

松茸子实体活性多肽提取工艺

张倩, 班颖珏, 张海婷, 陈啸天, 柳春雨, 张玮丹, 习泽, 林英*
(沈阳农业大学, 沈阳 110866)

摘要: 松茸是一种珍稀的食药菌类, 由于其具有抗癌、抗肿瘤、抗病毒、提高免疫力等功效受到广泛关注, 再加之松茸是松栎等树木外生的菌根真菌, 数量稀少, 因而被誉为“菌种之王”。本文针对松茸子实体, 通过设计单因素试验以及正交试验探究出松茸活性肽的最佳提取条件, 即在料水比为 1:12, 水醇比为 1:2, pH 值为 9, 28℃ 的条件下提取 10 h, 得到的多肽含量较多。

关键词: 松茸; 组织分离; 基因鉴定; 多肽提取

中图分类号: Q946.1

文献标识码: A

文章编号: 1003-8701(2017)04-0055-04

The Extraction Process of Bioactive Peptides of *Tricholoma matsutake*

ZHANG Qian, BAN Yingjue, ZHANG Haiting, CHEN Xiaotian, LIU Chunyu, ZHANG Weidan, XI Ze, LIN Ying*
(Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: Matsutake is a rare edible fungus. It has received widespread attention for its anticancer, antitumor, antiviral and improve immunity. On the other hand, matsutake is the mycorrhizal fungi of pine, oak trees and other exogenous, which make it sparse in quantity, therefore it is known as "Spawn King." Aiming at matsutake, through the designing of single factor test and orthogonal test, the optimum extraction conditions of active peptides of *Tricholoma matsutake* was found in the paper. With the ratio of material to water 1:12, water to alcohol 1:2 and under the pH 9 condition, 10h of the extraction at temperature of 28℃, more content of polypeptide could be extracted.

Key words: *Tricholoma matsutake*; Tissue isolation; Gene identification; Peptide extraction

松茸 [*Tricholoma matsutake*(Ito et Imai)Sing.] 是一种纯天然的稀有食药菌类, 被誉为“菌中之王”, 属担子菌门(Basidiomycota)、担子菌纲(Basidiomycetes)、伞菌目(Agaricales)、口蘑科(Tricholomataceae)、口蘑属(*Tricholoma*), 又叫松菇、松菌、合菌、松口蘑、台菌^[1], 松茸名称的由来要追溯到日本平安时代以前, 因其生长在松林地, 菌蕾状如鹿茸而得名^[2]。松茸是松栎等树木外生的菌根真菌, 主要分布在北回归线以北到北纬 50° 左右的栎松林中^[3], 在我国主要分布在东北地区、四川西南地区以及云南、广西、贵州、山西、西藏等地。松茸由于具有的独特浓郁香味, 口感似鲍鱼, 鲜嫩爽滑等特点, 因而在亚洲高端料理产业中具有

极高的地位, 特别受到日本等国家的推崇。松茸的组成成分也较为复杂, 含有多糖、多肽、甾类、萜类、油脂以及多种酶等物质, 相关研究表明松茸具有良好的生物活性和药用价值, 可以起到抗肿瘤、抗病毒、抗糖尿病、提高免疫力、美白等作用^[4-5]。目前对松茸方面的研究已经形成一种热潮, 本文主要是对松茸活性肽最佳提取工艺的研究。

1 试验材料

1.1 菌株

松茸: 由沈阳农业大学生物科学技术学院实验室提供。

1.2 药品

牛血清蛋白(BSA)、无水乙醇、考马斯亮蓝 G-250、95% 乙醇、85% 磷酸、dd H₂O。

1.3 仪器

组织捣碎机、分析天平、恒温水浴锅、低温高速离心机、UV-2600 型紫外分光光度计、可控温冰箱。

收稿日期: 2017-05-27

基金项目: 辽宁省大学生创新项目(201610157052); 沈阳农业大学大学生创新项目(2016-136)

