

结合感官评价与电子舌技术优化酶水解养殖暗纹东方鲀肌肉制备呈味肽

苗晓丹¹, 刘源¹, 马垒¹, 李琳¹, 王正全¹, 党亚丽², 王锡昌¹

(1. 上海海洋大学食品学院, 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306)

(2. 浙江省医学科学院保健食品研究所, 杭州 310013)

摘要: 国内外关于河豚滋味的研究主要集中在游离氨基酸、无机离子、核苷酸及其关联物上, 而对构成其鲜美浓郁和圆润香滑味感的呈味肽研究较少。因此应用酶生物技术挖掘滋味特性突出的暗纹东方鲀肌肉呈味肽, 并应用于食品中具有重要的研究意义与潜在的经济价值。以养殖暗纹东方鲀肌肉为原料, 采用中性蛋白酶、风味蛋白酶、水解蛋白酶及复合蛋白酶制备呈味肽, 以水解度、寡肽含量和电子舌结合感官评价的方法筛选不同酶解条件下的最优酶制剂。结果表明: 风味蛋白酶酶解液水解度最大而水解蛋白酶酶解液寡肽含量最高; 电子舌能够明确区分出不同蛋白酶酶解液; 电子舌分析结果与感官评价结果存在一定的相关性, 但电子舌提供的鲜味、咸味和酸味相对强度与感官评定的结果存在一定的差异。最终确定中性蛋白酶为酶解暗纹东方鲀肌肉制备呈味肽最佳酶制剂。

关键词: 暗纹东方鲀; 蛋白酶; 电子舌; 感官评价

文章编号: 1673-9078(2015)8-268-272

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.8.042

Optimized Enzymatic Hydrolysis for Flavor Peptide Preparation from Cultured Obscure Pufferfish (*Takifugu obscurus*) using Sensory Evaluation and Electronic Tongue

MIAO Xiao-dan¹, LIU Yuan¹, MA Lei¹, LI Lin¹, WANG Zheng-quan¹, DANG Ya-li², WANG Xi-chang¹

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China) (2. Institute of Health Food of Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

Abstract: Previous studies conducted on the taste of obscure pufferfish have mainly focused on content of free amino acids, inorganic ions, nucleotides and other related compounds, but the peptides contributing to the flavor as well as the sensation of mellow, creamy taste has rarely been studied. Therefore, the enzymatic extraction of flavor peptides responsible for prominent taste characteristics of obscure pufferfish has significant research and economic value for the food industry. Cultured obscure pufferfish muscle was used as to extract flavor peptides using neutral protease, flavorzyme, proteolytic enzyme, and protamex. A method combining the degree of hydrolysis (DH), oligopeptide content, taste sensor outputs from an electronic tongue, and sensory evaluation was used to identify the optimal enzyme and hydrolysis conditions. The results indicated that the DH of hydrolysates from flavorzyme and oligopeptide content of the hydrolysates from proteolytic enzyme showed the highest values. Electronic tongue could clearly differentiate different hydrolysates and correlated with the results from sensory evaluation to some extent. However, there were some differences between the relative intensities of umami, saltiness, and sourness between the results from electronic tongue and sensory evaluation. Finally, neutral protease was identified as the optimum protease for the enzymatic hydrolysis to produce flavor peptides from cultured obscure pufferfish muscle.

