

金针菇和杏鲍菇菇脚酶解条件优化及抗氧化活性评价

林群英¹, 龙良鯤², 葛婷婷², 张锋伦¹, 项春荣³, 孙晓明¹

(1. 中华全国供销总社南京野生植物综合利用研究院, 江苏 南京 210042; 2. 南京林业大学 化学工程学院, 江苏 南京 210037; 3. 镇江市丹徒区正东生态农业发展中心, 江苏 镇江 212000)

摘要:以金针菇和杏鲍菇菇脚为试材, 采用单因素试验与正交实验优化酶解条件, 对可溶性固形物进行提取, 并研究酶解物的成分及抗氧化活性, 以期酶解产物的开发应用提供参考依据。结果表明: 最佳酶解条件为食用菌水解酶 1.5%、风味酶 1.5%、料水比 1:30 g·mL⁻¹; 金针菇和杏鲍菇菇脚的酶解物分别含粗蛋白 24.35% 和 12.30%, 粗多糖 35.92% 和 37.40%, 黄酮 0.77、0.64 mg·kg⁻¹, 维生素 C 4.82、4.18 mg·kg⁻¹; 金针菇和杏鲍菇菇脚酶解物均具有显著的抗氧化能力。金针菇酶解物在 0.1 g·L⁻¹ 低浓度时可明显提高秀丽线虫的抗氧化能力, 最长存活时间为 12 d, 远长于对照组(5 d); 杏鲍菇酶解物的抗氧化能力与浓度呈正相关, 随着浓度的增加, 秀丽线虫最长寿命及平均寿命均相应延长。在高浓度 2.0 g·L⁻¹ 时, 秀丽线虫的最长寿命达 16 d, 平均寿命为 8.27 d。

关键词:金针菇; 杏鲍菇; 下脚料; 可溶性固形物; 酶解提取

中图分类号:S 646.1⁺5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)21-0155-05

食用菌已被公认为健康食品, 其产业已成为我国第六大产业, 产量居世界首位。金针菇(*Flammulina velutipes*)和杏鲍菇(*Pleurotus eryngii*)是我国重要的栽培品种, 生产规模增长迅速。这些食用菌在采收和包装过程中产生大量菇脚等下脚料。这些下脚料除了少部分被用作饲料外, 绝大部分被废弃, 造成浪费和环境污染。为更好地利用这些原料, 化废为宝, 可用金针菇菇脚提取可溶性膳食纤维、蛋白质和氨基酸等^[1-3]。金针菇具有抗氧化和提高免疫力的作用, 活性物质主要有多糖等^[4-5]。金针菇菇脚可用作多糖提取的原料^[6], 而杏鲍菇多糖亦具有多种生物活性, 均是开发功能性产品的理想原料^[7]。而利用菇脚等下脚料提取其中的可溶性固形物尚鲜见报道。因此, 该研究采用酶解方法对金针菇和杏鲍菇菇脚下脚料进行提取, 并对酶解产物的成分及抗氧化活性进行初步研究, 以期酶解产物的开发应用提供参考依据。

第一作者简介:林群英(1979-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向为食用菌栽培与应用。E-mail:linqunying1007@126.com

责任作者:孙晓明(1964-), 男, 硕士, 研究员, 研究方向为食用菌栽培与深加工。E-mail:sunxm64@163.com

基金项目:“十二五”国家科技支撑计划资助项目(2013BAD16B07)。

收稿日期:2016-08-04

1 材料与方法

1.1 试验材料

金针菇和杏鲍菇菇脚是采收时切除的菇脚下脚料, 60℃烘干后, 粉碎至 20 目以下。

碱性蛋白酶、纤维素酶、木瓜蛋白酶、风味酶、食用菌水解酶等水解酶购自南宁庞博生物工程有限公司。

野生型秀丽隐杆线虫 N2 由美国 Caenorhabditis Genetics Center(CGC)提供。

1.2 试验方法

1.2.1 单因素试验 以可溶性固形物为指标进行试验。酶类的选择: 料水比为 1:20 g·mL⁻¹, 50℃下水浴 3 h, 分别加入碱性蛋白酶、纤维素酶、木瓜蛋白酶、风味酶、食用菌水解酶等对金针菇和杏鲍菇菇脚原料进行酶解, 以筛选最佳酶类。料水比的选择: 料水比分别为 1:10、1:20、1:30 g·mL⁻¹, 加入 1% 风味酶, 50℃下水浴 3 h, 进行酶解。

