

松茸蛋白抗氧化肽制备及构效关系研究

葛 麒¹, 朱春燕², 陈湖南², 张思琼³, 芦 玲³, 林松毅^{1,2*}

(1. 大连工业大学食品学院, 国家海洋食品工程技术研究中心, 大连 116034; 2. 赣州全标生物科技有限公司, 赣州 341100; 3. 江西广来健康产业有限公司, 樟树 331200)

摘 要: **目的** 制备松茸(*Tricholoma matsutake*)蛋白抗氧化肽, 并探究其构效关系。**方法** 利用响应面法优化松茸蛋白提取工艺, 并进行氨基酸分析, 质谱鉴定超滤后的松茸蛋白模拟胃肠消化产物, 固相合成两条肽评分最高的肽段, 通过化学方法和 H_2O_2 诱导建立氧化损伤 HepaRG 细胞模型, 评价松茸多肽抗氧化活性, 同时结合红外光谱和圆二光谱分析其构效关系。**结果** 松茸蛋白提取较佳工艺参数为提取温度 $48^{\circ}C$ 、提取时间 120 min、pH 10, 此条件下的松茸蛋白提取率高达 $(72.56 \pm 0.45)\%$; 松茸蛋白氨基酸种类齐全, 必需氨基酸占总量氨基酸的 27.65%; SHSFFLP 的 1,1-二苯基苦基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)自由基和 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐[2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ammonium salt, ABTS]阳离子自由基清除率显著高于 SFPIIWQ ($P < 0.05$), SHSFFLP 和 SFPIIWQ 能显著降低受氧化损伤 HepaRG 细胞中活性氧和丙二醛含量, 提升细胞内超氧化物歧化酶活力。**结论** 本研究采用优化的松茸蛋白提取工艺筛选出两条抗氧化肽 HSFFLP 和 SFPIIWQ, SHSFFLP 抗氧化能力强于 SFPIIWQ 可能与二级结构 β 折叠的相对含量较高有关。

关键词: 松茸蛋白; 抗氧化肽; 构效关系

Research on preparation and structure-activity relationship of *Tricholoma matsutake* protein antioxidant peptide

GE Qi¹, ZHU Chun-Yan², CHEN Hu-Nan², ZHANG Si-Qiong³, LU Ling³, LIN Song-Yi^{1,2*}

(1. School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, National Engineering Research Center of Seafood, Dalian 116034, China; 2. Ganzhou Quanbiao Biological Technology Co., Ltd., Ganzhou 341100, China; 3. Jiangxi Guanglai Health Industry Co., Ltd., Zhangshu 331200, China)

ABSTRACT: Objective To prepare matsutake (*Tricholoma matsutake*) antioxidant peptides and explore their structure-activity relationship. **Methods** Matsutake protein extraction was optimized by response surface and amino acids content was analyzed, then 2 peptides were synthesized after mass spectrum identification on matsutake protein simulated gastrointestinal digestion product with ultrafiltration. Antioxidant activity of 2 peptides were evaluated by chemical method and oxidative damaged cell model induced by H_2O_2 . And structure-activity relationship was analysed by infrared spectroscopy and circular binary spectroscopy. **Results** The optimized parameter of matsutake protein extraction technology was extraction temperature $48^{\circ}C$, extraction time 120 min, pH 10. Under these conditions, the extraction rate of matsutake protein was $(72.56 \pm 0.45)\%$. Matsutake protein had a variety of amino

基金项目: 江西省重大科技研发专项(20203ABC28W015)

Fund: Supported by the Major Scientific and Technological Research and Development Projects of Jiangxi Province (20203ABC28W015)

*通信作者: 林松毅, 博士, 教授, 主要研究方向为食品功能与营养。E-mail: linsongyi730@163.com

*Corresponding author: LIN Song-Yi, Ph.D, Professor, School of Food Science and Technology, National Engineering Research Center of Seafood Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China. E-mail: linsongyi730@163.com

acids and essential amino acid content was 27.65%. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical and 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ammonium salt (ABTS) cationic free radical scavenging rates of SHSFLLP were better than SFPPIWQ significantly ($P<0.05$). Both SHSFLLP and SFPPIWQ could reduce reactive oxygen species and malondialdehyde content and increase superoxide dismutase activity in oxidative damaged HepaRG cells. **Conclusion** In this study, 2 antioxidant peptides, HSFFLP and SFPPIWQ, have been screened by optimized matsutake protein extraction technology. The antioxidant capacity of SHSFLLP was stronger than SFPPIWQ, which may be related to the higher relative content of secondary structure β -pleated sheet.

KEY WORDS: *Tricholoma matsutake* protein; antioxidant peptide; structure-activity relationship

0 引言

松茸[*Tricholoma matsutake* (Ito et Imai) Sing], 学名松口蘑^[1], 因生长条件要求苛刻, 故而十分珍稀, 具有极高的食药价值 and 浓郁的香气, 被誉为“菌中之王”^[1-2]。松茸含有丰富的松茸双链多糖、蛋白质和不饱和脂肪酸^[3], 对改善人体健康大有裨益, 具有抗氧化、抗肿瘤、增强免疫、保护肝脏等多种功效^[4]。目前, 对松茸的加工应用研究主要以高附加值产品开发和松茸多糖功能研究为主^[5]。例如, 安全等^[6]从松茸中分离的多糖具有良好的美白作用; DING 等^[7]发现松茸多糖 TMP-A 能激活 NF- κ B 信号通路从而发挥抗肿瘤作用; 沈成龙等^[8]从松茸中分离的多糖有一定的抗氧化活性。相比之下, 目前虽已有优化松茸蛋白提取工艺的报道, 然而松茸蛋白肽资源并未充分开发, 且松茸蛋白多肽的资源利用没有引起足够的重视。杜汉廷等^[9]从松茸水提物中所得蛋白具有免疫活性, LI 等^[10]发现从松茸水提物中所得肽 SDLKHFPF 和 SDIKHFPF 可减轻葡聚糖硫酸钠盐(dextran sulfate sodium salt, DSS)诱导小鼠结肠炎作用, 松茸蛋白多肽序列尚未充分研究。近 30 年来, 随着生物活性多肽研究地不断深入, 已有研究表明生物活性多肽在机体内的吸收利用效率比氨基酸高 2.0~2.5 倍, 具有抗菌、抗氧化、降血压等多种生物活性, 被广泛应用于食品、医药及美容等行业^[11]。此外, 生物活性肽的活性因来源不同而有所差异, 而含有优质蛋白的松茸是未知生物活性肽的宝库, 探究松茸蛋白多肽序列的组成能为其生物活性的研究奠定基础。

