

酶法制备螺蛳呈味基料及新型螺蛳粉汤料开发

莫凯棋¹, 李欣蔚¹, 吴新良², 苗建银^{1*}

(1. 华南农业大学食品学院, 广东省功能食品活性物重点实验室, 广东广州 510642)

(2. 东莞市华琪生物科技有限公司, 广东东莞 523000)

摘要: 以螺蛳肉为原料, 以水解度为指标, 通过蛋白酶筛选、单因素试验和响应面优化确定酶法制备螺蛳呈味基料工艺, 并对螺蛳呈味基料的游离氨基酸、总氨基酸和感官风味进行分析, 随后以螺蛳呈味基料为基础进行新型螺蛳粉汤料开发研究。结果表明, 螺蛳呈味基料最优酶解工艺参数为: 胰蛋白酶底质量比 0.19%, 料液比 1:2 g/mL, 酶解 pH 值 8.0, 酶解温度 50 °C, 酶解时间 3 h, 此时水解度为 26.82%, 其最终固形物得率比传统水煮法提高了 6.3 倍。螺蛳肉呈味基料总体风味良好, 鲜味 (6.64) 突出, 鲜甜氨基酸含量占总氨基酸总量的 57.48%。新型酶解型汤料配方为: 以原汤作为溶解体系 (质量分数), 螺蛳呈味基料、食盐、白砂糖和味精的添加量分别为 25 g/L、3%、1.25% 和 1.5%。新型酶解型汤料游离氨基酸总量 (142.21 mg/100 g) 和总氨基酸鲜甜氨基酸含量 (17.28 g/100 g) 较传统水煮型 (14.25 mg/100 g 和 13.48 g/100 g) 均显著提升。因此, 酶解型螺蛳粉汤料具有更好的风味价值。该研究为螺蛳资源的高效利用及螺蛳粉汤料的品质提升和产业化制备提供了新思路 and 参考。

关键词: 螺蛳; 酶解; 呈味基料; 响应面法; 螺蛳粉汤料

文章编号: 1673-9078(2024)11-129-139

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.11.1211

Enzymatic Preparation of River Snail Flavoring Bases and Development of a New River Snail Rice Noodle Soup

MO Kaiqi¹, LI Xinwei¹, WU Xinliang², MIAO Jianyin^{1*}

(1. Guangdong Key Laboratory of Functional Food Active Substances, College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)(2. Dongguan Huaqi Biological Technology Co. Ltd., Dongguan 523000, China)

Abstract: An enzymatic process for preparing flavoring bases from river snail meat was developed using a systematic approach involving protease screening, single-factor experiments, and response surface methodology-based optimization, with the degree of hydrolysis used as the key index. The free and total amino acid contents and sensory characteristics of the snail flavoring bases were then evaluated. Subsequently, a novel river snail-based rice noodle soup was formulated using the optimized flavoring base that had been developed. The optimal enzymatic parameters for preparing the river snail flavoring base were as follows: a trypsin-to-substrate mass ratio of 0.19%, solid-to-liquid ratio of 1:2 g/mL, pH value of 8.0, temperature of 50 °C, and duration of 3 h. Under these conditions, the degree of hydrolysis reached 26.82%, resulting in a final solid yield that was 6.3 times higher than that achieved using the traditional boiling method. Overall, the flavoring base

引文格式:

莫凯棋, 李欣蔚, 吴新良, 等. 酶法制备螺蛳呈味基料及新型螺蛳粉汤料开发[J]. 现代食品科技, 2024, 40(11): 129-139.

MO Kaiqi, LI Xinwei, WU Xinliang, et al. Enzymatic preparation of river snail flavoring bases and development of a new river snail rice noodle soup [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(11): 129-139.

收稿日期: 2023-10-11

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (2023A1515010006)

作者简介: 莫凯棋 (1996-), 男, 在读研究生, 研究方向: 食品新原料与功能性食品, E-mail: mokaiqi021@163.com

通讯作者: 苗建银 (1981-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品科学, E-mail: miaojy8181@scau.edu.cn

derived from river snail meat had an excellent flavor, with a prominent umami taste (6.64). Notably, amino acids with umami and sweet flavors constituted a significant proportion (57.48%) of the total amino acids. The formulation for the new enzymatically hydrolyzed soup is as follows: the original soup serves as the solvent system, with additions (in mass fractions) of 25 g/L flavoring base, 3% salt, 1.25% white sugar, and 1.5% monosodium glutamate. The total free amino acid content (142.21 mg/100 g) and total sweet amino acid content (17.28 g/100 g) in the new enzymatically hydrolyzed soup were significantly higher than those in the traditional boiled soup (14.25 mg/100 g and 13.48 g/100 g, respectively), rendering the flavor of the enzymatically hydrolyzed snail rice noodle soup superior. This study provides novel insights and recommendations for the efficient utilization of river snail resources and the quality enhancement and industrial preparation of river snail rice noodle soup.

