

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2022.80368

虎奶菇菌丝体抗菌肽提取工艺优化及活性研究

Optimization of extraction process and activity study of antimicrobial peptides from *Pleurotus tuber-regium* mycelium

张书会 罗 璐 孙雪言 马爱民

ZHANG Shu-hui LUO Lu SUN Xue-yan MA Ai-min

(华中农业大学食品科学技术学院, 湖北 武汉 430070)

(College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

摘要:目的:提高虎奶菇菌丝体抗菌肽得率和抑菌率。方法:将抗菌肽的得率和对金黄色葡萄球菌及大肠杆菌的抑菌率作为评价指标,在蛋白酶筛选的基础上,优化虎奶菇菌丝体抗菌肽的提取工艺,并测定其抗菌肽的最低抑菌浓度。结果:碱性蛋白酶酶解制备虎奶菇菌丝体抗菌肽的最佳工艺条件为酶解温度 39.5 °C、酶解时间 3.2 h、pH 值 11.1,料液比 1 : 20 (g/mL),酶添加量 6 000 U/g,此条件下虎奶菇菌丝体抗菌肽对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的实际抑菌率分别为 74.17% 和 86.22%,抗菌肽提取率为 22.67%。抗菌肽对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的 MIC 值分别为 5.0, 2.5 mg/mL。结论:虎奶菇菌丝体抗菌肽具有显著的抑菌活性,尤其是对大肠杆菌的抑菌作用更强。

关键词:虎奶菇菌丝体;抗菌肽;酶解法;抑菌活性;得率

Abstract: Objective: To improve the yield and antibacterial rate of antimicrobial peptides from *Pleurotus tuber-regium* mycelium (PTRM-AMPs). **Methods:** Taking the yield and the antibacterial rate of PTRM-AMPs against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* as evaluation indexes, on the basis of protease screening, the extraction process of PTRM-AMPs was optimized, and the minimum inhibitory concentration of PTRM-AMPs was determined. **Results:** The optimum technological conditions for the preparation of PTRM-AMPs by alkaline protease hydrolysis were as follows: the enzymatic hydrolysis temperature was 39.5 °C, the enzymatic hydrolysis time was 3.2 h, the pH value was 11.1, the solid-liquid ratio was 1 : 20 (g/mL), and the enzyme addition was 6 000 U/g. Under these conditions, the actual antibacterial rates of PTRM-AMPs against *S. aureus* and *E. coli* were

74.17% and 86.22% respectively, and the yield of PTRM-AMPs was 22.67%. The MIC values of PTRM-AMPs against *S. aureus* and *E. coli* were 5.0, 2.5 mg/mL respectively. **Conclusion:** PTRM-AMPs has significant antibacterial activity, especially against *E. coli*.

Keywords: *Pleurotus tuber-regium* mycelium; antimicrobial peptide; enzymatic hydrolysis; antibacterial activity; yield

抗菌肽 (Antimicrobial peptides, AMPs) 是含有 100 个以内氨基酸残基的多肽抗菌物质,具有广谱抑菌效果,对细菌、真菌、病毒以及寄生虫等均有抑制作用^[1],被广泛应用于生物医药、食品及动物饲料加工领域。抗菌肽能够通过破坏微生物的细胞膜或靶向细胞内成分产生抑菌作用^[2]。截至 2022 年 5 月,已有 3 000 多种抗菌肽被收录至抗菌肽数据库 (<https://aps.unmc.edu>) 中。然而这些抗菌肽主要来源于动物、植物和细菌,抗菌肽数据库中真菌来源的抗菌肽 < 1%。

虎奶菇 (*Pleurotus tuber-regium*) 是一种既能形成菌核又能形成子实体的高温食用菌,广泛分布于热带和亚热带地区^[3]。然而虎奶菇菌核和子实体的生长周期长,生物转化率低,因此常用液体深层发酵培养的菌丝体作为试验材料^[4]。近年来,有关虎奶菇生物活性的研究主要集中于抗氧化活性^[5]、抗肿瘤活性^[6]、免疫调节活性^[7]、抗炎活性^[8]、抑菌活性^[9]以及降血糖和降血脂活性^[10]等方面。虎奶菇菌丝体中含有丰富的蛋白质和氨基酸^[11],是天然抗菌肽的优质来源。但目前尚未见从虎奶菇菌丝体中提取抗菌肽的相关报道。

常见的抗菌肽制备方法主要包括酶解法、基因工程法、化学合成法以及微生物发酵法^[12]。由于专一性强、反应条件温和以及过程易于控制等优点,酶解法成为目前制备抗菌肽最常用的方法^[13]。因此,研究拟以虎奶菇菌丝体为原料,通过酶解法提取抗菌肽。在单因素试验的基础上结合响应面试验优化提取工艺,并对其抑菌活性

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:31772375)

作者简介:张书会,女,华中农业大学在读硕士研究生。

通信作者:马爱民(1965—),男,华中农业大学教授,博士。

E-mail: aiminma@mail.hzau.edu.cn

收稿日期:2022-04-30 改回日期:2022-07-31

进行研究,以期提高虎奶菇菌丝体抗菌肽的提取率和抑菌率,从而为虎奶菇菌丝体抗菌肽的进一步开发与利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株与主要试剂

虎奶菇菌株、金黄色葡萄球菌(ATCC25923)菌株、大肠杆菌(ATCC25922)菌株:华中农业大学食品科学技术学院食品微生物实验室;

木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶、风味蛋白酶、复合蛋白酶:上海源叶生物科技有限公司;

胰蛋白酶、牛血清白蛋白:德国 Biofroxx 公司;