1.2.2 正交实验酶解条件优化 在单因素试验基础上, 采用风味酶、食用菌水解酶和料水比 3 个因素进行 L₉(3⁴) 正交实验来优化酶解条件。具体因素和水平见表 1。

1.2.3 酶解产物冻干处理 酶解溶液 5 000 r·min⁻¹ 离心 20 min 后, 上清液于 -47.5℃下冷冻过夜, 再进行

表 1 $L_9(3^4)$ 正交实验因素水平Table 1 Levels and factors in orthogonal experimental design of $L_9(3^4)$

水平 Level	因素 Factor		
	水解酶 Hydrolysis enzyme/%	风味酶 Flavor enzyme/%	料水比 Ratio of material to water/(g·mL ⁻¹)
1	0.5	0.5	1:10
2	1.0	1.0	1:20
3	1.5	1.5	1:30

真空冷冻干燥处理,真空度为 25 Pa,温度设为 60 ℃。

1.2.4 酶解产物冻干粉成分测定 粗蛋白含量采用 GB/T5009.5-2010 第一法测定,换算系数为 6.25^[8];粗多糖含量采用 NY/T 1676-2008 进行测定^[9];黄酮类含量采用硝酸铝比色法进行含量测定^[10];维生素 C 含量采用 2,6-二氯酚靛酚滴定法进行测定;可溶性固形物含量采用烘干法进行测定^[11]。

1.2.5 酶解产物对秀丽线虫急性氧化应激能力的影响 将金针菇菇脚冻干粉配制成 1.0、5.0 g·L⁻¹,杏鲍菇冻干粉配制成 1.0、5.0、10、20 g·L⁻¹,以水为空白对照,添加至培养有秀丽线虫的 96 孔板中,样品终浓度稀释至 10 倍,于 20 ℃ 培养培养 48 h,之后于每个孔中添加 40 mmol·L⁻¹百草枯,每天记录线虫存活数目,直至线虫全部死亡。每组试验所测线虫数目不少于 80 条。

2 结果与分析

2.1 最佳酶解条件筛选

2.1.1 酶种类的选择 由图 1 可知,5 种水解酶均利于金针菇和杏鲍菇菇脚可溶性固形物的溶出,其中风味酶酶解效果最好,可溶性固形物得率分别 72.90% 和 68.04%,明显高于空白对照(CK),其次是食用菌水解酶和木瓜蛋白酶,酶解效果最差的是纤维素酶。

2.1.2 料水比的选择 由图 2 可知,这 2 种食用菌酶解的最佳料水比均为 1:20 g·mL⁻¹,在此料水比条件下,食用菌原料和酶均得到充分的溶解和反应空间,利于可溶性固形物的溶出。故采用 1:20 g·mL⁻¹的料水比进行后续试验。

表 2

酶解条件正交实验结果

Table 2 Orthogonal experiment design of $L_9(3^4)$ and the results

试验号 Number	食用菌水解酶 Edible mushroom hydrolysis enzyme	风味酶 Flavor enzyme	料水比 Ratio of material to water	金针菇可溶性固形物得率 Soluble solids yield of <i>Flammulina velutipes</i> / %	杏鲍菇可溶性固形物得率 Soluble solids yield of <i>Pleurotus eryngii</i> / %
1	1	1	1	23.90	18.23
2	1	2	2	57.51	49.41
3	1	3	3	84.20	83.27
4	2	1	3	77.76	71.69
5	2	2	1	31.59	26.73
6	2	3	2	70.47	66.42
7	3	1	2	61.56	51.84
8	3	2	3	87.80	87.20
9	3	3	1	40.10	34.02