Key words: river snail; enzymatic hydrolysis; flavoring base; response surface method; river snail rice noodle soup

螺蛳粉是广西特色美食，传统螺蛳粉以餐饮门店销售为主，但近年来逐渐从门店即食向商品化袋装产品转变。2021年柳州螺蛳粉全产业链销售收入达到501.6亿元，其中袋装柳州螺蛳粉销售收入151.97亿元，同比增长38.23%；出口方面，2021年预包装柳州螺蛳粉出口额约5256万元^[1]。袋装螺蛳粉的主要组成部分有米粉包、螺蛳水煮调味包和配料包等组成。当前国内对于螺蛳粉产品研究较少，主要集中在螺蛳粉的安全性评价和传统制作优化工艺上^[2,3]。螺蛳粉调料包是螺蛳粉最具特色的部分，当前多数企业开发的螺蛳粉调料包仍然是采用传统水煮工艺，但传统螺蛳粉汤料加工方式耗时耗力，原料利用率低，条件控制不当还会影响汤料风味，导致螺蛳粉产品质量不稳定。同时，随着近年来螺蛳粉产业的不断发展壮大，螺蛳资源供不应求。因此，如何高效、高品质利用螺蛳资源成为行业关注的问题。

蛋白酶解技术具有条件温和、高效、易控、安全等优势，是制备功能性蛋白基料的首选方法。蛋白质经蛋白酶降解后能生成更易被人体吸收的氨基酸、小分子活性肽等物质，这些小分子活性肽不但具有降血压^[4]、降血脂^[5]、抗氧化^[6]和增强免疫力^[7]等生理功能，而且能改善食品风味^[8]和用于制备功能性蛋白呈味肽基料。如部分呈味肽对糖尿病、高血压患者和肥胖人群等需要低钠、低糖食品的特殊人群有着潜在的利用价值^[9,10]。因此，呈味肽成为近年来国内外研究的热点。甘瑞卿等^[11]利用中性蛋白酶水解罗非鱼鱼皮得到小分子量的潜在呈味肽。Liu等^[12]加热超声处理红鳍东方鲀得到7种新型鲜味肽，并证实这些肽具有良好的鲜味特征。Sun等^[13]发现鲜味肽可以影响味道质量，在添加到鸡汤和酱料溶液等复杂基质中时改善风味。唐霄等^[14]使用中性蛋白酶酶解鹅肉制备呈味肽，制得酶解液整

体鲜味浓郁，持香时间久，整体风味良好。呈味肽与其他化学食品添加剂相比具有天然、安全、易吸收、呈味阈值低等优势，对于深度开发利用蛋白资源、拓宽蛋白质应用范围和提高调味品档次具有深远的意义。

本研究针对传统水煮螺蛳粉汤料加工过程中螺蛳原料利用率低和工序繁琐费时的现状，通过生物酶解技术高效制备螺蛳呈味基料，并采用氨基酸分析和感官评价分析螺蛳呈味基料的呈味物质基础和呈味效果。并在螺蛳呈味基料的基础上，开发新型螺蛳粉汤料。旨在为酶解型螺蛳粉汤料的开发提供理论基础和技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

螺蛳肉，由东莞市华琪生物科技有限公司提供；碱性蛋白酶（20万U/g）、胰蛋白酶（4000U/g）、木瓜蛋白酶（80万U/g）、中性蛋白酶（1万U/g）、复合蛋白酶（15万U/g），南宁庞博生物工程有限公司； $\phi=95\%$ 2,4,6-三硝基苯磺酸溶液（TNBS），成都化夏化学试剂有限公司；PBS缓冲液pH值7.4，赛默飞世尔生物化学制品（北京）有限公司；食用油、香辛料、味精和食盐等从华南农业大学天猫超市购入；L-异亮氨酸，上海麦克林生化科技有限公司；蔗糖，北京兰杰柯科技有限公司；HCl、KCl和酒石酸等试剂均为分析纯；新鲜的猪筒骨和鸡架骨当天从广州市天河区长湴综合市场购入。