福林酚:北京索莱宝科技有限公司;

乙醇、氢氧化钠、盐酸、四水合酒石酸钾钠:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.2 主要仪器与设备

真空冷冻干燥机:Beta2-8LD 型,德国 Christ 公司;

台式电热干燥箱:202-00AB 型,天津市泰斯特仪器有限公司;

数显恒温水浴锅:HH-4 型,上海力辰邦西仪器科技有限公司;

台式 pH 计:ST 2100 型,美国奥豪斯仪器有限公司;

超速冷冻离心机:Avanti J-E 型,美国 Beckman 公司;

超净工作台:VD-1320 型,北京东联哈尔仪器制造有限公司;

恒温培养摇床:KYC-1102C 型,金坛市盛蓝仪器制造有限公司;

全自动酶标仪:Multiskan Skyhigh 型,美国 Thermo 公司。

1.3 培养基

(1) PDA 培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂粉 15 g,加蒸馏水至 1 L,121 ℃ 高压灭菌 20 min。

(2) 发酵培养基:葡萄糖 20 g,酵母提取物 5 g,磷酸二氢钾 1 g,无水硫酸镁 0.5 g,加蒸馏水至 1 L,121 ℃ 高压灭菌 20 min。

(3) LB 培养基:胰蛋白胨 10 g,NaCl 10 g、酵母提取物 5 g,加蒸馏水至 1 L,121 ℃ 高压灭菌 20 min。

1.4 试验方法

1.4.1 液体深层发酵培养虎奶菇菌丝体 用孔径为 0.5 cm 的打孔器将 PDA 培养基上生长的虎奶菇菌丝体打孔后,用灭菌的镊子取 8 个菌丝块接种至 100 mL 液体发酵培养基中,32 ℃、120 r/min 培养 8 d。培养结束后,将其作为液体菌种,用灭菌的玻璃匀浆器磨匀,以 5% 的接种量接种至新的发酵培养基中。相同条件下培养 8 d,过滤洗涤,收集菌丝体,并冷冻干燥,获得干燥的虎奶菇

菌丝体。

1.4.2 样品脱脂 将冻干后的虎奶菇菌丝体研磨成粉末,于索氏提取器中用无水乙醇浸提 6 h 脱脂。脱脂后的菌丝于 50 ℃ 烘干,粉碎过筛,即得到脱脂虎奶菇菌丝体粉末。

1.4.3 酶解法制备虎奶菇菌丝体抗菌肽 参照文献[14—15]并修改。称取 1 g 脱脂菌粉,以料液比($m_{\text{菌粉}}:V_{\text{水}}$)为 1:20 (g/mL)溶解后,添加蛋白酶于最适 pH 及温度下酶解 3 h,加酶量为 8 000 U/g。每隔 1 h 使用 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L HCl 溶液维持体系中的 pH 恒定。反应结束,将虎奶菇菌丝体酶解液于沸水中水浴 10 min,11 000 r/min 离心 30 min,收集上清液。

1.4.4 虎奶菇菌丝体抗菌肽的初步分离 根据文献[15—16]并修改。向酶解上清液中加入 4 倍体积的无水乙醇,使乙醇体积分数为 80%,以除去酶解上清液中的多糖。混合液于 4 ℃ 静置 24 h,8 000 r/min 离心 15 min。将上清液旋转蒸发去除乙醇,加入一定体积的蒸馏水,—20 ℃ 放置过夜,真空冷冻干燥,获得虎奶菇菌丝体多肽粉末。

1.4.5 最适蛋白酶的筛选 分别用木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶、风味蛋白酶、复合蛋白酶和胰蛋白酶于其最适 pH 及温度下酶解制备虎奶菇菌丝体多肽(表 1)。将各蛋白酶酶解制备的虎奶菇菌丝体多肽粉末于干燥皿中贮藏用于后续多肽得率及抑菌率的测定。

1.4.6 单因素试验 在蛋白酶筛选的基础上,根据其最适蛋白酶的理論最适酶活范围,分别考察酶解温度(30, 35,40,45,50 ℃)、酶添加量(6 000,8 000,10 000,12 000, 14 000 U/g)、pH(9.5,10.0,10.5,11.0,11.5)、酶解时间(1,2,3,4,5 h)和料液比($V_{\text{水}}:m_{\text{菌粉}}$)[1:10,1:15,1:20,1:25,1:30 (g/mL)]对抗菌肽抑菌活性及得率的影响。

1.4.7 响应面试验 在单因素试验的基础上,确定响应面试验的三因素和三水平。并根据 Design-Expert 10.0.7 软件中的 Box-Behnken 中心组合设计原理设计响应面试验,优化虎奶菇菌丝体抗菌肽的最佳酶解条件。

表 1 不同蛋白酶的理論最适酶活条件

Table 1 Theoretical optimal conditions for enzyme activity of different proteases

种类	最适 pH	最适温度/℃	酶活/(U·g ⁻¹)
木瓜蛋白酶	7.0	37	8.0×10 ⁵
中性蛋白酶	7.5	45	1.0×10 ⁵
碱性蛋白酶	10.5	40	2.0×10 ⁵
风味蛋白酶	7.5	50	0.2×10 ⁵
复合蛋白酶	7.0	40	1.2×10 ⁵
胰蛋白酶	8.0	37	2.8×10 ⁵