目前蛋白质提取方法主要包括超声辅助法、酶法、盐析法、碱提酸沉法等^[12]。超声波提取未形成规模化, 酶法提取蛋白反应条件温和但生产成本高于碱法提取^[13]。彭倩等^[14]发现碱提酸沉方法较盐析法更能暴露腰果蛋白疏水基团, 所得蛋白质溶解性和起泡性较好。碱提酸沉法在工业生产应用广泛, 具有操作便捷、蛋白质得率高等优点^[15]。

因此本研究以吉林长白山野生松茸为原料, 采用碱提酸沉法, 通过响应面设计优化松茸蛋白提取工艺参数, 筛选合成潜在生物活性高的两条松茸肽, 通过化学方法和体外细胞模型结合光谱结构解析评价其抗氧化活性与空间结构的关系, 期望对松茸蛋白加工生产和松茸生物活

性肽的筛选和制备提供一定的理论依据, 为松茸多肽资源的生物活性研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

松茸购于吉林延吉市顺鑫松茸贸易有限公司。

胃蛋白酶(500 U/mg)、聚氰基丙烯酸正丁酯(butyleanoacrylate, BCA)蛋白浓度测定试剂盒(PC0020)(北京索莱宝科技有限公司); 胰蛋白酶(250 U/mg, 上海源叶生物科技有限公司); HepaRG 肝癌细胞(中国科学院上海细胞所); 0.25%胰酶-乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)、DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) 高糖培养基(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 青霉素-链霉素双抗(以色列 BioInd 公司); 1,1-二苯基苦基肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐[2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ammonium salt, ABTS] (北京宝希迪有限公司); CCK-8 试剂盒(C0038, 碧云天生物技术有限公司); 活性氧(reactive oxygen species, ROS)试剂盒(E004-1-1)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒(A003-1-1)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(A001-1-2)(南京建成生物工程研究所)。

1.2 仪器与设备

UFC900396 超滤管(默克密理博公司); ZXNC518040 电热恒温水浴锅(上海一恒科技有限公司); JJ-1 精密定时电动搅拌器(常州荣华仪器制造有限公司); SH220N 石墨消解仪、K9840 自动凯氏定氮仪(山东海能科学仪器有限公司); SCIENTZ-10ND 冷冻真空干燥机(宁波新芝生物科技股份有限公司); L-8800 氨基酸分析仪(日本日立有限公司); TECAN infinite M200 多功能酶标仪(瑞士 TECAN 公司); IR Prestige-21 傅里叶变换红外光谱仪(日本岛津公司); J-1500 圆二色光谱仪(日本 Jasco 公司)。

1.3 方法

1.3.1 松茸粉粗蛋白含量

参考 KUMAKURA 等^[16]的方法, 清理掉松茸表面污

垢, 于 60℃干燥至恒重后粉碎松茸过 60 目筛出松茸粉, 参考 GB 5009.5—2016《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》方法一, 测定松茸粉中粗蛋白含量。

1.3.2 松茸蛋白提取工艺

称取 2.5 g 松茸粉, 在一定的液料比条件下, 用 0.1 mol/L 氢氧化钠调节 pH, 在恒温水浴锅中机械搅拌提取液, 离心分离收集上清液(6000 r/min, 20 min), 利用 BCA 试剂盒测定蛋白质浓度, 调上清液 pH 至其松茸蛋白等电点, 静置 2 h 后离心分离(6000 r/min, 20 min), 收集沉淀进行真空冷冻干燥, 得到粗品松茸蛋白。松茸蛋白提取率计算按公式(1):

$$\text{松茸蛋白提取率}/\%=(c \times v)/(m \times w) \tag{1}$$

式中: c 为上清蛋白质量浓度, mg/mL, v 为上清体积, mL; m 为松茸干粉质量, mg; w 为松茸粗蛋白质量分数, %。

1.3.3 碱提酸沉法优化试验设计

(1)单因素试验设计

在提取温度为 30℃、提取时间 60 min、pH 7 条件下, 考察液料比(20:1、30:1、40:1、50:1、60:1, mL/g, 下同)对蛋白提取率的影响。在液料比为 40:1、提取时间 60 min、pH 7 条件下, 考察提取温度(20、30、40、50、60℃)对蛋白提取率的影响。在液料比为 40:1、提取温度 40℃、pH 7 条件下, 考察提取时间(30、60、90、120、150 min)对蛋白提取率的影响。在液料比为 40:1、提取温度 40℃、提取时间 120 min 条件下, 考察 pH (8、9、10、11、12)对蛋白提取率的影响。

(2)响应面优化试验设计

在单因素试验的基础上, 以蛋白提取率为指标进行三因素三水平响应面试验, 因素与水平设计见表 1。

表 1 响应面试验因素及水平
Table 1 Coded levels of independent variables used for response surface methodology

因素	水平		
	-1	0	1
A 提取温度/℃	30	40	50
B 提取时间/min	90	120	150
C pH	9	10	11

1.3.4 松茸蛋白氨基酸分析

参照 GB 5009.124—2016《食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定》方法测定松茸蛋白氨基酸的含量和组成。

1.3.5 松茸抗氧化肽的制备、鉴定和合成

调节 pH 为 2.0, 37℃条件下用 40 mg/mL 的胃蛋白酶按照酶与松茸蛋白 1:100 ($m:m$)进行 2 h 的模拟胃消化, 然后调节 pH 为 7.5, 用 2 mg/mL 的胰蛋白酶按照酶与松茸蛋白 1:400 ($m:m$)的比例进行 3 h 的模拟肠消化, 结束后煮沸 10 min 停止消化。将消化液离心(10000 r/min, 30 min), 收集上清, 用 75%乙醇于 4℃静置 24 h 除去蛋白质和糖类物质, 离心(10000 r/min, 30 min), 收集上清, 用超滤管分离

出小于 3 kDa 的组分, 冷冻干燥。委托昆山欧米克斯生物科技有限公司采用纳升高效液相色谱-串联质谱法(nano-high performance liquid chromatography-tandem gas chromatography, nano-HPLC-MS/MS)鉴定, 再使用肽评分网站(<http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/>)对肽段进行评分排序, 委托合肥赛曼诺生物科技有限公司对评分最高的两条肽链序列进行合成(纯度>0.98)。

1.3.6 体外化学方法评价肽抗氧化能力

参考 ZHANG 等^[17]方法, 加入 100 μ L 样液和 100 μ L 的 0.1 mmol/L 的 DPPH 溶液于 96 孔板中, 于黑暗室温环境中孵育 30 min, 在 517 nm 下用酶标仪检测吸光度。同时, 参考 HU 等^[18]方法, 制备含有 7 mmol/L 的 ABTS 与 2.45 mmol/L 的过硫酸钾的 ABTS 试剂, 于室温黑暗环境中孵育 16 h, 然后使用 80%乙醇稀释 ABTS 试剂, 使得吸光度在 734 nm 下为 0.700±0.005。将 0.2 mL 的肽溶液与 4 mL 稀释后的 ABTS 试剂混合, 室温孵育 6 min 后, 于 734 nm 下检测吸光度。自由基清除率计算按公式(2)。

$$\text{自由基清除率}/\%=(\text{自由基溶液吸光度}-\text{样品处理组吸光度})/\text{自由基溶液吸光度} \times 100\% \tag{2}$$

