

蒙古口蘑(*Tricholoma mongolicum*)多肽 制取技术的研究

王大为¹, 吴恩奇², 图力古尔^{2,*}

(1. 吉林农业大学食品科学与工程学院, 吉林 长春

130118 2. 吉林农业大学农学院, 吉林 长春

130118)

摘 要: 以蒙古口蘑为原料, 经过超临界CO₂流体萃取纯化及可控有限改性挤出处理后, 酶解制取蒙古口蘑多肽。采用两段式酶解法, 一段酶解采用碱性蛋白酶对蒙古口蘑进行水解, 二段采用风味蛋白酶对一段酶解物进行修饰处理, 以校正酶解液风味。通过正交试验方法对影响酶解效果及产品风味的主要因素进行研究和分析, 结果表明蒙古口蘑碱性蛋白酶酶解工艺最佳条件为: 温度55℃, 时间2.5h, 底物浓度2%, 酶用量1.5%(E/S); 所得酶解液利用风味蛋白酶较味后, 三倍体积浓度65%的乙醇溶液进行醇沉脱多糖, 蒙古口蘑多肽得率为32.10%。

关键词: 蒙古口蘑; 多肽; 超临界流体萃取; 可控有限改性挤出处理; 酶法水解

Research of Preparation Technology of *Tricholoma mongolicum* Polypeptide

WANG Da-wei¹, WU En-qi², TOLGOR Bau^{2,*}

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

2. College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: *Tricholoma mongolicum* was used as material to prepare polypeptide, and the material was processed through supercritical CO₂ fluid extraction and extrusion technology before enzymatic degradation. *Tricholoma mongolicum* polypeptide was prepared by two-stage enzymatic hydrolysis. The first stage use alcalase as hydrolysis enzyme to prepare polypeptide, and the second stage choose flavourzyme to adjust the flavor. The major factors that affected enzymatic degradation of *Tricholoma mongolicum* protein and product's flavor were studied through orthogonal test. The optimum conditions of enzymatic hydrolysis used alcalase as hydrolysis were established: temperature 55 °C, time 2.5 h, substrate concentration 2%, concentration of enzyme 1.5% (E/S), the first product were adjusted in flavor utilized flavourzyme, and the polysaccharide removed used three times volume 65% alcohol solution, yield ratio of *Tricholoma mongolicum* polypeptide prepared in this research is 32.10%.

Key words *Tricholoma mongolicum* polypeptide; supercritical CO₂ fluid extraction; extrusion technology; enzymatic hydrolysis

中图分类号: TQ936.16

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)09-0245-05

蒙古口蘑(*Tricholoma mongolicum* Imai), 又称白蘑、草原白蘑、查干蘑菇等, 是由日本真菌学者今井三子(S. Imai)于1937年定名发表的, 并记载其汉语名称为白蘑菇^[1]。蒙古口蘑属伞菌目(Agaricales), 口蘑科(Tricholomataceae), 口蘑属(*Tricholoma*)真菌, 夏秋季在草原上群生并形成蘑菇圈, 分布于河北、内蒙古、黑龙江、吉林、辽宁等地^[2-3]。蒙古口蘑性平、味甘, 具有宣肠益胃, 散热解表等功效, 可治小儿麻疹欲出不出, 烦躁不安等症, 适用于消化不良, 脘腹胀满,

胃气痛, 泄泻等症。蒙古口蘑干品蛋白质含量36%以上, 其组成氨基酸中必需氨基酸含量丰富, 占氨基酸总量的35.85%^[4], 是制备多肽的良好原料。多肽一般由2~50个氨基酸组成, 是蛋白质经水解、分离而制得的相对分子量较低的低肽混合物。多肽氨基酸组成与蛋白质近乎一致, 必需氨基酸含量平衡丰富, 且多肽化合物更容易被人体消化吸收, 尤其是某些低分子的肽类, 具有防病、治病、调节人体生理机能的功效, 是原蛋白质及其所组成氨基酸所不具备的。多肽克服了蛋白质

收稿日期: 2007-07-10

* 通讯作者

基金项目: 国家“十五”重大科技攻关专项(2001BA501A01)