1.4.8 多肽得率测定 参照文献[15]并修改。以牛血清白蛋白标准品浓度为横坐标,吸光度值 $OD_{500\text{ nm}}$ 为纵坐标绘制标准曲线,得线性回归方程 $y = 0.769x + 0.0532$ ($R^2 = 0.9982$)。将多肽粉末加蒸馏水复溶,经 50 倍稀释后取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 于 1.5 mL 离心管中,加入 $500\text{ }\mu\text{L}$ 碱性铜试液, $25\text{ }^\circ\text{C}$ 反应 10 min ,随后加入 $50\text{ }\mu\text{L}$ 福林酚试剂混匀后继续反应 30 min ,用酶标仪测定 500 nm 处吸光值。空白组用超纯水代替多肽溶液,按式(1)计算多肽得率。

$$R_1 = \frac{C \times n \times V}{m} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

R_1 ——虎奶菇菌丝体多肽得率, %;

C ——稀释后多肽溶液的质量浓度, mg/mL ;

n ——多肽的稀释倍数;

V ——虎奶菇菌丝体酶解后获得上清液的体积, mL ;

m ——脱脂菌粉样品的质量, mg 。

1.4.9 总糖含量测定 采用苯酚—硫酸法[17]。以葡萄糖含量为横坐标, $OD_{490\text{ nm}}$ 为纵坐标,绘制总糖含量测定的标准曲线为 $y = 7.0074x + 0.0678$ ($R^2 = 0.9997$)。并按式(2)计算总糖含量。

$$R_2 = \frac{C \times n \times V}{m} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

R_2 ——总糖含量, %;

C ——稀释后酶解液中糖质量浓度, mg/mL ;

n ——酶解液的稀释倍数;

V ——酶解液体积, mL ;

m ——脱脂菌粉样品的质量, mg 。

1.4.10 抑菌活性测定 参照文献[18]的方法,按式(3)计算抑菌率。

$$Y = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

Y ——抗菌肽抑菌率, %;

A_0 ——培养 12 h 后对照组混合液在 $OD_{600\text{ nm}}$ 处的吸光度;

A_1 ——培养 12 h 后样品组混合液在 $OD_{600\text{ nm}}$ 处的吸光度。

1.4.11 最小抑菌浓度(MIC)测定 采用微量稀释法[19]。

1.4.12 数据处理 每组试验重复 3 次,采用 Origin 2021 软件绘制图形,Design Expert 10.0.7 软件对响应面试验结果进行分析。

2 结果与分析

2.1 虎奶菇菌丝体抗菌肽的初步分离

由图 1 可知,醇沉法脱糖后酶解液中总糖含量仅为 2.95% ,远低于多肽含量,从而保证了多肽作为酶解液中

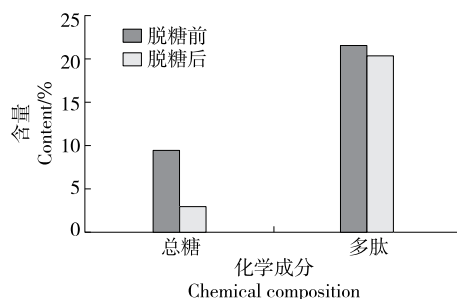


图 1 脱糖前后酶解液中多肽及总糖含量变化

Figure 1 Changes of polypeptide and total sugar contents in enzymatic hydrolysate before and after desugarization

抑菌的主要活性成分。此外,脱糖处理对酶解液中多肽含量的影响较小,脱糖处理前后酶解液中多肽含量分别为 21.55% 和 20.43% ,损失量较低。

2.2 最适蛋白酶的筛选

由图 2 可知,相比于其他蛋白酶,风味蛋白酶酶解制备的多肽得率最高,为 18.59% 。推测是因为风味蛋白酶是经复配而成的一种复合型蛋白酶,含有内切蛋白酶和外切肽酶,具有广泛的作用位点,水解更彻底,因此多肽得率较高[20]。其次对虎奶菇菌丝体多肽得率影响较大的是碱性蛋白酶(17.05%),是因为碱性蛋白酶主要作用于 C-端的某些疏水性氨基酸残基,导致蛋白质结构疏松,能够获得较多的多肽[21]。林冰洁等[22]研究发现,相比于中性、复合和风味蛋白酶,碱性蛋白酶酶解制备的抗菌肽得率最高为 88.88% ,与试验结果相似。

碱性蛋白酶酶解产生的多肽对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌均具有抑制作用,且抑菌活性最强,分别为 61.10% 和 75.30% ,与马尚玄等[23]的结论类似。利用木瓜蛋白酶、中性蛋白酶和胰蛋白酶制备的多肽对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的生长存在不同程度的促进作用,可能是这些蛋白酶制备的多肽粉末中存在的含碳物质和含氮物质能够促进金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的进一步生长

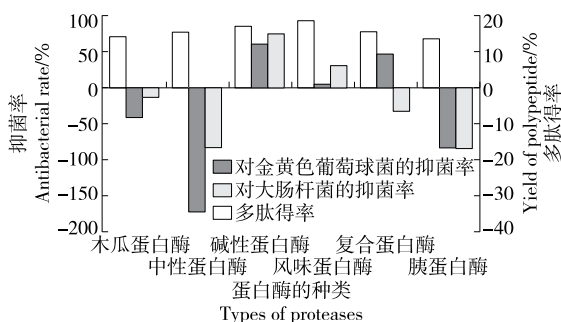


图 2 不同蛋白酶对虎奶菇菌丝体多肽得率及抑菌率的影响

Figure 2 Effects of different proteases on the yield and antibacterial rate of PTRM-AMPs

发育^[18-19]。宋伟光^[24]研究发现,碱性蛋白酶酶解产物中分子量<1 kD的多肽比例最高,为86.5%。而木瓜蛋白酶和中性蛋白酶中分子量<1 kD的多肽比例相对较低,分别为73.1%和72.4%。林贺等^[25]发现<1 kD的多肽组分对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌作用最显著。

