DOI:10.12441/spyswjs.20221123001 [文章编号] 1673-1689(2024)10-0140-13

大球盖菇风味肽的制备及其抗氧化活性研究

陈荣荣[1,2] 李 文[2] 吴 迪[2] 张 忠[2] 鲍大鹏[2] 杨 焱[2] 陈万超[2,3*]

(1. 上海海洋大学食品学院,上海 201200; 2. 上海市农业科学院食用菌研究所,上海 201403; 3. 上海百信生物科技有限公司,上海 201403)

摘要: 为促进大球盖菇(*Stropharia rugosoannulata*,*S. rugosoannulata*)深度开发利用,制备了大球盖菇风味活性肽基料,探究大球盖菇可溶性肽最佳酶解制备工艺,分析可溶性肽相对分子质量分布特征和酶解产物体外抗氧化活性。以可溶性肽质量分数为评价指标,结合仿生电子舌辅助筛选最佳蛋白酶、酶解方式、酶解温度、酶解时间、加酶量以及料液比;利用 Design Expert 软件设计三因素三水平试验,确定大球盖菇可溶性肽酶解最佳工艺。结果表明,中性蛋白酶和风味蛋白酶酶解效果较优,最佳酶解工艺为双酶分布酶解法。酶解温度 50 ℃,料液比 1 g∶30 mL;中性蛋白酶酶解时间 76 min,加酶量 1 175 U/g,酶解 pH 7.5;风味蛋白酶酶解时间 20 min,加酶量 490 U/g,酶解 pH 7.0。在此工艺条件下,酶解产物可溶性肽质量分数为 245.45 mg/g,鲜味值及咸味值高,可有效改善不良风味;可溶性肽相对分子质量低且集中,其中相对分子质量小于 500 的占比达 83.55%。1.0 mg/mL 酶解产物 DPPH 自由基清除率和 ABTS 自由基清除率分别为 81.84% 和 65.25%,IC_{50} 分别为 0.19 mg/mL 和 0.56 mg/mL,具有较好的体外抗氧化活性。综上,通过酶解工艺优化,大球盖菇风味活性肽基料可溶性肽产量高且相对分子质量低,呈味效果和抗氧化能力均较佳。

关键词: 大球盖菇;分步酶解;风味肽;可溶性肽;抗氧化活性

Preparation of Flavor Peptides from *Stropharia rugosoannulata* and Study of Their Antioxidant Activity

CHEN Rongrong[1,2] *LI Wen*[2] *WU Di*[2] *ZHANG Zhong*[2] *BAO Dapeng*[2]
YANG Yan[2] *CHEN Wanchao*[2,3*]

(1. College of Food Sciences & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201200, China; 2. Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China; 3. Shanghai Baixin Biotechnology Co., Ltd., Shanghai 201403, China)

Abstract: To promote the deeper utilization of *Stropharia rugosoannulata* (*S. rugosoannulata*) a flavorful and functional peptide base was prepared. The optimal enzymatic hydrolysis process for the soluble peptides from *S. rugosoannulata* was studied, and the molecular weight distribution characteristics and *in vitro* antioxidation activity of hydrolysate were analyzed. Based on the evaluation index of soluble peptide mass fraction, assisted by the results of bionic electronic tongue, the best protease, enzymatic hydrolysis mode, enzymatic hydrolysis temperature, enzymatic hydrolysis time, enzyme addition amount and material liquid ratio were screened, and then three factor and three level experiments were designed by using Design Expert software to determine the optimal enzymatic hydrolysis preparation process. The results showed that neutral protease and flavor protease had better hydrolysis effect. The optimum process for polypeptide preparation was as follows: the hydrolysis

基金项目: 上海市现代农业产业技术体系项目[沪农科产字(2022)第 9 号];上海市青年科技启明星计划项目(20QB1400900)。

通信作者: 陈万超(1987—),男,博士,助理研究员,主要从事食用菌风味成分分析及产生机制研究。E-mail: chenwanchao@saas.sh.cn

收稿日期: 2022-11-23 **修回日期:** 2023-03-05

process was double enzyme step hydrolysis, temperature was 50 ℃, the ratio of material to liquid was 1 g∶30 mL, neutral protease hydrolysis time was 76 min, the amount of enzyme added was 1 175 U/g, the hydrolysis pH was 7.5, flavor protease hydrolysis time was 20 min, the addition amount was 490 U/g, and the hydrolysis pH was 7.0. With the optimal conditions, the soluble peptide mass fraction of the hydrolysate was 245.45 mg/g, and the umami and salty value were high, which can effectively improve the bad flavor. Meanwhile, the molecular weight of polypeptide was low and concentrated, and the proportion of polypeptide with molecular weight less than 500 is 83.55%. Moreover, enzymatic hydrolysate had good antioxidant activity *in vitro*. The scavenging rates of 1.0 mg/mL hydrolysate to DPPH and ABTS were 81.84% and 65.25%, respectively, and the IC_{50} were 0.19 mg/mL and 0.56 mg/mL, respectively. To sum up, through optimization of enzymatic hydrolysis process, the hydrolysate of *S. rugosoannulata* had high polypeptide content, low molecular weight, demonstrated both good taste and antioxidant capacity.

Keywords: *Stropharia rugosoannulata*; step-by-step enzymolysis; flavor peptides; soluble peptides; antioxidant activity

大球盖菇属于担子菌门、伞菌纲、伞菌目、球盖菇科、球盖菇属[1-2]。作为草腐性食用菌，大球盖菇的抗逆性和适应能力强，能够高效利用农作物秸秆，降解土壤中有害物质，具有良好的经济价值和生态价值[3]。作为联合国粮农组织推荐栽培食用菌之一[4]，大球盖菇营养丰富，含有蛋白质、维生素、多糖等营养物质，在抗氧化、抗疲劳、抗肿瘤、降血糖等方面效果显著，是一种药食同源的食用菌，深受消费者喜爱[5-7]。大球盖菇菌盖鲜嫩、菌柄爽脆，鲜味浓郁[8]。其栽培简单、原料广泛，投入成本低且产量高，这些优势使得大球盖菇在科技兴农推广中备受关注[9]。

作为一种高蛋白质、低脂肪的食用菌，大球盖菇独特的风味主要来源于一些小分子物质如核苷酸、氨基酸以及有机酸等[10]，而可溶性肽也对其风味产生具有重要作用。目前，可溶性肽的提取方法主要有化学法、物理法、微生物法以及酶法等[11]。相较于其他3种方法，酶法提取具有专一性强、水解效率高、作用条件温和可控等特点[12]，具有广泛的应用前景。但天然蛋白质结构及组成复杂，单一酶解产生的小肽含量低，风味物质得不到充分释放，甚至会产生不良风味[13]。因此，常通过复合酶连续酶解获得目标产物，提高水解效率。酶解产物苦味的产生与多肽羧基末端疏水性氨基酸和氨基末端碱性氨基酸有关，若要制备低苦味酶解产物，可联合使用内肽酶和外肽酶。使用作用位点为疏水性氨基酸和碱性氨基酸的内切酶对蛋白质酶解后，再用外切酶将此类氨基酸切除，不仅增强了酶解效率，还能达到减弱酶解产物苦味的效果[13]。

作者以大球盖菇子实体为原料，利用多种商业化蛋白酶进行单一和复合酶解，以获取高产量且具有良好滋味特征的可溶性肽为目标，并对酶解产物相对分子质量分布进行分析。目前，大球盖菇抗氧化活性的研究主要集中在多酚[14]、多糖[15]等生物活性成分，对其酶解产物抗氧化活性研究较少。进一步对酶解产物的抗氧化功能进行研究，以期为大球盖菇风味活性肽的开发及酶解产物的高效利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

大球盖菇菌株：球盖菇5号[沪农品认食用菌（2004）第062号]，由上海菇林源菌业专业合作社（上海崇明）采用林下栽培模式栽培，培养料为稻草，于2021年4月采收第二潮菇子实体。将大球盖菇子实体清洗干净后，采用智能烘干系统热风干燥，干燥温度为55 ℃，连续干燥至水分质量分数低于10%，得到大球盖菇干品。将烘干后的大球盖菇粉碎后过100目筛，收集后置于干燥器中备用。

1.2 试剂与仪器

碱性蛋白酶（酶活力2×10^5 U/g）、胰蛋白酶（酶活力2.5×10^4 U/g）、中性蛋白酶（酶活力6×10^4 U/g）、木瓜蛋白酶（酶活力8×10^5 U/g）、菠萝蛋白酶（酶活力6×10^5 U/g）、风味蛋白酶（酶活力3×10^4 U/g）、复合蛋白酶（酶活力1×10^5 U/g）：北京索莱宝科技

