

# 姬松茸低聚肽的制备及性质

张艳荣<sup>1</sup>, 王大为<sup>1</sup>, 张雅媛<sup>1</sup>, 刘婷婷<sup>1</sup>, 李 玉<sup>2</sup>

(1. 吉林农业大学食品科学与工程学院, 2. 农学院, 长春 130118)

**摘要** 采用超临界 CO<sub>2</sub> 萃取对姬松茸进行脱脂处理后, 用微波提取姬松茸多糖, 以脱脂脱多糖的姬松茸为原料, 采用双酶法制取姬松茸低聚肽, 并对姬松茸低聚肽的抗氧化能力进行了研究. 结果表明, Alcalase 2. 4L 碱性蛋白酶的最佳酶解条件为: pH = 8. 5, 温度 55 °C, 酶解时间 2 h, 底物浓度 5%, 酶用量 1. 5%, 肽得率为 74. 7%. Flavourzyme 风味蛋白酶最佳酶解的条件为: pH = 7. 0, 温度 50 °C, 时间 1. 5 h, 酶用量为 4%, 最终肽得率为 80. 6%. 姬松茸低聚肽分子量集中在 5600 以下, 人体必需氨基酸含量为 50. 91% (质量分数). 姬松茸低聚肽对邻苯三酚自氧化具有明显的抑制作用, 抑制率为 35. 6%.

**关键词** 姬松茸; 低聚肽; 蛋白酶解; 抗氧化

**中图分类号** O629

**文献标识码** A

**文章编号** 0251-0790(2009)02-0293-04

姬松茸(*Agaricus blazei murill*)别名小松菇, 又称巴西蘑菇, 属担子菌纲, 伞菌目, 蘑菇科, 蘑菇属<sup>[1]</sup>, 是一种食药菌, 具有抑制肿瘤、降胆固醇和提高机体免疫力等功效. 目前我国已成为世界姬松茸三大生产国之一. 姬松茸蛋白含有 40% 以上的人体必需氨基酸, 是制备食用菌多肽或低聚肽的良好原料. 低聚肽易消化吸收, 具有独特的功能和生理活性, 被广泛地应用于医药、保健食品生产等领域. 姬松茸所含脂肪中以亚油酸为主的多不饱和脂肪酸占 70% 以上. 姬松茸子实体脂质成分腹腔注射对小白鼠艾氏腹水癌有消退效果<sup>[2, 3]</sup>. 姬松茸多糖因具有较强的抗肿瘤活性, 受到国内外有关学者的广泛关注.

目前, 对姬松茸加工主要是利用热水浸提或有机溶剂等方法提取粗多糖, 其它成分尚未充分利用, 且萃取物有机溶剂污染及蛋白变性均较严重, 再利用价值较低. 本研究采用超临界 CO<sub>2</sub> 低温萃取技术, 脱除姬松茸中脂质及色素等脂溶性成分, 萃取物与萃余物均无有机溶剂残留, 最大限度地保留了原料中功效成分的活性, 可获得高纯度姬松茸功能性油脂. 采用微波萃取技术对脱脂姬松茸进行多糖提取, 在提高多糖得率的同时使姬松茸蛋白适度变性, 以脱脂提糖后的姬松茸蛋白为原料, 采用双酶法制取低聚肽, 充分利用姬松茸蛋白质资源, 为姬松茸高附加值综合利用提供了新的途径.

## 1 实验部分

### 1.1 材料、试剂与主要仪器

姬松茸购于吉林农业大学食用菌基地; CO<sub>2</sub> 购于长春市氧气厂, 纯度为 99. 99%; Alcalase 2. 4L 碱性蛋白酶和 Flavourzyme 风味蛋白酶为丹麦诺维信公司产品; Sephadex G-25 葡聚糖凝胶为 Sigma 公司产品; 酪氨酸和牛血清白蛋白为中国惠世生化制剂有限公司产品; 中性胰岛素注射液(MV5600)为丹麦诺和诺生物制剂有限公司产品; 其它试剂均为国产分析纯化学试剂.