Key words: obscure pufferfish; *Takifugu obscurus*; protease; electronic tongue; sensory evaluation

收稿日期: 2014-11-12

基金项目: 国家自然科学基金(31371790; 31271900); “十二五”国家科技计划课题(2012BAD28B01); 上海市科委工程中心建设(11DZ2280300); 上海市教委重点学科建设项目(J50704); 上海高校知识服务平台上海海洋大学水产动物遗传育种中心(ZF1206)

作者简介: 苗晓丹(1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品营养与品质评价

通讯作者: 刘源(1979-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品营养与品质评价

氨基酸、核酸代谢产物、无机盐及呈味肽等均对食品滋味具有一定的贡献作用。呈味肽是指从食物中提取(酶解)或由氨基酸合成的对食品风味具有一定贡献的小分子肽类^[1-2],普遍存在于奶酪、酒、肉等多种加工食品和未经加工食品中。呈味肽会因肽链长短、氨基酸组成、一级结构与空间结构的不同而呈现出不同的呈味特性。目前已经陆续从多种食物中分离鉴定得到确定序列呈苦、鲜、酸、咸、甜等味的呈味肽和未知呈味特性的呈味肽。呈味肽不仅本身具有一定的呈味特性,当与某些物质作用时还具有补充或增强食品原有风味的作用^[3]。

河豚鱼在东南亚国家具有悠久的饮食文化历史,自古就有“吃了河豚,百味不鲜”及“拼死吃河豚”的说法。目前国内食用较多的有暗纹东方鲀、红鳍东方鲀、菊黄东方鲀等^[4],其中养殖暗纹东方鲀具有营养丰富,味道鲜美浓郁、圆润香滑、回味悠长的特点。对暗纹东方鲀滋味的研究主要集中在游离氨基酸、无机离子、核苷酸及其关联物上,研究表明游离氨基酸中的天冬氨酸、组氨酸、甘氨酸、丙氨酸、无机离子 Na⁺、风味核苷酸 5'-GMP (guanosine 5'-monophosphate,

5'-GMP)和 5'-IMP (inosine 5'-monophosphate, 5'-IMP)对其滋味贡献较大^[5];而对构成其鲜美浓郁和圆润香滑味感的呈味肽研究较少,本研究课题组已从煮制肌肉中分离鉴定得到兼具鲜味和甜味的辛肽(Tyr-Gly-Gly-Thr-Pro-Pro-Phe-Val)^[3]并对比分析了熟制与生鲜肌肉中的呈味肽。本实验以养殖暗纹东方鲀为原料,采用四种常见的蛋白酶制备呈味肽,以期为河豚鱼加工利用及开发富含呈味肽的营养功能型河豚鱼调味料提供重要的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

20尾二龄暗纹东方鲀(购买于江苏省中洋集团),经专业厨师剖杀、放血、去皮、去头、去内脏后冰鲜运至实验室,取肌肉储存于-80℃冰箱中备用;甲醛、氢氧化钠、盐酸等化学试剂均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司;试验用蛋白酶性能见表1,购自丹麦诺维信有限公司。

表1 蛋白酶酶活及性质

Table 1 Protease activities and properties

酶种类	温度/℃	pH 范围	作用类型	酶活力
中性蛋白酶	40~60 (45)	5.5~7.5 (7.0)	内切肽酶	1.5 AU/g
风味蛋白酶	45~55 (50)	5.0~7.0 (6.0)	内切和外切蛋白酶	500 LAPU/g
水解蛋白酶	50~70 (60)	6.0~9.0 (8.0)	内切蛋白酶	4.0 AU-A/g
复合蛋白酶	35~60 (40)	5.5~7.5 (6.0)	内切肽酶	1.5 AU/g

注:括号内数值为蛋白酶说明书所标最适反应温度和pH值。

1.2 仪器与设备

分析研磨机 All basic,德国 IKA;分散机 T10 basic ULTRA-TURRAX,德国 IKA;酶解反应器,上海辛森化学科技有限公司;恒温循环槽 MP-5,上海一恒科学仪器有限公司;冷冻离心机,美国 Beckman 有限公司;消化炉、全自动凯氏定氮仪,丹麦 FOSS 分析仪器公司;电子舌 α -ASTREE,法国 Alpha M.O.S 公司。

