

酶解法制备黑木耳 ACE 抑制肽的工艺优化

张洪志, 沈涛, 李学翠, 丁梅, 王明, 谢合群, 张蕊

(宁夏夏盛实业集团有限公司, 银川 750000)

摘要:以黑木耳为原料, 利用复合酶解法制备血管紧张素转化酶(Angiotensin-Converting Enzyme, ACE)抑制肽。以 ACE 抑制率和蛋白水解度为指标, 通过单因素试验确定复合酶的组合方式及加酶量, 利用正交试验对酶解工艺进行优化, 优化酶解温度和酶解时间等工艺参数。结果表明, 黑木耳的最佳酶解工艺为: 料液比 1:50(g/mL)、加酶量 200 U/g、复合蛋白酶(中性蛋白酶:胰蛋白酶)比例 1:2(U/U)、酶解温度 55 °C、酶解时间 4 h、酶解 pH 值 7.5。在此酶解工艺条件下黑木耳蛋白水解度达 61.22%, ACE 抑制率达 65.17%, 酶解液中多肽分子量主要集中在 131~4 983 Da, 占比达 92.19%。通过对黑木耳酶解工艺的优化, 提高了黑木耳蛋白的水解度及 ACE 抑制率, 为黑木耳制备 ACE 抑制肽的过程控制及规模应用提供理论指导。

关键词:黑木耳; 蛋白酶; ACE 抑制率; 蛋白水解度; 工艺优化

中图分类号: TS218*.2

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2026)02-00115-08

Optimization of ACE Inhibitory Peptide Preparation from *Auricularia auricula* by Complex Enzymatic Hydrolysis

ZHANG Hongzhi, SHEN Tao, LI Xuecui, DING Mei, WANG Ming, XIE Hequn, ZHANG Rui

(Ningxia Xiasheng Industrial Group Co., Ltd., Yinchuan 750000, China)

Abstract: Angiotensin-converting enzyme(ACE) inhibitory peptide was prepared from *Auricularia auricula* using complex enzymatic hydrolysis. ACE inhibition rate and degree of hydrolysis were used as key evaluation indices to optimize the preparation process through single-factor experiments and orthogonal testing. The optimal enzyme combination, enzyme dosage, hydrolysis temperature, hydrolysis time, and other process parameters for the complex enzyme system were determined. The results indicated that the optimal enzymatic hydrolysis conditions for *Auricularia auricula* were as follows: a solid-liquid ratio of 1:50 (g/mL), enzyme dosage of 200 U/g, hydrolysis temperature of 55 °C, hydrolysis time of 4 hours, pH 7.5, and a neutral protease to trypsin ratio of 1:2(U/U). Under these conditions, the degree of hydrolysis reached 61.22%, and the ACE inhibition rate was 65.17%. Additionally, 92.19% of the peptides had molecular weights ranging between 131 Da and 4,983 Da. These optimal conditions effectively enhanced protein hydrolysis and increased the ACE inhibition rate in the enzymatic hydrolysate of *Auricularia auricula*, providing theoretical guidance for process control and the large-scale application of enzymatic hydrolysis in the preparation of ACE inhibitory peptides from *Auricularia auricula*.

Key words: *Auricularia auricula*; Protease; ACE inhibition rate; Hydrolysis degree; Optimization

黑木耳是一种兼具药用和食用价值的真菌类食用菌^[1]。中国是黑木耳的主要生产国, 主要产区位于东北三省, 产量在全球居第 4 位。根据中国食用菌协会的统计数据, 2022 年全国黑木耳的产量约为 7.5×10^6 t^[2-4]。黑木耳的药用价值早在著名中医典籍《神农本草经》中就有记载, 其味甘、

性平, 具有益气、补血、润肺、止血、止痛和通便等功效^[5-6]。研究表明, 黑木耳富含膳食纤维、糖类、蛋白质和矿物质, 具有广泛的食用和药用开发潜力^[7-8]。

高血压是影响我国居民健康的一种常见慢性疾病, 也是全球心血管疾病的重要风险因素, 患病率达到 15%~20%, 显著增加了脑卒中、冠心病及心力衰竭等心脑血管疾病发生的风险^[9]。血管紧张素转化酶(Angiotensin-Converting Enzyme, ACE)是一种含锌的二肽羧基酶, 在血压的调节中发挥着关键作用^[10]。ACE 通过将无活性的血管紧

收稿日期: 2024-12-10

基金项目: 宁夏回族自治区重点研发计划项目(2024BEE02021)

作者简介: 张洪志(1988-), 男, 中级工程师, 硕士, 主要从事蛋白质资源深加工与综合利用研究。

张素 I(Angiotensin I, Ang I)转化为具有升压作用的血管紧张素 II(Angiotensin II, Ang II),同时使具有扩血管作用的缓激肽失活,促进醛固酮分泌,从而导致血压上升^[11]。考虑到 ACE 在高血压病理机制中的重要性,抑制其活性已成为治疗高血压的一种有效策略。然而,长期使用如依那普利、赖诺普利和卡托普利等化学合成的 ACE 抑制剂,尽管能够有效降低血压,却可能伴随血管水肿、肾脏损害、味觉障碍、高钾血症及过敏反应等副作用^[12]。因此,从天然原料中寻找 ACE 抑制肽作为替代疗法,对于高血压的治疗具有重要的现实意义,实现血压的有效控制,同时减少不良反应,提高患者的生活质量。