1.2 主要仪器与设备

HH-4数显恒温水浴锅，金坛市华城海龙实验仪器厂；AL104万分之一电子天平，梅特勒-托利多

仪器(上海)有限公司;FD-1 冷冻干燥机,海门市其林贝尔仪器制造有限公司;PHS-3CW pH 计,北京赛多利斯科学仪器有限公司;DH5000B II 电热恒温培养箱,津泰斯特仪器有限公司;L530 台式低速自动平衡离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;Enspire 2300 多功能酶标仪,美国 PerkinElmer 公司;Smarttongue 电子舌,上海瑞玢智能科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 水解度(DH)的测定

参照沈金鹏等^[15]的方法进行测定。以 L-亮氨酸作为标准物质,绘制标准曲线。吸取 0.125 mL 待测酶解液,加入 1 mL pH 值 7.4, 0.2 mol/L PBS 和 1 mL 0.1% (体积分数) TNBS, 在避光条件下,置于 50 °C 水浴锅中反应 1 h, 迅速冷却至室温后立即加入 2 mL 0.1 mol/L HCl 振荡以终止反应, 340 nm 下测定吸光度, 使用标准曲线法来确定样品溶液的浓度。如果所测吸光度超出标准曲线的最大吸光度范围, 必须对溶液进行适当稀释, 所得浓度乘以稀释倍数即可得到样品溶液浓度。蛋白质含量按国标 GB 5009.5-2016 中的凯氏定氮法测定。水解度公式, 如式(1)所示。

$$D = \frac{y(X_{\text{样}} - X_{\text{空}}) \times 0.16}{m \times P \times H_{\text{tot}}} \quad (1)$$

式中:

D ——水解度(DH), %;

y ——亮氨酸浓度, mmol/L;

$X_{\text{样}}$ ——样品在 340 nm 下的吸光度;

$X_{\text{空}}$ ——去离子水在 340 nm 下的吸光度;

m ——酶解样品的质量, g;

P ——酶解样品中的蛋白质含量, g/g;

H_{tot} ——蛋白质总肽键数, 7.85 mmol/g 蛋白质。

1.3.2 螺蛳呈味基料制备工艺研究

1.3.2.1 最优酶筛选

以螺蛳肉为原料, 选取 5 种蛋白酶在其推荐条件下酶解, 分别为碱性蛋白酶(pH 值 9.0, 55 °C)、复合蛋白酶(pH 值 6.0, 50 °C)、木瓜蛋白酶(pH 值 6.0, 55 °C)、胰蛋白酶(pH 值 8.0, 50 °C)、中性蛋白酶(pH 值 6.5, 55 °C)。将螺蛳肉搅碎成肉糜, 取 5 g 肉糜, 加 15 mL 蒸馏水, 调节 pH 值, 分别加酶 9 mg, 恒温水浴酶解 3 h, 酶解完成后转移至沸水中 10 min 灭酶处理, 冷却至室温后, 离心

(4 000 r/min, 15 min)。取上清液测定水解度, 筛选最优蛋白酶。

1.3.2.2 单因素实验

在确定最优蛋白酶为胰蛋白酶后, 开展如下单因素实验:

酶解时间对水解度的影响: 在酶解温度 50 °C, pH 值 8, 料液比 1:3 g/mL, 酶底质量比 0.18% 的条件下, 考察酶解时间(1、2、3、4、5 h)对螺蛳肉水解度的影响。

酶解温度对水解度的影响: 在酶解时间 3 h, pH 值 8, 料液比 1:3 g/mL, 酶底质量比 0.18% 的条件下, 考察酶解温度(40、45、50、55、60 °C)对螺蛳肉水解度的影响。

pH 值对水解度的影响: 在酶解时间 3 h, 酶解温度 50 °C, 料液比 1:3 g/mL, 酶底质量比 0.18% 的条件下, 考察 pH 值(7.0、7.5、8.0、8.5、9.0)对螺蛳肉水解度的影响。

料液比对水解度的影响: 在酶解时间 3 h, 酶解温度 50 °C, pH 值 8, 酶底质量比 0.18% 的条件下, 考察料液比(1:1、1:2、1:3、1:4、1:5 g/mL)对螺蛳肉水解度的影响。

酶底质量比对水解度的影响: 在酶解时间 3 h, 酶解温度 50 °C, pH 值 8, 料液比 1:3 g/mL, 考察酶底质量比(0.16%、0.17%、0.18%、0.19%、0.20%)对螺蛳肉水解度的影响。

