

## 大球盖菇风味肽高效制备及其 ACE 抑制活性

李文<sup>1,2</sup>, 陈万超<sup>1</sup>, 马海乐<sup>2\*</sup>, 吴迪<sup>1</sup>, 张忠<sup>1</sup>, 杨焱<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>上海市农业科学院食用菌研究所 国家食用菌工程技术研究中心

农业农村部南方食用菌资源利用重点实验室 上海 201403

<sup>2</sup>江苏大学食品与生物工程学院 食品物理加工研究院 江苏镇江 212013

**摘要** 以基料呈味特性和肽产量为指标,通过响应面工艺优化,获得大球盖菇风味肽高效制备酶解工艺,即酶解时间 51.62 min,碱性蛋白酶加酶量 0.99% (酶活力 200 000 U/g),酶解温度 42.03 °C,底物质量浓度 48.45 g/L。在传统酶解最优制备工艺基础上,采用同步超声辅助定向酶解技术制备大球盖菇富肽风味基料,平板超声辅助酶解 30 min 时,基料中肽含量(469.21 mg/g 干重)可达到传统酶解最优条件下的产肽量,基料制备时间显著缩短;辅助酶解 40 min 时的产肽量(492.87 mg/g 干重)较传统酶解产肽量提升了 6.5%。同步超声定向酶解制备的富肽基料,在咸味和鲜味呈味特性上,分别较传统酶解基料提升了 1.1~1.8 倍和 1.1~1.3 倍。所有制备工艺得到的富肽基料均具有较优的血管紧张素转化酶(ACE)抑制活性,半抑制浓度(IC<sub>50</sub>)分别为 0.071,0.074,0.122 mg/mL 和 0.123 mg/mL。通过对大球盖菇风味肽氨基酸序列分析发现,肽链中存在天冬氨酸(D)、缬氨酸(V)、谷氨酸(E)、亮氨酸(L)、甘氨酸(G)、精氨酸(R)、脯氨酸(P)、丙氨酸(A)的氨基酸组合肽段 DD、VV、EL、VG、VE、RP、RA、RV、VR 时,多肽呈现咸鲜味呈味特性。上述氨基酸组合占比较高,可能是基料呈咸鲜味的主要原因。计算机模拟分子对接技术对大球盖菇风味肽体外抑制 ACE 活性的预测结果显示,风味肽可与 ACE 活性口袋氨基酸残基形成氢键,推测这是风味肽发挥 ACE 抑制作用的主要原因。本研究结果为大球盖菇风味富肽基料的高效制备及开发应用提供理论依据,为制备减盐增鲜调味品、降血压功能食品或食品添加剂提供参考。

**关键词** 大球盖菇; 风味肽; 呈味特性; ACE 抑制活性; 分子对接

**文章编号** 1009-7848(2023)08-0229-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.08.024

食用菌是一种高蛋白、低脂肪的健康食品,其所含生物活性物质可用来解决医学和生物技术方面的问题。以食用菌为原料开发的保健食品、功能食品和药品,其深加工后的产品价值可比原料提高 3~4 倍<sup>[1]</sup>。食用菌种类繁多,根据栽培基质的不同,分为草腐菌和木腐菌。大球盖菇又名赤松茸,是草腐菌中具有很高秸秆利用率的食用菌<sup>[2]</sup>,在上海郊区广泛种植,助力解决目前秸秆还田中存在的诸多问题。随着大球盖菇栽培推广及产量提升,鲜菇市场供大于需,导致鲜菇价格下跌,进行精深加工是延伸大球盖菇产业链、提升价值链的重要措施。大球盖菇风味独特,富含蛋白、多肽及氨基酸等营养物质<sup>[3]</sup>,是开发天然风味基料和营养健康产品的优质原料。研究人员围绕大球盖菇多糖、甾

醇、黄酮等活性成分和成分的抗氧化、抑菌等功能进行研究和报道<sup>[4]</sup>,而其风味物质尚未有效地开发利用。

大球盖菇风味肽是一种菌物源性的天然呈味物质,是大球盖菇深加工新的研究方向。风味肽具有的风味特性和营养价值,不仅能带来愉悦的味觉感受,还能提供多肽及氨基酸等营养成分,在保障人体健康中发挥着重要的营养作用和生物活性。如已报道的咸味二肽<sup>[5]</sup>,其咸味强度与 NaCl 相当,对患有高血压、心血管疾病等需要低钠饮食的特殊人群有着重要的利用价值;甜味二肽阿斯巴甜及其衍生物不会使血糖升高,适合于肥胖症、糖尿病和心血管病人食用<sup>[6]</sup>。在食用菌风味肽研究中,鲜味肽、厚味肽等感官风味肽的研究较多<sup>[7-11]</sup>。大球盖菇风味肽呈味特性及其潜在的生物活性,还有待进一步挖掘。

超声技术因高效绿色、无污染等特点,已在农产品食品加工领域进行应用<sup>[12-13]</sup>。超声技术在食用菌领域的应用,多聚焦于食用菌原料预处理<sup>[14-16]</sup>、有效成分提取<sup>[17-19]</sup>、辅助酶解<sup>[20]</sup>、辅助发酵<sup>[21-23]</sup>等。

收稿日期: 2023-01-31

基金项目: 上海现代农业产业技术体系项目[沪农科产字(2023)第 9 号]

第一作者: 李文,女,博士,副研究员

通信作者: 马海乐 E-mail: mhl@ujs.edu.cn

杨焱 E-mail: yangyan@saas.sh.cn

本研究探索性地将平板超声技术应用于酶解反应全过程,通过对大球盖菇低值菌物蛋白(残次菇及菇柄)定向酶解制备富肽风味基料进行研究,挖掘兼具愉悦感官呈味特性和生物活性的大球盖菇风味活性肽,实现风味活性特征性成分的有效利用。本研究对提升大球盖菇产品附加值具有参考意义。开发的富肽基料也可作为一种重要的食品和药品新资源进行应用,符合我国大健康产业的发展需求。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

大球盖菇残次菇及菇柄原料由上海菇林源菌

业专业合作社提供,大球盖菇栽培品种为球盖菇5号【沪农品认食用菌(2004)第062号】。原料鲜菇样品采用热风干燥方式进行干制(干燥温度55℃,通风量3500 m<sup>3</sup>/h,干燥6h,水分含量低于8%)。将大球盖菇干品剪切至长、宽分别约为3 mm的菇丁作酶解原料。所用水解蛋白酶信息如表1所示。肽含量测定试剂盒,苏州梦犀生物医药科技有限公司;DOJINDO 同仁化学 ACE Kit-WST 试剂盒,上海宥露生物科技有限公司;恒大弱碱性水(pH 7.8~7.9),京东商城;柠檬酸、蔗糖、异亮氨酸、氯化钠、谷氨酸钠,北京索莱宝科技有限公司;乙腈、甲酸,美国 Thermo 公司;其它试剂(分析纯级),国药集团化学试剂有限公司。