食源性多肽类 ACE 抑制剂安全性高、吸收性良好、副作用较小,为高血压的预防和治疗开辟了新的方向^[13]。ACE 抑制肽的来源广泛,多种食物均发现具有降血压功效的多肽^[14]。黑木耳作为一种分布广泛、易于获取的食用真菌,其营养价值和生物活性成分备受关注。然而,目前关于黑木耳的研究主要集中在色素和多糖的提取上,而对黑木耳蛋白质的功能性研究相对较少。选择黑木耳作为原料进行蛋白酶解,探索潜在的生物活性肽资源,为功能性食品和药物开发提供新的思路和方法。本研究以黑木耳为原料,选取蛋白水解度和 ACE 抑制率作为主要指标,通过优化木耳粉酶解工艺参数,以提高黑木耳酶解液的 ACE 抑制率。通过系统的工艺优化,为黑木耳蛋白的酶解利用提供科学依据和技术支持。这不仅有助于推动黑木耳资源的深度开发和利用,还可为其他类似植物或微生物来源的蛋白质酶解研究提供有益的参考和借鉴。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

黑木耳购于银川大润发超市,产地黑龙江省珍珠山乡;血管紧张素转化酶(ACE)(≥ 2.0 U/mg):美国 Sigma 公司;马尿酸-组胺酰-亮氨酸(HHL):上海源叶生物科技有限公司;胰蛋白酶(100 U/mg)、糜蛋白酶(1 500 U/mg)、胃蛋白酶(30 U/mg)、复合蛋白酶(100 U/mg)、碱性蛋白酶(200 U/mg)、风味蛋白酶(50 U/mg)、酸性蛋白酶(150 U/mg)、中性蛋白酶(100 U/mg)、木瓜蛋白酶(100 U/mg)、菠萝蛋白酶(100 U/mg):宁夏夏盛实业集团有限公司;乙腈、5 种多肽标品(亮氨酸、乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸、血管紧张素 II、阿太地尔、细胞色素 C),上

海生化科技股份有限公司。

1.2 仪器设备

高效液相色谱仪,美国沃特世公司;pH 计,上海仪电科学仪器股份有限公司;HYP-320 消化炉、KDN103F 凯氏定氮仪,上海纤检仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 木耳粉制备工艺

将黑木耳在 100 °C 条件下烘干 12 h 后,用粉碎机粉碎,收集经过 40 目筛子筛下的黑木耳粉末,备用。

1.3.2 木耳粉酶解工艺

将木耳粉与纯化水以 1:50(g/mL)混合后,用酸碱将料液调节至各蛋白酶最适的 pH 值,按照底物重量加入蛋白酶,在最适的温度下酶解 4 h,酶解结束后,90 °C 恒温水浴 30 min 将酶液灭活,检测黑木耳酶解液的 ACE 抑制率和蛋白水解度,考察蛋白酶种类、复合酶类型、复合酶添加量对黑木耳的酶解效果。各蛋白酶最适酶解 pH 值和温度见表 1。

表 1 不同蛋白酶最适酶解 pH 值和温度

Table 1 Optimum pH and temperature for enzymatic hydrolysis of various proteases

序号 No.	种类 Type	最适 pH 值 Optimum pH	最适温度/°C Suitable temperature
1	胰蛋白酶	8.0	55
2	糜蛋白酶	7.0	37
3	胃蛋白酶	2.0	37
4	复合蛋白酶	8.0	50
5	碱性蛋白酶	8.5	55
6	风味蛋白酶	7.0	55
7	酸性蛋白酶	3.0	50
8	中性蛋白酶	7.0	50
9	木瓜蛋白酶	7.5	50
10	菠萝蛋白酶	7.0	50
11	中性蛋白酶+胰蛋白酶	7.0	50
12	中性蛋白酶+碱性蛋白酶	7.5	50
13	胰蛋白酶+碱性蛋白酶	8.0	55

1.3.3 单因素酶解试验

初始酶解条件设置为料液比 1:50(g/mL)、加酶量 200 U/g、复合酶(中性蛋白酶:胰蛋白酶)比例 1:1(U/U)、酶解时间 4 h、酶解温度 50 °C、酶解 pH 7.0,以 ACE 抑制率和蛋白水解度为指标,考察各酶解条件对酶解效果的影响。

1.3.4 复合蛋白酶水解黑木耳多因子试验

以ACE抑制率为指标值,以酶解温度、酶解时间、酶解pH值及复合酶比例为因素,采用四因

素三水平正交试验优化酶解工艺, $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平设计见表2。

表2 复合蛋白酶 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平表

Table 2 Factors and levels of $L_9(3^4)$ orthogonal test for complex protease hydrolysis

水平 Level	因素 Factor			
	A(温度)/°C Temperature	B(时间)/h Time	C(pH值) pH	D(复合酶比例) U/U
1	50	3	7.0	1:1
2	55	4	7.5	1:2
3	60	5	8.0	1:3