有限公司；肽含量测定试剂盒：苏州梦犀生物医药科技有限公司；细胞色素 C（相对分子质量 12 500）、抑肽酶（相对分子质量 6 500）、杆菌肽（相对分子质量 1 450）、乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸（相对分子质量 451）、乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸（相对分子质量 189）、DPPH 试剂：上海源叶生物科技有限公司；ABTS 试剂：上海阿拉丁生化科技股份有限公司；色谱级乙腈：美国 DIKMA 公司；三氟乙酸：美国 Sigma 公司；氢氧化钠和盐酸：国药集团化学试剂有限公司。

粉碎机：QE-400 型，浙江屹立工贸有限公司；水分测定仪：MA100 型，德国 Sartorius 公司；凯式定氮仪：Kjeltec 8100 型，瑞典 FOSS 公司；离心机：Allegra 25R Centrifuge 型，美国 Beckman 公司；酶标仪：Epoch 2 型，美国 Bio-Tek 公司；味觉分析系统：SA-402B 型，日本 INSENT 公司；恒温培养振荡器：ZWY 型，上海智城分析仪器制造有限公司；电热恒温鼓风干燥箱：DGG-9240B 型，上海森信实验仪器有限公司；电热恒温水浴锅：HWS-12 型，兰州文曦分析仪器有限公司；pH 计：北京莱万生物技术有限公司；数显折射仪：PAL-1 型，北京阿格勒科技有限公司。

1.3 分析方法

1.3.1 大球盖菇水分及粗蛋白质质量分数的测定

取 1.0 g 大球盖菇粉，用水分测定仪测定水分质量分数；按照 GB 5009.5—2016 中的凯式定氮仪法[16]测定粗蛋白质质量分数。

1.3.2 酶解工艺流程

称取 10.0 g 大球盖菇粉，加入 200 mL 蒸馏水，置于恒温培养振荡器中，用 1 mol/L 的 NaOH 或 1 mol/L 的 HCl 调节溶液起始 pH，待温度和 pH 处于最适条件时加入酶，反应一定时间。酶解后 100 ℃沸水浴 10 min 灭酶，酶解过程中摇晃 3 次。待酶解液冷却至室温，于 8 000 r/min 离心 15 min，收集上清液，经 0.45 μm 水系滤膜过滤处理。

1）单酶的筛选：以酶解产物可溶性肽质量分数及酶解产物风味值为筛选指标进行单酶筛选，固定加酶量 500 U/g，酶解时间 1 h，料液比 1 g∶20 mL，按照酶解工艺流程，在中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶、胰蛋白酶、菠萝蛋白酶、风味蛋白酶、复合蛋白酶各自最适温度和 pH 条件下反应，见表 1。根据酶解效果，筛选出适合用于制备大球盖菇风味肽的酶。

表 1 不同蛋白酶的酶解特性

Table 1 Enzymatic properties of different proteases

蛋白酶	最适温度/℃	最适 pH	特性
碱性蛋白酶	50	9.0	内切酶
胰蛋白酶	37	8.0	内切酶
中性蛋白酶	50	7.5	内切酶
木瓜蛋白酶	50	7.0	内切酶
菠萝蛋白酶	45	6.5	内切酶
风味蛋白酶	50	7.0	外切酶
复合蛋白酶	50	10.5	外切酶

注：风味蛋白酶和复合蛋白酶具有内切酶作用，但主要发挥外切酶作用。

2）复合酶确定及酶解方式选择：经筛选后选择中性蛋白酶和风味蛋白酶进行复合酶解，分为分步酶解和同步酶解 2 种酶解方式。分步酶解时，先加入 500 U/g 中性蛋白酶在最适温度和 pH 条件下反应 1 h，再加入 500 U/g 风味蛋白酶在最适温度和 pH 条件下继续酶解 1 h，酶解处理按照酶解工艺流程。同步酶解时，将 2 种蛋白酶同时加入底物中，酶解温度 50 ℃、酶解 pH 7.0、酶解时间 2 h，酶解处理与分步酶解条件一致。

3）分步酶解单因素试验：采用分步酶解方式，固定酶解温度 50 ℃，加入 500 U/g 中性蛋白酶，在 pH 7.5 的条件下酶解 1 h 后，加入 500 U/g 风味蛋白酶，在 pH 7.0 的条件下酶解 1 h，评价不同料液比（1 g∶15 mL、1 g∶20 mL、1 g∶25 mL、1 g∶30 mL、1 g∶35 mL、1 g∶40 mL）对大球盖菇酶解产物可溶性肽质量分数的影响。

固定料液比 1 g∶20 mL，中性蛋白酶在 pH 7.5 的条件下酶解 1 h 后，加入 500 U/g 风味蛋白酶在 pH 7.0 的条件下酶解 1 h，评价酶解温度（35、40、45、50、55、60 ℃）对大球盖菇酶解产物可溶性肽质量分数的影响。

固定料液比 1 g∶20 mL，酶解温度 50 ℃，加入 500 U/g 中性蛋白酶在 pH 7.5 的条件下酶解，评价中性蛋白酶酶解时间（20、40、60、80、100、120 min）对大球盖菇酶解产物可溶性肽质量分数的影响。

固定料液比 1 g∶20 mL，酶解温度 50 ℃，加入 500 U/g 中性蛋白酶在 pH 7.5 的条件下酶解 80 min，加入 500 U/g 风味蛋白酶在 pH 7.0 的条件下酶解，评价风味蛋白酶酶解时间（20、40、60、80、100、120 min）对大球盖菇酶解产物可溶性肽质量

分数的影响。

固定料液比1 g∶20 mL，酶解温度50 ℃，加入中性蛋白酶在pH 7.5的条件下酶解1 h，评价中性蛋白酶加酶量（250、500、750、1 000、1 250、1 500 U/g）对大球盖菇酶解产物可溶性肽质量分数的影响。

固定料液比1 g∶20 mL，酶解温度50 ℃，加入1 250 U/g中性蛋白酶在pH 7.5的条件下酶解1 h后，加入风味蛋白酶在pH 7.0的条件下酶解1 h，评价风味蛋白酶加酶量（100、200、300、400、500、600 U/g）对大球盖菇酶解产物可溶性肽质量分数的影响。

4）响应面优化试验：在单因素试验结果的基础上，选取中性蛋白酶酶解时间（*A*）、中性蛋白酶加酶量（*B*）、风味蛋白酶加酶量（*C*）为自变量，以酶解产物可溶性肽质量分数为响应值（*Y*），根据Box-Behnken设计原理，进行三因素三水平响应面优化试验设计。不加酶处理组以相同工艺条件但不添加酶反应，测定大球盖菇酶解产物可溶性肽质量分数。

1.3.3 可溶性肽质量分数测定

根据试剂盒说明书测定酶解产物中的可溶性肽质量分数。

1.3.4 电子舌分析

采用SA-402B味觉分析系统对离心后的酶解液进行分析。采用5个传感器分别对应酸味、苦味、鲜味、咸味和甜味。样品测试前将传感器活化并自检，待各传感器数值稳定后测定。样品稀释相同倍数，置于电子舌样品槽中测定。整个测试过程在室温（26±1）℃进行，测试时间为120 s，每个样品测试4次，取平均值。

1.3.5 相对分子质量分布测定

参照李慧凝等[17]的方法并略加修改，测定酶解液相对分子质量分布。色谱条件：色谱柱TSKgel 2000SWXL（300 mm×7.8 mm），流动相*V*（乙腈）∶*V*（水）∶*V*（三氟乙酸）=45∶55∶0.1，柱温30 ℃，流量0.5 mL/min，进样量10 μL，波长220 nm。标准品及样品用流动相配制，液体过0.22 μm滤膜。