作者简介: 王大为(1960-), 男, 教授, 主要从事功能食品的研究和开发。

营养学上的弱点,具有比蛋白质更丰富的营养和功能特性,是补充蛋白质的最佳营养物质。目前对蒙古口蘑的研究多见于驯化栽培及生态学方面,在功能食品方面研究甚少,本研究将蒙古口蘑脱脂、挤出处理后利用碱性蛋白酶及风味蛋白酶进行酶解制取蒙古口蘑多肽,可作为功能食品或生产功能食品的原料,为蒙古口蘑的精深加工及高附加值利用提供了科学的参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原辅材料

蒙古口蘑子实体:采自锡林郭勒草原;采摘后自然干燥、精选备用; CO_2 (纯度为99.95%,食品级) 长春市氧气厂。

1.1.2 生物化学制剂

碱性蛋白酶(Alcalase 2.4 L FG (2.4 AU-A/g))、风味蛋白酶(Flavourzyme 500 MG (500 LAPU/g)) 丹麦诺维信(中国)生物技术有限公司。

1.1.3 化学试剂

乙醚、无水乙醇、盐酸、硼酸、氢氧化钠、甲基红、溴甲酚绿、硫酸铜、硫酸钾、硫酸、过氧化氢、碳酸钠、酒石酸甲钠、钨酸钠、钼酸钠、磷酸、硫酸锂、液体溴等所用化学试剂均为市售分析纯级。

1.1.4 仪器与设备

SH10A型水分快速测定仪 上海恒平科学仪器有限公司;KDN型蛋白质测定仪 上海纤检仪器有限公司;RE-52AA旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂;DZF-6050型真空干燥箱 上海精宏实验设备有限公司;WF-250型万能粉碎机 上海蓝深制药机械有限公司;GB1302 METTLER TOLEDO 电子精密天平 梅特勒·托利多仪器有限公司;HA121-50-02型超临界 CO_2 流体萃取装置 南通华安超临界萃取有限公司;JC-60A型单螺杆挤出机 长春市食品工业研究所;HZS-HA水浴振荡器 哈尔滨市东联电子技术开发有限公司;PHS-3BW精密数显酸度计 上海理达仪器厂;CT15RT Versatile Refrigerated Centrifuger 上海天美科学仪器有限公司;742-1微型可见分光光度计 上海光学仪器厂;DYY-10C型电泳仪 北京市六一仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 工艺流程

根据原材料特点及本研究目的,蒙古口蘑多肽制取工艺流程设计如下:

蒙古口蘑子实体干品→筛选→漂洗→低温干燥→粉碎→超临界 CO_2 流体萃取脱脂脱色→可控有限改性挤出处理→一段酶解→灭酶→离心分离→上清液→二段酶解

→离心分离→上清液→灭酶处理→醇沉→真空过滤→真空浓缩→检测→真空干燥→检测→蒙古口蘑多肽

1.2.2 操作要点

1.2.2.1 蒙古口蘑预处理

将蒙古口蘑干品用20℃左右的流动水洗涤,去除泥沙及不可食用杂质,离心脱水后于料层厚度10mm,45℃、0.09MPa条件下真空干燥至水分含量小于8%,然后粉碎得可全部通过0.175mm孔径筛的蒙古口蘑粉备用。

1.2.2.2 蒙古口蘑脂肪脱除

采用超临界 CO_2 流体萃取技术对上述蒙古口蘑粉进行脱脂及纯化处理^[5]。萃取压力30MPa,萃取温度45℃,萃取时间60min, CO_2 流量25L/h。超临界 CO_2 流体萃取脱脂处理后蒙古口蘑中脂肪含量为0.1%。

1.2.2.3 蒙古口蘑挤出处理

采用可控有限挤出改性处理,使物料发生剪切、熔融、摩擦等作用,部分蛋白质、碳水化合物等大分子物质降解为小分子物质,使紧密的束缚性组织结构展开,蛋白质大分子被打开、断裂,可溶性成分增加,更易于被酶作用^[6]。挤出条件为挤出温度110℃,物料含水量40%,进料速度20kg/h,物料粒度0.147mm。