1.3.5 蛋白质测定

根据GB 5009.5-2016《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》的第一法进行蛋白质测定^[15]。

1.3.6 蛋白水解度测定

按照参考文献[16]的方法进行蛋白水解度的测定。称取15 g酶解液,加入质量分数15%的三氯乙酸溶液15 g,混匀,静置15 min,5 000 r/min离心5 min。记录离心后上清液的重量,并测定上清液总氮含量。

水解度=[(上清液重量×上清液总氮含量)/(酶解液总量×酶解液总氮含量)]×100%

1.3.7 ACE抑制率测定

按照参考文献[17]的方法测定ACE抑制率。

1.3.8 多肽分布测定

根据GB/T 22492-2008《大豆肽粉》的附录A测定多肽分布^[18]。

1.4 数据处理

正交试验分析由SPSS V17完成;试验结果图由Origin 8.1软件绘制。

2 结果与分析

2.1 蛋白酶的筛选

2.1.1 不同蛋白酶对黑木耳酶解效果的影响

本试验选用10种蛋白酶对黑木耳进行酶解,基于初步探索和蛋白酶在工业应用的经验评估,蛋白酶添加量均设定为150 U/g,旨在探索在相似条件下不同蛋白酶对黑木耳蛋白的酶解效果及ACE抑制肽的产生情况,不同蛋白酶对黑木耳的酶解效果见表3。

由表3可知,在ACE抑制率方面,中性蛋白酶表现最好,其酶解液ACE抑制率最高为49.62%,其次是胰蛋白酶,ACE抑制率为45.42%;在蛋白

表3 不同蛋白酶对黑木耳的酶解效果

Table 3 The enzymatic hydrolysis effect of different proteases on *Auricularia auricula*

序号 No.	蛋白酶 Protease	ACE抑制率/% ACE inhibition rate	蛋白水解度/% Protein hydrolysis degree
1	胰蛋白酶	45.42±1.23	34.45±1.99
2	糜蛋白酶	37.11±2.51	15.43±1.63
3	胃蛋白酶	16.58±0.88	10.97±2.50
4	复合蛋白酶	34.33±2.74	32.19±2.04
5	碱性蛋白酶	43.74±1.45	32.67±1.52
6	风味蛋白酶	23.29±1.89	23.64±2.67
7	酸性蛋白酶	10.45±2.17	13.17±1.19
8	中性蛋白酶	49.62±1.01	27.33±1.25
9	木瓜蛋白酶	16.27±2.73	20.25±2.96
10	菠萝蛋白酶	15.55±1.82	18.88±1.86

水解度方面,胰蛋白酶的酶解效果最好,其酶解液蛋白水解度为34.45%,其次为碱性蛋白酶,蛋白水解度为32.67%。由于酶具有专一性,不同蛋白酶只能作用于特定的肽键或含有特定基团的氨基酸所形成的肽键。酶的底物特异性和作用位点不同,直接影响酶解产物的组成、结构及功能,这可能是导致ACE抑制率和蛋白水解度存在差异的关键因素^[9]。结合上述数据,胰蛋白酶、碱性蛋白酶及中性蛋白酶在ACE抑制及蛋白水解方面各具优势。这些酶的底物特异性和作用机制差异显著影响了酶解产物的生物活性。结合ACE抑制率和蛋白水解度两方面考虑,选取胰蛋白酶、碱性蛋白酶和中性蛋白酶进行后续研究。

2.1.2 不同蛋白酶组合方式对黑木耳酶解效果的影响

根据上述试验结果,选用胰蛋白酶、碱性蛋白

酶、中性蛋白酶两两组合对黑木耳进行水解,复合蛋白酶比例均为1:1(U/U),加酶量均为150 U/g。不同蛋白酶组合方式对黑木耳的酶解效果如图1所示。

由图1可以看出,在ACE抑制率方面,中性蛋白酶+胰蛋白酶的复合蛋白酶的抑制效果最为显著,抑制率高达54.35%;其次是中性蛋白酶+碱性蛋白酶,抑制率为52.11%。这表明,在中性蛋白酶和胰蛋白酶这两种酶协同作用下,能够更有效地释放出具有ACE抑制活性的肽段。在蛋白水解度方面,胰蛋白酶+碱性蛋白酶的复合蛋白酶表现最佳,水解度达到45.62%,中性蛋白酶+胰蛋白酶次之,水解度为42.36%。虽然胰蛋白酶与碱性蛋白酶的组合在蛋白水解度上稍占优势,但中性蛋白酶与胰蛋白酶的组合在水解度上也达到了一个相对较高的水平,且其ACE抑制率的优势更为突出。这进一步证实了酶的组合使用在优化酶解产物特性方面的重要性。因此选用中性蛋白酶和胰蛋白酶作为复合蛋白酶开展后续研究。