综上,以多肽得率及多肽对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌率为评价指标,与其他5种蛋白酶相比,碱性蛋白酶酶解虎奶菇菌丝体得到的多肽不仅得率较高,其抑菌活性也最强。因此,选取碱性蛋白酶用于制备虎奶菇菌丝体抗菌肽。

2.3 单因素试验

2.3.1 酶解温度 由图3可知,当酶解温度为30~50℃时,抗菌肽得率和抑菌率呈先增加后降低的趋势,并在40℃时达最高,是因为过低的温度不利于蛋白酶与底物的结合,酶促反应延缓,因此得到的抗菌肽片段也相对较少,抑菌活性降低。随着酶解温度的增加,蛋白酶分子与底物分子之间自由碰撞概率增加,酶的催化效率也随之增加,能够促使底物产生更多的抗菌肽。酶解温度过高,蛋白酶的结构可能被破坏,酶活性降低,甚至失活,不利于抗菌肽的生成。因此选择40℃为最佳酶解温度。

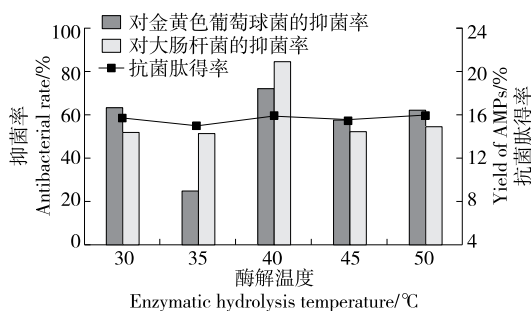


图3 酶解温度对虎奶菇菌丝体抗菌肽抑菌率及得率的影响

Figure 3 Effects of enzymatic hydrolysis temperature on antibacterial rate and yield of PTRM-AMPs

2.3.2 酶解时间 由图4可知,当酶解时间为1~3 h时,虎奶菇菌丝体抗菌肽对金黄色葡萄球菌的抑菌率逐渐增加,在3~5 h酶解范围内变化趋势平缓。抗菌肽得率及大肠杆菌的抑菌率在酶解1~5 h时先上升后下降,且在酶解3 h时达最大值,分别为17.67%和84.75%。继续增加酶解时间,抗菌肽得率和抑菌率反而降低。这可能是因为更长的酶解时间使得具有抑菌活性的多肽被继续降解为氨基酸,进而导致抗菌肽减少,抑菌率下降。故选择3 h为最佳酶解时间。

2.3.3 pH 由图5可知,当pH为9.5~10.5时,抗菌肽得率无明显变化,继续增大pH,抗菌肽得率变大。这是因为碱性蛋白酶在碱性较高的环境下能够发挥更好的作用,从而促进抗菌肽的生成。当pH为9.5~11.0时,抗菌

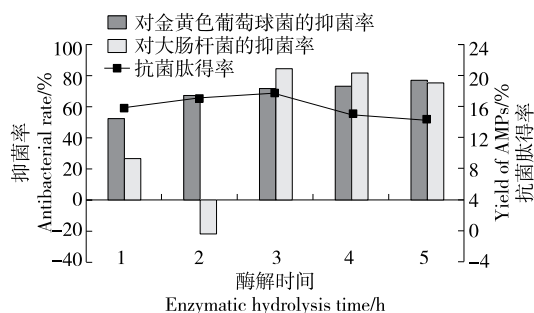


图4 酶解时间对虎奶菇菌丝体抗菌肽抑菌率及得率的影响

Figure 4 Effects of enzymatic hydrolysis time on antibacterial rate and yield of PTRM-AMPs

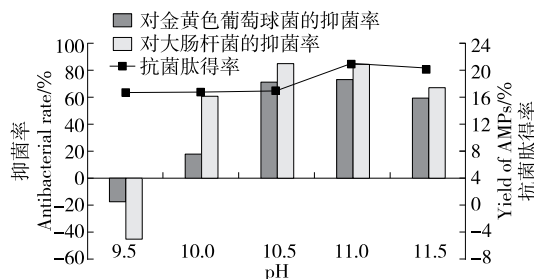


图5 pH对虎奶菇菌丝体抗菌肽抑菌率及得率的影响

Figure 5 Effects of pH on antibacterial rate and yield of PTRM-AMPs

肽对金黄色葡萄球菌的抑菌率随pH的增大逐渐增加,并在pH为11.0时达最大值(74.03%),继续增大pH,抑菌率反而下降,是因为过高的pH易导致蛋白酶活性降低,甚至失活。虎奶菇菌丝体抗菌肽对大肠杆菌抑菌率在pH为9.5~10.5时随pH的增加逐渐增强,当pH为10.5、11.0时,抑菌率差异不显著,分别为84.75%和84.54%。当pH>11.0时,抑菌率下降。因此选择11.0为最佳酶解pH。

2.3.4 料液比 由图6可知,当料液比为1:10~1:20(g/mL)时,虎奶菇菌丝体抗菌肽得率逐渐增加,抗菌肽对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌率也呈上升趋势。这是因为料液比较低时,底物黏稠,不能充分接触蛋白酶,不利于抗菌肽的提取。在一定水分含量范围内,随着料液比的增加,溶剂完全浸润样品,底物与蛋白酶充分接触,产生更多具有抗菌活性的多肽片段^[26]。当料液比从1:20(g/mL)继续增加至1:30(g/mL)时,抗菌肽得率虽有所增加,但抑菌率降低,可能是随着料液比的进一步增加,样品中其他水溶性物质溶解度增加,抗菌肽抑菌率下降,甚至促进大肠杆菌的生长。因此,综合考虑,选择1:20(g/mL)为最佳料液比。