1.3.7 体外细胞模型评价肽抗氧化能力

(1) HepaRG 细胞培养和毒性试验

HepaRG 细胞是常用于建立氧化损伤细胞模型的肝癌细胞。细胞培养条件如下: 将细胞置于含有 1%双抗和 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中, 培养于 37℃、5% CO₂ 培养箱, 待细胞贴壁率达到 80%以上时, 用胰酶进行消化, 用 100 μ L 质量浓度分别为 0、50、100、200、400、800 μ g/mL 的肽溶液于 96 孔板培养细胞 24 h 后, 检测细胞存活率, 确定松茸肽的无毒性浓度。同时, 按密度 8×10^3 个/孔接种于 96 孔板内, 培养 24 h。移去旧培养基, 用 100 μ L 浓度范围为 0~500 μ mol/L 的 H₂O₂ 培养细胞 6 h, 诱导氧化应激损伤。移去培养基, 每孔加入 90 μ L 培养基和 10 μ L CCK-8 试剂, 继续培养 1 h 后用酶标仪于 450 nm 检测吸光度, 计算细胞存活率来确定合适的 H₂O₂ 浓度用于建立氧化应激损伤模型。此外, 细胞接种后, 样品组给以 100 μ L 质量浓度分别为 50、100、200 μ g/mL 的肽溶液, 对照组和损伤组加入 100 μ L 完全培养基, 培养 24 h 后移去培养基, 空白组加入 100 μ L 培养基, 模型组和样品组每孔加入 100 μ L 浓度为 400 μ mol/L 的 H₂O₂ 溶液培养 6 h, 检测细胞存活率, 研究肽对细胞的保护作用。细胞存活率计算按公式(3)。

$$\text{细胞存活率}/\%=\text{样品组 OD 值}/\text{对照组 OD 值} \times 100\% \tag{3}$$

(2)细胞内 ROS、MDA 含量和 SOD 活力测定

参考刘先皓等^[19]方法, 将 HepaRG 细胞按密度 1×10^5 个/孔接种于 24 孔板内对照组、损伤组和样品组。对照组和损伤组每孔加入 800 μ L 培养基, 样品组每孔加入 800 μ L 质量浓度分别为 50、100、200 μ g/mL 的肽溶液, 培养 24 h 后弃去培养基, 对照组每孔加入 800 μ L 培养

基, 损伤组和样品组每孔加入 800 μL 的 400 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 继续培养 6 h。培养结束后按照试剂盒说明书检测细胞内 ROS、MDA 和 SOD 活力。

1.3.8 两条肽的结构分析

(1)傅里叶变换红外光谱分析

参考王丽波等^[20]方法, 称取 1 mg 样品, 加入 100 mg 溴化钾进行压片, 扫描范围在 4000~400 cm^{-1} , 进行傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FI-TR)测定。

(2)圆二色谱分析

参考陈振家等^[21]方法, 配制 0.25 mg/mL 样品溶液, 波长扫描范围在 190~260 nm, 进行圆二色谱测定, 测定肽二级结构并计算相对含量。

1.4 数据统计

每个试验均重复 3 次, 采用 Design-Expert 8.0.6 软件分析响应面数据, SPSS 22 软件分析差异显著性, Graphpad 软件绘图。其中** $P<0.01$ 代表差异极显著, * $P<0.05$ 代表差异显著, $P>0.05$ 代表差异不显著。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

松茸干粉中粗蛋白含量测得为(15.29 $\pm$ 0.19)%, 表明松茸蛋白含量丰富。随液料比升高, 蛋白提取率呈显著增大的趋势, 当液料比增至 40:1 (mL/g)时, 蛋白提取率增速减缓, 蛋白提取率为 60.34%。过高液料比会增大提取液浓缩难度, 提升生产成本, 因而选取合适液料比为 40:1 (mL/g)。蛋白提取率随温度升高先增大后降低, 其原因可能是: 当提取温度较低时, 分子运动速率随提取温度升高而加快, 有利于蛋白质的浸出^[22]; 当提取温度较高时, 蛋白质因热变性结构展开暴露疏水基团, 从而使蛋白质溶解度降低^[23], 蛋白提取率于 40 $^{\circ}\text{C}$ 达到最大值 53.29%, 因而选择提取温度为 40 $^{\circ}\text{C}$ 。蛋白提取率随提取时间的延长而显著增大, 提取时间 120 min 时蛋白提取率为 59.12%, 超过 120 min 蛋白提取率增速减缓。其原因可能是: 提取时间 90 min 时蛋白质已充分浸出, 但是继续延长提取时间, 松茸中其他物质的浸出阻碍蛋白质的浸出^[24], 所以蛋白提取率增大速率减缓^[25], 因而选择最佳提取时间为 120 min。蛋白提取率随 pH 增大呈现先显著增大后显著降低的趋势, 蛋白提取率于 pH 10 达到最大值 70.08%, 这可能是由于蛋白质分子氢键受到破坏, 蛋白质因表面电荷相近而相互排斥, 促进了蛋白质的溶出, 使得蛋白提取率升高^[26]; 然而碱性过强, 蛋白质会发生一定程度的碱水解而变性, 空间结构受损严重, 使得蛋白提取率降低, 同时会生成对人体有害的物质^[27], 因而选择 pH 为 10。

2.2 响应面试验结果与模型方差分析

根据单因素试验结果, 选择提取温度、提取时间、pH

为因素, 按照 Box-Behnken 原理进行响应面优化试验, 方案及结果见表 2。对表 2 数据进行二次多元回归拟合, 得到蛋白提取率(Y)对温度(A)、提取时间(B)、pH (C)的二次多项回归方程: $Y=+75.55-0.56A+0.27B-0.21C-2.81AB+0.66AC+0.31BC-4.18A^2-0.94B^2-4.68C^2$ 。通过 Design Expert 8.0.6 软件分析得出松茸蛋白提取较优理论工艺参数为提取温度 48.38 $^{\circ}\text{C}$ 、提取时间 120.00 min、pH 10.00, 蛋白提取率为 73.29%。考虑到操作可控性, 将较优组合优化为提取温度 48 $^{\circ}\text{C}$ 、提取时间 120 min、pH 10, 通过 3 次平行试验验证, 较优工艺条件下的蛋白提取率为(72.56 $\pm$ 0.45)%, 与预测值接近。