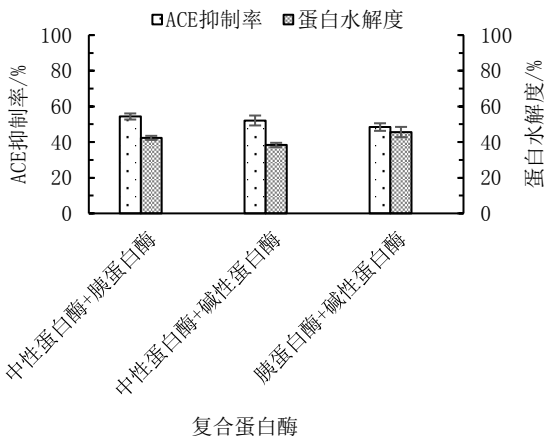


图1 复合蛋白酶对黑木耳的酶解效果

Fig.1 The enzymatic hydrolysis effect of complex proteases on *Auricularia auricula*

2.1.3 复合蛋白酶添加量对黑木耳酶解效果的影响

根据上述试验结果,选用中性蛋白酶和胰蛋白酶作为原料酶进行复配,中性蛋白酶与胰蛋白酶比例为1:1(U:U),研究复合蛋白酶的添加量对黑木耳的酶解效果。复合蛋白酶不同添加量对黑木耳的酶解效果如图2所示。

由图2可知,在复合蛋白酶添加量逐步增加的过程中,ACE抑制率也提高,当添加量达到200 U/g时,ACE抑制率达到最大值,为57.28%,随后有所下降。而在蛋白水解度方面,随着酶添加量的增加,蛋白水解度逐步提升,达到300 U/g时,蛋白水

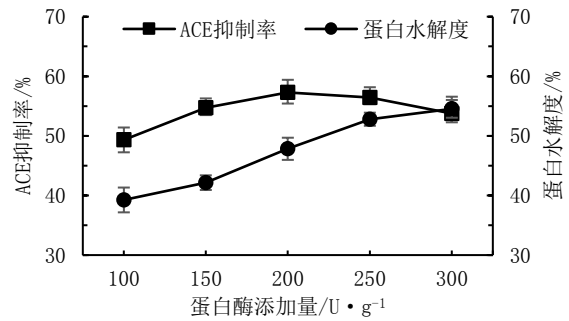


图2 复合蛋白酶不同添加量对黑木耳酶解效果的影响
Fig.2 The effect of different addition amounts of complex enzyme on the enzymatic hydrolysis of *Auricularia auricula*

解度为57.53%,在ACE抑制率达到峰值时,蛋白水解度为47.83%。随着酶量的增加,底物被逐步分解,蛋白水解度显著提高,释放出更多具有ACE抑制活性的多肽,导致ACE抑制率随之上升,然而,当蛋白水解度过高时,ACE抑制率却出现下降,说明酶解是一个复杂的动态过程,酶不断寻找底物中特定的切割位点,可能由于早期生成的ACE抑制活性多肽被进一步分解,导致其活性下降^[20]。综合分析,选择200 U/g作为后续研究的最佳添加量。

2.2 单因素酶解试验

2.2.1 不同料液比对黑木耳酶解效果的影响

由图3可知,在ACE抑制率方面,随着底物浓度的降低,ACE抑制率呈先升后降的趋势。当料液比为1:50(g/mL)时,ACE抑制率达到最大值,为57.75%。在蛋白水解度方面,随着底物浓度的降低,蛋白水解度逐渐增加,并在料液比为1:60(g/mL)时趋于稳定,达到48.31%。由此可知,底物浓度的适度降低有助于提升蛋白水解的程度,但过高的水解度并不一定意味着更高的ACE抑制活性,这可能与多肽的进一步降解有关。当黑木耳的料液浓度较高时,如

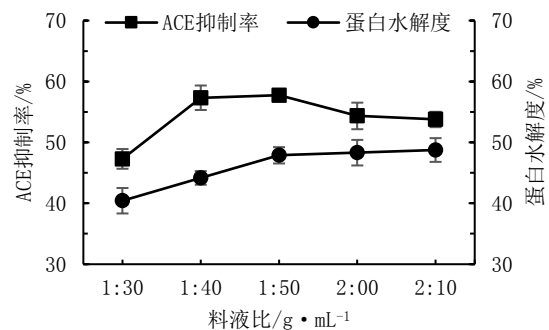


图3 料液比对黑木耳酶解效果的影响

Fig.3 The influence of liquid-solid ratio on the enzymatic hydrolysis effect of *Auricularia auricula*

料液比为1:(30~40)(g/mL),体系会变得较为黏稠,操作难度增加,同时不利于蛋白酶在酶解体系中的扩散,影响酶解效果。因此选择料液比1:50(g/mL)作为后续研究的条件。

2.2.2 不同温度对黑木耳酶解效果的影响

由图4可知,随着温度的升高,ACE抑制率和蛋白水解度也逐渐增加,当酶解温度达到55℃时,ACE抑制率和蛋白水解度达到最大值,分别为58.23%和50.61%,随后ACE抑制率和蛋白水解度逐渐下降。在较低温度下,蛋白酶的酶解效率受限,导致具有ACE抑制活性的多肽生成量减少,进而影响了ACE抑制率的提升。这可能是由于低温环境下,酶分子的运动速度减缓,底物与酶的接触机会减少,从而限制了酶解反应的进行。然而温度过高可能导致酶分子结构的改变,进而影响酶的催化活性,降低其水解能力^[21-22],不利于黑木耳蛋白的水解。因此,选择酶解温度50、55、60℃进行后续研究。