表1 蛋白酶信息

Table 1 Protease information

名称	酶活	温度/℃	pH 范围	供应商信息
胰蛋白酶	250.N.F.U/mg	37	6.5~8.5	诺维信 Novozymes
中性蛋白酶	50 U/mg	50	6.0~7.0	上海麦克林生化科技有限公司
碱性蛋白酶	200 000 U/g	50	8.5~10.5	北京索莱宝科技有限公司
风味蛋白酶	500 LAPU/g	50	5.5~7.5	诺维信 Novozymes
木瓜蛋白酶	2 000 U/mg	50	6.0~7.0	生工生物工程(上海)股份有限公司
胃蛋白酶	3 000 U/mg	37	1.5~2.0	上海麦克林生化科技有限公司
复合蛋白酶	1.6 AU-N/g	50	5.5~7.5	诺维信 Novozymes

### 1.2 仪器与设备

AKTA Flux 6 切向流膜过滤系统,格来赛生命科技(上海)有限公司;中空纤维膜(<3 000 u),通用电气(中国)医疗集团;Bio-Tek Epoch 2 酶标仪,美国 BioTek 公司;Christ Alpha 2-4 LDplus 真空冷冻干燥机,德国 Christ 公司;聚能超声装备 VCX1500,美国 Sonics & Materials 公司;平板超声装备 SB25-12DNT,宁波新芝生物科技股份有限公司;TS-5000Z Insent 电子舌味觉分析系统,北京盈盛恒泰科技有限责任公司;Thermo EASY-nLC 液相色谱仪、Thermo Scientific QE-orbitrap 质谱仪、75 μm i.d. × 150 mm Acclaim PepMap RSLC C18 nanoViper 色谱柱,美国 Thermo 公司。

### 1.3 方法

1.3.1 大球盖菇原料预处理方法 经原料成分分析可知,本研究所采用的大球盖菇原料中粗蛋白含量为(46.47 ± 3.60)g/100 g 干重。采用前期优化

的聚能超声原料处理工艺(超声功率密度 300 W/L,工作频率 20 kHz,超声处理 20 min)进行原料预处理,预处理后的原料水溶液中可溶性蛋白含量达到 203.36~205.40 mg/g 干重。

1.3.2 大球盖菇富肽基料酶解制备蛋白酶筛选方法 取 1.3.1 节预处理得到的原料液,根据水解蛋白酶推荐使用 pH 值范围(详见表 1),采用 1 mol/L 氢氧化钠和 1 mol/L 盐酸调节大球盖菇预处理原料液 pH 值;分别加入表 1 中的蛋白酶,蛋白酶的添加量为原料液中菇丁质量的 1%;各蛋白酶酶解温度按照蛋白酶推荐使用温度,酶解时间为 60 min,得到各个处理的酶解液。酶解液于 100℃水浴灭酶 10 min 后,4 000 r/min 离心 10 min,收集上清液。以上清液中多肽含量、电子舌风味评价值为指标,进行酶解反应水解蛋白酶筛选试验,考察蛋白酶种类对酶解反应风味肽产量及呈味特性的影响。

### 1.3.3 大球盖菇富肽基料酶解制备工艺优化方法

取 1.3.1 节预处理得到的原料液及 1.3.2 节优选水解蛋白酶,进行酶解反应单因素实验。以酶解上清液中多肽含量为指标,确定较优的酶解反应单因素水平区间。根据单因素实验结果,选择对产肽量影响较大的因素及水平,以多肽含量为响应值,采用 Design-Expert 8.0.6 软件设计 Box-Behnken 试验,优化酶解反应制备大球盖菇富肽风味基料工艺。

1.3.4 同步超声定向酶解制备大球盖菇富肽基料方法 采用 1.3.3 节优化的传统酶解工艺以及前期优化的促蛋白水解超声作用条件(平板超声功率密度 120 W/L,超声工作频率 20 kHz),进行同步超声定向酶解制备大球盖菇富肽基料。以酶解上清液中多肽含量为指标,确定促风味肽产生的最优超声作用时间。

1.3.5 大球盖菇风味基料肽含量和 ACE 抑制活性分析方法 收集 1.3.3 节和 1.3.4 节最优工艺制备的酶解液上清液(标记为传统或超声辅助酶解原液),采用超滤技术对酶解原液进行超滤,收集分子质量小于 3 000 u 的超滤液(标记为传统或超声辅助酶解超滤液)。酶解原液及超滤液于-70 ℃冷冻干燥 48 h 后收集冻干风味基料,对基料肽含量、呈味特性及 ACE 抑制活性进行分析。基料肽含量测定采用肽含量测定试剂盒(BCA 法),呈味特性分析采用电子舌味觉传感器,ACE 抑制活性测定采用 ACE Kit-WST 试剂盒。

肽含量测定方法如下:称取 0.1 g 冻干基料,加入 1 mL 试剂盒提取液,冰浴匀浆静置 30 min 后,12 000 r/min,4 ℃离心 10 min,收集上清液。取 10 μL 上清液样品,加入 190 μL 试剂盒工作液,60 ℃烘箱保温 30 min,于波长 562 nm 处测定吸光值,肽含量计算公式为:肽含量(mg/g 干重)=标准品质量浓度×(样品测定的吸光值-空白测定的吸光值)÷(标准品测定的吸光值-空白测定的吸光值)× $V_{提}$ ÷ $W$ 。标准品为四肽标准品,质量浓度为 0.5 mg/mL;空白为水; $V_{提}$ 为入的提取液的体积(1 mL); $W$ 为基料质量(g)。以冻干基料中多肽含量为指标,比较响应面优化工艺中不同因素水平制备富肽基料的能力。

大球盖菇富肽基料风味评价采用 TS-5000Z Insent 电子舌内置方法。称取 0.1 g 冻干基料,加入 100 mL 纯水溶解,移取 25 mL 溶液加入电子舌专用样品杯中,每个样品重复测试 4 次,取后 3 次测试结果。标准味觉对照溶液采用 0.08%柠檬酸溶液(酸味对照),1%蔗糖溶液(甜味对照),0.25%异亮氨酸溶液(苦味对照),0.35%氯化钠溶液(咸味对照)和 0.35%谷氨酸钠溶液(鲜味对照)。由 4 名男性和 6 名女性(年龄在 24 至 27 岁之间)组成感官评估小组,将感官评价数值与电子舌评价数值进行比较,选 2 种评价趋势一致的感官评价小组成员(5 名及以上),对风味基料进行综合感官评价描述。

ACE 抑制活性测定方法如下:取冻干基料纯水配置 10 mg/mL 样品原液,采用稀释率 1,1/5,1/5<sup>2</sup>,1/5<sup>3</sup>,1/5<sup>4</sup>,1/5<sup>5</sup>,1/5<sup>6</sup> 纯水稀释得待测样品溶液。取 20 μL 样品溶液,加入 20 μL 试剂盒基质缓冲液和 20 μL 试剂盒酶工作液,37 ℃培养 60 min,加入 200 μL 试剂盒指示液,室温下培养 10 min,于波长 450 nm 处测定吸光值。ACE 抑制剂活性值(%)=(无抑制全显色的吸光值-样品测定的吸光值)÷(无抑制全显色的吸光值-试剂空白对照吸光值)×100。试剂空白对照为 40 μL 纯水,加 20 μL 试剂盒基质缓冲液和 200 μL 试剂盒指示液。分别以样品质量浓度和抑制剂活性值为横纵坐标轴制作抑制曲线,由抑制曲线得到抑制率 50%时样品的质量浓度。