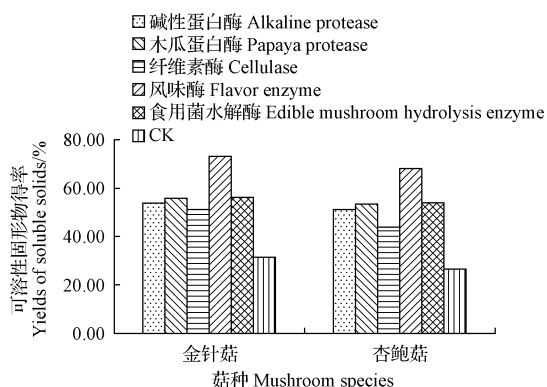


图 1 不同水解酶对金针菇和杏鲍菇菇脚酶解效果的比较

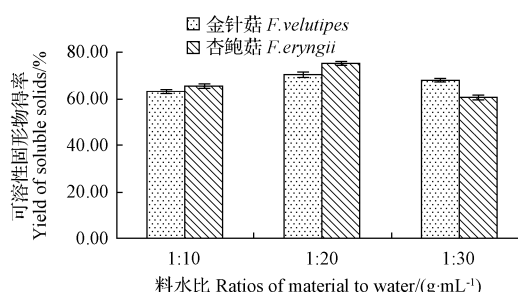
Fig. 1 Hydrolytic effect of different enzymes on fruit body feet of *Flammulina velutipes* and *Pleurotus eryngii*

图 2 不同料水比对金针菇和杏鲍菇菇脚酶解效果的比较

Fig. 2 Effect of ratio of material to water on enzymatic hydrolysis of fruit body feet of *Flammulina velutipes* and *Pleurotus eryngii*

2.1.3 正交实验优化酶解条件 由表 2、3 可知,料水比对金针菇和杏鲍菇菇脚的影响最大,其次是风味酶,食用菌水解酶影响最小,根据因素的影响大小,可知食用菌水解酶、风味酶和料水比的优化水平分别为 3、3、3,即酶解金针菇和杏鲍菇菇脚的最佳条件为食用菌水解酶 1.5%、风味酶 1.5%、料水比 1:30 g·mL⁻¹。在优化所得的酶解条件下进行酶解提取,金针菇和杏鲍菇菇脚的可溶性固形物得率分别为 88.12% 和 87.60%。

表 3 酶解条件正交实验结果直观法分析

Table 3 Intuitive analysis of orthogonal experimental results

	金针菇 <i>Flammulina velutipes</i>			杏鲍菇 <i>Pleurotus eryngii</i>		
	食用菌水解酶 Edible	风味酶	料水比	食用菌水解酶 Edible	风味酶	料水比
	mushroom hydrolysis enzyme	Flavor enzyme	Ratio of material to water	mushroom hydrolysis enzyme	Flavor enzyme	Ratio of material to water
K1	165.61	117.05	95.58	150.90	141.75	78.98
K2	179.82	176.90	189.54	164.84	163.34	167.67
K3	189.46	194.77	249.76	173.06	183.71	242.15
k1	55.20	39.02	31.86	50.30	47.25	26.33
k2	59.94	58.97	63.18	54.95	54.45	55.89
k3	63.15	64.92	83.25	57.69	61.24	80.72
极差 R	7.95	25.91	51.39	7.39	13.99	54.39
优化水平 Optimization level	3	3	3	3	3	3