SH10A 水分快速测定仪, 上海恒平科学仪器有限公司; RE-52AA 旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; PHS-3BW 电脑数显酸度计, 上海理达仪器厂; HZS-HA 水浴振荡器, 哈尔滨市东联电子技术有限公司; CT15RT 快速冷冻离心机, 上海天美科学仪器有限公司; UV2300 紫外-可见光分光光度计, 上海天美科学仪器有限公司; HDL-A 紫外检测仪, 上海金达生化仪器有限公司; WF-250 型万能粉碎机, 上海蓝深制药机械有限公司; HA 121-50-02 型超临界 CO<sub>2</sub> 萃取装置, 南通超临界萃取有限公司.

收稿日期: 2008-04-22.

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划(批准号: 2006BAD27B07)资助.

联系人简介: 李 玉, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事菌物学及产品开发研究. E-mail: xcyfzx@163. com

## 1.2 实验过程

1.2.1 酶解原料预处理 姬松茸呼吸作用强烈, 采摘后易发生褐变、开伞、发粘, 甚至腐败变质, 因此采后应立即用流动水快速漂洗, 沥干, 在 50 °C 以下真空干燥至水分质量分数小于 10%, 粉碎备用. 在压力 25 MPa、温度 35 °C、时间 100 min 及 CO<sub>2</sub> 流量 30 L/h 的条件下对姬松茸干燥粉末进行超临界 CO<sub>2</sub> 萃取脱脂处理, 萃取后姬松茸含脂率小于 0.1%. 然后在微波功率 700 W, 微波时间 6 min, 固液质量体积比为 1:20, 在姬松茸粉粒度为 0.125 mm 条件下微波处理提取姬松茸多糖, 使蛋白质适度变性. 在微波功率 800 W 及时间 7 min 下对脱脂提糖后的姬松茸粗蛋白残渣进行干燥处理, 然后粉碎至粒度为 0.125 mm 的粉末备用.

1.2.2 姬松茸低聚肽的制备 利用 Alcalase 2.4L 碱性蛋白酶对原料进行第 1 次酶解, pH = 8.5 不变, 以耗碱量(水解度)和肽得率为考察指标, 采用正交试验法研究温度(50, 55 及 60 °C)、酶解时间(1.0, 1.5 及 2.0 h)、底物质量分数(3%, 5% 及 7%)及酶质量分数(1.5%, 2.0% 及 2.5%)对酶解效果的影响. 将第 1 次酶解液在 5 °C 及 5000 r/min 条件下离心分离, 煮沸 5 min 灭酶, 真空浓缩, 以其为底物, 利用 Flavourzyme 风味蛋白酶进行第 2 次酶解, 以酶解液肽含量和脱苦效果为考察指标, 采用正交试验法研究温度(50, 55 及 60 °C)、时间(1.0, 1.5 及 2.0 h)、pH(6.5, 7.0 及 7.5)及酶用量(3%, 4% 及 5%)对酶解效果的影响<sup>[4]</sup>. 酶解液离心分离、灭酶条件同上. 将 2 次酶解所得酶解液经 0.25 μm 的微滤膜澄清处理后, 通过 Sephadex G-25 葡聚糖凝胶柱层析纯化处理, 所得姬松茸肽液在温度 55 °C, 压力 0.08 MPa 条件下, 真空浓缩到原来体积的 1/3 左右, 装盘, 料层厚度不超过 3 cm, 置于冷冻干燥机内预冷至料温 -25 °C 以下, 开始升温, 干燥仓压力 5 Pa, 冷阱温度 -50 °C, 以物料温度达到 20 °C 为干燥终点, 冷冻干燥得到姬松茸肽粉末制品.

1.2.3 分析与检测 蛋白质、脂肪、总糖等常规成分检测参照有关国家标准进行; 水解度检测采用 pH-stat 滴定法<sup>[5]</sup>; 肽含量检测采用福林-酚法<sup>[6]</sup>; 姬松茸低聚肽氨基酸组成及含量采用高效液相法和紫外检测法测定<sup>[7]</sup>; 分子量分布采用 G-25 葡聚糖凝胶层析及紫外检测, 柱径 1.6 cm, 填料高度 55 cm; 检测波长 280 nm, 洗脱液为双蒸水; 流速为 1 mL/min, 上样量 1 mL.