2.3.5 酶添加量 由图7可知,抗菌肽对金黄色葡萄球菌的抑菌率在加酶量为6 000~8 000 U/g范围内平缓增

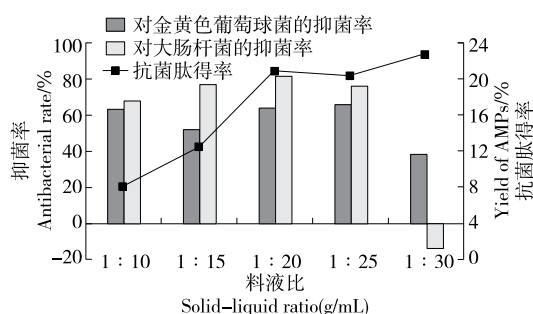


图 6 料液比对虎奶菇菌丝体抗菌肽抑菌率及得率的影响

Figure 6 Effects of solid-liquid ratio on antibacterial rate and yield of PTRM-AMPs

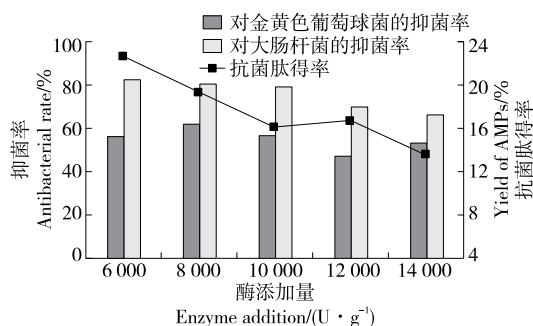


图 7 酶添加量对虎奶菇菌丝体抗菌肽抑菌率及得率的影响

Figure 7 Effects of enzyme addition on antibacterial rate and yield of PTRM-AMPs

加,在 8 000~14 000 U/g 范围内呈下降趋势。而抗菌肽得率和对大肠杆菌的抑菌率在加酶量为 6 000~14 000 U/g 时持续下降,是因为蛋白酶和底物的比例达到平衡时,能够生成较多的抗菌肽。蛋白酶添加量继续增加,底物质量保持不变,则会使得生成的抗菌肽进一步水解成活性较低的小分子肽或者无活性的氨基酸,抗菌肽含量及抑菌率下降。为节约成本,选择 6 000 U/g 为最佳酶添加量。

2.4 响应面优化

2.4.1 响应面试验设计与结果 根据单因素试验结果,固定料液比为 1:20 (g/mL),酶添加量为 6 000 U/g,以酶解时间、pH 和酶解温度为自变量,以抗菌肽对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌率为响应值,根据 Design-Expert 10.0.7 软件中的 Box-Behnken 中心组合设计原理进行响应面设计,因素水平见表 2,试验设计及结果见表 3。

2.4.2 响应面模型的建立及方差分析 通过 Design-Expert 10.0.7 软件对试验结果进行多元回归拟合,得回归模型方程:

$$Y_1 = 74.26 + 0.78A + 0.51B - 0.40C - 0.34AB -$$

表 2 响应面试验的因素和水平

Table 2 Factors and levels of response surface test

水平	A 酶解时间/h	B pH	C 酶解温度/℃
-1	2	10.5	35
0	3	11.0	40
1	4	11.5	45

表 3 响应面试验设计及结果

Table 3 Experimental design and results for response surface methodology

试验号	A	B	C	Y ₁ 对金黄色葡萄球菌的抑菌率/%	Y ₂ 对大肠杆菌的抑菌率/%
1	0	-1	-1	71.74	84.33
2	0	1	-1	72.51	85.26
3	-1	-1	0	70.12	83.23
4	-1	1	0	71.82	84.70
5	0	0	0	74.20	86.57
6	0	0	0	73.95	86.22
7	0	1	1	71.83	85.01
8	0	0	0	73.53	86.44
9	0	0	0	74.62	86.21
10	-1	0	-1	70.44	83.96
11	-1	0	1	70.34	83.55
12	1	1	0	72.69	85.35
13	1	-1	0	72.34	84.45
14	1	0	-1	72.58	85.02
15	0	-1	1	70.56	83.99
16	0	0	0	74.99	86.12
17	1	0	1	71.33	84.89

$$0.29AC + 0.12BC - 1.50A^2 - 1.01B^2 - 1.58C^2, \quad (3)$$

$$Y_2 = 86.31 + 0.53A + 0.54B - 0.14C - 0.14AB + 0.07AC + 0.023BC - 1.09A^2 - 0.79B^2 - 0.87C^2. \quad (4)$$

由表 4 可知, Y₁ 模型 $P < 0.01$, 失拟项 $P > 0.05$, 说明模型显著, 失拟项不显著。即该模型拟合较好, 能准确反映酶解时间、pH 和酶解温度对虎奶菇菌丝体抗菌肽抑菌率的影响。模型决定系数 R^2 为 0.964 6, 校正决定系数 R_{adj}^2 为 0.919 1, 说明该模型可靠, 预测值和实际值之间误差较小, 能准确预测和分析虎奶菇菌丝体抗菌肽对金黄色葡萄球菌的抑菌率。回归模型中一次项 A 和二次项 A^2 、 B^2 和 C^2 对虎奶菇菌丝体抗菌肽抑菌率的影响极显著 ($P < 0.01$), 一次项 B 和 C 对虎奶菇菌丝体抗菌肽抑菌率的影响显著 ($P < 0.05$)。各因素对虎奶菇菌丝体抗菌肽抑菌率(针对金黄色葡萄球菌)的影响顺序为 A(酶解时间) > B(pH) > C(酶解温度)。