1.3.6 抗氧化能力测定

DPPH自由基清除能力测定参照Wang等[18]的方法并略加修改。使用无水乙醇配制0.01 mmol/L DPPH溶液，避光保存。取1 mL不同质量浓度的待测样品，加入1 mL的DPPH溶液混匀。对照组用1 mL无水乙醇代替DPPH溶液，空白组用1 mL蒸馏水代替样品，阳性对照组选用不同质量浓度的抗坏血酸代替样品。室温避光反应30 min，在517 nm处测定吸光度。样品DPPH自由基清除率计算见式（1）。

$$S_{DPPH}=\left[1-(A_1-A_2)/A_0\right]\times 100\% \quad (1)$$

式中：

S_{DPPH}——DPPH自由基清除率，%；

A_1——样品组或阳性对照组的吸光度；

A_2——对照组的吸光度；

A_0——空白组的吸光度。

ABTS自由基清除能力测定参照赵原等[19]的方法并略加修改。配制7 mmol/L的ABTS溶液和2.45 mmol/L的过硫酸钾溶液，等体积混匀后室温避光12 h以上，使用前用pH 6.6的磷酸盐缓冲液稀释至734 nm处吸光度为0.70±0.02，得到ABTS工作液。取0.1 mL不同质量浓度待测样品，加入1 mL ABTS工作液混匀后反应6 min。对照组使用1 mL磷酸盐缓冲液代替ABTS溶液，空白组使用0.1 mL蒸馏水代替样品，阳性对照组选用不同质量浓度的抗坏血酸代替样品。分别在734 nm处测定吸光度，ABTS自由基清除率计算见式（2）。

$$S_{ABTS}=\left[1-(A_3-A_4)/A_5\right]\times 100\% \quad (2)$$

式中：

S_{ABTS}——ABTS自由基清除率，%；

A_3——样品组或阳性对照组的吸光度；

A_4——对照组的吸光度；

A_5——空白组的吸光度。

1.4 统计学分析

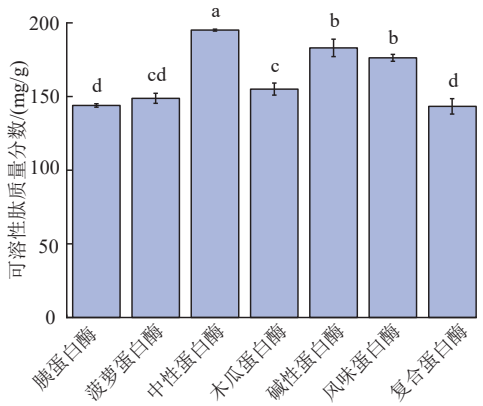
采用Excel 2019、IBM SPSS Statistics 25和Origin 2018对数据进行统计学分析及绘图，Design Expert 10软件进行响应面设计，Tukey HSD检验进行差异显著性分析。每组试验重复3次，结果以平均值±标准差表示。

2 结果与讨论

2.1 单酶的筛选及复合酶的确定

不同种类的酶由于其专一性，在酶解过程中作用位点不同导致其酶解产物在组成、结构及功能上也不同[20]。大球盖菇水分质量分数为

7.4%，粗蛋白质质量分数为43.53%。样品分别经5种内切酶（碱性蛋白酶、胰蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶）与2种外切酶（风味蛋白酶、复合蛋白酶）处理后，酶解产物中可溶性肽质量分数见图1。中性蛋白酶酶解得到的可溶性肽质量分数（195.12 mg/g）显著高于其他酶（$P<0.05$），碱性蛋白酶酶解后得到的可溶性肽质量分数也处于较高水平；而外切酶中风味蛋白酶与复合蛋白酶相比可以产生更多可溶性肽，酶解能力更强。电子舌分析结果见表2，中性蛋白酶酶解产物比碱性蛋白酶酶解产物的鲜味、甜味更强，且咸味减弱，对于制备良好风味肽更有利；外切酶中风味蛋白酶酶解产物在鲜味、抑制苦味方面不如复合蛋白酶，但其能够使酶解产物的甜味更强，并且产肽能力也显著高于复合蛋白酶。内切酶将底物酶解后会使肽链末端疏水性基团暴露，导致酶解液产生苦味等不良风味。中性蛋白酶主要酶切酪氨酸、苯丙氨酸、芳香族氨基酸等疏水性氨基酸残基的羧基端肽键，有利于风味蛋白酶发挥外切酶作用，改善不良风味和口感。因此，选择中性蛋白酶和风味蛋白酶组合，进一步研究复合蛋白酶对大球盖菇的酶解效果。



不同小写字母表示各水平间存在显著性差异（$P<0.05$）。

图1 不同蛋白酶对大球盖菇可溶性肽质量分数影响

Fig. 1 Effects of different proteases on the mass fraction of soluble peptide of *S. rugosoannulata*

2.2 酶解方式的选择

中性蛋白酶与风味蛋白酶对大球盖菇同步/分步酶解的影响结果见表3。同步酶解法得到可溶性肽质量分数为207.36 mg/g，分步酶解法得到可溶性肽质量分数达到211.54 mg/g。电子舌分析结果可知，分步酶解比同步酶解提升了产物的咸味值和甜味值，呈现更柔和的味觉属性。

表2 不同蛋白酶对大球盖菇滋味的影响

Table 2 Effects of different proteases on the taste of *S. rugosoannulata*

蛋白酶	酸味值	苦味值	鲜味值	咸味值	甜味值
胰蛋白酶	−49.44±0.94^{d}	9.46±0.22^{a}	16.84±0.04^{a}	−7.05±0.47^{c}	11.85±0.20^{ab}
菠萝蛋白酶	−42.28±0.06^{a}	6.86±0.06^{d}	14.34±0.12^{e}	−10.42±0.05^{f}	11.26±0.12^{bcd}
中性蛋白酶	−48.68±0.08^{c}	7.67±0.03^{b}	16.78±0.05^{a}	−7.13±0.02^{c}	12.14±0.24^{a}
木瓜蛋白酶	−47.14±0.05^{b}	7.67±0.03^{b}	15.93±0.04^{c}	−8.74±0.04^{e}	11.74±0.10^{abc}
碱性蛋白酶	−48.13±0.13^{c}	7.83±0.11^{b}	16.28±0.10^{b}	−6.20±0.06^{b}	11.10±0.23^{cd}
风味蛋白酶	−46.57±0.13^{b}	9.26±0.28^{a}	15.66±0.16^{d}	−7.73±0.10^{d}	10.70±0.69^{de}
复合蛋白酶	−46.64±0.21^{b}	7.19±0.08^{c}	15.87±0.14^{c}	−5.22±0.05^{a}	10.18±0.51^{e}

注：同一列不同字母表示差异显著（$P<0.05$）。

表3 同步酶解和分步酶解对可溶性肽质量分数和滋味的影响

Table 3 Effects of one-step enzymatic hydrolysis and two-step enzymatic hydrolysis on the mass fraction and taste of soluble peptide

酶解方式	可溶性肽质量分数/(mg/g)	酸味值	苦味值	鲜味值	咸味值	甜味值
同步酶解	207.36±0.95^{a}	−37.53±0.11^{a}	9.76±0.04^{a}	14.07±0.05^{a}	−12.22±0.10^{b}	10.89±0.13^{b}
分步酶解	211.54±2.53^{a}	−38.22±0.08^{b}	10.11±0.14^{a}	14.27±0.16^{a}	−9.61±0.03^{a}	11.16±0.10^{a}

注：同一列不同字母表示差异显著（$P<0.05$）。

2.3 复合酶单因素试验

不同酶解条件对大球盖菇可溶性肽质量分数的影响见图2。料液比较高时，过量的底物不能与酶分子结合，且酶解产物会抑制酶解反应的正向

进行，酶解反应趋于饱和[19]；料液比较低时，过量酶分子不能充分发挥作用，产物减少。因此，合适的料液比有利于底物和酶分子充分反应及反应物的合理应用。随料液比的降低，酶解产物可溶性肽质量分数呈现先升高后降低的趋势，其变化范围为207.22~225.73 mg/g，并在料液比为1 g∶30 mL时达到最大值225.73 mg/g。不同料液比条件下，酶解产物味觉属性也有所不同（见表4）。当料液比为1 g∶30 mL时，此时酶解液鲜味值突出，酸味值最低，咸味值较高，综合味觉值和可溶性肽质量分数的结果，选择1 g∶30 mL为最佳料液比。

不同酶解温度对大球盖菇酶解工艺的影响见图2（b）。随着反应温度不断升高，酶促反应速度加快，产物增多；当温度过高时，高温使酶变性，酶活性丧失，酶促反应减弱，产物减少。当酶解温度从35 ℃逐渐提高到50 ℃时，可溶性肽质量分数表现出缓慢升高趋势，表明中性蛋白酶和风味蛋白酶活性随着温度升高而提高，50 ℃时可溶性肽质量分数达到最高值214.94 mg/g，显著高于其他反应温度（P<0.05）；当温度超过50 ℃时，可溶性肽质量分数逐渐降低，表明随着温度的升高，中性蛋白酶和风味蛋白酶逐步变性，有活性的酶减少导致产物减少。电子舌分析结果见表4，反应温度为50 ℃时，产物可溶性肽鲜味值、咸味值最高，酸味值较低，具有较好的风味特征。综合可溶性肽质量分数可知，50 ℃为分步酶解最佳酶解温度。