1.3 方法

1.3.1 暗纹东方鲀肌肉酶解工艺流程

暗纹东方鲀肌肉解冻→绞碎→1:4加水匀浆→用 1 mol/L 的 NaOH 或 HCl 溶液调 pH 至各蛋白酶的最适 pH 值→在最适温度下预热 15 min→加入 2% (m/m) 蛋白酶,恒温酶解 2 h→100℃水浴加热 10 min,灭酶→冷却→8000 r/min 离心 10 min→收集上清液备用

1.3.2 水解度与寡肽含量测定

肽键断裂后生成多肽和氨基酸,水解度(DH)是水解后生成的 α -氨基氮含量与样品中总氮含量的比值。 α -氨基氮的量参考 DB35/T 1089-2011 甲醛滴定法测定,样品总氮量参考 AOAC 928.08 凯氏定氮法测定。

小分子肽含量采用三氯乙酸(TCA-N)法^[6-7],称取 10 mL 酶解液,加入 10 mL 20%三氯乙酸溶液,混合均匀,静置 10 min。将样品溶液在 4000 r/min 下离心 10 min,测上清液总氮含量,用以表示酶解液中小分子肽含量。

1.3.3 感官评定

感官评价小组由经过筛选和培训的年龄在 20~25 岁之间的感官评价员组成,4 名男性和 8 名女性。评分采用 5 点制(0 表示没有味道,5 表示味道最浓烈),对暗纹东方鲀肌肉酶解液的滋味(包括鲜味、浓厚感、咸味、甜味、酸味和苦味)进行评价。酶解液 1:7 稀

释并水浴加热, 感官评定时样品温度维持在 40 ℃ 左右。12 名感官评价员根据四种不同蛋白酶酶解液的整体滋味属性进行喜好性排序, 排序一至四名样品分别得 8、6、4、2 分。取评分的平均值作为感官评价结果。

1.3.4 电子舌测定滋味轮廓

法国 Alpha M.O.S 公司的电子舌系统, 由 7 根化学传感器阵列 (SRS、GPS、STS、UMS、SPS、SWS 和 BRS, 其中 SRS、STS 和 UMS 能分别对酸味、咸味和鲜味具有专一性响应)、一个参比电极、电信号处理器以及模式识别系统组成。样品测试前, 电子舌需通过活化、校准和诊断。酶解液经纯净水 1:7 稀释, 数据每秒采集一次共 120 s, 选取第 120 s 响应值作为原始数据进行处理。每个样品重复测定 7 次, 取信号值稳定的最后 3 次结果进行分析。氯化钠 (NaCl) 和谷氨酸钠 (MSG) 配成浓度为 0.1 mg/mL、0.2 mg/mL 和 0.3 mg/mL 的混合液 (NaCl+MSG 1、NaCl+MSG 2 和 NaCl+MSG 3), 作为参照的标准梯度溶液。

1.3.5 数据处理

实验的数据结果进行统计分析, 其中水解度与寡肽含量结果用 Origin 8.0 处理, 电子舌采集数据根据系统自带软件 AlphaSoft 进行主成分分析 (PCA)。