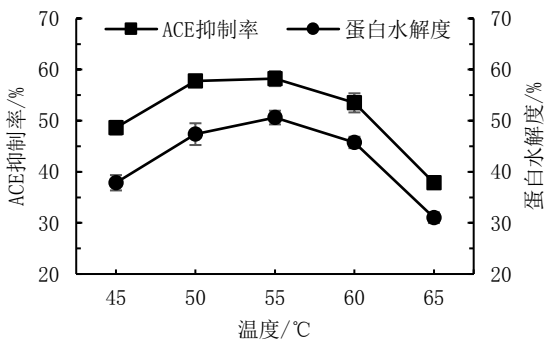


图4 不同温度对黑木耳酶解效果的影响

Fig.4 The effect of enzymatic hydrolysis temperature on the enzymatic hydrolysis effect of *Auricularia auricula*

2.2.3 不同酶解时间对黑木耳酶解效果的影响

由图5可知,酶解时间对ACE抑制率有显著影响,酶解时间逐渐增加时,ACE抑制率也逐渐升

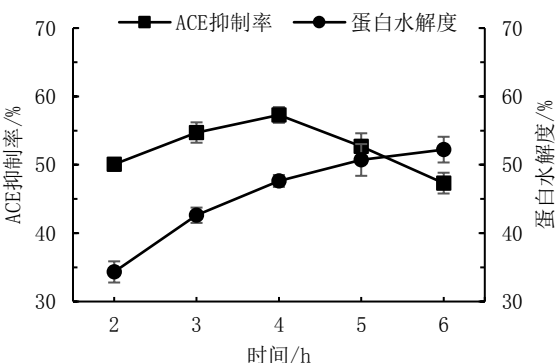


图5 不同时间对黑木耳酶解效果的影响

Fig.5 The effect of enzymatic hydrolysis time on the enzymatic hydrolysis effect of *Auricularia auricula*

高,当酶解时间为4 h时,ACE抑制率达到峰值,为57.29%,随后ACE抑制率逐渐下降。在蛋白水解度方面,随着酶解时间的增加,蛋白水解度逐步提高,6 h时达到54.22%,而在ACE抑制率达到最大值时,蛋白水解度为47.64%。随着酶解时间的延长,酶解反应不断进行,释放出更多具有ACE抑制活性的多肽,使ACE抑制率上升;但随着时间进一步延长,可能由于ACE抑制肽被进一步分解为低活性肽段或氨基酸,导致抑制效果下降^[23-24]。因此,选择酶解时间为3、4、5 h进行后续研究。

2.2.4 不同pH值对黑木耳酶解效果的影响

由图6可知,黑木耳在酶解过程中,随着pH值升高,ACE抑制率和蛋白水解度逐渐增加,当pH值为7.5时,ACE抑制率达到最大值(59.74%),此时蛋白水解度为52.43%,随后ACE抑制率逐渐降低;而当pH值为8.0时,蛋白水解度最高,达到55.64%,此时ACE抑制率为54.38%。这说明在高pH值条件下虽能促进蛋白质更彻底的水解,但也可能导致部分具有高效ACE抑制活性的肽段被降解,从而减弱了整体的抑制效果。同时在过碱或过酸的条件下,酶的空间结构可能受到破坏,导致酶的活性下降^[25-27],从而影响ACE抑制率和蛋白水解度。基于以上结果,选择pH值7.0、7.5、8.0作为后续的研究条件。

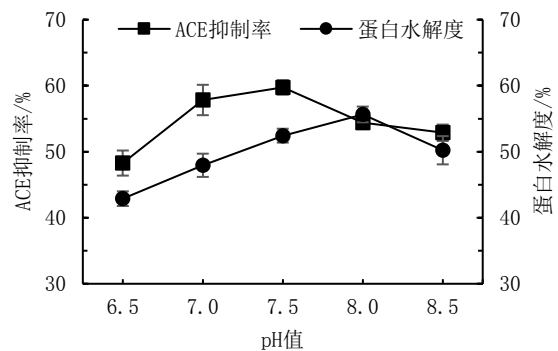


图6 不同pH值对黑木耳酶解效果的影响

Fig.6 The effect of enzymatic hydrolysis pH value on the enzymatic hydrolysis effect of *Auricularia auricula*

2.2.5 不同复合蛋白酶比例对黑木耳酶解效果的影响

由图7可知,随着复合蛋白酶中胰蛋白酶比例的增加,ACE抑制率呈现出先升后降的趋势。当中性蛋白酶与胰蛋白酶的比例为1:2(U/U)时,ACE抑制率最高,达60.07%。这说明胰蛋白酶的适度增加能够有效增强酶解产物的ACE抑制活性,这可能是由于胰蛋白酶的特异性切割位点与中性蛋白酶存在互补效应,促进了更多具有ACE