表 2 响应面试验设计及结果
Table 2 Box-Behnken design with experimental results

试验号	A/ $^{\circ}\text{C}$	B/min	C	蛋白提取率/%	
				实测值	预测值
1	0 (40)	-1 (90)	-1 (9)	70.05 $\pm$ 0.79	70.18
2	0	0 (120)	0 (10)	75.84 $\pm$ 0.63	75.55
3	0	1 (150)	1 (11)	70.44 $\pm$ 1.12	70.31
4	0	1	-1	69.94 $\pm$ 0.93	70.09
5	-1 (30)	-1	0	66.64 $\pm$ 0.74	67.91
6	1 (50)	0	1	65.18 $\pm$ 1.52	66.58
7	0	0	0	75.87 $\pm$ 0.61	75.55
8	0	0	0	74.93 $\pm$ 0.92	75.55
9	0	-1	1	69.29 $\pm$ 0.58	69.14
10	-1	1	0	72.82 $\pm$ 0.72	74.07
11	1	1	0	68.59 $\pm$ 1.34	67.32
12	1	0	-1	64.55 $\pm$ 1.76	65.67
13	1	-1	0	73.66 $\pm$ 0.88	72.41
14	-1	0	1	67.50 $\pm$ 0.67	66.38
15	-1	0	-1	69.52 $\pm$ 0.78	68.12

由表 3 可知, 模型的 F 为 7.14 而 $P<0.05$, 失拟误差 F 为 15.02, $P>0.05$, 说明模型显著, 失拟项不显著, 该试验误差主要为随机误差, 结果准确可靠。该模型的决定系数 $R^2=0.9278$, 表明实际数据能较好对应响应面的二次多项回归方程。根据 F 的大小可知, 各因素对蛋白提取率影响的主次顺序为提取温度(A)>提取时间(B)>pH (C)。该模型变异系数为 2.33, 说明该试验结果可靠性较高, 该模型能较准确地预测碱提酸沉法松茸蛋白提取率, 一定程度上具有指导实际意义。

响应面 3D 图的陡峭程度可以反映响应值随自变量的交互作用而变化的幅度, 响应面 3D 图越陡, 表明响应值受自变量交互作用影响大^[28]; 等高线图的椭圆程度可以反映不同因素交互作用的强度, 等高线椭圆形状越明显, 两响应因素交互作用越强^[29]。由图 1 可知, 响应面 3D 图开口均向下, 等高线图呈明显椭圆形, 表明提取温度和提取时间两因素有明显交互作用, 与方差分析结果一致。

表 3 拟合二次多项式模型的方差分析						
Table 3 Analysis of variance for the fitted quadratic polynomial model						
方差来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	172.63	9	19.18	7.14	0.0217	*
A	2.53	1	2.53	0.94	0.3763	
B	0.58	1	0.58	0.22	0.6623	
C	0.34	1	0.34	0.13	0.7364	
AB	31.64	1	31.64	11.78	0.0186	*
AC	1.76	1	1.76	0.65	0.4556	
BC	0.40	1	0.40	0.15	0.7165	
A ²	64.54	1	64.54	24.02	0.0045	**
B ²	3.25	1	3.25	1.21	0.3214	
C ²	80.81	1	80.81	30.08	0.0027	**
残差	13.43	5	2.69			
失拟误差	12.86	3	4.29	15.02	0.0631	
纯误差	0.57	2	0.29			

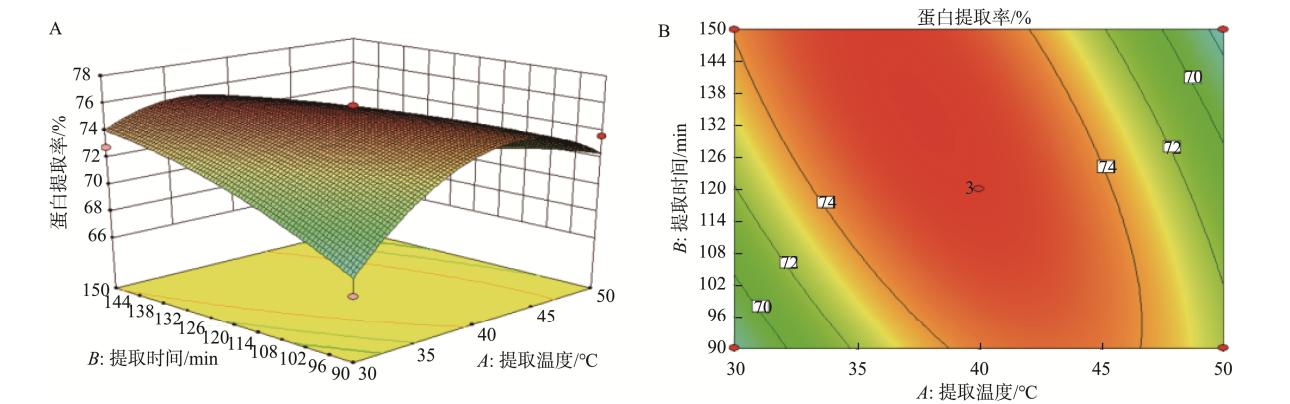


图 1 提取温度和提取时间交互作用的响应面及等高线图

Fig.1 Response surface plots showing the interactive effect of extraction temperature and time

表 4 松茸蛋白氨基酸含量分析			
Table 4 Analysis of amino acids content of <i>Tricholoma matsutake</i> protein			
氨基酸种类	百分比/%	氨基酸种类	百分比/%
天冬氨酸 Asp	11.07±0.05	蛋氨酸 Met	1.11±0.07
苏氨酸 Thr	5.28±0.03	异亮氨酸 Ile	2.94±0.02
丝氨酸 Ser	5.89±0.04	亮氨酸 Leu	4.61±0.02
谷氨酸 Gln	20.19±0.10	酪氨酸 Tyr	2.34±0.02
甘氨酸 Gly	9.01±0.06	苯丙氨酸 Phe	3.58±0.05
丙氨酸 Ala	11.21±0.02	赖氨酸 Lys	4.35±0.02
半胱氨酸 Cys	0.77±0.02	组氨酸 His	2.09±0.14
缬氨酸 Val	5.78±0.04	精氨酸 Arg	4.66±0.03
必需氨基酸 EAA	27.65±0.07	脯氨酸 Pro	5.12±0.05
疏水氨基酸 HAA	29.23±0.09	/	/

注: /表示无此项。

2.3 松茸蛋白氨基酸分析

由表 4 可知,松茸蛋白氨基酸种类齐全,必需氨基酸含量达 27.65%,疏水性氨基酸占比 29.23%。相关研究表明,疏水性氨基酸与多肽抗氧化活性密切相关^[30],而松茸蛋白较高疏水氨基酸含量表明松茸蛋白是制备抗氧化肽的潜在资源。