2.2 酶解产物冻干粉成分测定

由表 4 可知,金针菇酶解冻干粉含粗蛋白含量为 24.35%,杏鲍菇为 12.30%,仅为金针菇的一半。金针菇和杏鲍菇酶解冻干粉中粗多糖的含量分别为 35.92% 和 37.40%。黄酮含量分别为 77、64 mg·kg⁻¹。这 2 种食用菌冻干粉的维生素 C 含量较为接近,分别为 482.4、418.1 mg·kg⁻¹。

表 4 金针菇及杏鲍菇酶解产物成分含量

Table 4 Component contents in hydrolysis products from fruit body feet of *Flammulina velutipes* and *Pleurotus eryngii*

	粗蛋白	粗多糖	黄酮	维生素 C
	Crude protein	Crude polysaccharide	Flavone	Vitamin C
	/ %	/ %	/(mg·kg ⁻¹)	/(mg·kg ⁻¹)
金针菇	24.35	35.92	77	482.4
<i>Flammulina velutipes</i>				
杏鲍菇	12.30	37.40	64	418.1
<i>Pleurotus eryngii</i>				

2.3 酶解产物对秀丽线虫急性氧化应激能力的影响

2.3.1 金针菇酶解物对秀丽线虫急性氧化应激能力的影响 由图 3、4 可知,金针菇酶解物在低浓度(0.1 g·L⁻¹)时可明显提高秀丽线虫的抗氧化能力,最长存活时间为 12 d,远远长于 CK 组(5 d)。在培养前 3 d,0.5 g·L⁻¹处理的存活率低于对照组,酶解物降低

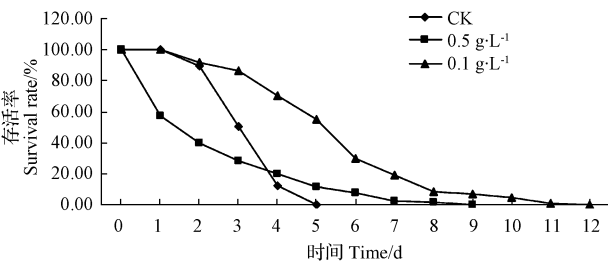


图 3 金针菇酶解物对秀丽线虫急性氧化应激能力的影响

Fig. 3 Lifespans of paraquat-treated nematodes pretreated with or without of hydrolysis product from fruit body feet of *Flammulina velutipes*

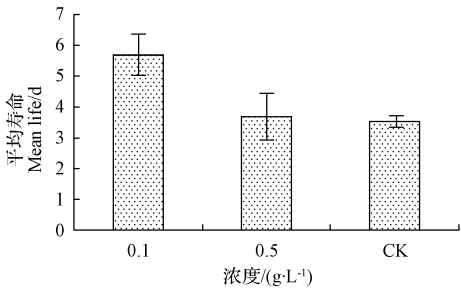


图 4 金针菇酶解物对秀丽线虫急性氧化应激条件下平均寿命的影响

Fig. 4 Mean lifespans of paraquat-treated nematodes pretreated with or without of hydrolysis product from fruit body feet of *Flammulina velutipes*

了线虫急性氧化应激能力,但后期能明显提高存活率,延长其存活时间。但随着浓度的提高,金针菇酶解物的抗氧化能力反而下降,平均寿命为 3.69 d,短于 0.1 g·L⁻¹处理组的平均寿命(5.70 d)。

2.3.2 杏鲍菇酶解物对秀丽线虫急性氧化应激能力的影响 杏鲍菇酶解物可显著增强秀丽线虫急性氧化应激能力。由图 5、6 可知,随着浓度的增加,秀丽线虫最长寿命及平均寿命均相应延长。在高浓度 2.0 g·L⁻¹时,秀丽线虫的最长寿命长达 16 d,平均寿命为 8.27 d。