1.3.2.3 响应面优化

基于单因素试验结果, 以酶解 pH 值、料液比和酶底质量比为自变量, 以水解度为响应值, 根据 Box-Behnken 中心组合设计原理进行三因素三水平响应面实验, 优化水解度的最佳制备工艺, 因素水平见表 1。

表 1 响应面设计因素水平表

Table 1 Response surface design factor lever table

因素	水平		
	-1	0	1
酶解 pH 值	7.5	8.0	8.5
料液比/(g/mL)	1:2	1:3	1:4
酶底质量比/%	0.17	0.18	0.19

1.3.2.4 螺蛳呈味基料制备

在最优酶解条件下制备螺蛳呈味基料, 酶解完成后转移至沸水中进行 10 min 灭酶处理, 冷却至室温, 离心(4 000 r/min, 15 min), 离心后进行冻干处理。

表 2 螺蛳粉汤料感官评价表

Table 2 Sensory evaluation of river snail rice noodle soup

项目	外观 (20 分)	气味 (40 分)	滋味 (40 分)	总分 (100)
一类	(16~20 分) 颜色为棕褐色或者棕黄色, 色泽诱人, 有光泽	(31~40 分) 螺蛳特征香味浓郁饱满, 无焦糊味, 香气协调, 愉悦	(31~40 分) 鲜甜醇厚、回味悠长, 口感好	>80
二类	(10~15 分) 颜色为黄色或淡黄色, 无光泽	(21~30 分) 螺蛳特征香味一般, 有稍微腥苦味, 可以接受	(21~30 分) 滋味一般, 鲜味不突出, 伴有异味, 口感一般	60~80
三类	(<10 分) 颜色为深黑或深棕色, 无光泽	(<20 分) 无螺蛳特征香味, 腥味重或者焦糊味, 难以接受	(<20 分) 滋味怪异, 伴有糊味或者苦味, 口感较差	<60

1.3.3 传统水煮型螺蛳粉汤料制备

1.3.3.1 原汤熬制

骨汤熬制：从广州市天河区长湴综合市场购入新鲜的猪筒骨和鸡架骨，清洗干净备用。按照猪筒骨料液比为 1:4，鸡架骨料液比为 1:4 的比例，将洗净的猪筒骨和鸡架骨冷水下锅，加入总物料质量分数 2% 的生姜片和大葱去腥，煮至血沫飘起，用漏勺滤出血沫、生姜片和大葱，小火熬制 5 h。熬制结束后用 300 目滤网过滤备用。

原汤制备：按照香辛料占骨汤体积分数：八角 0.05%、香叶 0.04%、白芷 0.04%、沙姜 0.09%、草果 0.07%、花椒 0.09%、砂仁 0.08%、白寇 0.04%。香辛料冷油下锅，炒至香料微焦，不断翻炒，直至香辛料风味物质飘出。最后趁热加入 300 mL 骨汤，煮制 15 min，使香料与骨汤充分混匀，随后冷却至室温后保存，并以此为原汤备用。

1.3.3.2 传统水煮法螺蛳提取物汤料制备

称取 55 g 螺蛳肉，轻微炒制表面微黄，再加入 50 mL 原汤，熬制 0.5 h，冷却至室温后保存。并以此为水煮型螺蛳粉汤料。

1.3.4 新型酶解型汤料制备

以原汤为基础汤料（质量分数），进行风味调配工艺优化，初定工艺为螺蛳呈味基料 100 g/L，食用盐 3%，味精 1.5%，糖 0.3%。随后对 4 个因素螺蛳呈味基料（25、75、100、125、150 g/L）、食用盐（1%、2%、3%、4%、5%）、味精（0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%）和糖（0.5%、0.75%、1%、1.25%、1.5%）分别进行单因素实验，以感官评价总分为指标，考察各因素对酶解型螺蛳粉汤料风味的影响。

1.3.5 总氨基酸测定

参照 GB 5009.124-2016《食品中氨基酸的测

定》^[16]测定螺蛳呈味基料、传统水煮型螺蛳粉汤料和新型酶解型螺蛳粉汤料中总氨基酸的组成及其含量，在此测定中胱氨酸、蛋氨酸检测结果会部分破坏，色氨酸被完全破坏。

1.3.6 游离氨基酸测定

称取 200 mg 螺蛳呈味基料（汤料量取 1 mL 液体样用正己烷脱脂），加入 2 mL 体积分数 5% 的磺基水杨酸，混匀超声 30 min，冷却离心（12 000 r/min，10 min），过 0.22 μm 滤膜后上机检测。