作者简介: 张倩(1994-), 女, 在读本科, 主要从事微生物活性物质提取研究。

通讯作者: 林英, 女, 博士, 副教授, E-mail: 99linying@163.com

2 松茸子实体多肽的提取

2.1 溶液的配制

(1)蛋白质标准溶液配制:精确称取 100 mg BSA 粉末,再量取 100 mL dd H₂O,溶解,定容,-4℃保存。

(2)显示剂溶液的配制:精确称取 100 mg 的考马斯亮蓝 G-250 粉末,加入 50 mL 95% 无水乙

醇,充分溶解后加入 100 mL 85% H₃PO₄ 后用 dd H₂O 定容至 1 000 mL。

2.2 标准曲线的制作

分别取 6 支洁净试管按表 1 配制相应的标准溶液,配制完成后再分别向其中加入 5 mL 的显示剂溶液,混匀后静置 2 min,于 595 nm 的分光光度计下测定其吸光值(A),根据吸光值绘制相应的标准曲线图,见图 1。

表 1 标准溶液配制

编号	0	1	2	3	4	5
标准蛋白溶液(mL)	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8
蛋白质量(mg)	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8
蒸馏水(mL)	1.0	0.9	0.8	0.6	0.4	0.2
总体积(mL)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

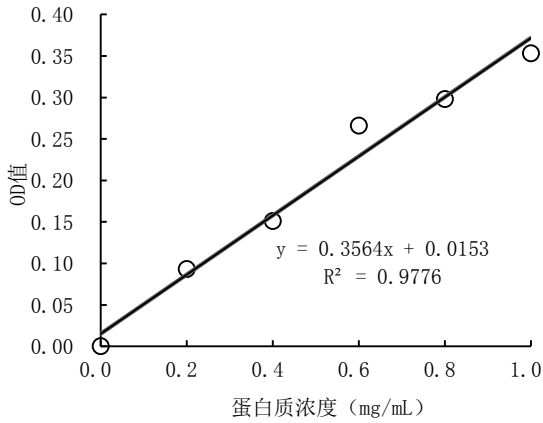


图 1 标准曲线

2.3 单因素试验设计

将松茸子实体干燥粉碎后称取 1 g 粉末,根据设定的不同料水比向其中加入不同体积的 ddH₂O 并放置在不同温度下进行提取,过滤取其上清液后加入不同浓度的乙醇溶液沉淀、静置 24 h,离心(5 000 r/min×30 min)后取上清液即为水醇溶物,分别取 1 mL 加入 5 mL 的显示剂在 UV-2600 型紫外分光光度计下测定其各自的吸光值与标准曲线相对比即能测定出该水醇溶液中肽类物质的含量。本试验分别以提取温度、提取时间、料水比、乙醇浓度、pH 值做单因素试验,确定不同的试验条件对松茸子实体多肽的提取量是否会产生影响,具体的试验设计如表 2 所示。

表 2 单因素试验设计

提取温度(℃)	提取时间(h)	料水比(W:V)	水醇比(V:V)	pH 值
4	2	1:6	1:1	5
28	4	1:8	1:1.5	6
52	6	1:10	1:2	7
75	8	1:12	1:2.5	8
100	10	1:14	1:3	9

2.4 正交试验设计

表 3 正交试验设计

水平	试验因素		
	A 料水比(W:V)	B 水醇比(V:V)	C pH 值
1	1:8	1:1	7
2	1:10	1:1.5	8
3	1:12	1:2	9

根据单因素试验结果,用正交试验的思路对料水比、水醇比、pH 值进行比较,找到一个最佳的优化条件,具体的正交试验设计如表 3。

3 试验结果与分析

3.1 不同提取温度和时间下松茸子实体多肽的提取量

由图 2 可知,松茸多肽的提取量受提取温度

和提取时间的影响,随着提取温度的升高,松茸多肽的提取量普遍呈上升的趋势,但是过高的提取温度反而使松茸多肽的提取量产生抑制作用;同时提取时间的延长也使得松茸多肽的提取量呈上升趋势。从曲线走势可以得到:当温度为28℃、时间为10 h时,松茸子实体多肽的提取量最大。