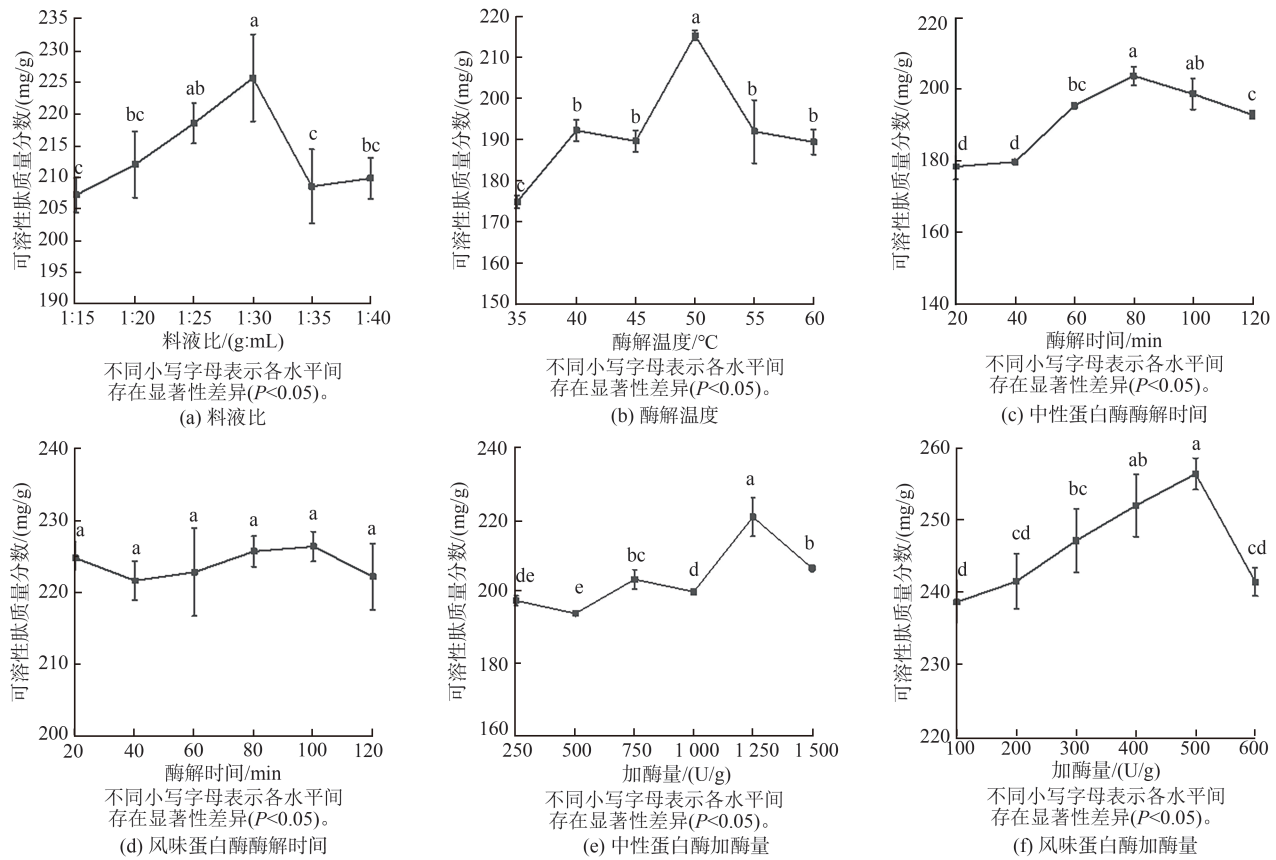


图2　不同酶解条件对大球盖菇可溶性肽质量分数的影响

Fig. 2　Effects of different enzymolysis conditions on the mass fraction of soluble peptide of *S. rugosoannulata*

如图2（c）所示，随中性蛋白酶酶解时间的延长，可溶性肽质量分数先升高后降低，在酶解20 min时最低为178.35 mg/g，酶解80 min时达到最大值203.65 mg/g，80 min后可溶性肽质量分数呈下降趋势。电子舌结果表明（见表4），酶解120 min产物鲜味值最大，而80 min时酶解产物鲜味值也达到较高水平，咸味值最大；酶解时间为80 min时酶解产物的苦味值低于120 min时的苦味值。综合考虑可溶性肽质量分数、电子舌分析结果以及酶解时间，选择80 min作为中性蛋白酶最佳酶解时间，研究其与风味蛋白酶的分步酶解。

表 4 不同酶解条件对大球盖菇滋味的影响

Table 4 Effects of different enzymolysis conditions on the taste of *S. rugosoannulata*

酶解条件	酶解参数	酸味值	苦味值	鲜味值	咸味值	甜味值
料液比/(g∶mL)	1∶15	−45.32±2.39^{ab}	5.23±0.64^{a}	15.87±0.40^{abc}	−7.30±0.85^{abc}	6.78±0.18^{a}
	1∶20	−42.58±1.66^{ab}	5.83±0.60^{a}	15.53±0.24^{bc}	−8.01±0.33^{bcd}	6.67±0.16^{a}
	1∶25	−40.99±2.58^{a}	6.08±0.84^{a}	15.00±0.27^{c}	−8.69±0.41^{cd}	6.98±0.17^{a}
	1∶30	−48.67±2.49^{b}	6.10±0.86^{a}	16.55±0.35^{a}	−6.66±0.89^{ab}	6.98±0.13^{a}
	1∶35	−43.59±3.79^{ab}	5.54±0.51^{a}	15.22±0.64^{bc}	−9.00±0.78^{d}	6.99±0.09^{a}
	1∶40	−44.63±3.87^{ab}	6.20±0.69^{a}	16.01±0.76^{ab}	−6.42±1.13^{a}	6.37±0.18^{a}
酶解温度/℃	35	−47.05±0.72^{a}	6.98±0.31^{bc}	16.20±0.19^{d}	−6.40±0.21^{b}	6.27±0.12^{a}
	40	−47.36±0.55^{a}	6.64±0.18^{c}	16.78±0.20^{bc}	−5.50±0.04^{a}	6.73±0.15^{a}
	45	−46.87±1.36^{a}	7.33±0.11^{ab}	16.51±0.26^{cd}	−6.46±0.70^{b}	6.45±0.10^{a}
	50	−48.05±0.36^{ab}	7.24±0.14^{ab}	17.18±0.12^{a}	−5.04±0.25^{a}	6.90±0.18^{a}
	55	−47.96±0.95^{ab}	7.39±0.39^{ab}	16.94±0.08^{ab}	−5.59±0.51^{a}	6.80±0.21^{a}
	60	−49.48±0.16^{b}	7.68±0.30^{a}	17.11±0.18^{ab}	−5.33±0.09^{a}	6.83±0.17^{a}
中性蛋白酶酶解时间/min	20	−51.32±0.57^{ab}	6.02±0.23^{cd}	16.64±0.23^{b}	−5.57±0.06^{a}	6.50±0.08^{a}
	40	−50.53±1.39^{a}	5.62±0.43^{d}	16.82±0.12^{ab}	−6.30±0.30^{b}	6.75±0.10^{a}
	60	−52.18±0.51^{b}	6.30±0.36^{abc}	17.19±0.29^{a}	−5.62±0.20^{a}	6.87±0.13^{a}
	80	−52.00±0.38^{b}	6.10±0.35^{bcd}	17.23±0.31^{a}	−5.54±0.19^{a}	6.92±0.17^{a}
	100	−52.28±0.20^{b}	6.72±0.11^{ab}	17.04±0.19^{ab}	−5.61±0.06^{a}	6.80±0.10^{a}
	120	−52.15±0.14^{b}	6.80±0.33^{a}	17.30±0.28^{a}	−5.69±0.18^{a}	6.97±0.14^{a}
风味蛋白酶酶解时间/min	20	−52.99±0.51^{a}	7.42±0.40^{ab}	17.20±0.05^{b}	−4.84±0.06^{c}	6.84±0.20^{a}
	40	−53.20±0.55^{a}	7.07±0.11^{b}	17.30±0.16^{b}	−5.06±0.13^{d}	6.94±0.17^{a}
	60	−53.38±0.39^{a}	7.58±0.08^{a}	17.36±0.14^{b}	−5.17±0.10^{d}	6.97±0.21^{a}
	80	−54.77±0.41^{b}	7.54±0.02^{a}	18.21±0.13^{a}	−3.40±0.12^{b}	7.10±0.23^{a}
	100	−54.62±0.30^{b}	7.67±0.06^{a}	18.22±0.09^{a}	−2.96±0.08^{a}	7.11±0.13^{a}
	120	−54.69±0.28^{b}	7.72±0.04^{a}	18.13±0.09^{a}	−3.46±0.06^{b}	7.08±0.08^{a}
中性蛋白酶加酶量/(U/g)	250	−55.69±0.65^{a}	8.13±0.02^{bc}	17.50±0.29^{b}	−4.65±0.10^{bc}	6.25±0.09^{a}
	500	−54.86±1.53^{a}	8.00±0.07^{d}	17.61±0.13^{b}	−4.81±0.58^{c}	6.23±0.10^{a}
	750	−55.84±0.74^{a}	8.20±0.07^{b}	18.05±0.17^{a}	−3.79±0.20^{a}	6.30±0.12^{a}
	1 000	−54.91±0.35^{a}	8.41±0.05^{a}	17.54±0.19^{b}	−4.84±0.03^{c}	6.35±0.05^{a}
	1 250	−55.08±0.23^{a}	8.40±0.06^{a}	17.63±0.21^{b}	−4.91±0.03^{c}	6.47±0.08^{a}
	1 500	−55.02±0.19^{a}	8.06±0.04^{cd}	17.72±0.17^{ab}	−4.29±0.13^{ab}	6.35±0.09^{a}
风味蛋白酶加酶量/(U/g)	100	−56.01±0.43^{b}	7.68±0.23^{c}	17.85±0.31^{a}	−2.48±0.07^{a}	7.06±0.08^{a}
	200	−55.82±0.37^{b}	7.46±0.21^{c}	17.82±0.25^{a}	−2.45±0.02^{a}	7.04±0.12^{a}
	300	−55.38±0.21^{ab}	7.43±0.13^{c}	17.57±0.29^{a}	−2.96±0.09^{c}	6.99±0.17^{a}
	400	−55.02±0.55^{a}	8.52±0.14^{b}	17.80±0.29^{a}	−2.36±0.13^{a}	7.05±0.09^{a}
	500	−54.96±0.21^{a}	7.38±0.20^{c}	17.61±0.28^{a}	−2.44±0.07^{a}	7.02±0.04^{a}
	600	−54.97±0.17^{a}	9.02±0.23^{a}	17.46±0.31^{a}	−2.69±0.07^{b}	6.93±0.13^{a}