1.2.2.4 碱性蛋白酶酶解单因素试验

在底物浓度5%、酶浓度(E/S)2.5%、pH为8.5、酶解时间2h条件进行酶解,记录不同的酶解温度碱消耗量的变化,作出酶解温度与碱消耗量的关系曲线;在底物浓度5%、酶浓度(E/S)2.5%、酶解温度55℃、pH8.5条件下进行酶解,记录不同水解时间碱消耗量的变化,作出水解时间对碱消耗量的关系曲线;在酶浓度(E/S)2.5%、酶解温度55℃、酶解时间2h、pH8.5条件下进行酶解,记录不同底物浓度条件下酶解酶解液所消耗的碱量,作出底物浓度与碱消耗量的关系曲线;在底物浓度5%、酶解温度55℃、酶解时间2h、pH8.5条件下进行酶解,记录不同的酶加入量对碱消耗量的影响,作出酶加入量与碱消耗量的关系曲线。以单因素试验结果为依据设计正交试验各因素变化水平。

1.2.2.5 碱性蛋白酶酶解正交试验设计

采用Alcalase碱性蛋白酶对蒙古口蘑进行酶解,准确称取一定量超临界及挤出处理后的蒙古口蘑物料加入适量蒸馏水溶解,调节恒温水浴振荡器至试验设定温度,加热保温,调整pH,加入一定量的Alcalase碱性蛋白酶进行水解,水解过程中保持振荡频率60r/min,并滴加适当浓度NaOH溶液以维持pH值在 8.5 ± 0.05 范围内不变,达到预定时间后停止加热搅拌,酶解液进行灭酶处理、冷却至室温、离心分离。根据消耗的NaOH溶液体积,可确定水解程度。影响酶解效果的主

要因素有：酶解温度(A)、酶解时间(B)、底物浓度S%(C)、酶浓度E/S(D)，并以耗碱量为考查指标，确定出最佳工艺条件，因素水平设计见表1。

表1 碱性蛋白酶酶解L₉(3⁴)正交试验设计
Table 1 Design of Alkaline protease hydrolysis L₉(3⁴) orthogonal test

水平	因素			
	A 温度(℃)	B 时间(h)	C 底物浓度(%)	D 酶浓度%(E/S)
1	50	1.5	2	1.0
2	55	2.0	5	1.5
3	60	2.5	8	2.0

$$\text{蒙古口蘑多肽得率(\%)} = \frac{\text{蒙古口蘑多肽含量}}{\text{蒙古口蘑中蛋白质含量}} \times 100$$

1.2.2.6 碱性蛋白酶灭酶处理及离心分离

为防止酶解过度产生不良反应影响酶解液品质，影响下一步工艺的进程，反应结束后，将酶解液加热至90℃，保温10min进行灭酶。然后迅速冷却至室温，将水解液在5000r/min转速下离心15min，取上清液即水解蛋白液备用。

1.2.2.7 风味蛋白酶酶解

蛋白质被碱性蛋白酶水解成肽后，往往产生不同程度的苦味，这对产品风味有很大影响。控制蛋白质的水解度和用特殊酶处理将所得多肽酶解液中不良风味去除是多肽制取中的又一关键技术环节。消除蛋白质水解产物苦味的方法主要有疏水吸附法、掩蔽法、化学反应法、溶液抽提、酶聚合法分离及肽酶水解法等。其中肽酶水解法是最为有效的方法，而其他常用的脱苦方法都会造成必需氨基酸的损失^[7-8]。风味蛋白酶是一种内切酶和外切酶的混合酶，可以有效地将疏水性氨基酸从蛋白质末端切除。风味蛋白酶在二段酶解中切下肽链末端的疏水性氨基酸，使末端疏水性氨基酸游离，以降低一段酶解产物苦味等不良风味。本研究中所采用风味蛋白酶，温度50℃、pH7.0、酶用量0.5%~1.0%、酶解时间1.5h，对碱性蛋白酶蒙古口蘑酶解液进行苦味校正^[8-9]。

1.2.2.8 风味蛋白酶灭酶处理及离心分离

同1.2.2.6。

1.2.2.9 醇沉脱多糖

利用多糖溶于水或酸、碱、盐溶液而不溶于醇、醚、丙酮等有机溶剂的特点，在酶解液中加入乙醇破坏多糖水溶液中的氢键，降低多糖的溶解度，使其以沉淀的形式析出，实现对多肽液的脱多糖处理。醇沉过程中所用乙醇浓度、体积、及处理时间等为主要影