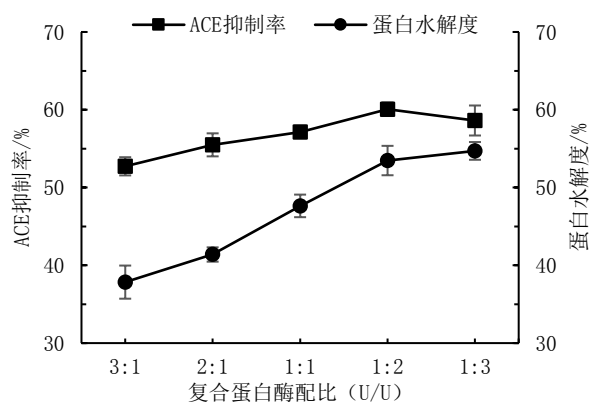


图7 不同复合蛋白酶比例对黑木耳酶解效果的影响

Fig. 7 The effect of complex enzyme proportion on the enzymatic hydrolysis effect of *Auricularia auricula*

抑制活性的肽段的生成。在蛋白水解度方面,随着胰蛋白酶比例的增加,蛋白水解度逐渐提高,当中性蛋白酶与胰蛋白酶的比例为1:3(U/U)时,水解度为57.71%,ACE抑制率有所下降,这反映了胰蛋白酶在促进蛋白质底物广泛水解方面的高效性,然而过度水解可能导致具有特定生物活性的肽段被破坏。因此,基于以上结果,选择复合蛋白酶的比例为1:1(U/U)、1:2(U/U)和1:3(U/U)作为后续研究的条件。

2.3 复合蛋白酶酶解黑木耳多因子试验

根据单因素试验的数据分析结果,按照表3进行正交试验,试验结果见表4。

由表4中极差R值可知,复合蛋白酶酶解黑木耳制备ACE抑制肽工艺中各因素影响大小依

表4 黑木耳正交酶解试验结果表

Table 4 Table of orthogonal enzymatic hydrolysis test results for *Auricularia auricula*

试验号 Test number	A(温度)/°C Temperature	B(时间)/h Time	C(pH值) pH	D(复合蛋白酶比例) U/U	ACE抑制率/% ACE inhibition rate
1	1	1	1	1	54.72±0.43
2	1	2	3	2	58.35±0.25
3	1	3	2	3	55.49±0.16
4	2	1	3	3	53.43±0.22
5	2	2	2	1	62.11±0.41
6	2	3	1	2	59.61±0.29
7	3	1	2	2	52.67±0.40
8	3	2	1	3	54.51±0.11
9	3	3	3	1	50.77±0.27
K ₁	56.19	53.61	56.28	55.87	
K ₂	58.38	58.32	56.76	56.88	
K ₃	52.65	55.29	54.18	54.48	
R	5.73	4.72	2.57	2.40	

次为酶解温度、酶解时间、酶解pH值、复合蛋白酶比例,且最佳工艺为酶解温度55℃,酶解时间4h,酶解pH7.5,复合蛋白酶比例(中性蛋白酶:胰蛋白酶)1:2(U/U)。在最佳酶解工艺条件下,ACE抑制率为65.17%,蛋白水解度为61.22%。

2.4 黑木耳酶解液中多肽分析

采用液相色谱仪检测在最佳酶解条件下的酶解液中多肽分布,酶解液中多肽分子量分布见表5。

由表5可知,酶解液中多肽分子量主要集中在131~4983Da,占比达92.19%,其中多肽分子量在131~<1046Da的占比38.75%,这一区间的多肽往往具有较好的生物利用度和ACE抑制活性。

已有研究表明,小分子量的多肽能够更有效地穿透细胞膜,与ACE酶的活性位点结合,从而发挥显著的抑制作用^[28-29]。因此,该区间的多肽可能是ACE抑制肽的主要分布区域之一;多肽分子量在1046~<4983Da的占比53.45%,通常而言,肽链长度的增加往往伴随着生物活性的降低,然而,在食物中存在一类由10~51个氨基酸残基组成的肽链,这类肽链尽管分子量相对较大,却能在肠道内被完全吸收并展现出生物活性^[30]。这一区间的多肽可能富含多种高效ACE抑制活性的成分,他们可能通过一系列复杂的相互作用机制与ACE酶相结合,进而表现出更为显著的抑制效能。

表5 黑木耳酶解液中多肽分子量分布
Table 5 Molecular weight distribution of polypeptides in enzymolysis solution

序号 No.	多肽分子量/Da Molecular weight of peptides	占比/% Proportion
1	<131	4.06
2	131~<451	27.98
3	451~<1 046	10.77
4	1 046~<3 325	41.54
5	3 325~<4 983	11.91
6	4 983~11 000	0.36
7	>11 000	3.39