1.3.6 大球盖菇酶解制备富肽基料中风味肽序列分析方法 选取呈味特性及 ACE 抑制活性较优的大球盖菇富肽基料,采用液相色谱串联质谱分析技术(Liquid chromatography tandem-mass spectrometry, LC-MS/MS)对大球盖菇风味基料中肽段进行氨基酸序列分析。基料样品经 Millipore ZipTip C18 微量层析柱脱盐处理后,采用 20 μL 溶解液(0.1%甲酸,5%乙腈)溶解肽段,涡旋振荡,13 500 r/min,4 ℃离心 20 min,收集上清液并转移到上样管中,取 8 μL 样品液进行质谱肽段序列分析鉴定。液相色谱流动相 A,0.1%甲酸;流动相 B,0.1%甲酸,80%乙腈;LC-MS/MS 设置参数如表 2 所示。采用 PEAKS 软件进行数据库检索。

表 2 LC-MS/MS 参数设置  
Table 2 LC-MS/MS parameter settings

液相设置参数				质谱设置参数		
时间/min	流速/nL·min <sup>-1</sup>	A/%	B/%	参数	数值	
0.00	400	97	3	一级质谱	分辨率	120 000
3.00	400	97	3		自动增益控制	4×10 <sup>5</sup>
7.00	400	92	8		离子最大注入时间/ms	50
46.00	400	68	32		质量扫描范围/m·z <sup>-1</sup>	350~1 550
51.00	400	56	44	二级质谱	分辨率	30 000
56.00	400	1	99		自动增益控制	1×10 <sup>5</sup>
60.00	400	1	99		离子最大注入时间/ms	100
60.10	300	97	3		一级质谱中选择进行二级碎裂的离子数	20
70.00	400	97	3		NCE 模式碰撞能量	32

1.3.7 大球盖菇酶解制备风味肽活性作用机制预测方法 采用 BIOPEP-UWM 网站 (<https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep-uwm/>) 对鉴定得到的活性肽进行风味预测,筛选呈味较优的风味肽。采用计算机分子对接技术模拟风味肽与 ACE 受体蛋白之间的结合状态,对风味肽活性作用机制进行预测。采用 Discovery Studio 2019 软件对 ACE 受体 (PDB:1O86) 进行去除水分子,保留 Zn<sup>2+</sup>和 Cl<sup>-</sup>,补充完整的氨基酸残基等处理和结构优化<sup>[24]</sup>。利用软件 CDOCKER 模块进行风味肽与 ACE 的半柔性对接,结合能力以“-CDOCKER Energy”值表示。挑选亲和力最高(能量最小)的复合物结构,分析风味肽与 ACE 受体的结合位点和作用方式,预测风味肽发挥 ACE 抑制活性的作用机制。

#### 1.4 数据处理与分析

响应面试验所得数据以 3 次测定结果的平均值±标准差表示,采用 Design-Expert 8.0.6 软件处理和分析。基料 ACE 抑制活性,采用 Excel 软件处理和分析。采用 SPSS 20.0 软件进行电子舌采集数据主成分分析 (Principal component analysis, PCA)。

## 2 结果与分析

### 2.1 蛋白酶筛选结果

蛋白酶酶解制备的富肽基料电子舌风味评价 PCA 分析结果如图 1a 所示(对照样品为相同底物质量浓度、电压力锅浸提 2 h 提取制备样品)。研

究发现,中性蛋白酶、碱性蛋白酶、胃蛋白酶和复合蛋白酶酶解制备的富肽基料,与咸味和鲜味参照标品风味接近,4 种酶可作为呈咸呈鲜富肽风味基料酶解制备候选酶。进一步对各蛋白酶酶解制备的基料中肽含量分析,由结果可知,碱性蛋白酶酶解基料中肽含量最高,达到 311.05 mg/g 干重(图 1b)。因此,基于大球盖菇蛋白酶酶解制备的富肽基料风味评价和肽含量结果,优选碱性蛋白酶进行呈咸、呈鲜富肽基料酶解制备工艺研究。

### 2.2 酶解工艺优化结果

结合前期单因素筛选结果,优选酶解时间 30~90 min、加酶量 0.5%~1.5%、酶解温度 40~60 °C 和底物质量浓度 40~60 g/L 进行响应面优化。为了避免酶解过程中酸、碱调节 pH 值引入钠离子,影响肽基料风味评价结果,在酶解工艺优化反应中不做 pH 值调节。在本研究限定的酶解条件下,采用食品级弱碱性水,可以保证酶解条件。响应面试验结果如图 2 和表 3 所示。基于响应面试验结果利用软件预测出的富肽基料最优酶解制备工艺条件为:酶解时间 51.62 min,加酶量 0.99%,酶解温度 42.03 °C,底物质量浓度 48.45 g/L。经验证,该工艺条件实际产肽量平均值为 461.31 mg/g 干重,与模型理论预测值 466.51 mg/g 干重相比,相对误差为 1.13%,模型预测最优酶解制备工艺可信。该酶解工艺制备的大球盖菇风味基料肽含量,较高压浸提子实体原液中肽含量(119.20 mg/g 干重)提升了 2.87 倍。