1.3.7 感官评价

1.3.7.1 螺蛳呈味基料感官评价

参考 Shen 等^[17]的方法并略做修改，感官评价小组由八名实验室成员组成（四男四女，年龄在 18~26 岁之间）。这些小组成员健康、无味觉障碍且不吸烟。小组成员经过感官训练，能够准确识别酸、甜、苦、咸、鲜五种基本味道。要求小组成员通过感官实验训练能够评估以下标准味觉溶液：用于甜味的蔗糖溶液（1%，*m/V*）、用于鲜味的味精溶液（0.35%，*m/V*）、用于咸味的氯化钠溶液（0.35%，*m/V*）、用于苦味的 L- 异亮氨酸溶液（0.25%，*m/V*）、用于酸味的柠檬酸溶液（0.08%，*m/V*）。样品的感官评价分数范围为 0~10 分，0 分表示无味，10 分表示味道突出。参考溶液评分为 5 分。

感官小组成员将 1~2 mL 样品放在舌头的中央区域，以记录每个味道属性的强度。在室温下用棕色瓶随机编号并分配给每个小组成员。在评估过程中，小组成员在每个样品后都不允许交流并休息 30 s，以减少味觉疲劳。评价测试一式三份地进行，并且对小组成员给出的值进行平均。

1.3.7.2 汤料感官评价

取 10 mL 成品按照 1:6 比例加入 60 mL 热水，

煮制 5 min。再转移至烧杯中,在自然光下观察色泽,闻其香气,漱口后品其滋味。成品温度维持在 50 ℃进行感官评价。螺蛳粉汤料感官评价标准见表 2。

1.4 数据处理

本研究中的数据都进行了至少 3 次重复,使用 Design Expert 11 软件、SPSS 21.0 软件和 Microsoft Office 2019 软件进行实验设计和数据分析,最终数据结果以平均值 ± 标准差 (SD) 表示。

2 结果与讨论

2.1 螺蛳呈味基料酶解工艺研究

2.1.1 蛋白酶初筛

采用五种商业蛋白酶对螺蛳肉进行酶解,结果如图 1 所示。由于不同蛋白酶对螺蛳肉蛋白的酶切位点不同,蛋白水解程度不同,水解效果具有显著差异。本研究水解度最大为胰蛋白酶,水解度为 20.07%。为了达到最佳的酶解效果,选择水解度最高的胰蛋白酶进行后续的酶解试验。

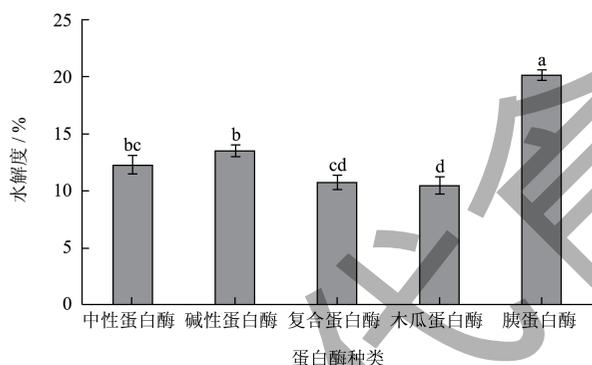


图 1 5 种蛋白酶的水解度比较

Fig.1 Comparison of hydrolysis degrees of five proteases

注:字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。下图同。

2.1.2 单因素实验

2.1.2.1 酶解时间对水解度的影响

由图 2 可知,在螺蛳肉蛋白质酶解的过程中,随着水解时间的增加,水解度逐渐增加。水解时间超过 3 h 后,水解度没有显著性趋势。在酶解时间为 3 h 时水解度最大,为 24.35%。可以看出,随着水解时间延长,水解度增加缓慢。从经济角度考虑,选择胰蛋白酶水解制备螺蛳呈味基料的酶解时间为 3 h。

2.1.2.2 酶解 pH 值对水解度的影响

从图 3 可知,当 pH 值从 7.0 到 8.0 时,水解度逐渐升高并在 8.0 处达到最大,为 24.76%。当 pH

值为 9.0 时,水解度较 pH 值 8.0 较小。水解度降低是因为蛋白酶体系中的酶分子活性部位上的相关基团解离程度受 pH 值影响,进而影响酶与底物的结合能力和酶反应速率。当 pH 值高于或低于该值时,酶的天然构象以及酶与底物的解离状态都会受到影响,从而影响稳定性,抑制酶活性,甚至失活^[18]。因此,确定胰蛋白酶制备螺蛳呈味基料的 pH 值为 8.0。