注：同一条件同一列的不同字母表示差异显著（P<0.05）。

如图 2(d)所示，中性蛋白酶酶解 80 min 后，加入风味蛋白酶酶解 20~120 min，可溶性肽质量分数无显著差异，而风味蛋白酶酶解 80~120 min 的味觉属性中鲜味值和咸味值有所提升，酸味值下降，风味较好。风味蛋白酶酶解 20~60 min 的鲜味值和咸味值也处于较高水平。考虑可溶性肽质量分数以及工艺耗时等因素，确定中性蛋白酶酶解 80 min 后加入风味蛋白酶继续酶解 20 min 为最优分步酶解时间。

随着中性蛋白酶加酶量提高，可溶性肽质量分数呈先升后降的趋势，在中性蛋白酶加酶量为 1 250 U/g 时达到最大值 221.91 mg/g，见

图2（e）。电子舌分析结果显示，中性蛋白酶加酶量为1 250 U/g时，具有良好的滋味。考虑酶解成本等因素，固定中性蛋白酶加酶量为1 250 U/g，进行风味蛋白酶最优加酶量的工艺优化。如图2（f）所示，风味蛋白酶从100 U/g提高到600 U/g时，酶解产物可溶性肽质量分数先升高后降低，并在风味蛋白酶加酶量为500 U/g时达到最大值256.00 mg/g。此条件下酶解产物苦味值较低，鲜味值和咸味值较高，呈现出较好的风味。结合可溶性肽质量分数、电子舌分析结果和酶解工艺成本等因素，确定中性蛋白酶加酶量为1 250 U/g、风味蛋白酶加酶量为500 U/g。

2.4 响应面优化酶解工艺

2.4.1 Box-Behnken响应面设计与结果分析

在单因素试验基础上，采用Box-Behnken设计三因素三水平响应面优化试验，探究分步酶解大球盖菇风味肽的工艺条件，设计方案及试验结果见表5。

2.4.2 回归模型建立及方差分析

利用Design Expert 10软件进行多元回归拟合，得到回归模型为：

$$Y=237.92-4.34A-7.42B-0.06C-1.51AB+0.30AC+5.30BC-8.34A^2-12.53B^2-8.40C^2。$$

方差分析和显著性检验结果见表6。该模型的F为26.85，P为0.000 1（$P<0.01$），具有统计学意义，可用于预测响应值；模型的失拟项P为0.054 5（$P>0.05$），表明该模型拟合程度较好，模型的残差可能来源于试验中的随机误差。变异系数为1.32%，表明模型的相关性好，精密度和准确度高[21]。噪音信号比为15.090>4，说明本模型能真实反映结果，可靠性高。这些数据充分表明模型的回归效果显著，可用于表示响应值与自变量间的多元回归关系。复相关系数R^2=0.971 9，矫正系数R^2_{adj}=0.935 7，说明能够解释93.57%的响应值，且二者较接近，说明偏差在合理范围内，实际值与预测值的拟合度好[22]。各因素对结果的影响程度可根据F的大小得知，F越大，对结果影响越显著。因此，3个因素对可溶性肽质量分数的影响顺序为：$B>A>C$。根据P可知，A和B对结果影响极显著（$P<0.01$）；3个交互项的偏回归系数仅BC极显著（$P<0.01$），其余两项均不显著（$P>0.05$）；二次项对结果的影响均极显著（$P<0.01$）。

2.4.3 各因素交互作用分析

由图3响应曲面图和等高线图可知，曲面越陡峭对结果的影响程度越大，等高线越密集对结果

表5 Box-Behnken设计方案及试验结果

Table 5 Design and results of Box-Behnken experiment

试验编号	中性蛋白酶酶解时间/min	中性蛋白酶加酶量/（U/g）	风味蛋白酶加酶量/（U/g）	可溶性肽质量分数/（mg/g）
1	80	1 000	600	218.09
2	100	1 500	500	205.29
3	60	1 250	400	228.11
4	100	1 250	600	214.83
5	80	1 250	500	238.12
6	80	1 500	600	215.53
7	100	1 000	500	224.84
8	80	1 500	400	205.29
9	80	1 250	500	240.21
10	80	1 250	500	236.01
11	60	1 500	500	212.28
12	60	1 250	600	227.63
13	80	1 250	500	236.73
14	80	1 000	400	229.04
15	80	1 250	500	238.53
16	100	1 250	400	214.13
17	60	1 000	500	225.78