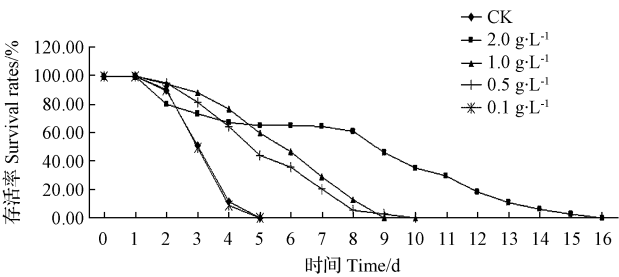


图 5 杏鲍菇酶解物对秀丽线虫急性氧化应激能力的影响

Fig. 5 Lifespans of paraquat-treated nematodes pretreated with or without of hydrolysis product from fruit body feet of *Pleurotus eryngii*

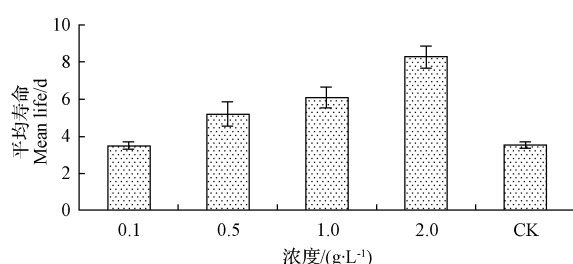


图6 杏鲍菇菇脚酶解物对秀丽线虫急性氧化应激条件下平均寿命的影响

Fig. 6 Mean lifespans of paraquat-treated nematodes pretreated with or without of hydrolysis product from fruit body feet of *Pleurotus eryngii*

3 结论与讨论

该试验结果表明,风味酶最利于可溶性固形物的提取,正交实验得出了金针菇和杏鲍菇菇脚的最佳酶解条件为食用菌水解酶 1.5%、风味酶 1.5%、料水比 1 : 30 g · mL⁻¹。金针菇酶解产物含有丰富的粗蛋白、多糖、黄酮及维生素 C,是其抗氧化能力的重要物质基础^[12-14]。超声波协同复合酶法提取的杏鲍菇多糖和可溶性膳食纤维均具有较强的清除自由基能力^[15-16]。这些研究结果与该试验结果相一致。

秀丽线虫作为模式生物被广泛用于多个领域^[17-18]。在生物活性评价方面,秀丽线虫亦已被广泛用于植物活性物质的功能筛选与评价,但在食用菌活性物质方面还较为少见。食用菌的抗氧化活性评价多以体外自由基清除为主^[19]。该研究以秀丽线虫为生物模型研究酶解产物的抗氧化活性,更直接而有效地评价酶解产物的抗氧化功能,为酶解产物的开发提供了有力的参考依据。

参考文献

- [1] 吴素蕊,郑淑彦,桑兰,等. 金针菇菇脚可溶性膳食纤维提取工艺研究[J]. 食品工业科技,2012,33(11):300-311.
- [2] 张乐,宋洪波,周林燕,等. 超声波提取金针菇根中的蛋白质[J]. 食品

与发酵工业,2013,39(12):204-208.