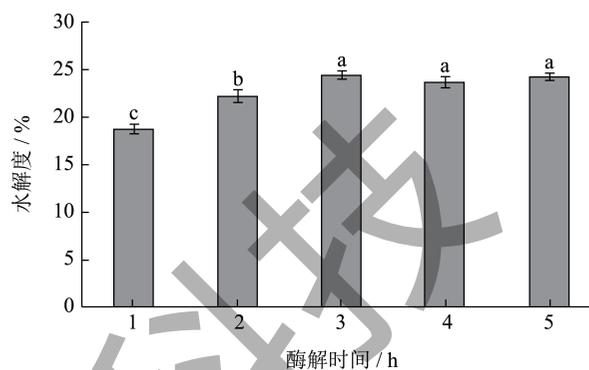


图 2 酶解时间对水解度的影响

Fig.2 Effect of enzymatic hydrolysis time on degree of hydrolysis

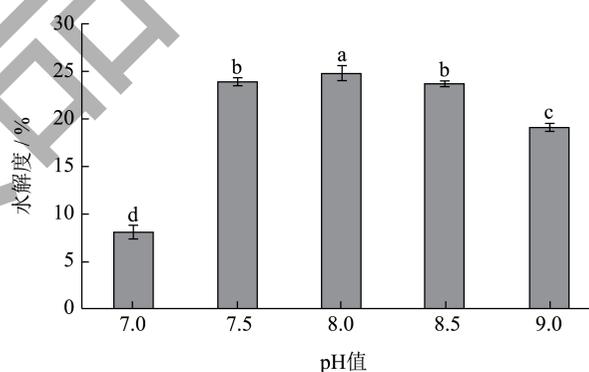


图 3 pH 值对水解度的影响

Fig.3 Effect of pH value on degree of hydrolysis

2.1.2.3 酶解温度对水解度的影响

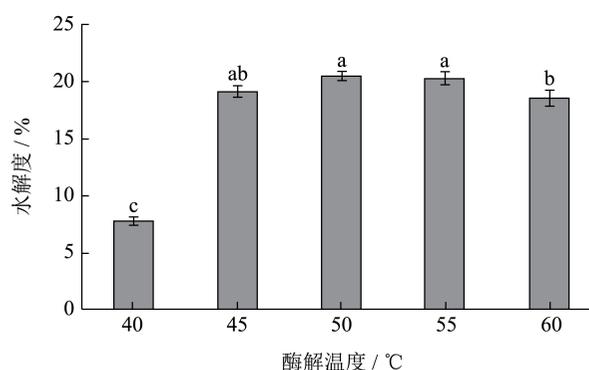


图 4 温度对水解度的影响

Fig.4 Effect of temperature on degree of hydrolysis

如图4所示,随着酶解温度从40℃升高至50℃,水解度也逐渐升高,当酶解温度为50℃时,水解度达到最大值20.49%。在酶解温度45~55℃时,水解度基本趋于稳定。当酶解温度超过50℃时,水解度下降。由于酶的活性受酶解温度的影响,酶在高温条件下可能变性和失活,酶的稳定性下降,其切割肽链的作用减弱^[19]。因此,确定胰蛋白酶制备螺蛳呈味基料的酶解温度为50℃。

2.1.2.4 酶底质量比对水解度的影响

由图5可知,随着酶底质量比的增加,水解度呈先升高后降低的趋势。当酶底质量比从0.16%到0.18%时,水解度随着酶底质量比的增加,水解度逐渐增加,并在酶底质量比为0.18%时水解度达到最大,为21.71%。随着酶用量的增加,底物与酶的接触机会增加,底物固定后,酶促反应也逐渐增强。当酶底物浓度达到饱和时,酶促反应速率达到最大值,因为酶浓度的增加会有一个稳定期,即酶促反应的零级反应。如果酶用量不断增加,体系流动性会变差,影响分子的扩散运动,反应速率会呈下降趋势^[20]。因此,确定胰蛋白酶制备螺蛳呈味基料的酶底质量比为0.18%。