2 结果与分析

2.1 不同蛋白酶对水解度与寡肽含量的影响

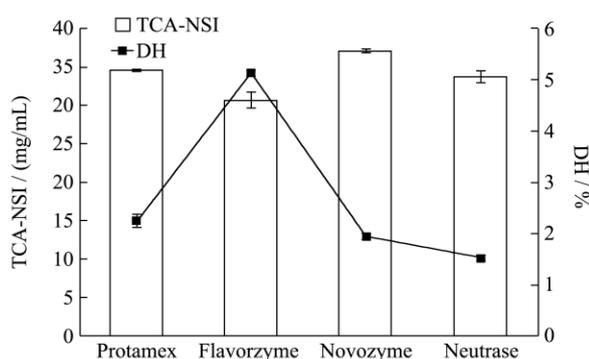


图 1 不同蛋白酶对暗纹东方鲀肌肉水解度与寡肽含量的影响

Fig.1 Effect of different proteases on the DH and TCA-NSI content

由图 1 所示, 各种蛋白酶对水解度与寡肽得率的影响并不相同。水解度是酶解过程中断裂的肽键数占总肽键数的百分比, 主要是内切酶活力与外切酶活力协同作用的结果。水解度从大到小依次是风味蛋白酶、复合蛋白酶、水解蛋白酶和中性蛋白酶酶解液, 这可能是由于各蛋白酶的作用类型和内切活力与外切活力的比值上存在差异。但寡肽含量从高到低是水解蛋白酶、复合蛋白酶、中性蛋白酶和风味蛋白酶酶解液。寡肽得率主要取决于内切酶活力, 与外切酶活力关系

不大^[8]。风味蛋白酶酶解液的水解度最高但寡肽含量却最低, 这可能是由于其外切酶活力较强而内切酶活力相对较低。寡肽含量高的酶解液其呈味肽的含量也可能相应较高, 因此根据水解度和寡肽含量的差异三种蛋白酶明显优于风味蛋白酶制备暗纹东方鲀肌肉呈味肽。

2.2 不同蛋白酶对暗纹东方鲀酶解液滋味轮廓的影响

2.2.1 酶解液滋味特性

感官评价可以通过直观的描述将感官属性进行强度描述, 能够量化地反映食品品质特性, 从而判定食品品质的差异性, 为食品品质控制、改善等提供理论依据。电子舌通过模拟人的味觉识别系统, 可以在量化感官数据的基础上评价体系的一致性。因而结合感官与电子舌的分析方法, 更能真实地反映暗纹东方鲀酶解液的滋味轮廓。

由表 2 根据感官评价结果可知, 四种酶解液的共同特点是鲜味评分普遍较高, 浓厚感、咸味的评分居中, 苦味较低, 甜味、酸味评分最低, 与电子舌结果具有相似性。电子舌通过 Arossoft 软件将传感器 (SRS、STS、UMS) 得到的响应信号值通过转化得到相应的滋味相对强度值, 从而对不同样品中三种滋味相对强度进行比较。结合感官及电子舌分析结果, 风味蛋白酶与中性蛋白酶酶解液滋味特性相近, 尤其表现在鲜味、浓厚感和咸味上。风味蛋白酶作为一种兼具内切和外切作用的复合蛋白酶能彻底水解动植物蛋白质生成氨基酸, NH 可能含有与 FH 相似数量或种类的氨基酸。有研究表明在样品液 10% 的情况下感官评价中的苦味与鲜味传感器输出值具有明显的负相关性^[9], 除复合蛋白酶酶解液外其他三种酶解液均符合此规律, 这可能是由于对复合蛋白酶酶解液的苦味与作为苦味参照物的咖啡因有所差异。蛋白酶在酶解过程中产生的疏水性氨基端会造成酶解液具有苦味, 而苦味是酶解过程中应尽量避免的。对于四种酶解液, 苦味评分顺序为 HH>NH、PH>FH。诺维信公司的复合蛋白酶 Protamax 是一种专为制备低苦味酶解液的复合蛋白酶, NH 与 PH 苦味感官评分相同、苦味相对较弱。浓厚感 (kokumi) 是由日本味之素株式会社首先发现并提出的^[10], 指能引起滋味品尝方面的“浓厚感与持久感觉”, 除 PH 浓厚感较弱其他三种酶解液均较好的保留了暗纹东方鲀肉汤浓厚、持久的感觉。