2.4 松茸肽序列评分

使用肽评分网站对质谱鉴定的肽段序列进行评分,肽评分越高,多肽潜在生物活性越强^[31],评分排名前 20 的肽段序列如表 5 所示,其中肽评分前两位序列分别为 SHSFFLP 和 SFPPIWQ。SHSFFLP 含有疏水性氨基酸(苯丙氨酸、亮氨酸、脯氨酸),SFPPIWQ 含有疏水性氨基酸(苯丙氨酸、脯氨酸、异亮氨酸、色氨酸),较高的肽评分与两条肽较高的疏水性氨基酸含量相吻合。

表 5 肽评分					
Table 5 Peptides scores					
编号	序列	评分	编号	序列	评分
1	SHSFFLP	0.95	11	EGPWNHSF	0.77
2	SFPPIWQ	0.94	12	GLPFDPYD	0.76
3	AQGWIQW	0.88	13	AGLQFPVGR	0.76
4	PSPGLLPP	0.87	14	TVLPLFIML	0.76
5	SSLPPPGSMGP	0.86	15	LDPGGAPF	0.75
6	ATPPPPGP	0.84	16	GLFPGIT	0.75
7	GFIPNGGR	0.80	17	GFINPLIY	0.75
8	KDEVWFG	0.79	18	LPTPPGPP	0.73
9	SSAYPAPGGP	0.79	19	ASALPVF	0.72
10	HGSLGFLPR	0.78	20	GPVAIFI	0.68

2.5 肽体外化学抗氧化能力

DPPH 自由基和 ABTS 阳离子自由基的清除能力常用来评价天然抗氧化剂的抗氧化活性^[32]。如图 2A 所示, 随松茸多肽质量浓度的增加, DPPH 自由基清除率呈上升的趋势, 表现出剂量依赖性, 质量浓度为 5 mg/mL 时, 肽 SHSFFLP 的 DPPH 自由基清除率(44.80%)显著高于肽 SFPIIWQ 的 DPPH 自由基清除率(14.63%)。与之相似, 松茸多肽 ABTS 阳离子自由基清除能力也呈剂量依赖性, 质量浓度为 5.0 mg/mL 时, 肽 SHSFFLP 的 ABTS 阳离子自由基清除率(66.16%)显著高于肽 SFPIIWQ 清除率(4.64%)。综上, 两条肽均有一定体外抗氧化能力。值得注意的是, SHSFFLP 对 DPPH 自由基和 ABTS 阳离子自由基的清除能力明显强于 SFPIIWQ, 表明两条肽虽然疏水性氨基酸组成相似, 但是抗氧化活性差别较大, 这可能与它们的空间结构有关。

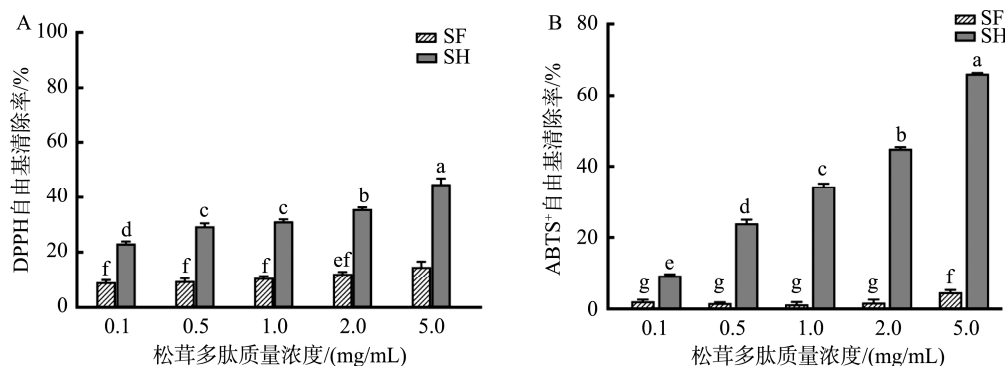
2.6 细胞毒性试验

当细胞存活率在 90%以下时, 即可认为对细胞具有毒性^[33]。由图 3A 可知, 当多肽质量浓度超过 200 $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞存活率显著低于 90%, 说明质量浓度 50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ 的松茸多肽对 HepaRG 细胞无明显毒害作用,

可用于后续试验。由图 3B 可知, 与对照组相比, 当 H_2O_2 浓度为 400 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞存活率显著降低至 51.36%, 表明 H_2O_2 诱导 HepaRG 细胞氧化损伤建模成功。由图 3C 可知, 随着多肽质量浓度增加, 细胞存活率逐渐上升。200 $\mu\text{g/mL}$ 的 SHSFFLP 处理组细胞存活率为 73.41%, 而同剂量 SFPIIWQ 处理组细胞存活率为 59.12%, 均显著高于损伤组, 表明 SHSFFLP 和 SFPIIWQ 均对 H_2O_2 诱导的氧化损伤 HepaRG 细胞有一定保护作用, 且 SHSFFLP 对 HepaRG 细胞保护能力强于 SFPIIWQ, 这可能与它们的清除细胞内自由基能力有关。

2.7 细胞内 ROS、MDA 含量及 SOD 活力

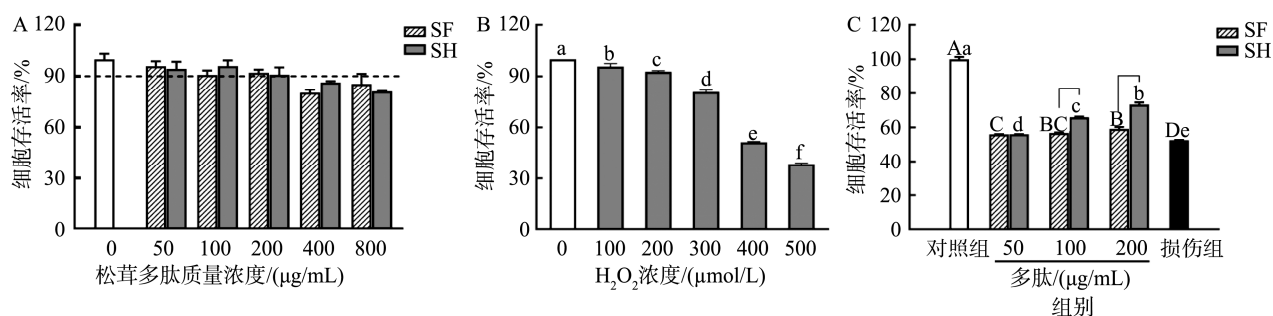
由图 4A 可知, 与空白组相比, 模型组细胞内 ROS 相对含量显著升高至 339.69%, 说明 HepaRG 细胞氧化损伤模型建立成功; 随着多肽质量浓度的增加, 细胞内 ROS 水平显著下降, 说明 H_2O_2 能诱导细胞内 ROS 产生从而损伤细胞, 而松茸多肽可通过降低细胞内活性氧水平起到保护细胞的作用。由图 4B 可知, 与对照组相比, 损伤组细胞内 MDA 含量显著升高至 2.87 $\mu\text{mol/mg prot}$; 随着多肽质量浓度的增加, 细胞内 MDA 含量逐渐降低, 说明 H_2O_2 可通过