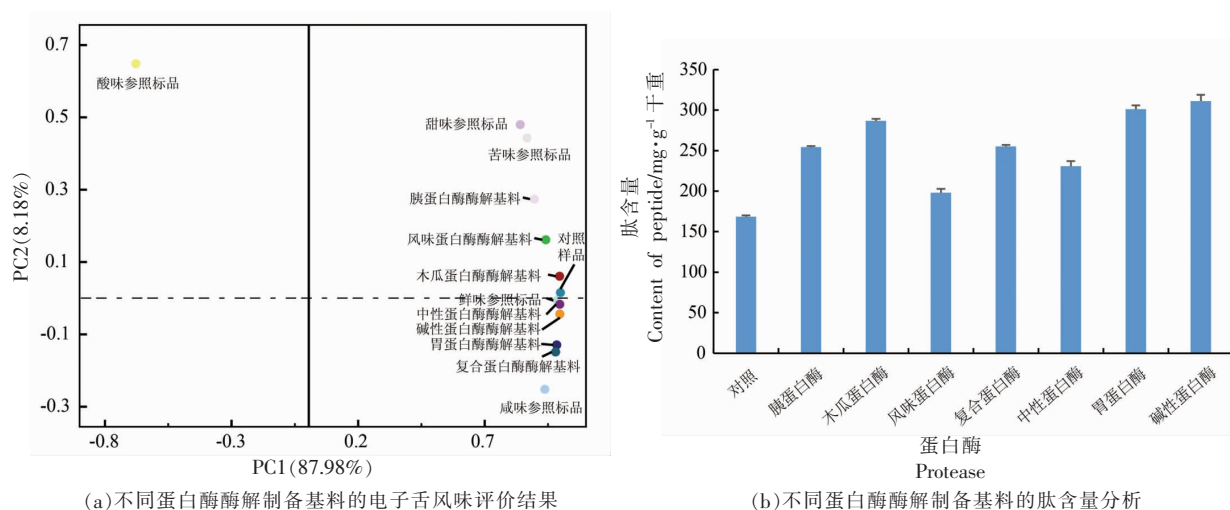


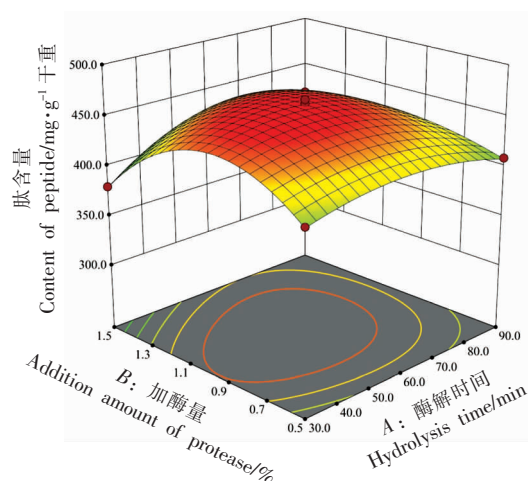
图 1 不同蛋白酶酶解制备基料的电子舌风味评价及肽含量分析图

Fig.1 Electronic tongue flavor evaluation and peptide content analysis of substrates prepared by enzymatic hydrolysis of different proteases

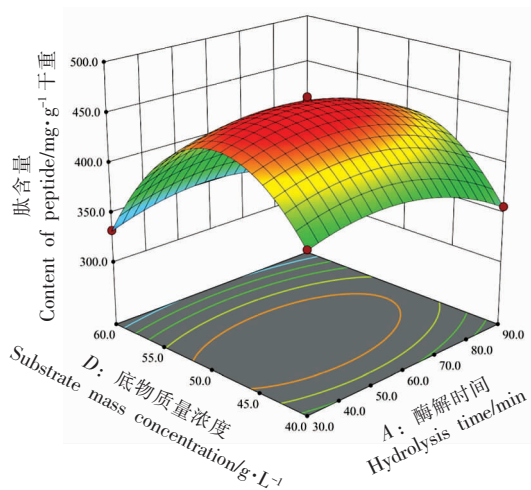
表 3 响应面试验结果

Table 3 Results of response surface experimental design

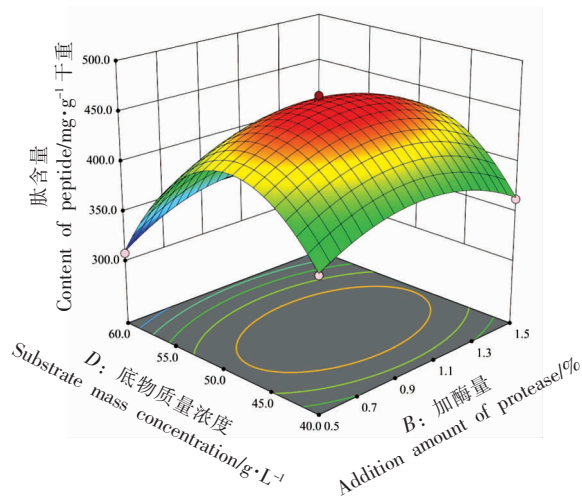
组号	酶解时间(A)/min	加酶量(B)/%	温度(C)/°C	底物质量浓度(D)/g·L <sup>-1</sup>	肽含量/mg·g <sup>-1</sup> 干重
1	90	1.0	50	40	357.09 ± 17.45
2	60	1.0	50	50	462.39 ± 24.09
3	90	1.0	50	60	327.72 ± 18.79
4	90	1.5	50	50	420.35 ± 21.48
5	60	1.5	50	60	322.86 ± 14.67
6	90	1.0	60	50	447.08 ± 26.34
7	60	0.5	50	60	307.47 ± 12.65
8	30	0.5	50	50	411.49 ± 18.70
9	60	1.5	40	50	433.98 ± 21.45
10	60	1.0	50	50	462.43 ± 21.19
11	60	1.5	60	50	418.67 ± 17.12
12	60	0.5	50	40	364.29 ± 15.81
13	60	0.5	60	50	419.04 ± 14.35
14	60	1.0	50	50	461.79 ± 26.63
15	30	1.0	40	50	433.72 ± 25.44
16	30	1.0	50	60	332.52 ± 14.71
17	30	1.5	50	50	380.18 ± 19.15
18	60	0.5	40	50	461.67 ± 21.06
19	60	1.0	60	60	352.41 ± 16.44
20	60	1.0	60	40	404.49 ± 14.79
21	60	1.0	50	50	456.09 ± 26.51
22	60	1.0	40	60	362.34 ± 17.47
23	60	1.5	50	40	363.40 ± 15.78
24	30	1.0	60	50	444.83 ± 23.28
25	90	0.5	50	50	408.98 ± 20.92
26	60	1.0	50	50	466.51 ± 22.50
27	60	1.0	40	40	401.17 ± 15.71
28	30	1.0	50	40	388.80 ± 17.75
29	90	1.0	40	50	434.22 ± 21.35



(a) 酶解时间和加酶量交互作用对肽含量的影响



(b) 酶解时间和底物质量浓度交互作用对肽含量的影响



(c) 加酶量和底物质量浓度交互作用对肽含量的影响

图2 大球盖菇富肽基料酶解制备响应面优化结果

Fig.2 Response surface optimization results of peptide rich substrate enzymatic hydrolysis preparation of *Stropharia rugosoannulata*

采用同步超声定向酶解制备大球盖菇富肽基料,在平板超声辅助酶解 30 min 时,基料中肽含量(469.21 mg/g 干重)可达到传统酶解最优条件下产肽量,酶解时间显著缩短;辅助酶解 40 min 时的产肽量(492.87 mg/g 干重),较传统酶解产肽量提升了 6.5%;由此确定同步超声定向酶解制备大球盖菇富肽基料最佳超声作用时间为 30~40 min。