3 结论

试验以黑木耳为原料,以ACE抑制率和蛋白水解度为指标,在考察10种蛋白酶水解效果的基础上,选择中性蛋白酶和胰蛋白酶进行复合蛋白酶解,制备黑木耳ACE抑制肽,并对酶解工艺进行优化。通过单酶、复合酶及酶解条件的单因素试验和正交酶解试验,最终确定黑木耳的最佳酶解条件为:料液比1:50(g/mL)、复合蛋白酶比例(中性蛋白酶:胰蛋白酶)1:2(U/U)、加酶量200 U/g、酶解温度55℃,酶解时间4 h,酶解pH 7.5,在此条件下ACE抑制率达65.17%,蛋白水解度达61.22%,酶解液中多肽分子量主要集中在131~4 983 Da,占比达92.19%。本研究为黑木耳在功能性食品应用中的开发与利用提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 王国红,马怀良,律凤霞,等.黑木耳多糖的生物活性研究进展[J].中国林副特产,2021(2):88-92.
WANG G H, MA H L, LYU F X, et al. Research progress on biological activity of polysaccharide from *Auricularia auricula* [J]. Forest By-Product and Speciality in China, 2021(2): 88-92. (in Chinese)
- [2] 中国食用菌协会.2022年度全国食用菌统计调查结果分析[J].中国食用菌,2024,43(1):118-126.
China Edible Fungi Association. Analysis of the 2022 national edible fungi statistics survey results[J]. Edible Fungi of China, 2024, 43(1): 118-126. (in Chinese)
- [3] ZHAO Y, WANG L, ZHANG D, et al. Comparative transcriptome analysis reveals relationship of three major domesticated varieties of *Auricularia auricula-judae*[J]. Scientific Reports, 2019,9(1): 78.
- [4] 郑琪,邬智高.黑木耳近年来的研究应用进展[J].轻工科技,2017,33(11):11-14.
ZHENG Q, WU Z G. Research and application progress of black fungus in recent years[J]. Light Industry Science and Technology, 2017, 33(11): 11-14. (in Chinese)
- [5] LI X, WANG Z, WANG L, et al. In vitro antioxidant and anti-proliferation activities of polysaccharides from various extracts of different mushrooms[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13(5): 5801-5817.
- [6] 付丽娜,郑佳东,孟慧荣,等.黑木耳多糖的提取工艺优化及抗氧化活性研究[J].粮食与油脂,2021,34(8):93-96.
FU L N, ZHENG J D, MENG H R, et al. Optimization of extraction process and antioxidant activity of *Auricularia auricula* polysaccharide[J]. Cereals & Oils, 2021, 34(8): 93-96. (in Chinese)
- [7] 张燕燕,刘新春,王雪,等.黑木耳营养成分及生物活性研究进展[J].南方农业,2018,12(29):130-134.
ZHANG Y Y, LIU X C, WANG X, et al. Research progress on nutritional components and biological activity of *Auricularia auricula*[J]. South China Agriculture, 2018, 12(29): 130-134. (in Chinese)
- [8] 李雪,李琢伟,李爽,等.磷酸化黑木耳多糖脂质体的表征和抗氧化能力[J].食品研究与开发,2023,44(1):68-75.
LI X, LI Z W, LI S, et al. Characterization and antioxidant capacity of phosphorylated *Auricularia auricula* polysaccharide liposome[J]. Food Research and Development, 2023, 44(1): 68-75. (in Chinese)
- [9] ZHANG S L, LUO Q B, SUO S K, et al. Preparation, identification, molecular docking study and protective function on HU-VECs of novel ACE inhibitory peptides from protein hydrolysate of skipjack tuna muscle[J]. Marine Drugs, 2022, 20(3): 176.
- [10] YE S F, CHEN Q L, LI D Y, et al. Isolation and identification of novel angiotensin I-converting enzyme(ACE) inhibitory peptides from Pony Seed and evaluation of the inhibitory mechanisms[J]. Journal of Functional Foods, 2022, 95: 105151.
- [11] 李爽,刘小芳,李福后,等.南极磷虾ACE抑制肽的酶解制备工艺优化及其稳定性研究[J].食品工业科技,2023,44(21):243-250.
LI S, LIU X F, LI F H, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis preparation process and stability evaluation of ACE inhibitory peptides from Antarctic krill(*Euphausia superba*)[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(21): 243-250. (in Chinese)
- [12] 纪慧卓,陈嘉钰,李欣,等.大黄鱼蛋白源ACE抑制三肽的虚拟筛选、体外活性验证及分子机制[J].食品工业科技,2021,42(6):125-129,143.
JI H Z, CHEN J Y, LI X, et al. Screening, in Vitro activity and molecular mechanism of ACE inhibitory tripeptides from larimichthys crocea protein[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(6):125-129,143. (in Chinese)
- [13] 董彩军,李锋.食源性ACE抑制肽的研究进展[J].上海轻工业,2023(6):162-164.
DONG C J, LI F. Research progress on food-derived ACE inhibitory peptides[J]. Shanghai Light Industry, 2023(6): 162-164. (in Chinese)
- [14] 王宝贝,张慧,刘宇松,等.食源性多肽的降血压作用及其