表 4 回归模型方差分析(Y_1)[†]
Table 4 Variance analysis of regression model (Y_1)

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P	显著性
模型	36.19	9	4.02	21.20	0.000 3	* *
A	4.84	1	4.84	25.49	0.001 5	* *
B	2.09	1	2.09	11.02	0.012 8	*
C	1.29	1	1.29	6.79	0.035 1	*
AB	0.46	1	0.46	2.40	0.165 1	
AC	0.33	1	0.33	1.74	0.228 3	
BC	0.06	1	0.06	0.33	0.583 9	
A ²	9.49	1	9.49	50.04	0.000 2	* *
B ²	4.33	1	4.33	22.82	0.002 0	* *
C ²	10.56	1	10.56	55.69	0.000 1	* *
残差	1.33	7	0.19			
失拟项	0.03	3	0.01	0.03	0.990 5	
纯误差	1.03	4	0.32			
合计	37.51	16				

† * * 表示差异极显著($P<0.01$), * 表示差异显著($P<0.05$); $R^2=0.964\ 6$, $R^2_{\text{adj}}=0.919\ 1$ 。

由表 5 可知, Y_2 模型 $P<0.01$,失拟项 $P>0.05$,不显著,拟合度高,能够较好地反映酶解时间、pH 和酶解温度对虎奶菇菌丝体抗菌肽抑菌率(针对大肠杆菌)的影响。模型决定系数 R^2 为 0.988 5,校正决定系数 R^2_{adj} 为 0.973 8,说明该模型可用,能够针对虎奶菇菌丝体抗菌肽对大肠杆菌的抑菌率拟合出真实的响应结果。该回归模型中一次项 A、B 和二次项 A²、B² 及 C² 对虎奶菇菌丝体

抗菌肽抑菌率的影响极显著($P<0.01$),一次项 C 对虎奶菇菌丝体抗菌肽抑菌率的影响显著($P<0.05$)。各因素对虎奶菇菌丝体抗菌肽抑菌率(针对大肠杆菌)的影响顺序为 B(pH)>A(酶解时间)>C(酶解温度)。

2.4.3 响应面交互作用分析 由图 8、图 9 可知,酶解时间和 pH 的交互作用对虎奶菇菌丝体抗菌肽抑菌率的影响最显著,酶解时间、pH 和酶解温度 3 个因素中任意两个因素之间的交互作用均不明显,与表 4、表 5 中方差分析结果相吻合。

2.4.4 双指数最优提取条件的确定及验证 根据模型分析结果及试验操作的可行性,将最佳酶解条件确定为酶解时间 3.2 h、pH 值 11.1、酶解温度 39.5 ℃,此时虎奶菇菌丝体抗菌肽对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌抑菌率的预测值分别为 74.43%和 86.46%。为了验证该模型的有效性,连续进行 3 组重复实验,测得该条件下制备的虎奶菇菌丝体抗菌肽对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌率平均值分别为 74.17%和 86.22%,与模型预测结果接近。因此,此模型准确可行。此时,抗菌肽得率为 22.67%,比优化前提高了 5.62%。

2.5 最小抑菌浓度(MIC)

由图 10 可知,抗菌肽对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的 MIC 值分别为 5.0、2.5 mg/mL。马尚玄等^[23]采用碱性蛋白酶酶解制备的澳洲坚果多肽 MNP-8 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的 MIC 分别为 4.0、4.5 mg/mL,与试验结论相似。因此天然虎奶菇菌丝体抗菌肽具有广谱抑菌活性,且抑菌作用较强,有望成为抗生素和食品防腐剂的替代品。

表 5 回归模型方差分析 (Y_2)[†]
Table 5 Variance analysis of regression model (Y_2)

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P	显著性
模型	16.93	9	1.88	67.11	<0.000 1	* *
A	2.28	1	2.28	81.33	<0.000 1	* *
B	2.33	1	2.33	83.25	<0.000 1	* *
C	0.16	1	0.16	5.70	0.048 4	*
AB	0.08	1	0.08	2.90	0.132 4	
AC	0.02	1	0.02	0.70	0.430 6	
BC	2.03E-03	1	2.03E-03	0.07	0.795 8	
A ²	4.97	1	4.97	177.21	<0.000 1	* *
B ²	2.65	1	2.65	94.61	<0.000 1	* *
C ²	3.19	1	3.19	113.99	<0.000 1	* *
残差	0.20	7	0.03			
失拟项	0.06	3	0.02	0.55	0.673 2	
纯误差	0.14	4	0.04			
合计	17.12	16				

† * * 表示差异极显著($P<0.01$), * 表示差异显著($P<0.05$); $R^2=0.988\ 5$, $R^2_{\text{adj}}=0.973\ 8$ 。

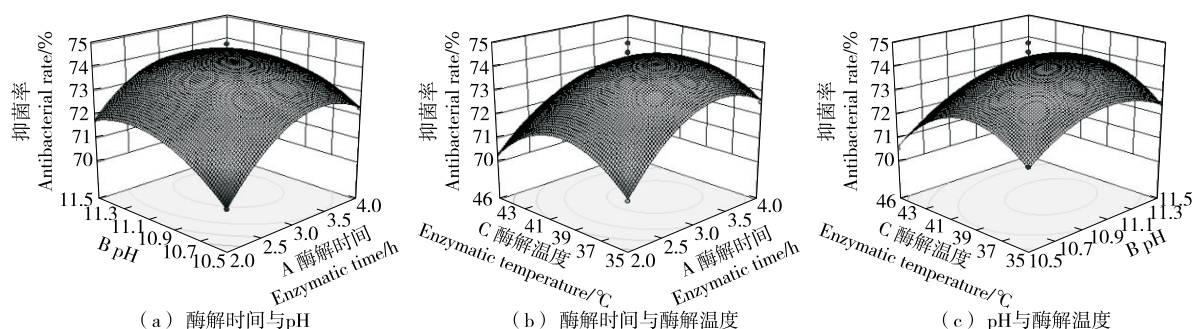


图 8 各因素交互作用对虎奶菇菌丝体抗菌肽抑菌率的影响(金黄色葡萄球菌)