### 2.3 大球盖菇富肽基料呈味特性

对传统酶解最优工艺条件及同步超声定向酶解制备(40 min)的大球盖菇富肽基料(原液及超滤液)进行电子舌风味评价,基料呈味特性如表 4 所示。电子舌分析结果显示,基料咸味、鲜味和苦味的滋味评价值较高,且咸味的评价数值高于鲜味和苦味。传统酶解超滤液较传统酶解原液咸味、苦味提升,鲜味下降,推测酶解产生的小分子物质(<3 000 u)主要发挥了呈咸和呈苦特性,大分子物质(>3 000 u)主要发挥了呈鲜特性;超声辅助酶解制备基料,超滤液较原液的咸味、鲜味和苦味虽均有所下降,但下降差异不显著,推测超声辅助酶解让酶解基料中呈味组分分子质量分布更均匀。超声辅助酶解样品较传统酶解样品呈苦和呈咸鲜评价值都有所提高,苦味提升可能与采用超声技术有关,超声处理促使酶解基料中更多疏水氨基酸残基暴露引起苦味增加;咸鲜味提升可能与超声作用促使蛋白结构、酶切位点改变有关,超声物理场如何诱导蛋白酶酶切产咸鲜味肽段的机理有待进一步解析。感官评价小组成员对基料咸鲜味评价结果,与电子舌评价结果一致,对酶解基料苦味感知并不明显,基料风味综合评价更多呈现一种咸鲜味复合的感官感知体验。感官评价苦味味觉感知弱,是否与高强度咸鲜味掩盖,或与苦味受体感知(敏感)阈值、感知时间有关,有待进一步研究。总体而言,超声辅助酶解较传统酶解制备的风味基料,在呈咸鲜味上都具有一定优势(同配比质量浓度的高压浸提水提样品,鲜味评价值  $1.57 \pm 0.15$ ,苦味评价值  $8.91 \pm 0.39$ ,无咸味呈味特性),适合作为呈咸呈鲜富肽基料的开发技术手段。

### 2.4 大球盖菇富肽基料 ACE 抑制效果

传统酶解最优工艺条件及超声辅助酶解制备

(40 min)的大球盖菇富肽基料 ACE 抑制活性结果如表 5 所示。相同配比质量浓度下,大球盖菇富肽基料原液样品之间及超滤液样品之间,ACE 抑制活性接近,均优于高压浸提 2 h 子实体原液 ACE 抑制效果( $IC_{50}$  为 0.378 mg/mL)。在酶解基料配比

质量浓度 2 mg/mL 时,ACE 抑制率均可达到 85% 以上。富肽基料超滤液的 ACE 抑制活性高于原液,与文献报道的活性肽分子质量小于 3 000 u 的结果具有一致性<sup>[25-26]</sup>。

表 4 酶解制备原液基料和超滤液基料呈味特性分析结果

Table 4 Results of taste characteristics of enzymatic hydrolysis and ultrafiltration samples

富肽基料	酸味	苦味	涩味	酸性苦味 回味	涩味回味	鲜味	满口感	咸味
传统酶解原液	$-35.52 \pm 1.03$	$10.72 \pm 0.12$	$-13.17 \pm 0.07$	$-0.76 \pm 0.06$	$-0.19 \pm 0.11$	$12.43 \pm 0.33$	$-0.17 \pm 0.01$	$12.93 \pm 0.23$
传统酶解超滤液	$-47.03 \pm 2.21$	$14.06 \pm 0.22$	$-11.97 \pm 0.15$	$-0.91 \pm 0.04$	$-0.30 \pm 0.12$	$8.21 \pm 0.23$	$-0.85 \pm 0.01$	$18.23 \pm 0.23$
超声辅助酶解原液	$-50.00 \pm 2.62$	$14.62 \pm 0.13$	$-9.78 \pm 0.25$	$-0.38 \pm 0.05$	$-0.19 \pm 0.03$	$13.17 \pm 0.16$	$-0.93 \pm 0.03$	$23.33 \pm 0.11$
超声辅助酶解超滤液	$-50.89 \pm 2.18$	$14.17 \pm 0.12$	$-12.25 \pm 0.11$	$-0.91 \pm 0.08$	$-0.24 \pm 0.07$	$10.40 \pm 0.18$	$-0.88 \pm 0.01$	$20.65 \pm 0.15$

表 5 酶解制备原液基料和超滤液基料 ACE 抑制活性分析结果

Table 5 Results of ACE inhibition activity analysis of enzymatic hydrolysis and ultrafiltration samples

富肽基料	$IC_{50}/mg \cdot mL^{-1}$	ACE 抑制曲线拟合公式
传统酶解原液	0.123	$y = 17.437 \ln(x) + 67.387, R^2 = 0.9484$
传统酶解超滤液	0.071	$y = 20.231 \ln(x) + 81.367, R^2 = 0.9994$
超声辅助酶解原液	0.122	$y = 26.391 \ln(x) + 76.553, R^2 = 0.9788$
超声辅助酶解超滤液	0.074	$y = 21.808 \ln(x) + 82.816, R^2 = 0.952$

## 2.5 大球盖菇富肽基料中肽序列分析结果

对呈味特性及 ACE 抑制活性较优的大球盖菇富肽超滤基料进行风味活性肽序列分析。在传统酶解制备超滤基料中,共鉴定得到 546 种多肽(可信度评分 $-10 \lg P > 15$ ), $-10 \lg P > 20$  的多肽有 349 种,肽分子质量分布如图 3 所示。对 $-10 \lg P > 20$  的肽段两端氨基酸性质进行统计,肽链 N 端疏水氨基酸数量为 129 个,占比 36.96%;C 端疏水氨基酸数量为 156 个,占比 44.70%;两端均为疏水氨基酸的多肽有 59 个,占比 16.91%。在超声辅助酶解制备超滤基料中,共鉴定得到 748 种多肽(可信度评分 $-10 \lg P > 15$ ), $-10 \lg P > 20$  的多肽有 481 种(图 3)。 $-10 \lg P > 20$  的肽链 N 端疏水氨基酸数量为 162 个,占比 33.68%;C 端疏水氨基酸数量为 223 个,占比 46.36%;两端均为疏水氨基酸的多肽有 77 个,占比 16.01%。综上所述,虽然 2 种超滤液基料的 ACE 抑制活性相近,但超声辅助酶解鉴

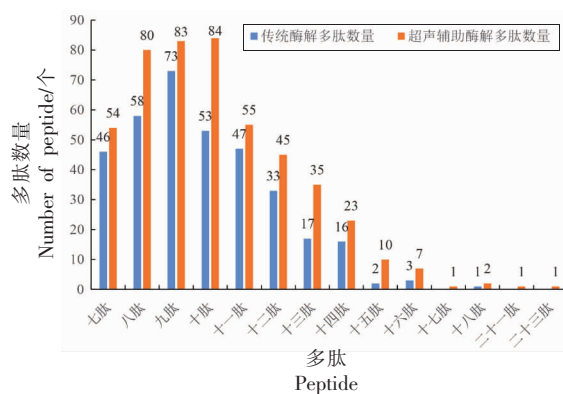


图 3 酶解制备基料超滤液肽段序列分析结果

Fig.3 Peptide sequence analysis results of enzymatic hydrolysis ultrafiltration samples

定得到的肽段种类较传统酶解肽段种类更为丰富;2 种工艺制备得到的基料中,均是 C 端为疏水氨基酸的肽段比例高(相关研究报道疏水氨基酸可能是导致酶解液产生苦味的主要原因,且肽链