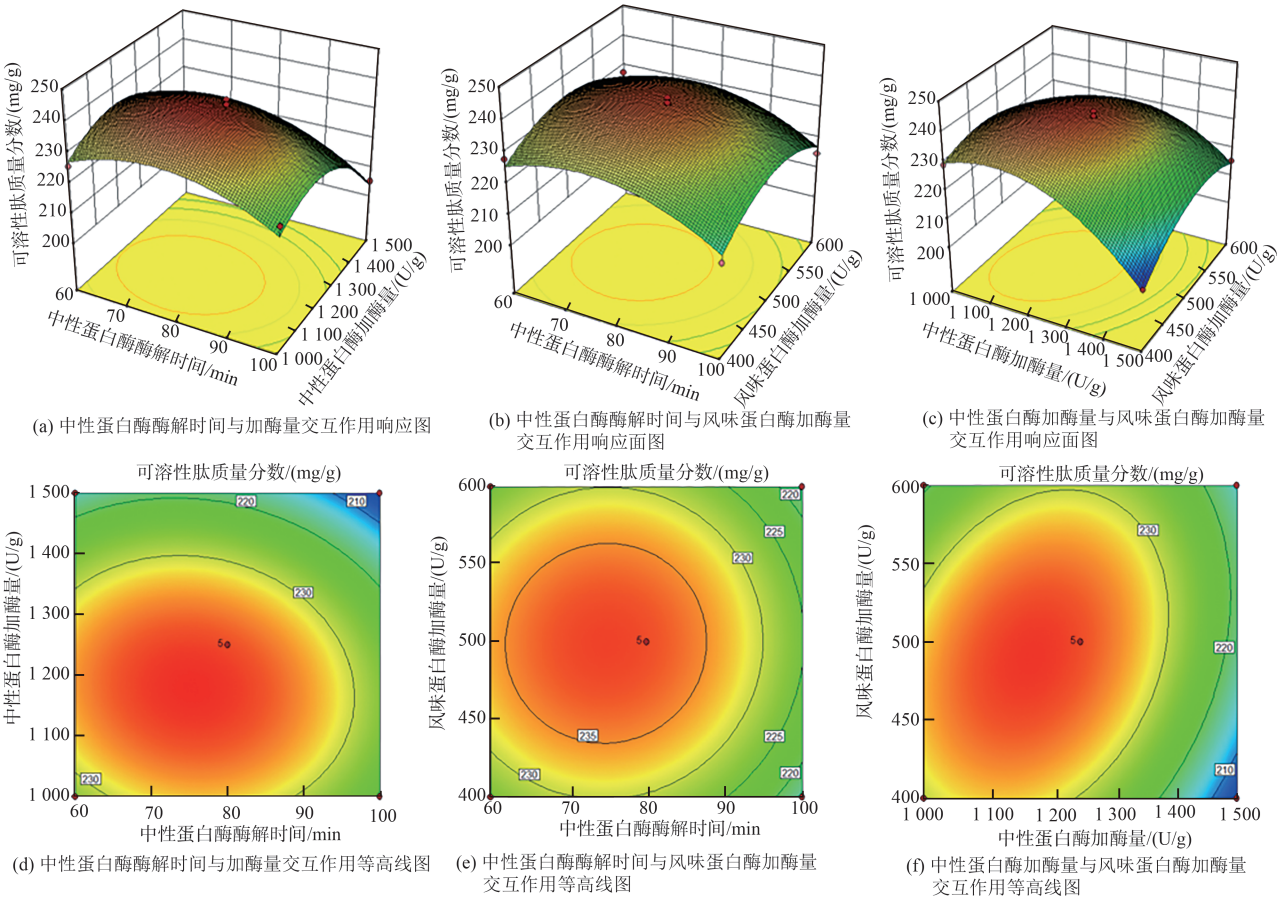
表 6　回归模型方差分析和显著性检验

Table 6　Analysis of variance and significance test of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	*F*	*P*
模型	2 103.29	9	233.70	26.85	0.000 1**
A	150.60	1	150.60	17.30	0.004 2**
B	440.45	1	440.45	50.61	0.000 2**
C	0.03	1	0.03	0.003 45	0.954 8
AB	9.15	1	9.15	1.05	0.339 3
AC	0.35	1	0.35	0.04	0.847 2
BC	112.25	1	112.25	12.90	0.008 8**
A^2	293.04	1	293.04	33.67	0.000 7**
B^2	661.06	1	661.06	75.96	<0.000 1**
C^2	297.27	1	297.27	34.16	0.000 6**
残差	60.92	7	8.70		
失拟项	50.20	3	16.73	6.24	0.054 5
纯误差	10.72	4	2.68		
总离差	264.21	16			

注：*代表差异显著（*P*<0.05）；**代表差异极显著（*P*<0.01）。

影响越大，等高线越近似于椭圆，说明二者交互作用越明显[21]。当风味蛋白酶加酶量为 500 U/g 时，可溶性肽质量分数随着中性蛋白酶酶解时间和中性蛋白酶加酶量变化呈先增后降趋势。中性蛋白酶加酶量曲面变化幅度更大，等高线更密集，说明中性蛋白酶加酶量对结果的影响大于中性蛋白酶酶解时间。等高线近似于圆形，说明中性蛋白酶加酶量和中性蛋白酶酶解时间之间相互作用不显著。当中性蛋白酶加酶量为 1 250 U/g 时，可溶性肽质量分数随中性蛋白酶酶解时间和风味蛋白酶加酶量变化呈先增后降的趋势，中性蛋白酶酶解时间曲面变化幅度更大，等高线更密集，说明中性蛋白酶加酶量对结果影响大于风味蛋白酶加酶量；等高线趋近于圆形，说明二者之间相互作用不显著。当中性蛋白酶酶解时间为 80 min 时，可溶性肽质量分数随着中性蛋白酶加酶量和风味蛋白酶加酶量的提高呈先增后降趋



(a) 中性蛋白酶酶解时间与加酶量交互作用响应图　(b) 中性蛋白酶酶解时间与风味蛋白酶加酶量交互作用响应面图　(c) 中性蛋白酶加酶量与风味蛋白酶加酶量交互作用响应面图

(d) 中性蛋白酶酶解时间与加酶量交互作用等高线图　(e) 中性蛋白酶酶解时间与风味蛋白酶加酶量交互作用等高线图　(f) 中性蛋白酶加酶量与风味蛋白酶加酶量交互作用等高线图

图 3　各因素交互作用对大球盖菇可溶性肽质量分数影响的响应面图和等高线图

Fig. 3　Response surface map and contour map of the interaction of various factors on the mass fraction of soluble peptide of *S. rugosoannulata*

势，且中性蛋白酶加酶量曲面变化幅度更大，等高线更密集，说明中性蛋白酶加酶量对结果的影响大于风味蛋白酶加酶量；等高线呈椭圆形，说明二者之间相互作用显著。综合分析可知，中性蛋白酶加酶量对可溶性肽质量分数影响最大，其次是中性蛋白酶酶解时间，而风味蛋白酶加酶量对结果的影响最小，此结果与方差分析结果一致。

2.4.4　最佳工艺确定及验证

根据软件预测最佳工艺方案为中性蛋白酶加酶量1 174.07 U/g，酶解时间75.31 min，风味蛋白酶加酶量489.71 U/g，此条件下可溶性肽质量分数为239.56 mg/g。根据可操作性和可行性，将最佳工艺调整为中性蛋白酶加酶量1 175 U/g，酶解时间76 min，风味蛋白酶加酶量490 U/g，进行3次平行验证。由表7可知，最佳工艺组得到酶解产物可溶性肽质量分数为245.45 mg/g，高于预测值，其相对标准偏差（RSD）为1.02%。相同条件下，不加酶组产物可溶性肽质量分数仅为213.35 mg/g。经优化后，产物鲜味值、咸味值提高，苦味值减弱，整体表现出鲜咸味突出，酸味及苦味较弱的风味特征。因此，采用响应面优化获得的大球盖菇风味肽提取工艺模型可靠，具有实用价值。

表7　最佳酶解工艺对大球盖菇可溶性肽质量分数和滋味的影响

Table 7　Effect of the optimal conditions of the enzymatic hydrolysis on the mass fraction and taste of soluble peptide of *S. rugosoannulata*

组别	可溶性肽质量分数/(mg/g)	酸味值	苦味值	鲜味值	咸味值	甜味值
最佳工艺组	245.45±6.96^{a}	−56.53±0.65^{a}	8.29±0.27^{b}	18.02±0.31^{a}	0.27±0.65^{a}	7.32±0.10^{a}
不加酶处理组	213.35±3.91^{b}	−56.48±0.59^{a}	10.76±0.23^{a}	17.88±0.28^{a}	−1.29±0.45^{b}	7.37±0.14^{a}

注：同一列具有不同字母的数据之间差异显著（P<0.05）。

2.5　可溶性肽相对分子质量分布

以保留时间为横坐标，相对分子质量的对数值为纵坐标绘制标准曲线。得到标准曲线的拟合方程为y=−0.170 3x+6.758 9，R^2=0.972 9，x为保留时间，y为相对分子质量的对数值，线性关系较好。

对最佳工艺组和不加酶处理组产物进行相对分子质量分布测定，见图4。在最优工艺条件下，大球盖菇最佳工艺组酶解产物相对分子质量小于500的占比为83.55%；相对分子质量500~1 000的占比为15.19%；相对分子质量1 000~10 000的占比仅为1.26%。而相同条件下，大球盖菇不加酶处理组产物在相对分子质量小于500和1 000～10 000的占比较大，分别为38.41%和38.34%；相对分子质量500~1 000的占比为20.29%，相对分子质量10 000以上的占比仅为2.96%。表明大球盖菇经中性蛋白酶和风味蛋白酶分步酶解后，可溶性肽相对分子质量主要集中在小于1 000范围，酶解效果好。王倩等[23]用木瓜蛋白酶对鸭蛋卵清蛋白进行酶解时发现，酶解产物相对分子质量在1 500以下。相对分子质量低于1 000的寡肽营养价值高，可以直接被人体吸收[24]。研究表明相对分子质量小于1 000的寡肽有独特增味作用，能与呈味物质发挥协同作用，使口感更柔和[25]。本研究中大球盖菇最佳工艺组酶解产物相对分子质量集中在1 000以下，因此，此酶解工艺可以为大球盖菇风味肽的制备提供参考。