注: SH 代表肽 SHSFFLP, SF 代表肽 SFPIIWQ; 不同小写字母代表差异显著, 下同。

图 2 松茸多肽体外化学抗氧化能力

Fig.2 Chemical antioxidant capacity of matsutake polypeptides in vitro



注: A 图表示不同质量浓度的松茸多肽对 HepaRG 细胞存活率的影响; B 图表示不同浓度的 H_2O_2 对细胞存活率的影响; C 图表示松茸多肽对受 H_2O_2 损伤细胞存活率的影响; B 图中不同小写字母表示组间差异显著, $P < 0.05$; C 图中使用的 H_2O_2 浓度为 400 $\mu\text{mol/L}$; C 图中不同大写字母表示 SF 组间差异显著, 不同小写字母表示 SH 组间差异显著, **表示 SF 和 SH 组间差异极显著, $P < 0.01$, 下同。

图 3 不同浓度下松茸多肽和 H_2O_2 细胞存活率

Fig.3 Cell viability under different peptide and H_2O_2 mass concentrations

诱导细胞内 MDA 的积累损伤细胞, 而松茸多肽可通过降低细胞内 MDA 含量起到保护细胞的作用。由图 4C 可知, 与对照组相比, 损伤组细胞内 SOD 活力显著降低至 79.41 U/mg prot; 随着多肽质量浓度的增加, 细胞内 SOD 活性显著上升, 说明 H_2O_2 能通过降低细胞内 SOD 活性损伤细胞, 而松茸多肽可通过提升细胞内 SOD 活性起到保护细胞的作用。

综合松茸多肽对氧化损伤细胞内 ROS、MDA 水平及 SOD 活性的影响结果可知, SHSFFLP 和 SFPPIWQ 可能是通过降低细胞内 ROS 和 MDA 水平, 提高 SOD 活力来抑制细胞凋亡。SHSFFLP 对氧化损伤 HepaRG 细胞保护作用强于 SFPPIWQ, 这与 SHSFFLP 的抗氧化活性强于 SFPPIWQ 的结果相一致。

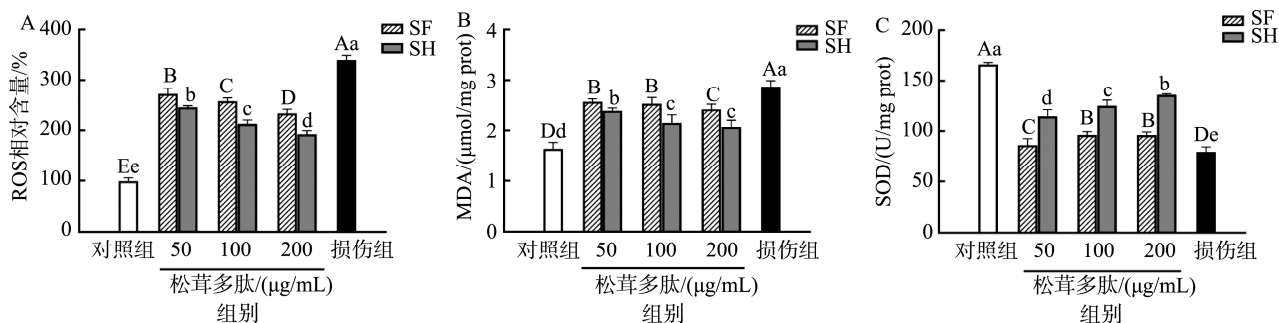
2.8 松茸肽的二级结构分析

由于抗氧化肽的氨基酸序列和结构不同, 其抗氧化活性存在差异^[34]。松茸蛋白肽 SHSFFLP 和 SFPPIWQ 疏水性氨基酸组成相似, 然而两条肽的抗氧化活性存在明显差异, 这可能与它们的空间结构有关。由图 5A 可知, 酰胺带吸收峰频率和振幅的差异, 表明两种肽的二级结构存在差异。由图 5B 可知, 与 SFPPIWQ 相比, SHSFFLP 二级结构

中 β -折叠相对含量图增长至 29.53%, β 转角相对含量图降至 17.17%, 无规则卷曲相对含量图增长至 53.20%。研究表明, β -折叠代表分子有序性, β 折叠使得肽链展开, β 转角和无规则卷曲是柔性构象, 用于连接多肽元件^[35]。SHSFFLP 二级结构含有更高的 β 折叠, 而 SHSFFLP 抗氧化能力优于 SFPPIWQ, 可能与 SFPPIWQ 结构更伸展从而能暴露更多与自由基作用位点有关。

3 结 论

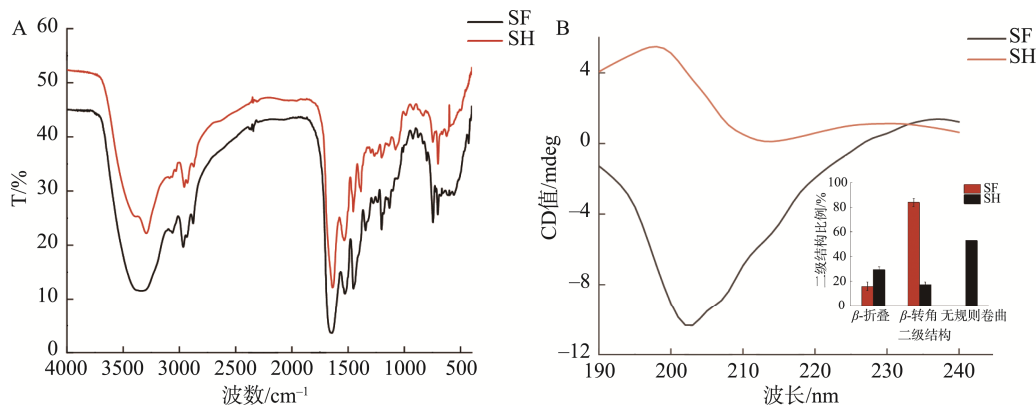
本研究以蛋白提取率为指标, 基于响应面法确定了松茸蛋白提取较佳工艺参数为提取温度 48°C、提取时间 120 min、pH 10, 此条件下蛋白提取率高达(72.56±0.45)%。通过构建细胞模型和比较制备的松茸蛋白肽 SHSFFLP 和 SFPPIWQ 二级结构, 发现 SHSFFLP 抗氧化能力强于 SFPPIWQ 的原因可能与 SHSFFLP 的 β 折叠相对含量较高有关, 这需要进一步的研究论证。未来, 可基于动物模型的相关细胞信号通路展开对松茸抗氧化肽作用机制进行更深入探索, 为松茸蛋白和抗氧化肽的开发利用提供更充分的理论依据。