端存在疏水氨基酸的肽段,ACE抑制效果较好<sup>[27-28]</sup>)。2种基料中共有肽段数量为283个。结合BIOPEP-UWM网站对鉴定得到的肽段进行呈味特性预测,经网站预测,在LC-MS/MS二级质谱鉴定得到的峰面积百分含量占比前10%的肽段中,肽链中存在天冬氨酸(D)、缬氨酸(V)、谷氨酸(E)、亮氨酸(L)、甘氨酸(G)、精氨酸(R)、脯氨酸(P)、丙氨酸(A)的氨基酸组合肽段DD、VV、EL、VG、VE、RP、RA、RV、VR时,多肽呈现咸鲜味呈味特性,上述氨基酸组合在基料肽段中占比较高(62%~73%,以七肽为例),可能是基料呈咸鲜味特性的主要原因。

## 2.6 大球盖菇风味肽活性作用机制

基于分子对接技术对风味肽的活性作用机制进行预测和解析。以AFRVPTL(预测为咸味肽)和MDLLDRL(预测为鲜味肽或苦味肽)2个风味七肽为例,通过构建肽段的3D结构,与ACE受体蛋白进行半柔性对接,结果表明,AFRVPTL对接结果中最佳构象结合能为-113.682 kJ/mol;AFRVPTL与ACE的氨基酸残基形成12个氢键,分别为Ser517(2)、Asn522(2)、Pro519、Glu403(2)、Asn70(2)、Glu143、Ala354(2);2个 $\pi$ - $\pi$ 和1个 $\pi$ -烷基相互作用,对应的氨基酸残基分别为Tyr523、His383和Phe391;5个盐桥和电荷吸引,对应的氨

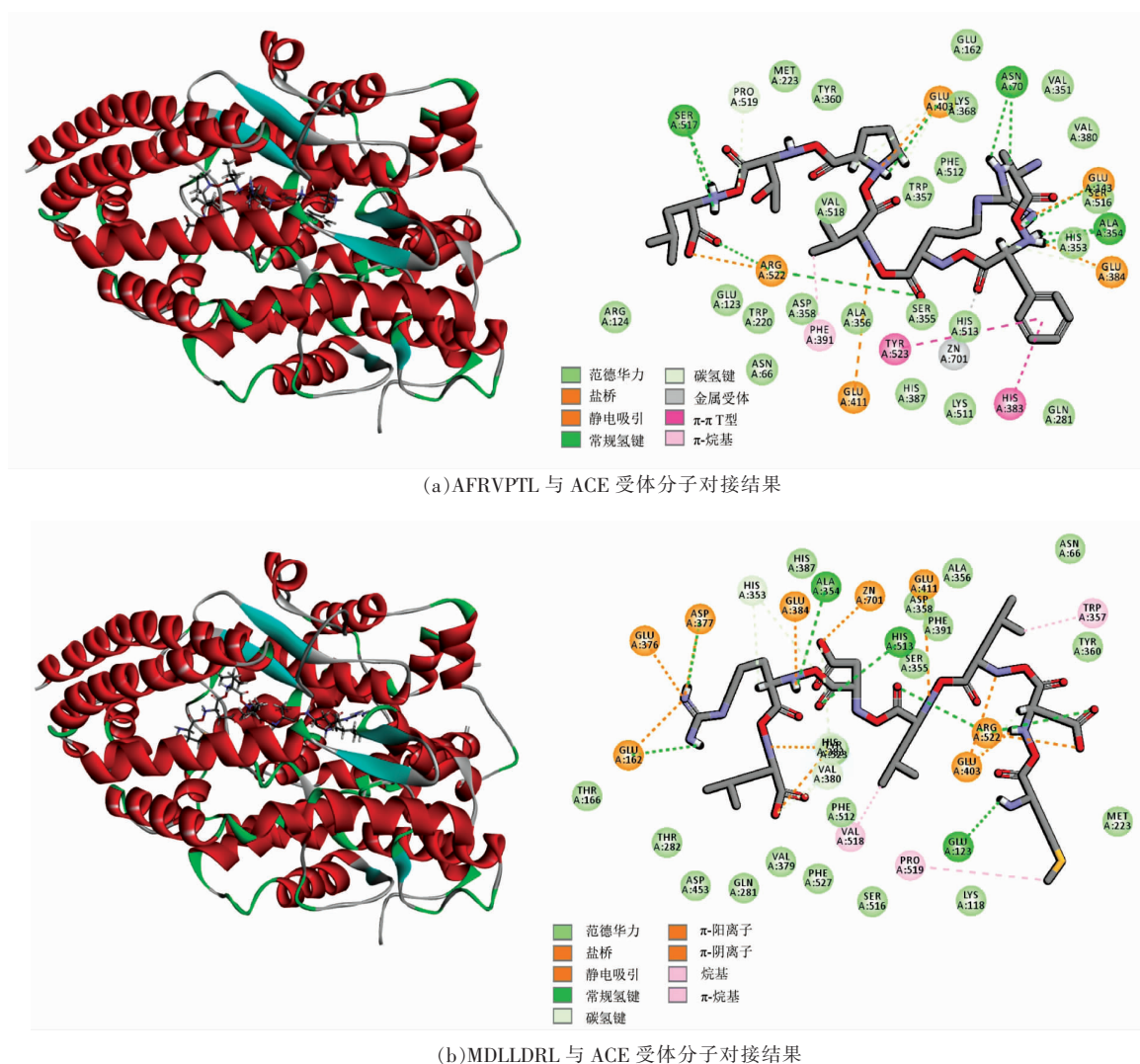


图4 风味肽AFRVPTL和MDLLDRL与ACE受体分子对接结果

Fig.4 Molecular docking results of flavor peptides AFRVPTL and MDLLDRL with ACE



氨酸残基分别为 Arg522、Glu411、Glu384、Glu143、Glu403,受体其它氨基酸残基与肽段之间以范德华力相互作用。MDLLDRL 对接结果中最佳构象结合能为-194.734 kJ/mol;MDLLDRL 与 ACE 的氨基酸残基形成 12 个氢键,分别为 Glu162、Asp377、His353 (2)、Ala354、His513、Arg522 (2)、Glu123、Val380(2)、Glu403;3 个  $\pi$ -烷基相互作用,对应的氨基酸残基分别为 Trp357、Val518、Pro519;8 个盐桥和电荷吸引,对应的氨基酸残基为 Glu162、Glu376、Asp377、Glu384、Zn701、Glu411、Agr522、Glu403,受体其它氨基酸残基与肽段之间以范德华力相互作用(图 4)。ACE 主要含有 3 个活性口袋 S<sub>1</sub>、S<sub>2</sub> 和 S<sub>1</sub>'<sup>[29]</sup>,分子对接模拟结果显示,AFRVPTL 可与 ACE 的活性口袋 S1 形成氢键相互作用,MDLLDRL 可与 ACE 的活性口袋 S<sub>1</sub>、S<sub>2</sub> 和 S<sub>1</sub>' 形成氢键相互作用,由此推测风味肽与 ACE 受体形成氢键相互作用,是基料发挥 ACE 抑制活性的主要原因。