响脱多糖效果的因素^[10]，本研究采用对比试验设计对醇沉工艺进行研究。取蒙古口蘑两段酶解后酶解液，加入乙醇，乙醇浓度分别为30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%，加入体积倍数为2、3、4，搅拌振荡均匀，置于室温静置2~5h。醇沉液经抽滤，得粗多糖经烘干至恒重后进行精密称量；滤液进行真空浓缩及脱醇处理。本研究根据多糖脱除率及醇沉浓缩后滤液中可溶性肽含量两个指标来衡量醇沉效果，确定最佳醇沉脱多糖工艺。

1.2.2.10 真空浓缩、干燥

采用旋转蒸发器进行真空浓缩，浓缩条件为0.09MPa，50℃，浓缩至浓度大于60%，进行真空干燥，真空干燥条件为真空度0.09MPa、45℃，干燥至成品含水量为3%~5%。

1.3 成分分析

蛋白质含量的测定按GB 5511—1985 规定方法进行；脂肪含量的测定按GB 5512—1985 规定方法进行；水分的测定水分快速测定仪法；粗多糖含量测定按GB/T 5009.10—2003 规定方法进行；灰分的测定按GB 5505—1985 规定方法进行；可溶性肽含量测定采用斐林(Folin)-酚法。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

单因素试验结果见图1、2、3、4。通过对单因素试验结果进行分析可知碱性蛋白酶酶解时适宜作用条件为温度55~60℃，时间1.5~2.5h，底物浓度2%~8%，酶浓度1.5%~2.5%(E/S)。由此证明正交试验设计水平设计合理。

2.2 碱性蛋白酶酶解正交试验最佳工艺条件的确定

由表2正交试验结果可知，各因素对碱性蛋白酶酶解的影响程度强弱顺序为C>A>B>D，即底物浓度影响最大，其次是酶解温度、酶解时间，酶加入量影

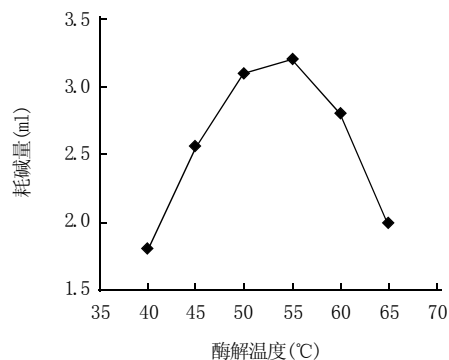


图1 酶解温度对碱消耗量的影响

Fig.1 Effects of temperature on alkali consumption

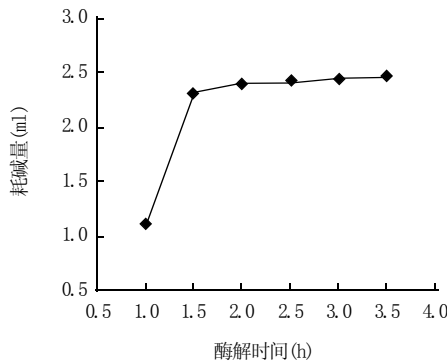


图2 酶解时间对碱消耗量的影响
Fig.2 Effects of time on alkali consumption

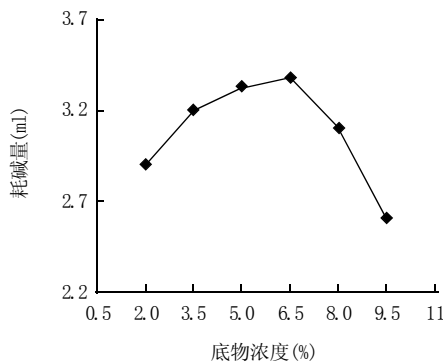


图3 底物浓度对碱消耗量的影响
Fig.3 Effects of substrate concentration on alkali consumption

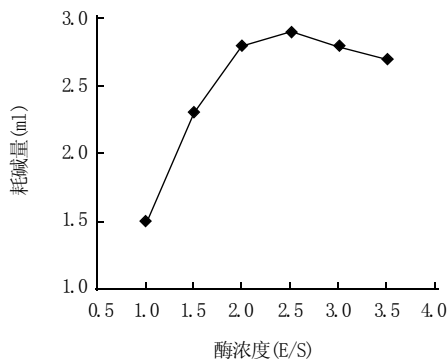


图4 酶加入量对碱消耗量的影响
Fig.4 Effects of concentration of enzyme on alkali consumption

响最小。最优组合为： $A_2B_3C_1D_2$ ，即底物浓度 2%，酶解温度 55℃，酶浓度 1.5E/S，酶解时间 2.5h。按此工艺条件对蒙古口蘑进行酶解，碱消耗量为 3.50ml，水解度最高。