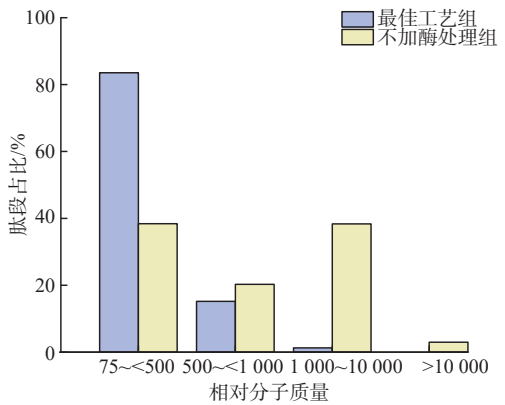


图4　可溶性肽相对分子质量分布

Fig. 4　Distributionoftherelativemolecularmass of soluble peptides

2.6　体外抗氧化活性分析

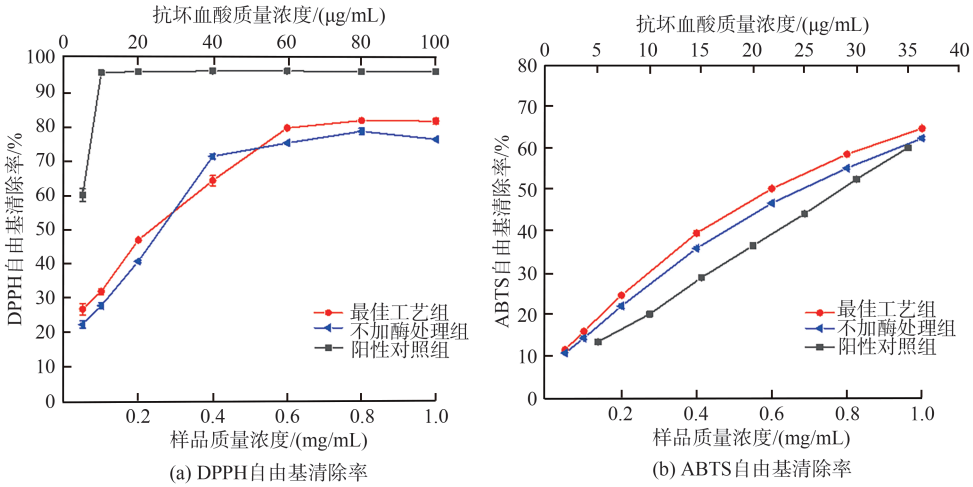
2.6.1　DPPH自由基清除能力分析

DPPH自由基作为在室温下稳定存在的自由基，DPPH抗氧化主要是基于自由基清除作用，由于其反应时间短，可用于评价体外抗氧化物

活性[26]。如图 5(a)所示，最佳工艺组和不加酶处理组产物随样品质量浓度升高，DPPH 自由基清除能力逐渐增强，当质量浓度超过一定范围，其抗氧化能力趋于稳定；最佳工艺组酶解产物除在质量浓度为 0.4 mg/mL 时的抗氧化能力弱于未酶解产物，其余质量浓度下抗氧化能力均强于不加酶处理组；在 0.8 mg/mL 时，最佳工艺组酶解产物 DPPH 自由基清除率达到 81.94%，但其 DPPH 自由基清除能力远低于阳性对照抗坏血酸。最佳工艺组酶解产物 DPPH 自由基清除能力的 IC_{50} 为 0.19 mg/mL，低于 10 mg/mL[27]，说明大球盖菇最佳工艺组酶解产物的抗氧化能力较好。黄典等[26]用蛋白酶水解牛肝菌，其酶解产物 IC_{50} 为 0.88 mg/mL，高于大球盖菇酶解产物的 IC_{50}。张芳艺等[28]研究发现，草菇可溶性肽质量浓度为 2.5 mg/mL时，DPPH自由基清除率达到 74.11%。大球盖菇酶解产物在质量浓度为0.8 mg/mL时，其清除率已达到81.84%，说明分步酶解法制备大球盖菇酶解产物抗氧化能力较强。

2.6.2 ABTS 自由基清除能力分析

ABTS 法是检测亲水性和亲脂性物质抗氧化活性常用的方法。其原理主要是当抗氧化剂存在时抑制 ABTS 自由基生成，通过 734 nm 处吸光度差异反映抗氧化能力强弱[29]。随大球盖菇酶解产物与未酶解产物质量浓度升高，ABTS 自由基清除能力逐渐增强，见图 5(b)。酶解产物的抗氧化能力均强于未酶解产物，当酶解产物质量浓度为 1.0 mg/mL 时，ABTS 自由基清除率为 65.25%，而未酶解产物 ABTS 自由基清除率为 62.87%。酶解产物 ABTS 自由基清除能力的 IC_{50} 为 0.56 mg/mL，抗坏血酸的 IC_{50} 为 27.85 μg/mL。赵原等[19]制备酶解麦胚风味活性肽，其 ABTS 自由基清除能力的 IC_{50} 为 0.45 mg/mL，低于大球盖菇酶解产物 IC_{50}。夏易玄[30]在豌豆肽脱苦处理后发现其 ABTS 自由基清除能力的 IC_{50} 为 1.67 mg/mL，高于大球盖菇酶解产物，表明大球盖菇酶解产物比豌豆肽具有更好的 ABTS 自由基清除能力。



(a) DPPH自由基清除率　(b) ABTS自由基清除率

图 5　体外抗氧化活性分析

Fig. 5　Evaluation of *in vitro* antioxidant activity

3　结论

作者以大球盖菇为原料，从 7 种蛋白酶中筛选出中性蛋白酶和风味蛋白酶，确定先加中性蛋白酶酶解，再加风味蛋白酶切除疏水性氨基酸及碱性氨基酸的分步酶解工艺制备大球盖菇风味肽。通过单因素试验和 Box-Behnken 响应面试验优化酶解参数，得到大球盖菇可溶性肽酶解最佳工艺为：中性蛋白酶加酶量 1 175 U/g、酶解时间 76 min，风味蛋白酶加酶量 490 U/g、酶解时间 20 min。此工艺条件下获得的可溶性肽质量分数为 245.45 mg/g。最佳工艺组产物表现出较高鲜味值和咸味值，降低了苦味值，风味优良且丰富。可溶性肽相对分子质量分布结果表明，在分步酶解最佳工艺条件下，大球盖菇酶解产物相对分子质量集中在小于 1 000 范围，酶解效果较好。最佳工艺组产物对 DPPH 自由基及 ABTS 自由基均有较好的清除能

力：当质量浓度为1.0 mg/mL时，DPPH自由基清除率达到81.84%，ABTS自由基清除率为65.25%；IC_{50}分别为0.19 mg/mL和0.56 mg/mL，酶解效果突出。该研究为大球盖菇风味肽制备、风味产品以及功能产品开发提供参考，为后续风味肽的分离纯化提供佐证并有望开发新型菌菇源风味活性肽。

参考文献

[1] 黄年来. 大球盖菇的分类地位和特征特性[J]. 食用菌，1995，17(6)：11.
HUANG N L. Taxonomic status and characteristics of *Pleurotus ostreatus*[J]. Edible Fungi，1995，17(6)：11.(in Chinese)

[2] 刘柱. 分析草腐菌类大球盖菇高效栽培技术[J]. 种子科技，2019，37(4)：58.
LIU Z. Efficient cultivation techniques of *Pleurotus ostreatus*，a grass rot fungus，were analyzed[J]. Seed Science & Technology，2019，37(4)：58.(in Chinese)

[3] 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.(in Chinese)

[4] 魏亚兰，刁治民，陈克龙，等. 大球盖菇生物学特性及经济价值的探讨[J]. 青海草业，2017，26(4)：43-48.
WEI Y L，DIAO Z M，CHEN K L，et al. Biological characteristics and value of stropharia rugosoannulata[J]. Qinghai Prataculture，2017，26(4)：43-48.(in Chinese)

[5] 黄美仙，岑燕霞，孙朋，等. 大球盖菇研究进展[J]. 黑龙江农业科学，2021(12)：124-129.
HUANG M X，CEN Y X，SUN P，et al. Research progress of *Stropharia rugosoannulata*[J]. Heilongjiang Agricultural Sciences，2021(12)：124-129.(in Chinese)

[6] WU F，ZHOU L W，YANG Z L，et al. Resource diversity of Chinese macrofungi：edible，medicinal and poisonous species[J]. Fungal Diversity，2019，98(1)：1-76.