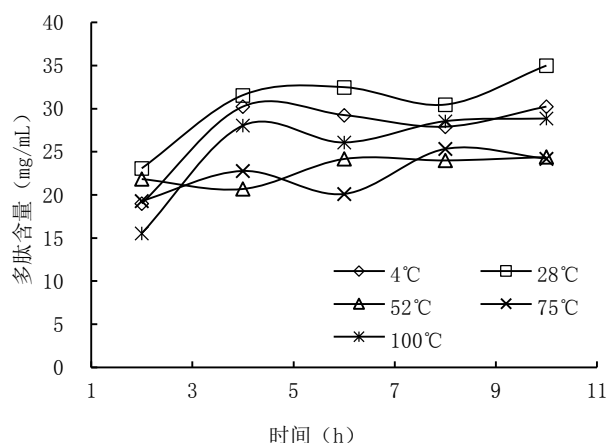


图2 不同提取温度及时间松茸子体的提取量

3.2 不同料水比下松茸子实体多肽的提取量

由图3可知,松茸子实体多肽的提取量受料水比的影响,最初随着水量的增加松茸多肽的提取量也相应地增加,当料水比为1:10时,多肽的提取量达到最大。而后再增加水量松茸多肽的提取量反而呈现下降的趋势且下降速率较快。

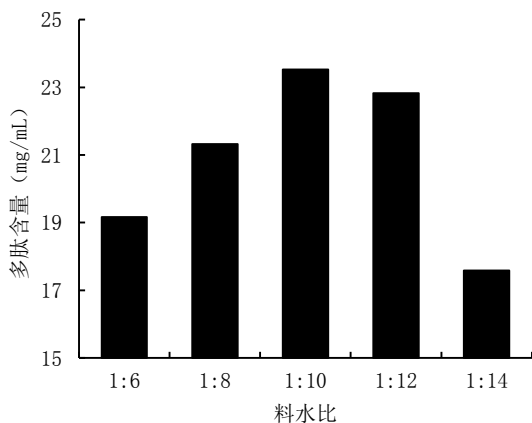


图3 不同料水比松茸子体多肽的提取量

3.3 不同醇浓度下松茸子实体多肽的提取量

由图4可知,醇浓度对松茸子实体多肽的提取量具有影响,最初其提取量随醇浓度的增加而增加,当水醇比为1:1.5时多肽的提取量达到最大,而后随水醇比的增加,多肽的提取量逐渐降低。

3.4 不同pH值下松茸子实体多肽的提取量

由图5可知,不同pH值对松茸子实体多肽的提取具有影响,其提取量随pH的增加而增加,且

pH值越大,松茸子实体多肽的提取量就越大。

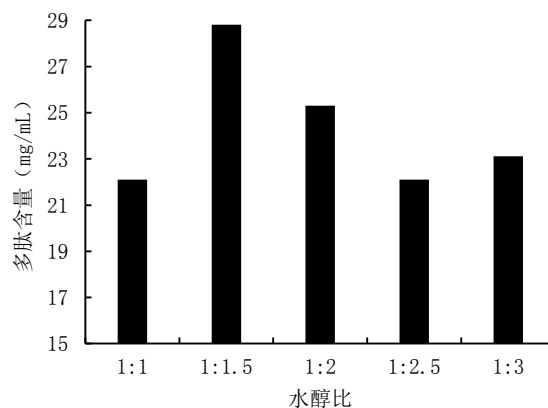


图4 不同醇浓度松茸子体多肽的提取量

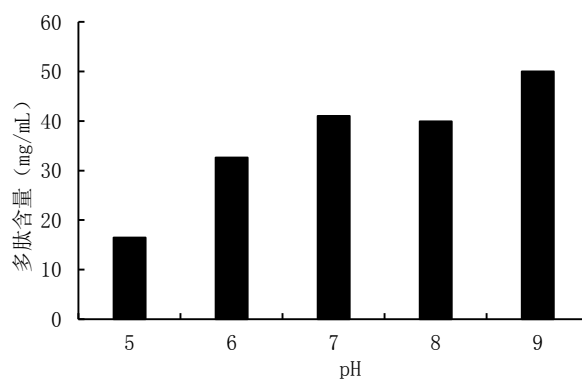


图5 不同pH值下松茸子实体多肽的提取量

3.5 松茸子实体多肽提取工艺的优化

综合上述试验结果可知,不同提取温度、提取时间、料水比、水醇比、pH值都对松茸子实体多肽的提取具有影响,因而在确定提取温度为28℃,提取时间为10 h的基础上,以料水比、水醇比、pH值三因子设计了正交试验,结果见表4、5。

表4 松茸子实体多肽提取的正交试验结果

试验号	A	B	C	多肽含量(mg)
1	1	1	1	21.54
2	1	2	2	25.44
3	1	3	3	24.63
4	2	1	2	20.78
5	2	2	3	24.65
6	2	3	1	21.88
7	3	1	3	26.45
8	3	2	1	20.17
9	3	3	2	26.51