比较感官评价和电子舌得出的结果, 发现二者之间完全不一致或不完全一致的现象。这可能是酶解

液本身味道复杂、电子舌滋味强度依据单一纯物质等多种原因造成的。

表 2 不同蛋白酶酶解液滋味强度

Table 2 Taste intensities of hydrolysates produced by different proteases

滋味	中性蛋白酶酶解液(NH)	风味蛋白酶酶解液(FH)	水解蛋白酶酶解液(HH)	复合蛋白酶酶解液(PH)
鲜味	3.33±0.49	3.42±0.67	2.17±0.58	3.00±0.85
浓厚感	2.50±0.80	2.75±0.75	2.33±0.78	1.67±0.78
咸味	3.17±0.58	3.50±0.67	1.83±0.72	2.92±0.79
甜味	0.25±0.45	0.58±0.67	0.58±0.79	0.25±0.45
酸味	0.58±0.51	0.75±0.62	0.17±0.39	0.58±0.51
苦味	1.08±0.51	0.25±0.45	1.58±0.67	1.08±0.67
整体喜好	5.17±0.83	6.17±0.94	4.67±0.98	4.00±0.85
鲜味(UMS)	6.55	6.62	2.71	8.12
咸味(STS)	6.62	7.08	2.66	7.64
酸味(SRS)	4.53	4.81	5.22	9.44

注：表格虚线以上结果由感官评价得出，虚线以下结果是由电子舌特异性传感器给出的相对滋味强度。

2.2.2 酶解液电子舌滋味轮廓

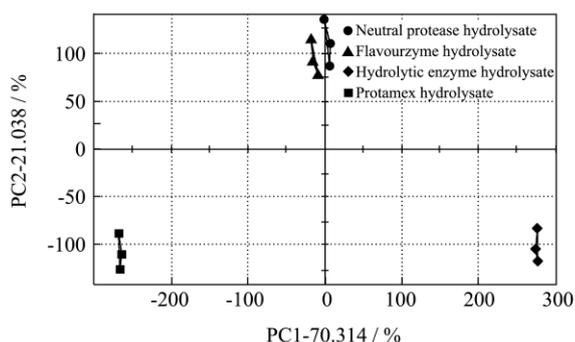


图 2 不同蛋白酶酶解液电子舌 PCA 图

Fig.2 Principal component analysis (PCA) plot for the electronic tongue results of hydrolysates produced by different proteases

图 2 为稀释过的四种不同蛋白酶酶解液的电子舌 PCA 图，主成分分析图中前二维主成分 (PC1 和 PC2) 的累积贡献率达到 91.35%，说明 PC1 与 PC2 两轴包

含了 PCA 转换中绝大部分的信息，提取的主成分能够很好地反映原来多指标的信息；同时通过对传感器信号值进行处理区分指数达 98，说明电子舌能够将四种蛋白酶酶解液在滋味方面存在显著的差异并且电子舌能进行完全区分。

不同样品间的间距可通过判别指数表示，数值越大其滋味差异性越明显。由于风味蛋白酶常用于制备风味调味料且感官评价中整体喜好评分最高，选取风味蛋白酶酶解液作为判别指数中主要的参照溶液。由表 3 可知，中性蛋白酶酶解液相较于其他两种酶解液与风味蛋白酶的判别指数最小、滋味最为接近，与感官评价中中性蛋白酶酶解液整体喜好程度仅次于风味蛋白酶酶解液的结果相符合。喜好评分是根据酶解液整体可接受度而言，将不同的滋味特性综合评判，与单一滋味评分的高低并不存在完全的一致性。

表 3 基于电子舌的不同蛋白酶酶解液差异性

Table 3 Differences between hydrolysates based on the results from electronic tongue

	样品	参比样品	间距	判别指数/%
1	风味蛋白酶酶解液(FH)	复合蛋白酶酶解液(PH)	325.51	85.45
2	风味蛋白酶酶解液(FH)	水解蛋白酶酶解液(HH)	351.30	87.82
3	风味蛋白酶酶解液(FH)	中性蛋白酶酶解液(NH)	37.70	6.53
4	复合蛋白酶酶解液(PH)	水解蛋白酶酶解液(HH)	542.58	94.77
5	复合蛋白酶酶解液(PH)	中性蛋白酶酶解液(NH)	348.00	86.16
6	水解蛋白酶酶解液(HH)	中性蛋白酶酶解液(NH)	345.51	86.56