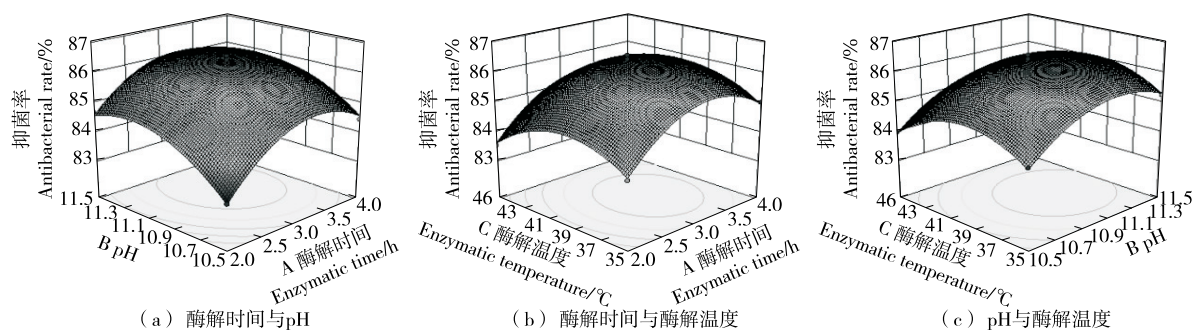
Figure 8 Effects of the interaction of various factors on antibacterial rate of PTRM-AMPs (Against *S.aureus*)

图 9 各因素交互作用对虎奶菇菌丝体抗菌肽抑菌率的影响(大肠杆菌)

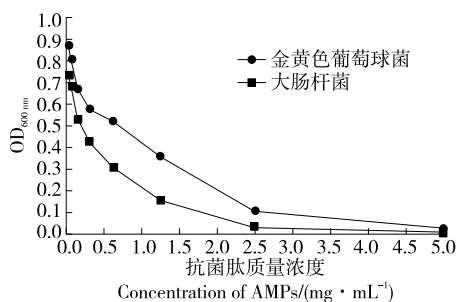
Figure 9 Effects of the interaction of various factors on antibacterial rate of PTRM-AMPs (Against *E.coli*)

图 10 虎奶菇菌丝体抗菌肽的最小抑菌浓度

Figure 10 Minimum inhibitory concentration of PTRM-AMPs

3 结论

碱性蛋白酶酶解制备虎奶菇菌丝体抗菌肽的最佳工艺条件为酶解时间 3.2 h、酶解温度 39.5 °C、pH 值 11.1, 此时虎奶菇菌丝体抗菌肽对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌率分别为 74.17% 和 86.22%, 抗菌肽得率为 22.67%。抗菌肽对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的最低抑菌浓度分别为 5.0、2.5 mg/mL。后续可对虎奶菇菌丝体抗菌肽进行分离纯化, 并研究其作为抗生素及食品防腐剂的潜在可能, 从而提高虎奶菇菌丝体抗菌肽的利用价值。

参考文献

- [1] GANZ T. The role of antimicrobial peptides in innate immunity[J]. Integrative & Comparative Biology, 2003, 43(2): 300-304.

- [2] ZHANG S H, LUO L, SUN X Y, et al. Bioactive peptides: A promising alternative to chemical preservatives for food preservation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69: 12 369-12 384.
- [3] LIN S L, WANG P X, LAM K, et al. Research on a specialty mushroom (*Pleurotus tuber-regium*) as a functional food: Chemical composition and biological activities[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68 (35): 9 277-9 286.
- [4] ZHANG B B, CHEUNG P C K. Use of stimulatory agents to enhance the production of bioactive exopolysaccharide from *Pleurotus tuber-regium* by submerged fermentation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(4): 1 210-1 216.
- [5] LIN S L, LAI T C, CHEN L, et al. Antioxidant and antiangiogenic properties of phenolic extract from *Pleurotus tuber-regium* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(39): 9 488-9 498.
- [6] ABDULLAH E, ABIDIN N Z, ABDULLAH N. Cytotoxic proteins from king tuber oyster medicinal mushroom, *Pleurotus tuber-regium* (Agaricomycetes), sclerotium against human MDA-MB-231 breast cancer cells [J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2022, 24(1): 27-40.
- [7] WU G H, LU C L, JIANG J G, et al. Regulation effect of polysaccharides from *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) on the immune activity of mice macrophages[J]. Food & Function, 2014, 5(2): 337-344.
- [8] LIU Y W, MEI H C, SU Y W, et al. Inhibitory effects of *Pleurotus*