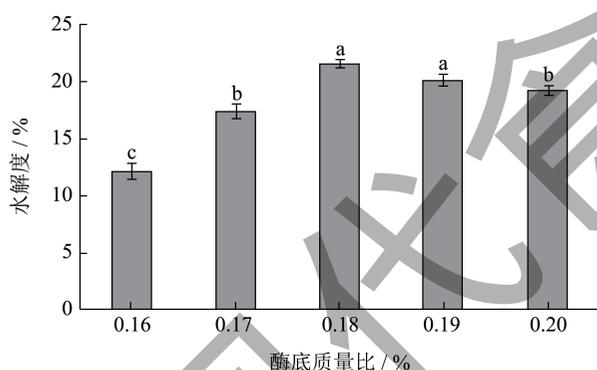


图5 酶底质量比对水解度的影响

Fig.5 Effect of enzyme/substrate mass ratio on degree of hydrolysis

2.1.2.5 料液比对水解度的影响

料液比的变化会导致酶反应体系中酶解物和酶的浓度变化,从而影响整体酶促反应效果。由图6可知,当料液比在1:1 g/mL到1:3 g/mL范围内,随着料液比的增大,水解度增加。当料液比为1:3 g/mL时,水解度达到最大,为20.45%。当料液比大于1:3 g/mL时,水解度随着料液比的增大而减小。由于随着料液比的增大,酶浓度被稀释降低,酶与底物结合几率减小,造成水解度下降。因此,确定胰蛋白酶制备螺蛳呈味基料的酶解料液比为1:3 g/mL。

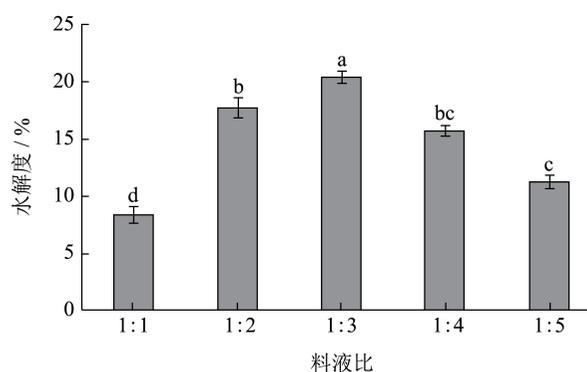


图6 料液比对水解度的影响

Fig.6 Effect of solid-liquid ratio on degree of hydrolysis

2.1.3 响应面优化回归模型与方差分析

根据单因素试验结果,选取酶解pH值、酶底质量比、料液比为自变量,以螺蛳肉酶解水解度为响应值,通过Design Expert 11进行Box-Behnken试验设计来优化这些因素,得到表3响应面优化试验结果。

采用Design Expert 11软件对表3中的数据进行多元回归拟合,得到水解度与三个因素变量的多元二次回归方程为: $DH(\%) = 25.00 + 0.0898A + 1.57B - 3.68C - 1.58AB - 2.26AC - 2.15BC - 4.98A^2 - 2.53B^2 - 4.03C^2$

表3 响应面设计及结果

Table 3 Response surface design and results

试验号	酶解 pH 值 A	酶底质量比 B/%	料液比 C(g/mL)	水解度 Y/%
1	8	0.19	1:2	26.82
2	8	0.17	1:4	14.35
3	8	0.17	1:2	18.32
4	8	0.18	1:3	24.23
5	7.5	0.18	1:4	14.27
6	7.5	0.18	1:2	16.21
7	8.5	0.18	1:2	22.22
8	8.5	0.17	1:3	17.47
9	7.5	0.19	1:3	20.67
10	7.5	0.17	1:3	15.44
11	8	0.18	1:3	24.55
12	8	0.18	1:3	26.95
13	8	0.19	1:4	14.26
14	8.5	0.19	1:3	16.37
15	8	0.18	1:3	23.22
16	8.5	0.18	1:4	11.25
17	8	0.18	1:3	26.04

表 4 回归模型及方差分析

Table 4 Variance analysis for regression equation						
方差来源	平方和 SS	自由度 dF	均方 MS	F 值	Prob>F	显著性
模型	398.23	9	44.25	19.06	0.000 4	**
A	0.064 6	1	0.064 6	0.027 8	0.872 3	
B	19.65	1	19.65	8.46	0.022 7	*
C	108.48	1	108.48	46.72	0.000 2	**
AB	10.01	1	10.01	4.31	0.076 5	
AC	20.37	1	20.37	8.77	0.021 1	*
BC	18.43	1	18.43	7.94	0.025 9	*
A ²	104.43	1	104.43	44.98	0.000 3	**
B ²	27.01	1	27.01	11.63	0.011 3	*
C ²	68.42	1	68.42	29.47	0.001	**
残差	16.25	7	2.32			
失拟项	7.42	3	2.47	1.12	0.439 9	不显著
纯误差	8.83	4	2.21			
总和	414.48	16	C.V.=7.79%			

注: ** 表示影响极显著 ($P < 0.01$), * 表示影响显著 ($P < 0.05$).

