- [15] 顾宇,杨雪,徐晨希,等.以总多糖,粗脂肪及蛋白质为指标的黑龙江省不同产区五味子品质评价[J].中国中医药科技,2022(3):29.
- [16] 周慧江,朱振宝,易建华.核桃蛋白水解物水解度测定方法比较[J].粮食与油脂,2012,25(2):28-30.

- [17] Xu R, Ye H, Sun Y, et al. Preparation, preliminary characterization, antioxidant, hepatoprotective and antitumor activities of polysaccharides from the flower of tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. *Food & Chemical Toxicology An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*,2012,50(7):2473-2480.
- [18] Xie L, Shen M, Wen P, et al. Preparation, characterization, antioxidant activity and protective effect against cellular oxidative stress of phosphorylated polysaccharide from *Cyclocarya paliurus*[J]. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*,2020(145):111754.
- [19] 杨一山,柴胜丰,唐健民,等.鹅毛玉凤花总多糖提取工艺优化及抗氧化活性研究[J].*广西科学院学报*,2022,38(2):188-196.
- [20] 杨杰,王佩环,刘石生.橡胶籽蛋白提取工艺研究[J].*中国油脂*, 2013,38(8):22-25.
- [21] 陈飞平,周家华,常虹,等.籽粒苋籽蛋白质的提取工艺研究[J].*食品工业*,2013,34(1):1-4
- [22] 李笑笑,孙东晓,张祎,等.高场强超声波对大豆分离蛋白溶解性的改善作用[J].*现代食品科技*,2021,37(6):6.
- [23] 李永恒,田双起,赵仁勇,等.微波辅助碱法提取麦胚蛋白及其功能特性的研究[J].*河南工业大学学报(自然科学版)*,2018,39(4): 14-19.

作者简介: 朱中燕(1993-),女,中国重庆人,硕士,助理实验师,从事食品活性成分及风味物质研究。

通讯作者: 许程剑(1978-),男,中国安徽庐江人,博士,从事食品质量与安全研究。

基金项目: 不同加工烹饪方式对松茸营养成分变化规律与风味物质形成机理的研究,项目编号: 2023PY02; 四川特色食用菌在餐饮中应用与创新团队,项目编号: 20SCTUTY03。