注: H_2O_2 作用浓度为 400 $\mu\text{mol/L}$ 。

图 4 松茸多肽对氧化损伤 HepaRG 细胞内 ROS 含量(A)、MDA 含量(B)和 SOD 活性(C)的影响

Fig.4 Effects of matsutake peptides on ROS content (A), MDA content (B) and SOD activity (C) in oxidative damaged HepaRG cells



注: A 图为红外光谱图; B 图为圆二色谱图, B 中小图为多肽二级结构相对含量图。

图 5 松茸多肽红外光谱和圆二色谱分析

Fig.5 Infrared spectroscopy and circular dichroism analysis of matsutake peptides

参考文献

- [1] 刘利平, 李德顺, 张劲松, 等. 不同产地松茸子实体营养和功能成分比较[J]. 中国食用菌, 2022, 41(12): 31–38.
- LIU LP, LI DS, ZHANG JS, *et al.* Comparison of nutritional and functional components in fruiting bodies of matsutake mushrooms from different producing areas [J]. Edible Fungi China, 2022, 41(12): 31–38.
- [2] 菌中之王: 松茸[Z]. 吉林蔬菜, 2020, (1): 38.
- The king of germs: *Tricholoma matsutake* [Z]. Jilin Veget, 2020, (1): 38.
- [3] 松茸的营养构成及营养特点[J]. 中国食用菌, 2017, 36(4): 91.
- Nutrient composition and characteristics of *Tricholoma matsutake* [J]. Edible Fungi China, 2017, 36(4): 91.
- [4] 么宏伟, 佟立君, 付婷婷, 等. 松茸食药价值研究进展[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(5): 67–69.
- MO HW, TONG LJ, FU TT, *et al.* Research progress on medicinal value of *Tricholoma matsutake* [J] J Anhui Agric Sci, 2015, 43(5): 67–69.
- [5] 叶柳珍, 王成阳, 张明泽, 等. 松茸产品开发的研究进展[J]. 广东化工, 2014, 41(14): 111, 120.
- YE LZ, WANG CY, ZHANG MZ, *et al.* Research progress of *Tricholoma matsutake* products [J]. Guangdong Chem Ind, 2014, 41(14): 111, 120.
- [6] 安全, 李国庆, 李学涛, 等. 松茸多糖的提取精制工艺及其美白功效验证[J]. 香料香精化妆品, 2022, 193(4): 82–88, 115.
- AN Q, LI GQ, LI XT, *et al.* Extraction and refining process of matsutake mushroom polysaccharide and verification of its whitening effect [J]. Flav Frag Cosm, 2022, 193(4): 82–88, 115.
- [7] DING X, LI J, HOU YL, *et al.* Comparative analysis of macrophage transcriptomes reveals a key mechanism of the immunomodulatory activity of *Tricholoma matsutake* polysaccharide [J]. Oncol Rep, 2016, 36(1): 503–513.
- [8] 沈成龙, 陈怡帆, 曾英杰, 等. 松茸多糖的体外抗氧化性及对乙醇氧化损伤小鼠作用的研究[J]. 食品工业科技, 2022, 43(23): 371–377.
- SHEN CL, CHEN YF, ZENG YJ, *et al.* Antioxidant activity of matsutake mushroom polysaccharide *in vitro* and its effect on mice damaged by ethanol oxidation [J]. Sci Technol Food Ind, 2022, 43(23): 371–377.
- [9] 杜汉廷, 葛麒麟, 林松毅, 等. 低温水提松茸免疫活性因子的试验研究[J]. 农业工程学报, 2022, 38(2): 323–330.
- DU HT, GE Q, LIN SY, *et al.* Experimental study on immune activity factors of matsutake mushrooms extracted by low temperature water [J]. Trans Chin Soc Agric Eng, 2022, 38(2): 323–330.
- [10] LI MQ, DONG L, DU HT, *et al.* Potential mechanisms underlying the protective effects of *Tricholoma matsutake* singer peptides against LPS-induced inflammation in RAW264. 7 macrophages [J]. Food Chem, 2021, 353: 129452.
- [11] 黄小梨, 徐紫婷, 巫胜源, 等. 生物活性多肽及其应用研究进展[J]. 食品安全导刊, 2022, 360(31): 158–160.
- HUANG XL, XU ZT, WU SY, *et al.* Research progress of bioactive peptides and their applications [J]. Chin Food Saf Magaz, 2022, 360(31): 158–160.
- [12] 郑新雷. 杏鲍菇分离蛋白的制备、理化功能特性与抗氧化活性研究[D]. 南宁: 广西大学, 2019.
- ZHENG XL. Study on preparation, physicochemical properties and antioxidant activity of *Pleurotus eryngii* protein [D]. Nanning: Guangxi University, 2019.
- [13] 胡博, 高盼, 毛燕妮, 等. 酶法辅助提取米糠蛋白工艺优化的研究[J]. 中国油脂, 2023-04-15. DOI: 10.19902/j.cnki.zgyz.1003-7969.220623
- HU B, GAO P, MAO YN, *et al.* Study on optimization of enzymatic assisted extraction of rice bran protein [J]. China Oils: 1–13. [2023-04-15]. DOI: 10.19902/j.cnki.zgyz.1003-7969.220623
- [14] 彭倩, 颜小燕, 李雨婷, 等. 盐提和碱提酸沉两种方法提取腰果蛋白的结构及其功能性质分析[J]. 食品科学, 2017, 38(23): 75–81.
- PENG Q, YAN XY, LI YT, *et al.* Analysis of structure and functional properties of cashew protein extracted by salt extraction and alkali extraction and acid precipitation [J]. Food Sci, 2017, 38(23): 75–81.
- [15] 徐玥, 张存芳, 杨耿, 等. 碱提酸沉法提取牡丹籽饼中蛋白质的研究[J]. 中国油脂, 2019, 44(8): 28–30, 40.
- XU Y, ZHANG CL, YANG G, *et al.* Study on extraction from peony seeds by alkali extraction and acid precipitation [J]. China Oils, 2019, 44(8): 28–30, 40.
- [16] KUMAKURA K, HORI C, MATSUOKA H, *et al.* Protein components of water extracts from fruiting bodies of the reishi mushroom *Ganoderma lucidum* contribute to the production of functional molecules [J]. J Sci Food Agric, 2019, 99(2): 529–535.
- [17] ZHANG QZ, TONG XH, QI BK, *et al.* Changes in antioxidant activity of alcalase-hydrolyzed soybean hydrolysate under simulated gastrointestinal digestion and transepithelial transport [J]. J Funct Foods, 2019, A1: 298–305.
- [18] HU F, CI AT, WANG H, *et al.* Identification and hydrolysis kinetic of a novel antioxidant peptide from pecan meal using alcalase [J]. Food Chem, 2018, 261: 301–310.
- [19] 刘先皓, 杨明静, 陈壁, 等. 东紫苏多酚提取物对 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(24): 9499–9506.
- LIU XH, YANG MJ, CHEN B, *et al.* Research of protective effect of polyphenol extract from *Perilla orientalis* on oxidative damaged HepG2 cells [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(24): 9499–9506.
- [20] 王丽波, 程龙, 徐雅琴, 等. 南瓜籽多糖热水提取工艺优化及其抗氧化活性[J]. 农业工程学报, 2016, 32(9): 284–290.
- WANG LB, CHEN L, XU YQ, *et al.* Optimization of hot water extraction process and antioxidant activity of pumpkin seed polysaccharide [J]. Trans Chin Soc Agric Eng, 2016, 32(9): 284–290.
- [21] 陈振家, 王晓闻, 荆旭, 等. 不同温度处理对红芸豆蛋白热稳定性及结构的影响[J]. 农业工程学报, 2020, 36(19): 306–312.
- CHEN ZJ, WANG XW, JING X, *et al.* Effect of different temperature treatment on thermal stability and structure of red assail protein [J]. Trans Chin Soc Agric Eng, 2020, 36(19): 306–312.
- [22] 高泽汝, 刘昆仑, 陈复生. 碱法提取玉米胚芽蛋白的条件优化[J]. 食品工业, 2020, 289(10): 5–8.
- GAO ZR, LIU KL, CHEN FS. Optimization of extracting maize germ