3 结论

本试验采用感官结合电子舌的方法，并通过水解度与寡肽含量的差异分析不同蛋白酶酶解液。从理化

指标测定结果得知，风味蛋白酶酶解液水解度最大而水解蛋白酶酶解液寡肽含量最高。对挖掘酶解液中呈味肽而言，寡肽含量指标比水解度更为重要，因而其他三种蛋白酶制备暗纹东方鲀肌肉呈味肽明显优于风

味蛋白酶。从感官结合电子舌的评价结果得知,四种酶解液的共同特点是鲜味评分普遍较高,浓厚感、咸味的评分居中,苦味较低,甜味、酸味评分最低;中性蛋白酶酶解液由于与风味蛋白酶酶解液滋味特性最为接近。因此,最终确定中性蛋白酶为酶解暗纹东方鲀肌肉制备呈味肽最佳酶制剂。

参考文献

- [1] Claeys E, De Smet S, Balcaen A, et al. Quantification of fresh meat peptides by SDS-PAGE in relation to ageing time and taste intensity [J]. Meat Science, 2004, 67(2): 281-288
- [2] Fadda S, Lopez C, Vignolo G. Role of lactic acid bacteria during meat conditioning and fermentation: peptides generated as sensorial and hygienic biomarkers [J]. Meat Science, 2010, 86(1): 66-79
- [3] Zhang Mei-xiu, Wang Xi-chang, Liu Yuan, et al. Isolation and identification of flavour peptides from puffer fish (*Takifugu Obscurus*) muscle using an electronic tongue and MALDI-TOF/TOF MS/MS [J]. Food Chemistry, 2012, 135(3): 1463-1470
- [4] 王丽雅,陶宁萍,龚玺.河豚的食用安全性及营养价值研究进展[J].上海农业学报,2012,28(2):123-128
WANG Li-ya, TAO Ning-ping, GONG Xi. Research progress of edible safety and nutritional value of puffer fish [J]. Acta Agriculturae Shanghai, 2012, 28(2): 123-128
- [5] 邓捷春,王锡昌,刘源.暗纹东方鲀与红鳍东方鲀滋味成分差异研究[J].食品工业科技,2010,31(3):106-108
DENG Jie-chun, WANG Xi-chang, LIU Yuan. Study on difference of taste compounds between fugu obscurus and fugu rubripes [J]. Science and Technology of Food Industry, 2010, 31(3): 106-108
- [6] Hoyle N T, Merritt J H. Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea Harengus*) [J]. Food Science, 1994, 59(1): 76-79
- [7] Ovissipour M, Kenari A A, Motamedzadegan A, et al. Optimization of protein recovery during hydrolysis of yellowfin tuna (*Thunnus Albacares*) visceral proteins [J]. Aquatic Food Product Technology, 2011, 20(2): 148-159
- [8] 方佳茂,刘偲琪,庄楚周,等.复合酶水解蚕蛹蛋白制备功能性寡肽的工艺研究[J].现代食品科技,2012,3:323-328
FANG Jia-mao, LIU Si-qi, ZHUANG Chu-zhou, et al. Optimization of Enzymatic Hydrolysis Conditions for Preparation of Functional Oligopeptide from Silkworm Pupa Protein [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 3: 323-328
- [9] Cheung Imelda W Y, Li-Chan Eunice C Y. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity and bitterness of enzymatically-produced hydrolysates of shrimp (*Pandalopsis Dispar*) processing byproducts investigated by taguchi design [J]. Food Chemistry, 2010, 122(4): 1003-1012
- [10] Ueda Y, Sakaguchi M, Hirayama K, et al. Characteristics flavor constituents in water extract of garlic [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1990, 54(1): 163-169