2.3 各因素对酶解效果的影响

2.3.1 酶解温度对酶解效果的影响

随着温度的升高，水解速度加快，当升高至 55℃时，水解度达到峰值，继续升高温度将抑制酶的活性甚至使其失活，使得水解度下降。主要原因是反应初

表2 $L_9(3^4)$ 正交试验结果
Table 2 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	因 素				耗碱量(ml)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	2.75
2	1	2	2	2	2.60
3	1	3	3	3	2.50
4	2	1	2	3	2.80
5	2	2	3	1	2.75
6	2	3	1	2	3.50
7	3	1	3	2	2.63
8	3	2	1	3	3.00
9	3	3	2	1	3.20
K_1	7.85	8.18	9.25	8.70	
K_2	9.05	8.35	8.60	8.73	
K_3	8.83	9.20	7.88	8.30	
k_1	2.62	2.73	3.08	2.90	
k_2	3.02	2.78	2.87	2.91	
k_3	2.94	3.07	2.63	2.77	
R	0.40	0.34	0.45	0.14	

始温度较低时，未达到酶的最佳水解温度，酶活力较低，随着温度的升高，体系的内能随之增大，达到酶最佳作用温度，反应速度加快；当温度高于 55℃时，酶逐渐变性，酶活性降低，反应速度亦降低。随着温度的升高，碱消耗量增大，即水解度不断增大，到 55℃以后，温度继续升高，碱消耗量减少，即水解度降低，故本研究中碱性蛋白酶水解最佳温度为 55℃。

2.3.2 酶解时间对酶解效果的影响

超临界 CO_2 萃取脱除蒙古口蘑中的脂类及色素等脂溶性物质，提高了蒙古口蘑中极性成分的溶解性和分散性，降低了其溶出阻力，蛋白质与水的接触面积及亲和力大幅度增加^[5]。另外，挤出处理时，物料发生剪切、熔融、摩擦等作用，使紧密的束缚性组织结构展开，蛋白质大分子被打开、断裂，可溶性成分增加，暴露出更多的酶解位点^[6]。所以酶解较迅速，2.5h 时水解程度即达到最高，2.5h 之后随底物浓度大幅度降低，碱消耗量增加减缓，反应速度也随之降低，甚至停止。

2.3.3 底物浓度对酶解效果的影响

随着底物浓度的增加，碱消耗量逐渐上升，当底物浓度达到 6.5% 时，碱消耗量达到最大，当底物浓度继续增加时，随底物浓度的增加，蛋白质不能充分浸润，影响了酶对蛋白质的作用，碱消耗量反而降低，导致水解度下降。较低的底物浓度，被作用基质过少，导致化学平衡向逆反应方向进行，酶解效果亦较差。本研究中最佳底物浓度为 2%。

2.3.4 酶浓度对酶解效果的影响

随酶浓度的不断加大，提高了酶对蛋白质的作用能力，水解度也呈上升趋势。当浓度达到一定值时，酶

用量与耗碱量关系曲线的斜率减小,趋于平缓,继续加大酶用量对提高水解度作用不明显。本研究由于采用超临界CO₂萃取及挤出改性处理,提高了蒙古口蘑中极性成分的溶解度,暴露出更多的酶解位点,因此降低了碱性蛋白酶的酶解难度^[5-6],较少的酶用量即可达到理想的酶解效果,降低了生产成本,本研究最佳酶浓度为1.5%。