- protein by alkali method [J]. Food Ind, 2020, 289(10): 5–8.
- [23] SEREEWATTHANAWUT L, PRAPINTIP S, WATCHIRARUJI K, *et al.* Extraction of protein and amino acids from deoiled rice bran by subcritical water hydrolysis [J]. Bioresour Technol, 2008, 99(3): 555–561.
- [24] 李小凡, 王常青, 誉艳, 等. 香菇柄中水溶性蛋白的提取及组成分析[J]. 食品工业科技, 2015, 36(9): 343–345, 349.
- LI XF, WANG CQ, ZI Y, *et al.* Extraction and composition analysis of water-soluble protein from stalk of mushroom [J]. Sci Technol Food Ind, 2015, 36(9): 343–345, 349.
- [25] 李大文. 苦杏仁蛋白提取工艺研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2013.
- LI DW. Study on extraction technology of amygdalin [D] Xianyang: Northwest Agriculture & Forestry University, 2013.
- [26] DENIZ S, HARALD R, SUSANNE S. Ultrasound-assisted extraction of protein from pumpkin seed press cake: Impact on protein yield and techno-functionality [J]. Foods, 2022, 11(24): 4029.
- [27] FENGXUE Z, ZHIGANG S, XIN L, *et al.* Ultrasound-assisted alkaline extraction of protein from tenebrio molitor larvae: Extraction kinetics, physiochemical, and functional traits [J]. Ultra Sonochem, 2023, 95: 106379.
- [28] 王立, 邹烨, 张坤, 等. 响应面试验优化超声辅助碱提鸭肝蛋白工艺及其抗氧化性能[J]. 食品科学, 2017, 38(18): 222–228.
- WANG L, ZOU Y, ZHANG K, *et al.* Response surface test was used to optimize the extraction process of duck liver protein by ultrasonic assisted alkali and its antioxidant properties [J]. Food Sci, 2017, 38(18): 222–228.
- [29] 张艳荣, 高宇航, 刘婷婷, 等. 白灵菇蛋白提取及功能特性和结构分析[J]. 食品科学, 2018, 39(14): 42–50.
- ZHANG YR, GAO YH, LIU TT, *et al.* Protein extraction, functional properties and structural analysis of mushroom [J]. Food Sci, 2018, 39(14): 42–50.
- [30] 包显颖, 陈丽, 倪姮佳, 等. 抗氧化多肽研究及其应用前景[J]. 生命科学, 2016, 28(9): 998–1005.
- BAO XY, CHEN L, NI HJ, *et al.* Research and application prospect of antioxidant polypeptides [J]. Chin Bull Life Sci, 2016, 28(9): 998–1005.
- [31] ZHENG JR, LI MQ, WANG CZ, *et al.* A novel nonapeptide SSDAFFPFR from Antarctic krill exerts a protective effect on PC12 cells through the BCL-XL/Bax/Caspase-3/p53 signaling pathway [J]. Food Biosci, 2021, 43: 101345.
- [32] 王共明, 张健, 李来好, 等. 仿刺参精、卵多肽体外抗氧化及对 H₂O₂ 诱导巨噬细胞氧化损伤的保护作用[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(15): 4933–4941.
- WANG GM, ZHANG J, LI LH, *et al.* Antioxidant and protective effects of Apostichopus japonicus extract and egg polypeptides on H₂O₂-induced oxidative damage of macrophages *in vitro* [J]. J Food Saf Qual, 2022, 13(15): 4933–4941.
- [33] ZHAO Y, DONG YF, GE Q, *et al.* Neuroprotective effects of NDEELNK from sea cucumber ovum against scopolamine-induced PC12 cell damage through enhancing energy metabolism and upregulation of the PKA/BDNF/NGF signaling pathway [J]. Food Funct, 2021, 12(17): 7676–7687.
- [34] WU D, ZHANG SY, SUN N, *et al.* Neuroprotective function of a novel hexapeptide QMDDQ from shrimp via activation of the PKA/CREB/BDNF signaling pathway and its structure-activity relationship [J]. J Agric Food Chem, 2020, 68(24): 6759–6769.
- [35] 吴丹. 青虾-玉米双源蛋白肽协同改善东莨菪碱诱导记忆损伤的机理研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2020.
- WU D. Study on mechanism of memory improvement by synergistic action of shrimp peptide and maize peptide through scopolamine-induced amnesiac mice [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2020.

(责任编辑: 郑 丽 韩晓红)

作者简介



葛 麒, 硕士, 主要研究方向为食品功能与营养。

E-mail: 1942791040@qq.com



林松毅, 博士, 教授, 主要研究方向为食品功能与营养。

E-mail: linsongyi730@163.com