[7] 宋盼盼，赵妍，李治平，等. 硒对镉胁迫下大球盖菇菌丝生长的影响[J]. 菌物学报，2021，40(9)：2402-2411.
SONG P P，ZHAO Y，LI Z P，et al. Effects of exogenous selenium on the mycelial growth of *Stropharia rugosoannulata* under cadmium stress[J]. Mycosystema，2021，40(9)：2402-2411.(in Chinese)

[8] 于慧萍，胡思，黄文，等. 干制方式对大球盖菇滋味物质的影响[J]. 食品工业科技，2021，42(9)：251-256.
YU H P，HU S，HUANG W，et al. Effects of drying process on the tasty components in *Stropharia rugoso-annulata*[J]. Science and Technology of Food Industry，2021，42(9)：251-256.(in Chinese)

[9] 洪琦，赵勇，陈明杰，等. 大球盖菇菌渣原位还田对土壤有机质、酶活力及细菌多样性的影响[J]. 食用菌学报，2022，29(1)：27-35.
HONG Q，ZHAO Y，CHEN M J，et al. Effects of *in situ Stropharia rugosoannulata* cultivation residue return on soil organic matter，enzyme activity and bacterial diversity[J]. Acta Edulis Fungi，2022，29(1)：27-35.(in Chinese)

[10] 谷镇，杨焱. 食用菌呈香呈味物质研究进展[J]. 食品工业科技，2013，34(5)：363-367.
GU Z，YANG Y. Research progress in flavor components of edible fungus[J]. Science and Technology of Food Industry，2013，34(5)：363-367.(in Chinese)

[11] 王迪，李文霞，姚瑜，等. 沙棘蛋白和多肽的提取及功能活性研究进展[J]. 食品工业科技，2022，43(3)：447-455.
WANG D，LI W X，YAO Y，et al. Research progress on extraction and functional activity of sea buckthorn protein and polypeptides[J]. Science and Technology of Food Industry，2022，43(3)：447-455.(in Chinese)

[12] 桂海佳，李江龙，李泽林，等. 基于双酶水解优化牛肉酶解液工艺及其呈味成分分析[J]. 中国调味品，2022，47(10)：103-109.
GUI H J，LI J L，LI Z L，et al. Optimization of beef enzymatic hydrolysate technology and analysis of its flavor components based on double enzymes hydrolysis[J]. China Condiment，2022，47(10)：103-109.(in Chinese)

[13] 范海茹，李淑英，许斌，等. 内外切蛋白酶连续酶解制备豆粕鲜味肽的研究[J]. 中国调味品，2021，46(1)：77-82.
FAN H R，LI S Y，XU B，et al. Study on preparation of soybean meal umami peptides by continuous enzyme hydrolysis[J]. China Condiment，2021，46(1)：77-82.(in Chinese).

[14] 黄珊. 大球盖菇酚类物质的提取及其抗氧化性研究[D]. 福州：福建农林大学，2010.

[15] 杜敏华，王小立，苏海飞，等. 大球盖菇多糖超声波提取及抗氧化活性[J]. 食品研究与开发，2013，34(16)：18-22.
DU M H，WANG X L，SU H F，et al. Optimization of extraction process by using ultrasound-assisted methodology and antioxidant activity of polysaccharide from *Stropharia rugosoannulata*[J]. Food Research and Development，2013，34(16)：18-22.(in Chinese)

[16] 国家卫生和计划生育委员会，国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定：GB 5009.5—2016[S]. 北京：中国标准出版社，2017.

[17] 李慧凝，张明振，孟少珂，等. 响应面法优化鲤鱼肽的复

合酶酶解工艺及氨基酸评价[J]. 食品工业科技,2021,42(4):121-127.
LI H N,ZHANG M Z,MENG S K,et al. Optimization process condition using response surface for bi-enzymatic of *Katsuwonus pelamis* peptides and amino acid evaluation [J]. Science and Technology of Food Industry,2021,42(4):121-127.(in Chinese)

[18] WANG L Y,MA M T,YU Z P,et al. Preparation and identification of antioxidant peptides from cottonseed proteins[J]. Food Chemistry,2021,352:129399.

[19] 赵原,金艳,张民. 酶解麦胚制备风味活性肽的研究[J]. 食品研究与开发,2022,43(14):42-51.
ZHAO Y,JIN Y,ZHANG M. Enzymatic production of wheat germ peptides with flavor and activity[J]. Food Research and Development,2022,43(14):42-51.(in Chinese)

[20] 厉望,靳挺,武玉学. 带鱼蛋白酶解条件优化及酶解物抗氧化性能[J]. 食品科学,2013,34(9):234-239.
LI W,JIN T,WU Y X. Optimization of enzymatic hydrolysis of hairtail protein and antioxidant activities of its hydrolysates [J]. Food Science,2013,34(9):234-239.(in Chinese)

[21] 李灵,熊芸,张钰瑶,等. 响应面法优化猕猴桃类胡萝卜素提取工艺[J]. 四川大学学报(自然科学版),2022,59(5):156-162.
LI L,XIONG Y,ZHANG Y Y,et al. Optimization of carotenoid extraction process of Kiwifruit by response surface methodology [J]. Journal of Sichuan University (Natural Science Edition),2022,59(5):156-162.(in Chinese)

[22] 李思雨,张静,崔馨戈,等. 响应面法优化赤芝、紫芝子实体总三萜提取工艺[J]. 安徽中医药大学学报,2022,41(4):92-98.
LI S Y,ZHANG J,CUI X G,et al. Optimization of the extraction process for total triterpenoids from fruiting bodies of *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma Sinense* by response surface methodology [J]. Journal of Anhui University of Chinese Medicine,2022,41(4):92-98.(in Chinese)

[23] 王倩,贺萍,刘琪,等. 鸭蛋卵清蛋白多肽的酶解条件优化及生物活性[J]. 食品与生物技术学报,2020,39(9):89-98.
WANG Q,HE P,LIU Q,et al. Optimization of enzymatic hydrolysis conditions of ovalbumin from duck eggs and biological activity of the resulting peptides[J]. Journal of Food Science and Biotechnology,2020,39(9):89-98.(in Chinese)

[24] MAEBUCHI M,SAMOTO M,KOHNO M,et al. Improvement in the intestinal absorption of soy protein by enzymatic digestion to oligopeptide in healthy adult men[J]. Food Science and Technology Research,2007,13(1):45-53.

[25] TOELSTEDE S,DUNKEL A,HOFMANN T. A series of kokumi peptides impart the long-lasting mouthfulness of matured Gouda cheese[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2009,57(4):1440-1448.

[26] 黄典,高雅,刘蕾,等. 蛋白酶水解美味牛肝菌工艺优化及酶解产物的抗氧化活性[J]. 食品工业科技,2021,42(12):209-217.
HUANG D,GAO Y,LIU L,et al. Optimization of preparation technology and antioxidant activity of enzymatic hydrolysate from *Boletus edulis* hydrolyzed by protease [J]. Science and Technology of Food Industry,2021,42(12):209-217.(in Chinese)

[27] 徐杰,林泽安,李子青,等. 响应面法优化珍珠龙胆石斑鱼肉肽的酶法制备工艺及酶解产物的抗氧化活性[J]. 食品工业科技,2020,41(19):205-211.
XU J,LIN Z A,LI Z Q,et al. Optimization of enzymatic preparation process of peptides from pearl gentian grouper by response surface methodology and the antioxidant activity of the enzymatic hydrolysis products[J]. Science and Technology of Food Industry,2020,41(19):205-211,239.(in Chinese)

[28] 张芳艺,罗小芳,黄惠芸,等. 草菇子实体多肽提取工艺及其抗氧化活性[J]. 菌物学报,2023,42(2):584-596.
ZHANG F Y,LUO X F,HUANG H Y,et al. Extraction technology and antioxidant activities of polypeptides from fruiting bodies of *Volvariella volvacea*[J]. Mycosystema,2023,42(2):584-596.(in Chinese)

[29] 卢琪,薛淑静,杨德,等. 不同加工方式对大球盖菇水提液挥发性风味成分和抗氧化能力的影响[J]. 食品工业科技,2021,42(23):41-48.
LU Q,XUE S J,YANG D,et al. Effects of different processing methods on the volatile components and antioxidant ability of the water extracts from *Stropharia rugosoannulata* [J]. Science and Technology of Food Industry,2021,42(23):41-48.(in Chinese)

[30] 夏易玄. 豌豆肽的制备、脱苦及抗氧化活性研究[D]. 无锡:江南大学,2022.

(责任编辑:刘冬梅)