由表4可知,最佳因素组合为 $A_3B_3C_3$,即从松茸子实体中提取多肽含量在料水比为1:12,水醇比为1:2,pH为9时达到最大,通过比较R值发现,各因素对多肽含量的影响不同:pH值>料水

比>水醇比(表5)。由此得到,提取松茸子实体多肽的最佳条件为:温度28℃,料水比为1:12,水醇比为1:2,pH为9时提取10h,此时提取得到的子实体多肽含量最多。

表5 各因素与多肽含量的极差分析

考察值	料水比	水醇比	pH值
K ₁	71.61	68.77	63.59
K ₂	67.31	70.26	72.73
K ₃	73.13	73.02	75.73
K ₁ 平均值	23.87	22.92	21.20
K ₂ 平均值	22.44	23.42	24.24
K ₃ 平均值	24.34	24.34	25.24
R(极差)	1.9	1.42	4.04

4 结 论

本试验以松茸子实体干粉作为试验材料进行活性多肽的提取,以提取温度、提取时间、料水比、pH值、水醇比作为活性多肽的提取条件分别做单因素试验,并在确定了最佳提取温度和最佳提取时间后根据单因素试验结果以料水比、pH值、水醇比作为条件设计了三因素三水平的正交试验。

4.1 通过单因素试验得出:提取温度、提取时间、料水比、水醇比、pH值对松茸子实体多肽的提取都产生相应的影响,松茸活性多肽的提取量在较高的提取温度和较长的提取时间时能提取出较多含量的多肽,但是长时间的高温条件会使多肽的提取量下降,因此当提取温度为28℃、提取10h时提取量相对较大,且当料水比为1:10、水醇比为1:1.5、pH值为9时达到最大。

4.2 由正交试验极差分析确定最佳组合为料水比为1:12、水醇比为1:2、pH值为9,且三个提取条件对活性多肽的提取量的影响程度为:pH值>料水比>水醇比。

综上所述,松茸子实体活性多肽的最佳提取条件为料水比1:12、水醇比1:2、pH值9、提取温度28℃、提取时间10h,提取得到的多肽含量较多。

参考文献:

- [1] 李维国,赵永光.适于松茸生长的生长条件[J].微生物学杂志,2000,20(3):52-54.
- [2] 谭伟.日本松茸的研究与栽培史[J].中国食用菌,1991,10(3):15-16.
- [3] 苏建兰.云南松茸产业市场前景分析与对策建议[J].林业经济,2010(1):115-119.
- [4] 孙刚,王振堂.松茸发生植被特征及功能分区[J].吉林农业科学,2000,25(1):50-53.
- [5] 苏开美.云南楚雄、中甸地区松茸生态环境调查研究[J].中国食用菌,2002,21(3):19-20.
- [6] 郑爽,李长田.松茸菌丝体美白抗氧化特性的研究[J].中国食用菌,2014,33(4):50-54.
- [7] 陈霞,刘芹,丁侃.松茸的化学成分、活性及药理作用研究进展[J].中国医疗前沿,2009,4(12):114-115.
- [8] 刘莹.褐蘑菇子实体多肽的提取工艺[J].食用菌,2009(4):10-11.
- [9] Hee Choa, Young Suk Kima, Hyung Kyoon Choi B, et al. Metabolomic discrimination of different grades of pine-mushroom (*Tricholoma matsutake* Sing.) using 1H NMR spectrometry and multivariate data analysis[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007, 43: 900-904.
- [10] Fei Hong Zhai, Qi Wang, Jian Rong Han. Nutritional components and antioxidant properties of seven kinds of cereals fermented by the basidiomycete *Agaricus blazei*[J]. Journal of Cereal Science, 2015,34:23-25.
- [11] Wong J H, Ng T B, Wang H. Cordymin, an antifungal peptide from the medicinal fungus *Cordyceps militaris*[J]. Peptides, 2011, 18(5): 387-392.
- [12] Lau C C, Abdullah N, Shuib A S, et al. Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from edible mushroom *Agaricus bisporus* (J. E. Lange) Imbach identified by LC-MS/MS[J]. Food Chemistry, 2014,148(1):396-401.

(责任编辑:王昱)