1.2.4 姬松茸低聚肽性质 采用邻苯三酚自氧化法对姬松茸低聚肽的抗氧化性进行初步研究<sup>[8,9]</sup>. 在 4.5 mL 0.1 mol/L 的 Tris-盐酸缓冲溶液(pH = 8.2, 内含 1 mmol/L EDTA)中加入 0.1 mL 姬松茸肽液(1 mg/mL), 在 25 °C 恒温水浴中保温 10 min, 加入 0.1 mL 同温度的邻苯三酚(4.5 mmol/mL), 混匀后迅速置于干燥的石英比色皿中, 在 320 nm 下, 每隔 30 s 测定一次 OD 值. 以等体积去离子水代替姬松茸低聚肽液做空白对照实验. 抑制率  $I(\%) = [(\Delta A - \Delta A_0) / \Delta A_0] \times 100\%$ , 式中  $I$  表示抑制率,  $\Delta A$  表示加入肽液后邻苯三酚的自氧化速率,  $\Delta A_0$  表示加入肽液前邻苯三酚的自氧化速率. 自氧化速率定义为每分钟光密度值的变化.

按保健食品功能实验标准方法对姬松茸低聚肽的保肝、降脂、免疫及抗疲劳作用进行了研究<sup>[10]</sup>.

## 2 结果与讨论

### 2.1 Alcalase 2.4L 碱性蛋白酶对姬松茸蛋白的水解

酶解初期水解度随着时间的延长而增加, 随着酶解反应的进行, 底物浓度减小, 反应位点逐渐被酶分子饱和, 继续延长时间, 水解度增长缓慢, 酶解 2 h 后出现降低现象. 温度升高加快分子的热运动, 增加反应物碰撞接触机会, 提高反应速率. 但温度升高 60 °C 以上时酶逐渐变性而失活, 酶反应速率下降. 当酶用量超过 1.5% 时, 耗碱量(水解度)及肽含量均无明显提高. 当底物质量分数小于 5% 时, 底物分子与酶分子接触及结合的机会减少, 酶解反应减弱甚至停止, 酶解液耗碱量减少, 水解度降低. 另外, 高水分含量的酶解产物给后续的浓缩带来困难. 当底物质量分数大于 5% 时, 反应体系黏度较大, 流动性差, 不利于操作, 底物和酶活性部位接触机会减少, 水解度降低. 实验结果表明, 各因素对酶解效果影响的强弱次序为: 酶解时间 > 酶解温度 > 酶浓度 > 底物浓度. 当温度 55 °C、酶解时间 2 h、底物质量分数 5%、酶与底物比 1.5% 及耗碱量为 5.32 mL 时, 酶解效果最好, 姬松茸肽得率为 74.7%.

## 2.2 Flavourzyme 对姬松茸蛋白的水解

Alcalase 2.4L 碱性蛋白酶对姬松茸蛋白进行水解可获得较为理想的肽得率, 但由于其三、四级结构被破坏, 原来隐藏在分子内部的疏水性氨基酸如亮氨酸、异亮氨酸及缬氨酸等暴露在分子表面, 赋予制品较强的苦味, 影响姬松茸肽在食品中的应用. 采用 Flavourzyme 风味蛋白酶对经 Alcalase 2.4L 蛋白酶作用所得的酶解液进行 2 次酶解, 不仅可对产物起到矫味修饰作用, 同时可进一步提高酶解程度. 正交试验时各因素对 Flavourzyme 蛋白酶酶解作用影响强弱次序为: pH 值 > 酶解时间 > 酶解温度 > 酶用量. 当温度 50 ℃、时间 1.5 h、pH 7.0 及酶用量为 4% 时, 酶解效果最好, 肽得率为 80.6%. 研究表明, 随着酶用量的增加和时间的延长, 肽得率及脱苦效果均有所增强, 但时间过长易引起杂菌污染, 使酶解液腐败变质. Flavourzyme 水解产物较清澈, 苦味较弱, 无异味.