### 3 结论与讨论

以蛋白酶水解制备基料呈味特性和产肽量为考察指标,优选碱性蛋白酶作为定向酶解制备富肽风味基料候选酶,进一步通过响应面工艺优化,获得了传统酶解制备大球盖菇富肽基料的最优工艺条件,即酶解时间 51.62 min,碱性蛋白酶加酶量 0.99%(酶活力 200 000 U/g),酶解温度 42.03 ℃,底物质量浓度 48.45 g/L。进一步采用超声技术辅助酶解制备大球盖菇富肽风味基料,平板超声同步辅助酶解时间 30 min,即可达到传统酶解最优条件下的产肽量,较传统酶解时间显著缩短;超声辅助酶解时间 40 min,产肽量较传统酶解制备风味活性肽产量提升了 6.5%。超声辅助酶解制备的富肽基料,较传统酶解制备的富肽基料,呈咸鲜特性上均具有一定优势,其咸味提升了 1.1~1.8 倍,鲜味提升了 1.1~1.3 倍。大球盖菇酶解制备的富肽基料肽链中存在 DD、VV、EL、VG、VE、RP、RA、RV、VR 等氨基酸组合时,多肽呈现咸鲜味呈味特性。虽然传统酶解和超声辅助酶解制备的富肽基料原液样品之间或超滤液样品之间的 ACE 抑制效果相差不大,但超声辅助酶解鉴定得到的肽段种类更为丰富。在样品溶液配比质量浓度 2

mg/mL 时,基料 ACE 抑制率均可达到 85%以上。分子对接技术预测大球盖菇风味肽体外 ACE 抑制活性作用机制结果显示,风味肽能够与 ACE 的活性口袋氨基酸残基形成氢键相互作用,推测这是基料能够对 ACE 发挥抑制作用的主要原因。因此,后续可基于分子对接技术对 LC-MS/MS 鉴定的得到的大球盖菇风味肽进行活性预测,合成分子对接筛选获得的高活性风味肽,进一步采用体外分子互作技术和体内降血压策略进行活性验证,进而获得具有良好风味和生物活性的大球盖菇风味活性肽,这对采用酶解技术定向制备具有生物活性的大球盖菇富肽基料具有指导意义。本研究通过挖掘大球盖菇富肽基料的生物活性,将菌物多肽的风味特性与功能活性有效结合,在针对需要低钠饮食特殊人群产品开发上,具有参考价值。未来可在减盐增鲜策略相关研究方面开展进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] ZHANG Y R, WANG D W, CHEN Y T, et al. Y Healthy function and high valued utilization of edible fungi [J]. Food Science and Human Wellness, 2021, 10(4): 408-420.
- [2] 熊维全,曾先富,李昕竺.大球盖菇的栽培现状与发展建议[J].食用菌,2021,43(5):73-75.  
XIONG W Q, ZEGN X F, LI X Z. Cultivation and development of *Stropharia rugosoannulata* mushroom [J]. Edible Fungi, 2021, 43(5): 73-75.
- [3] 王丽,倪淑君,李淑荣,等.大球盖菇盖和菇柄营养成分分析[J].黑龙江农业科学,2016(11):143-145.  
WANG L, NI S J, LI S R, et al. Analysis of the different parts of base nutrition of *Stropharia rugosoannulata* [J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2016(11): 143-145.
- [4] 汪虹,陈辉,张津京,等.大球盖菇生物活性成分及药理作用研究进展[J].食用菌学报,2018,25(4):115-120.  
WANG H, CHEN H, ZHANG J J, et al. Research progresses on bioactive components in *Stropharia rugosoannulata* and their pharmacological effects [J]. Acta Edulis Fungi, 2018, 25(4): 115-120.

- [5] ZHUANG M Z, LIN L Z, ZHAO M M, et al. Sequence, taste and umami-enhancing effect of the peptides separated from soy sauce[J]. Food Chemistry, 2016, 206: 174-181.
- [6] 方聪, 刘怡雪, 黎四芳. 新型超高甜度二肽甜味剂爱德万甜的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2021, 32(2): 128-136.
- FANG C, LIU Y X, LI S F. Research progress in new ultra-high potency dipeptide sweetener advance[J]. China Food Additives, 2021, 32(2): 128-136.
- [7] XU X D, XU R, SONG Z, et al. Identification of umami-tasting peptides from *Volvariella volvacea* using ultra performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry and sensory-guided separation techniques[J]. Journal of Chromatography A, 2019, 1596: 96-103.
- [8] FENG T, WU Y, ZHANG Z W, et al. Purification, identification, and sensory evaluation of Kokumi peptides from *Agaricus bisporus* mushroom[J]. Foods, 2019, 8(2): 43.
- [9] KONG Y, ZHANG L L, ZHAO J, et al. Isolation and identification of the umami peptides from shiitake mushroom by consecutive chromatography and LC-Q-TOF-MS[J]. Food Research International, 2019, 121: 463-470.
- [10] 李晓明, 黄占旺, 徐明生, 等. 白玉菇中鲜味肽的分离鉴定及呈味特性分析[J]. 食品科学, 2021, 42(24): 252-260.
- LI X M, HUANG Z W, XU M S, et al. Separation, identification and taste characteristics of umami peptides from white *Hypsizygus marmoreus*[J]. Food Science, 2021, 42(24): 252-260.
- [11] 梁佳明, 王肖肖, 张蓝云, 等. 兰茂牛肝菌菌柄和菌盖中鲜味成分的分析及菌盖中鲜味肽的鉴定[J]. 食品科学, 2021, 42(22): 232-239.
- LIANG J M, WANG X X, ZHANG L Y, et al. Analysis of umami components in stipe and pileus of *Lanmaoa asiatica* and identification of umami peptides in pileus[J]. Food Science, 2021, 42(22): 232-239.
- [12] BHARGAVA N, MOR R S, KUMAR K, et al. Advances in application of ultrasound in food processing: A review[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2021, 70: 105293.
- [13] LI W, MA H L, HE R H, et al. Prospects and application of ultrasound and magnetic fields in the fermentation of rare edible fungi[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2021, 76: 105613.
- [14] 戚思影. 低频超声预处理对脱水香菇品质及风味的影响[D]. 扬州: 扬州大学, 2021.
- QI S Y. Effect of low frequency ultrasonic pretreatment on the quality and flavor of dehydrated shiitake mushroom[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2021.
- [15] 陶天艺, 裴斐, 方东路, 等. 低温漂烫联合超声浸渍预处理对预制菜肴中双孢蘑菇品质的影响[J]. 食品工业科技, 2021, 42(10): 130-137.
- TAO T Y, PEI F, FANG D L, et al. Effects of low temperature blanching with ultrasonic dipping pretreatment on the quality of *Agaricus bisporus* in ready-to-eat dishes[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(10): 130-137.
- [16] 王睿, 负建民, 何奎, 等. 双孢菇边角料制备 ACE 抑制肽[J]. 中国食品学报, 2022, 22(1): 125-134.
- WANG R, YUN J M, HE K, et al. Preparation of ACE inhibitory peptide from scraps of *Agaricus bisporus*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(1): 125-134.
- [17] 陈婵, 黄靖, 丁玲. 超声波辅助提取大球盖菇总黄酮工艺优化[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(24): 116-119.
- CHEN C, HUANG J, DING L. Study on ultrasonic wave assisted extraction of flavonoids from *Stropharia*[J]. Food Research and Development, 2015, 36(24): 116-119.
- [18] 张少岩, 孟丽, 柏晓冉, 等. 超声波辅助浸提木耳总黄酮类化合物的工艺优化[J]. 菌物学报, 2020, 39(10): 1960-1970.
- ZHANG S Y, MENG L, BAI X R, et al. Technological optimization of ultrasonic assisted extraction of total flavonoids from *Auricularia cornes*[J]. Mycosystema, 2020, 39(10): 1960-1970.
- [19] 田雨. 羊肚菌蛋白质提取及抗氧化肽制备研究[D]. 太原: 山西大学, 2020.
- TIAN Y. Study on protein extraction and antioxidant peptide preparation of *Morchella esculenta*[D]. Taiyuan: Shanxi University, 2020.
- [20] 同政泉, 刘婷婷, 张闪闪, 等. 猴头菇多肽的制备及体外抗氧化、降血脂活性研究[J/OL]. 吉林农业大学学报, (2021-06-09)[2022-01-06]. <https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=3uoqIhG8C45S0n9fL2su>