2.4 醇沉脱多糖及多肽得率测定

按实验设计进行醇沉脱多糖实验,实验结果见图5、6。

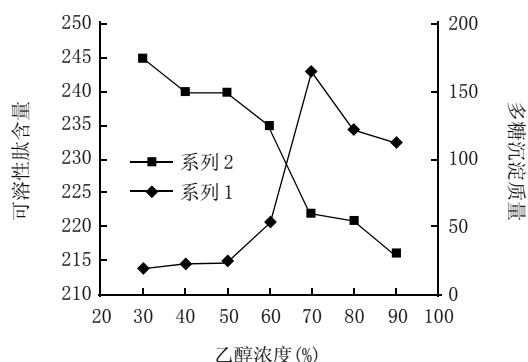


图5 三倍体积乙醇溶液醇沉效果
Fig.5 Effects of alcohol precipitation

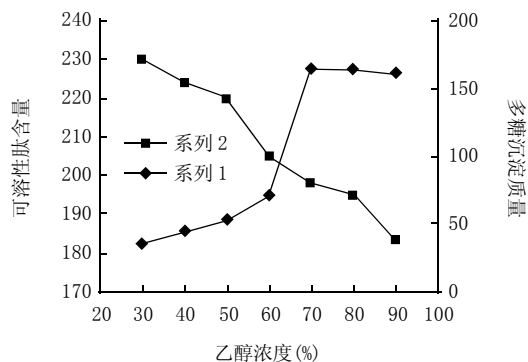


图6 四倍体积乙醇溶液醇沉效果
Fig.6 Effects of alcohol precipitation

随着乙醇浓度的增加,多糖的沉淀质量有明显的上升趋势。乙醇浓度较低时,多糖沉淀的增加量不是很明显。在高于50%后,多糖沉淀量增加明显,到70%达到最高值。而随后沉淀量有所下降。可溶性肽含量

随乙醇浓度的增加,呈下降趋势。较低浓度的乙醇对蒙古口蘑酶解液中多肽变性程度不大,乙醇浓度由30%升至60%的过程中,可溶性肽含量不明显。当乙醇浓度高于60%后,可溶性肽的含量明显下降,即高浓度乙醇溶液对蛋白质及肽类的变性作用较大。另外,乙醇体积倍数的增加可明显增加多糖沉淀质量,同时乙醇体积倍数的增加酶解液中可溶性肽的含量的损失。三倍体积醇沉处理所脱除的多糖质量少于四倍体积醇沉处理,但可溶性肽含量明显高于四倍体积醇沉处理。因此采用三倍体积、浓度65%的乙醇溶液进行醇沉脱多糖处理,脱多糖后酶解产物采用斐林(Folin)-酚法测定多肽得率为32.10%。

3 结论

3.1 采用L₉(3⁴)正交试验设计对蒙古口蘑进行碱性蛋白酶酶解,确定碱性蛋白酶酶解工艺的最佳条件:酶解温度55℃,酶解时间2.5h,底物浓度2%,酶浓度1.5%(E/S),碱消耗量3.5ml,在此条件下水解效果达到最佳状态。

3.2 采用对比实验法对蒙古口蘑酶解液的醇沉脱多糖效果进行研究,以三倍体积浓度为65%的乙醇溶液进行醇沉时,既可以达到脱除多糖的目的,又可以最大限度的保留酶解液中的多肽,减少多肽纯化损失。

参考文献:

- [1] 刘培贵,宋刚.“口蘑”食菌研究札记[J].云南植物研究,1993,15(2):149-154.
- [2] 卯晓岚.中国经济真菌[M].北京:科学出版社,1998:69.
- [3] 邓叔群.中国的真菌[M].北京:科学出版社,1963:597.
- [4] 汪麟,李育岳.20种食用菌的氨基酸含量分析[J].食品科学,1985,6(1):10-12.
- [5] 王大为,张艳荣,单玉玲,等.超临界CO₂萃取对蒙古口蘑多糖提取率的影响[J].食品科学,2006,27(3):107-110.
- [6] 王大为,刘婷婷,图力古尔.挤出处理对蒙古口蘑肽提取率影响的研究[J].食品科学,2007,28(6):150-152.
- [7] 钱方,邓岩,王凤翼,等.蛋白酶及大豆蛋白水解物苦味的研究[J].大连轻工业学院学报,2000,9(3):40-44.
- [8] 许永红.蛋白酶法水解物苦味的控制[J].食品工业科技,1997(3):1-3.
- [9] 王艳,王金水,王玲玲,等.水解植物蛋白的酶法制备[J].粮食加工,2006(2):42-45.
- [10] 林德祥,邱巨香,陈叶明.正交试验法优选云芝多糖醇沉工艺的研究[J].南京中医药大学学报,2005,21(5):328-330.