## 2.3 姬松茸低聚肽氨基酸组成及含量

经检测姬松茸低聚肽中肽质量分数 94.2%, 总糖 0.1%, 水分 5.2%, 灰分 0.5%. 从图 1 及表 1 可知, 姬松茸低聚肽富含赖氨酸、酪氨酸、蛋氨酸, 必需氨基酸含量 50.91%. 图 2(A) 和 (B) 分别表示胰岛素标准品和姬松茸肽的分子量分布曲线. 姬松茸肽液按分子量大小分为 3 个组分 [见图 2(B) 中

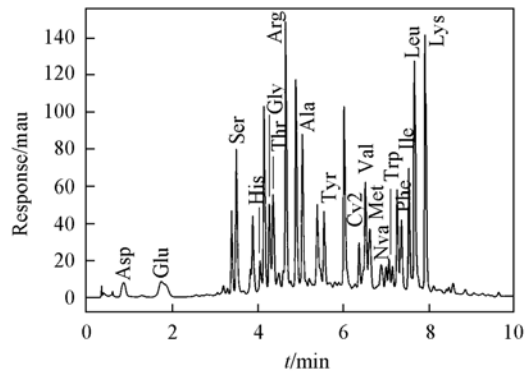


Fig. 1 Amino acid spectrum of *Agaricus blazei* oligopeptides

Table 1 Comparison of amino acid from *Agaricus blazei* oligopeptides

Essential amino acid	Mass fraction (%)	Essential amino acid	Mass fraction (%)	Nonessential amino acid	Mass fraction (%)	Nonessential amino acid	Mass fraction (%)
Thr	3.88	Met	5.25	Ser	4.21	Ala	2.46
Leu	5.05	Lys	6.58	Gly	1.74	His	4.83
Phe	6.29	Ile	3.69	Cys	—	Pro	8.09
Ser	3.57	Val	3.45	Asp	2.36	Arg	2.04
				Glu	5.54	Tyr	5.14

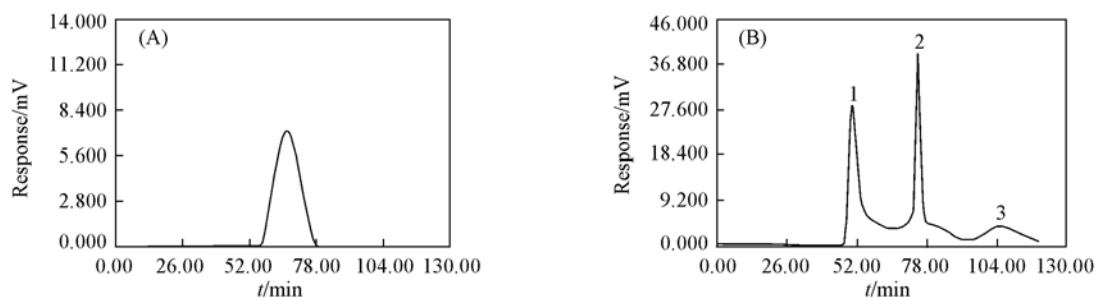


Fig. 2 Molecular weight distribution curves of insulin(A) and *Agaricus blazei* oligopeptides(B)

1, 2, 3 峰], 各组分的分离效果较好. 对比胰岛素凝胶分离的出峰时间和洗脱体积可知, 姬松茸低聚肽分子量小于 5600.

## 2.4 姬松茸低聚肽的抗氧化性

邻苯三酚在碱性条件下迅速自氧化, 释放出  $O_2^-$ , 生成有色中间产物. 中间产物的累积在滞后 30~40 s 后与时间成线性关系, 在 320 nm 有强烈吸收. 加入姬松茸低聚肽可清除超氧阴离子, 阻止中间产物的积累, 实验证明姬松茸低聚肽具有抗氧化活性, 对邻苯三酚的抑制率为 35.6% (见图 3).

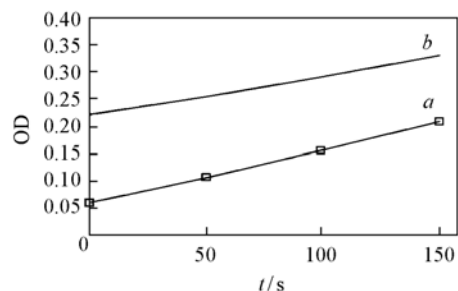


Fig. 3 Inhibitory effect of *Agaricus blazei* peptide on pyrogallol acid

a. Autoxidation velocity of pyrogallol acid; b. autoxidation velocity of pyrogallol acid with *Agaricus blazei* peptide.