- 机制研究进展[J]. 食品与机械, 2024, 40(3): 217-224.
- WANG B B, ZHANG H, LIU Y S, et al. Research progress on the mechanism of food-derived antihypertensive peptides[J]. Food & Machinery, 2024, 40(3): 217-224. (in Chinese)
- [15] GB 5009.5-2016, 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [16] 张洪志, 沈涛, 杜新园, 等. 酶解血粉制备氨基酸水溶肥工艺条件优化[J]. 磷肥与复肥, 2024, 39(1): 11-15.
- ZHANG H Z, SHEN T, DU X Y, et al. Optimization of process conditions for preparation of amino acid water-soluble fertilizer by enzymatic hydrolysis of blood powder[J]. Phosphate & Compound Fertilizer, 2024, 39(1): 11-15. (in Chinese)
- [17] 沈强. 基于蛋白酶特异性水解的血管紧张素转化酶抑制肽研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2023.
- [18] GB/T 22492-2008, 大豆肽粉[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [19] 苑园园, 于宏伟, 田益玲, 等. 酶法制备牡蛎ACE抑制肽的条件优化[J]. 中国食品学报, 2013, 13(3): 115-121.
- YUAN Y Y, YU H W, TIAN Y L, et al. Enzymatic preparation of angiotensin I-Converting enzyme inhibitory peptides derived from Oyster[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 13(3): 115-121. (in Chinese)
- [20] 蔡金秀, 夏姗姗, 马佳雯, 等. 马面鱼皮ACE抑制肽的制备、分离纯化及稳定性[J]. 中国食品学报, 2022, 22(3): 225-234.
- CAI J X, XIA S S, MA J W, et al. Preparation, isolation and stability of collagen ACE inhibitory peptides from the skin of Navodon septentrionalis[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(3): 225-234. (in Chinese)
- [21] 殷海洋, 刘振春, 张世康, 等. 响应面优化超声波辅助酶法提取油莎豆ACE抑制肽的工艺[J]. 食品工业科技, 2021, 42(14): 182-187.
- YIN H Y, LIU Z C, ZHANG S K, et al. Optimization of ultrasonic-assisted enzymatic extraction of ACE inhibitory peptides from cyperus esculentus by response surface method[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(14): 182-187. (in Chinese)
- [22] 王振斌, 刘加友, 陈兵兵, 等. 响应面优化酶法制备芝麻饼粕ACE抑制肽研究[J]. 中国粮油学报, 2015, 30(9): 88-93.
- WANG Z B, LIU J Y, CHEN B B, et al. The response surface optimizate preparation of sesame dregs' Ace inhibitory peptides with enzyme[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2015, 30(9): 88-93. (in Chinese)
- [23] 石兰英, 田新民. 牡丹峰保护区土壤有机质和蛋白酶对海拔梯度及人为干扰的响应[J]. 东北农业科学, 2022, 47(2): 56-58, 128.
- SHI L Y, TIAN X M. Response of soil organic matter and protease to elevation gradient and hu-man disturbance in mudanfeng nature reserve[J]. Journal of Northeast Agricultural Sciences, 2022, 47(2): 56-58, 128. (in Chinese)
- [24] 陈秋鑫, 陈雪芹, 马倩, 等. 酶解法制备牡丹籽ACE抑制肽及其稳定性[J]. 食品工业科技, 2020, 41(19): 149-156.
- CHEN Q L, CHEN X Q, MA Q, et al. Preparation and stability of ACE inhibitory peptides from peony seed meal by enzymatic hydrolysis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(19): 149-156. (in Chinese)
- [25] 田旭静, 段鹏慧, 范三红, 等. 响应面法优化酶解藜麦糠蛋白制备抗氧化肽工艺[J]. 食品科学, 2018, 39(10): 158-164.
- TIAN X J, DUAN P H, FAN S H, et al. Response surface methodology for optimization of hydrolysis conditions for preparing antioxidant peptides from quinoa bran protein[J]. Food Science, 2018, 39(10): 158-164. (in Chinese)
- [26] 赵海新. 水稻叶片酶活性与生理性状对碱性盐胁迫的响应分析[J]. 东北农业科学, 2023, 48(4): 1-5, 11.
- ZHAO H X, Response analysis of enzyme activity and physiological characters of rice leaves to alkaline salt stress[J]. Journal of Northeast Agricultural Sciences, 2023, 48(4): 1-5, 11. (in Chinese)
- [27] 季鑫, 金爱武, 朱强根. 竹炭基有机肥对茶园土壤酶活性及微生物群落的影响[J]. 东北农业科学, 2022, 47(2): 64-68.
- JI X, JIN A W, ZHU Q G. Effects of bamboo charcoal organic fertilizer on soil enzyme activity and microbial community in tea garden[J]. Journal of Northeast Agricultural Sciences, 2022, 47(2): 64-68. (in Chinese)
- [28] 赵谋明, 任娇艳. 食源性生物活性肽结构特征与生理活性的研究现状与趋势[J]. 中国食品学报, 2011, 11(9): 69-81.
- ZHAO M M, REN J Y. The status and trends of peptide structural and physiological characteristics[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2011, 11(9): 69-81. (in Chinese)
- [29] 张文平, 杨久春, 吕正兵, 等. 多肽和蛋白质药物口服吸收机制及策略的研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(5): 903-907.
- ZHANG W P, YANG J C, LYU Z B, et al. Progress in mechanisms and strategies of peptide and protein drugs by oral administration[J]. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 2013, 27(5): 903-907. (in Chinese)
- [30] 梁美艳, 陈庆森. 具有降低心血管疾病危险的相关生物活性肽的研究现状[J]. 食品科学, 2009, 30(19): 335-340.
- LIANG M Y, CHEN Q S. Current progress in bioactive peptides for reducing cardiovascular disease[J]. Food Science, 2009, 30(19): 335-340. (in Chinese)

(责任编辑: 范杰英)