- [3] 黄家莉,李明元,李宗堂,等. 金针菇加工下脚料酶解工艺研究[J]. 食用菌,2014(3):73-74.
- [4] MA Z, CUI F, GAO X, et al. Purification, characterization, antioxidant activity and anti-aging of exopolysaccharides by *Flammulina velutipes* SF-06 [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2015, 107(1):73-82.
- [5] WU M, LUO X, XU X, et al. Antioxidant and immunomodulatory activities of a polysaccharide from *Flammulina velutipes* [J]. J Tradit Chin Med, 2014, 34(6):733-740.
- [6] 游丽君,刘钧发,冯梦莹,等. 酶法水解金针菇多糖及其产物特性分析[J]. 现代食品科技,2013,29(7):1486-1490.
- [7] 暴增海,马桂珍. 杏鲍菇多糖和营养成分的研究现状[J]. 北方园艺, 2007(6):239-240.
- [8] 卫生部食品卫生监督检验所,河北省唐山市卫生防疫站. GB/T5009.6-2003 食品中蛋白质的测定方法[S]. 北京:中国标准出版社, 2010.
- [9] 农业部食用菌产品质量监督检验测试中心(上海),上海市农业科学院食用菌研究所. NY/T 1676-2008 食用菌中粗多糖含量的测定[S]. 北京:中国标准出版社,2008.
- [10] 罗珊珊,凌建亚,陈畅,等. 九州虫草中黄酮类化合物提取工艺研究[J]. 山东中医杂志,2005,24(8):499-501.
- [11] 康健,崔建云. 新疆沙枣可溶性固形物浸提过程的影响因素研究[J]. 食品研究与开发,2008,29(11):56-60.
- [12] 苗敬芝,董玉玮,唐仕荣. 酶法提取杏鲍菇多糖及抗氧化活性研究[J]. 食品工业,2015,36(5):27-30.
- [13] 方玉梅,张春生,谭萍,等. 金针菇黄酮类化合物的抗氧化性作用[J]. 食品研究与开发,2012,33(3):15-18.
- [14] 黄琼,黄晓梅,张平,等. 金针菇多糖的抗氧化活性[J]. 食品研究与开发,2014,35(4):66-69.
- [15] 王雅,苗敬芝,董玉玮. 超声波协同复合酶法提取杏鲍菇多糖及抗氧化活性的研究[J]. 食品工业,2014,35(3):134-137.
- [16] 苗敬芝,董玉玮,秦杰. 超声协同酶法提取杏鲍菇中可溶性膳食纤维及抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技,2015,36(10):168-172.
- [17] 杨再昌,杨小生. 秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)在药物筛选中的应用[J]. 生命科学,2009,21(4):593-598.
- [18] 杨可欣,李煜,李国君,等. 基于秀丽隐杆线虫的化学毒性评估技术研究进展[J]. 环境与健康杂志,2013,30(4):366-370.
- [19] 蒋倩婷,林群英,曾宏彬,等. 蛹虫草白化菌株抗氧化活性[J]. 食用菌学报,2011,18(2):62-64.

Extraction of Soluble Solids From Fruit Body Feet of *Flammulina velutipes* and *Pleurotus eryngii* by Enzymatic Hydrolysis

LIN Qunying¹, LONG Liangkun², GE Tingting², ZHANG Fenglun¹, XIANG Chunrong³, SUN Xiaoming¹

(1. Nanjing Institute for the Comprehensive Utilization of Wild Plants, Nanjing, Jiangsu 210042; 2. College of Chemical Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing, Jiangsu 210037; 3. Zhenjiang City Dantu District Zhengdong Ecological Agriculture Development Center, Zhenjiang, Jiangsu 212000)

Abstract: Fruit body feet of *Flammulina velutipes* and *Pleurotus eryngii* were used as test materials, single factor tests and orthogonol design experiments were applied to optimize the enzymatic hydrolysis conditions for extraction of soluble solids. The components and antioxidant activity of the hydrolysate were studied, to provide reference for exploration of hydrolysates from fruit body feet of *F. velutipes* and *P. eryngii*. The results showed that edible mushroom hydrolysis enzyme at 1.5%, flavor enzyme at 1.5% and material to water ratio at 1 : 30 g · mL⁻¹ consisted the best conditions for

发酵床养鸡菌渣垫料栽培平菇试验

卢东升^{1,2}, 余炎炎³, 谢正萍¹, 苏久艳¹

(1. 信阳师范学院 生命科学学院, 河南 信阳 464000; 2. 大别山农业生物资源保护与利用研究院, 河南 信阳 464000;
3. 信阳学院 理工系, 河南 信阳 464000)

摘要:以发酵床养鸡菌渣垫料和棉籽壳为试材, 采用对比试验的方法, 研究发酵床养鸡菌渣垫料对平菇栽培的影响。结果表明: 发酵床养鸡菌渣垫料含有一定的有益物质, 经适当处理可以作为原料用于平菇栽培; 在棉籽壳中加入适量菌渣垫料作为基质, 可以促进平菇菌丝发育, 使菌丝粗壮浓密, 产量和品质显著提高; 以棉籽壳和菌渣垫料为主料栽培平菇时, 菌渣垫料与棉籽壳之比以 1:10 为最佳。