- tuber-regium mycelia and bioactive constituents on LPS-treated RAW 264.7 cells[J]. Journal of Functional Foods, 2014, 7: 662-670.
- [9] METSEBLING B P, OBA R, MOSSEBO D C, et al. Comparative assessment of antifungal and antibacterial activities of crude extracts of the king tuber culinary-medicinal mushroom, *Pleurotus tuber-regium* (Agaricomycetes) from Cameroon[J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2020, 22(4): 359-366.
- [10] HUANG H Y, KORIVI M, CHAING Y Y, et al. *Pleurotus tuber-regium* polysaccharides attenuate hyperglycemia and oxidative stress in experimental diabetic rats[J]. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2012, 2012: 856381.
- [11] CHEN L, ZHANG B B, CHEUNG P C K. Comparative proteomic analysis of mushroom cell wall proteins among the different developmental stages of *Pleurotus tuber-regium*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(24): 6173-6182.
- [12] 阮晓慧, 韩军岐, 张润光, 等. 食源性生物活性肽制备工艺、功能特性及应用研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(6): 248-253.
- RUAN X H, HAN J Q, ZHANG R G, et al. Progress in the preparation, functional properties and applications of food-derived bioactive peptides[J]. Food and Fermentation Industries, 2016, 42(6): 248-253.
- [13] 张作达, 王琴飞, 吴若娜, 等. 木薯叶片多肽的制备与抗氧化功能研究[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(7): 146-153.
- ZHANG Z D, WANG Q F, WU R N, et al. Preparation and antioxidant function of polypeptide from cassava leaf[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(7): 146-153.
- [14] 韩梦瑶, 李新月, 王晓梅, 等. 大口黑鲈鱼皮胶原蛋白肽的制备及抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2022, 38(4): 175-182, 194.
- HAN M Y, LI X Y, WANG X M, et al. Study on preparation of collagen peptides from *Micropterus salmoides* skin and its antioxidant activity[J]. Food & Machinery, 2022, 38(4): 175-182, 194.
- [15] 黄雨, 刘魏红, 王洪阳, 等. 裙带菜孢子叶仿生酶解工艺优化及酶解肽的抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技, 2022, 43(13): 180-189.
- HUANG Y, LIU W H, WANG H Y, et al. Optimization of bionic enzymatic hydrolysis of *Undaria pinnatifida* sporophyll and antioxidant activity analysis of its hydrolysate peptides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(13): 180-189.
- [16] 江晨, 齐宏涛, 于丽娜, 等. 响应面优化花生蛋白抗菌肽制备工艺[J]. 山东农业科学, 2021, 53(11): 111-119.
- JIANG C, QI H T, YU L N, et al. Optimization of peanut antibacterial peptide preparation by response surface methodology[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2021, 53(11): 111-119.
- [17] 张米帅, 邹雨佳, 刘如明. 戴氏虫草水提多糖和碱提多糖的活性炭脱色工艺优化[J/OL]. 食品工业科技. (2022-05-25) [2022-05-30]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022020124>.
- ZHANG M S, ZOU Y J, LIU R M. Optimization of activated carbon decolorization process of water-and alkali-extracted polysaccharides from *Cordyceps taii* [J/OL]. Science and Technology of Food Industry. (2022-05-25) [2022-05-30]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022020124>.
- [18] TANG W T, ZHANG H, WANG L, et al. Antimicrobial peptide isolated from ovalbumin hydrolysate by immobilized liposome-binding extraction[J]. European Food Research and Technology, 2013, 237: 591-600.
- [19] MA B, GUO Y X, FU X, et al. Identification and antimicrobial mechanisms of a novel peptide derived from egg white ovotransferrin hydrolysates[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 131: 109720.
- [20] 徐永霞, 曲诗瑶, 李涛, 等. 不同蛋白酶对蓝蛤酶解液风味特性的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(4): 190-196.
- XU Y X, QU S Y, LI T, et al. Effects of different proteases on the flavor characteristics of *Aloidia aloidia* muscle hydrolysates[J]. Food Science, 2021, 42(4): 190-196.
- [21] 王焯, 张登科, 史咏梅, 等. 鲑鱼暗色肉抗菌肽的制备及分离纯化[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(19): 104-111.
- WANG B, ZHANG D K, SHI Y M, et al. Preparation and purification of antimicrobial peptides from dark meat of bonito[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(19): 104-111.
- [22] 林冰洁, 薛鹏, 荆金金, 等. 不同蛋白酶制备藜麦麸皮多肽及其活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(3): 114-119, 127.
- LIN B J, XUE P, JING J J, et al. Activity of polypeptides from *Chenopodium quinoa* husks prepared with different proteases[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(3): 114-119, 127.
- [23] 马尚玄, 郭刚军, 黄克昌, 等. 不同分子量澳洲坚果多肽氨基酸组成与抑菌活性[J]. 食品工业科技, 2021, 42(7): 83-88.
- MA S X, GUO G J, HUANG K C, et al. Amino acid compositions and antibacterial activities of different molecular weight macadamia nut polypeptides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(7): 83-88.
- [24] 宋伟光. 棉籽蛋白抗菌肽分离鉴定、构效关系研究以及中试规模制备[D]. 无锡: 江南大学, 2020: 11-17.
- SONG W G. A study on the fractionation and identification, structure-function relationships and the pilot-scale preparations of cottonseed protein antibacterial peptides [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020: 11-17.
- [25] 林贺, 金平, 杨培国, 等. 蒲公英酶解抗菌肽的分析[J]. 分子植物育种, 2020, 18(10): 3388-3394.
- LIN H, JIN P, YANG P G, et al. Analysis of antimicrobial peptides in *Taraxacum mongolicum* enzymatic hydrolysis[J]. Molecular Plant Breeding, 2020, 18(10): 3388-3394.
- [26] 于淑池, 张鸣芯. 光参多肽的酶解制备工艺及其功能特性研究[J]. 中国食品添加剂, 2021, 32(5): 60-67.
- YU S C, ZHANG M X. Research on the enzymatic preparation and functional properties of polypeptide from *Cucumaria japonica*[J]. Chinese Food Additives, 2021, 32(5): 60-67.