## 2.5 姬松茸低聚肽的功能

姬松茸低聚肽能明显降低高血脂模型动物血清 T-CHO 和 TG 含量, 对高血脂模型大鼠血清中 HDL-C 含量的降低有明显的抑制作用, 对 LDL-C 含量的升高有明显的降低作用; 能明显的提高动物肝脏 SOD 水平, 降低肝脏 MDA 含量; 对高脂饮食所致小鼠血脂升高所致肝脂肪蓄积有明显的改善作用; 能明显增加小鼠脾、胸腺脏器系数, 增加小鼠单核巨噬细胞系统吞噬功能, 延长小鼠在水中的存活时间。功能实验结果显示, 姬松茸低聚肽具有一定的保肝、降脂、免疫及抗疲劳作用。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] HUANG Da-Bin(黄大斌), LI Kai-Ben(李开本), CHEN Ti-Qiang(陈体强). China Mushroom(中国食用菌)[J], 1994, **13**(2): 12—15
- [ 2 ] LIN Yan-Jin(林炎金). Mushroom(食用菌)[J], 1994, (5): 11
- [ 3 ] WEI Xiu-Jian(魏秀俭), ZHANG Wen-Hui(张文会), GUO Yan(郭彦). China Food and Nutrition(中国食物与营养)[J], 2005, (10): 23—24
- [ 4 ] WANG Da-Wei(王大为), WU En-Qi(吴恩奇), TOLGOR Bau(图力古尔). Food Science(食品科学)[J], 2007, **28**(9): 245—249
- [ 5 ] XIAO Kai-Jun(肖凯军), GAO Kong-Rong(高孔荣), ZENG Qing-Xiao(曾庆孝). Guangzhou Food Industry Science and Technology(广州食品工业科技)[J], 1995, **11**(2): 5—10
- [ 6 ] GAO Ying(高英), YU Yu-Zhong(俞玉忠). Channal Pharmacy(海峡药学)[J], 2004, **16**(6): 57—58
- [ 7 ] YANG Yan-Jun(杨严峻). Food Analysis(食品分析)[M], Beijing: China Light Industry Press, 2002, 253—300, 425—565
- [ 8 ] LU Yang(卢阳), WANG Feng-Yi(王凤翼), KONG Fan-Dong(孔繁东). Journal of Dalian Institute of Light Industry(大连轻工业学院学报)[J], 2001, **20**(4): 257—259
- [ 9 ] XU Li(徐力), LI Xiang-Lu(李相鲁), WU Xiao-Xia(吴晓霞), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2004, **25**(3): 466—469
- [ 10 ] ZHENG Jian-Xian(郑建仙). Functional Foods(功能性食品)[M], Beijing: China Light Industry Press, 306—521

## Preparation, Characterization and Properties of *Agaricus blazei* Murill Oligopeptide

ZHANG Yan-Rong<sup>1</sup>, WANG Da-Wei<sup>1</sup>, ZHANG Ya-Yuan<sup>1</sup>, LIU Ting-Ting<sup>1</sup>, LI Yu<sup>2\*</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, 2. College of Agronomy,  
Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

**Abstract** *Agaricus blazei* Murrill fruit polysaccharides was extracted by microwave technology after supercritical CO<sub>2</sub> fluid extracting. *Agaricus blazei* Murill oligopeptide were manufactured through proteolysis of two kind protease after degreasant and polysaccharide-free, and the antioxidation activity of oligopeptide was preliminary studied. The results show that the optimum hydrolyzing conditions of Alcalase 2.4L are pH = 8.5, temperature 55 °C, concentration of substrate is 5%, time is 2 h, the amount of enzyme is 1.5%, the yield of peptide is 74.7%. The optimum hydrolyzing conditions of Flavourzyme are pH = 7.0, temperature 50 °C, time is 1.5 h, enzyme concentration 4%, the final peptide yield reached 80.6%. *Agaricus blazei* Murrill oligopeptide is rich in Pro, Lys, Phe, the content of essential amino acid(EAA) is 50.91%, the molecular weight below 5600. The anti oxidation activity of *Agaricus blazei* Murrill oligopeptide has obviously activity of antioxidant, the suppression rate is 35.6%.

**Keywords** *Agaricus blazei* Murill; Oligopeptide; Proteolysis; Antioxidation

(Ed.: H, J, Z)