关键词:发酵床; 养鸡; 菌渣垫料; 平菇栽培

中图分类号:S 646.1⁺4 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2016)21-0159-03

发酵床养鸡是近年来兴起和提倡的生态环保型养殖模式, 此方式养鸡管理方便、养殖环境无臭味, 可达到零排放无污染, 是一种环境友好型养殖方式^[1-3]。食用菌菌渣为栽培食用菌后的废弃料, 以此料为主制发酵床开展生态养鸡, 可有效降低发酵床垫料成本, 促进菌渣的资源化利用。发酵床养鸡废弃的垫料具有丰富的营养元素。据测定, 其有机质含量为 42.62%~54.12%, 全氮 1.54%~2.12%, 全磷 2.24%~5.55%, 全钾 0.57%~2.15%。将发酵床养鸡废弃垫料作为肥料加以利用的研究较多, 而用它作为食用菌培养料的研究十分稀少^[4-5]。现以棉籽壳和废弃的养鸡菌渣垫料为主要材料制作不同培养基, 对平菇进行菌丝培养和出菇试验, 旨

在探索其用于培养平菇可行性, 为发酵床养鸡生态垫料的资源转化以及食用菌栽培中物质循环利用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

废弃菌渣垫料从信阳市五星乡生态养殖场收集, 105℃烘箱中烘至恒重。棉籽壳为市售, 晒干后备用。

平菇(*Pleurotus ostreatus*)母种品种为“园林 802”, 由信阳师范学院食用菌实验室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种的制备 采用常规方法先将保藏菌种转管活化, 后将母种接入玉米粒培养基制原种, 再将原种接入棉籽壳麦皮培养基制成栽培种。

1.2.2 培养基制作、菌种培养与接种 以棉籽壳和菌渣垫料为主料按表 1 配方, 料水比 1:1.4 kg·L⁻¹, 制作 7 种培养基。采用常规方法将培养基分别装入聚丙烯塑料袋中, 每袋干料 250 g, 每种培养基装 20 袋。所有培养基在 121℃高压锅灭菌 1.5 h, 灭菌结束后料袋温度降至

第一作者简介:卢东升(1963-), 男, 河南平舆人, 博士, 教授, 现主要从事真菌学与植物微生物生态学教学与科研等工作。E-mail: luds0365@sina.com.

基金项目:大别山农业生物资源保护与利用学科群开放课题资助项目(2016); 信阳师范学院博士科研基金资助项目(200501); 信阳师范学院生科院实验教学中心开放实验资助项目(2015)。

收稿日期:2016-08-04

extratction of soluble solids. The hydrolysis products of fruit body feet of *F. velutipes* and *P. eryngii* respectively contained 24.35% and 12.30% of crude protein, 35.92% and 37.40% of crude polysaccharides, 0.77 mg·kg⁻¹ and 0.64 mg·kg⁻¹ of flavones, 4.82 mg·kg⁻¹ and 4.18 mg·kg⁻¹ of vitamin C. It was proved that hydrolysis products poccessed good anti-oxidant activities. Hydrolysis products of *F. velutipes* at low concentration (0.1 mg·mL⁻¹) could obviously improve the antioxidant capacity of the nematode, extending the longest survival time from 5 days (CK) to 12 days. And the antioxidant ability of hydrolysate of *P. eryngii* was positively correlated with the concentration. The longest survival time and mean lifespan were both extended as concentrations increased. At high concentration of 2.0 g·L⁻¹, the longest survival time and mean lifespan could reach to 16 days and 8.27 days, respectively.

Keywords: *Flammulina velutipes*; *Pleurotus eryngii*; fruit body feet; soluble solids; enzymatic hydrolysis