- RadTyEV12pW9UrhTDCdPD65smUY22K1s2MJELQQbpXlh1PlsBWvYFP-7zET9aeThTHMqooB2xuHH&uniplatform=NZKPT.
- TONG Z Q, LIU T T, ZHANG S S, et al. Preparation of *Hericium erinaceus* polypeptides and their antioxidation and hypolipidemic activity *in vitro* [J/OL]. Journal of Jilin Agricultural University, (2021-06-09)[2022-01-06]. <https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=3uoqIhG8C45S0n9fL2suRadTyEV12pW9UrhTDCdPD65smUY22K1s2MJELQQbpXlh1PlsBWvYFP-7zET9aeThTHMqooB2xuHH&uniplatform=NZKPT>.
- [21] ZHANG H N, MA H L, LIU W, et al. Ultrasound enhanced production and antioxidant activity of polysaccharides from mycelial fermentation of *Phellinus igniarius*[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 113: 380-387.
- [22] SUN L, LIU L P, YANG L, et al. Effects of low-intensity ultrasound on the biomass and metabolite of *Ganoderma lucidum* in liquid fermentation [J]. Journal of Food Process Engineering, 2021, 44(1): e13601.
- [23] 王薇薇. 超声波和磁场对樟芝液态培养影响的研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2015.
- WANG W W. Research on effect of ultrasound and magnetic field on fermentation of *Antrodia cinnamomea* ATCC 200183[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2015.
- [24] 于志鹏, 樊玥, 赵文竹, 等. 鸡蛋蛋白 ACE 抑制肽的筛选、鉴定及其作用机制[J]. 食品科学, 2020, 41(12): 129-135.
- YU Z P, FAN Y, ZHAO W Z, et al. Identification and mechanism of action of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides from hen egg proteins[J]. Food Science, 2020, 41(12): 129-135.
- [25] 朱梦媛, 李冲伟. 植物源功能肽的制备、生理活性与应用研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(17): 363-369.
- ZHU M Y, LI C W. A review of the preparation, physiological activities and application of plant-derived functional peptides[J]. Food Science, 2021, 42(17): 363-369.
- [26] XUE L, YIN R X, HOWE K, et al. Activity and bioavailability of food protein-derived angiotensin-I-converting enzyme-inhibitory peptides[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2021, 20(2): 1150-1187.
- [27] 贾俊强. 超声对酶法制备小麦胚芽 ACE 抑制肽的影响及其作用机理[D]. 镇江: 江苏大学, 2009.
- JIA J Q. Effect and mechanism of ultrasound on enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2009.
- [28] 刘畅. 食源性生物活性肽对 ACE N 和 C 结构域的抑制作用机制研究[D]. 长春: 吉林大学, 2021.
- LIU C. Study on the inhibitory mechanism of food-derived bioactive peptides on ACE N and C domains[D]. Changchun: Jilin University, 2021.
- [29] WU S F, QI W, SU R X, et al. CoMFA and CoMSIA analysis of ACE-inhibitory, antimicrobial and bitter-tasting peptides[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2014, 84: 100-106.

### Efficient Preparation of Flavor Peptides from *Stropharia rugosoannulata* and Its ACE Inhibitory Activity

Li Wen<sup>1,2</sup>, Chen Wanchao<sup>1</sup>, Ma Haile<sup>2\*</sup>, Wu Di<sup>1</sup>, Zhang Zhong<sup>1</sup>, Yang Yan<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, National Engineering Research Center of Edible Fungi, Key Laboratory of Edible Fungi Resources and Utilization (South), Ministry of Agriculture, Shanghai 201403

<sup>2</sup>School of Food & Biological Engineering, Institute of Food Physical Processing, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu)

**Abstract** In this study, the enzymatic hydrolysis preparation of flavor peptide from *Stropharia rugosoannulata* were optimized by using response surface methodology based on the taste characteristics and peptide yield. The optimal process parameters were as follows, the hydrolysis time was 51.62 min, the addition amount of alkaline protease was 0.99% (enzyme activity, 200 000 U/g), the hydrolysis temperature was 42.03 °C, and the substrate mass concentration was 48.45

g/L. Based on the optimal parameters of conventional enzymatic hydrolysis process, the peptide was prepared by simultaneous ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis. The peptide content in the samples (469.21 mg/g dry weight) at 30 min treatment of the plate ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis could reach the peptide yield under the optimal conditions of conventional enzymatic hydrolysis, and the preparation time of the base material was significantly reduced; the peptide yield (492.87 mg/g dry weight) at 40 min treatment of ultrasound-assisted enzyme hydrolysis was 6.5% higher than that of conventional enzyme hydrolysis. The peptides prepared by simultaneous ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis had better savory and umami taste characteristics, which were enhanced by 1.1–1.8 times and 1.1–1.3 times, respectively, compared with the peptide prepared by conventional enzymatic hydrolysis. The peptide-rich samples showed superior angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory activity with 50% inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) of 0.071, 0.074, 0.122 mg/mL and 0.123 mg/mL. By analyzing the sequence of the flavor peptide, it was found that the peptide showed salty and umami taste when the aspartic acid (D), valine acid (V), glutamic acid (E), leucine acid (L), glycine acid (G), arginine acid (R), proline acid (P), and alanine acid (A) in the combination of DD, VV, EL, VG, VE, RP, RA, RV or VR were present in the peptide sequence. The high proportion of these amino acids' combination in the peptides might be the main reason for the salty and umami taste characteristics of the samples. The mechanism of *in vitro* ACE inhibitory activity of the flavor peptide was predicted by molecular docking technique, and the flavor peptides could form hydrogen bond interaction with the amino acid residues of ACE active pocket, which might be the main reason for the ACE inhibitory effect of the flavor peptides. The study can provide a theoretical basis for the preparation and application of the flavor-active peptide of mushroom, and provide a reference for the preparation of salt-reducing and umami-enhancing condiments, functional foods, or food additives.

**Keywords** *Stropharia rugosoannulata*; flavor peptide; taste characteristics; ACE inhibitory activity; molecular docking