对回归模型及方程进行显著性检验, 如表 4 所示。从表 4 水解度方差分析表中可知, 该模型 $P=0.000 4 < 0.001$, 具有极显著性。失拟项 P 值 $0.439 9 > 0.05$, 表明失拟项不显著, 模型拟合程度好, 表明由实验操作等偶然因素对试验的结果影响较小^[21]。变异系数 CV 值为 $7.79\% < 10\%$, 说明试验结果较为可靠^[22]。由回归模型进行显著性检验中的 P 值、 F 值, 可以反映出各个因素对水解度的影响, F 值越大, 则该因素的影响效果越强^[23], 从表 4 中可以看出, 酶底质量比 B 和料液比 C 与水解度之间存在高度显著的交互作用。其中, 料液比呈现极显著影响 ($P < 0.01$), 根据 F 值大小可推测三个因素对水解度的影响程度依次为: 料液比 > 酶底质量比 > 酶解 pH 值。三因素交互作用的 3D 响应曲面图和 2D 等高线图如图 7 所示。从图 7 可以看出酶底质量比和料液比的交互作用最强, 酶解 pH 值和料液比的交互作用次之, 酶解 pH 值和酶底质量比的交互作用最弱。

通过软件预测和分析, 得到胰蛋白酶酶解螺蛳肉制备呈味基料的最佳酶解工艺条件为: 酶解 pH 值 8.031、酶底质量比 0.186%、料液比 1:2.379 g/mL, 水解度为 26.581%。对预测的工艺条件在实际操作进行优化, 验证实验设置条件参数为 pH 值 8.0、酶

底质量比 0.19%、料液比为 1:2 g/mL、酶解温度 50 °C、酶解时间为 3 h。在此条件下, 水解度为 26.680%, 没有显著差异, 证实了预测模型的有效性。

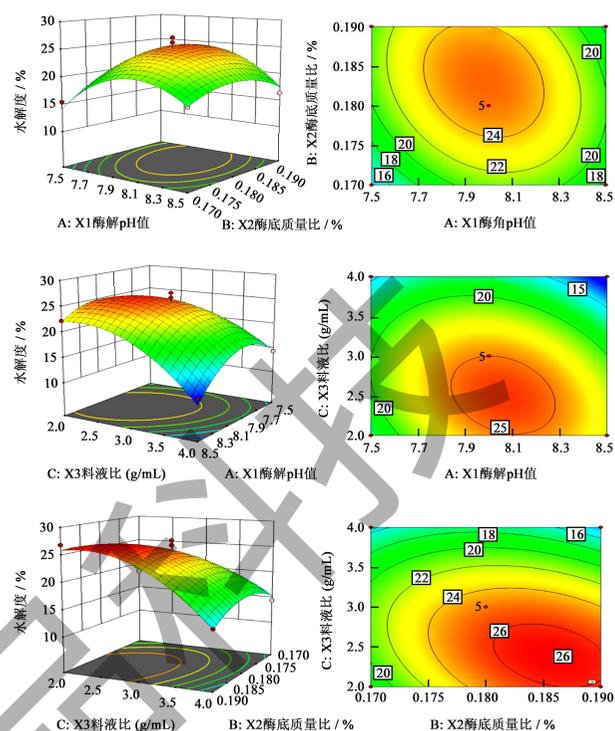


图 7 酶底质量比、料液比、pH 值交互作用对水解度的影响
Fig.7 Effect of the interaction diagram of enzyme/substrate mass ratio, solid-liquid ratio, and pH value to the degree of hydrolysis

2.2 螺蛳呈味基料总氨基酸和游离氨基酸分析

在胰蛋白酶的作用下, 螺蛳肉蛋白质被分解为短肽和游离氨基酸, 对螺蛳呈味基料的非挥发性风味有显著影响。螺蛳呈味基料的总氨基酸和游离氨基酸组成如表 5 所示。

总氨基酸的测定主要是研究其营养特性和潜在风味基础。螺蛳呈味基料总氨基酸共检出 17 种氨基酸, 其中鲜甜味氨基酸为 29.54 g/100 g, 占总氨基酸总量 57.48%。付雪媛等^[24]采用风味蛋白酶酶解北极甜虾头所得的基料, 氨基酸分析其鲜甜味氨基酸占总氨基酸总量的 53.51%。螺蛳呈味基料的鲜味氨基酸含量和氨基酸总量均高于姚玉静等^[25]检测牡蛎酶解产物的氨基酸含量, 说明螺蛳呈味基料具有开发调味料的潜力。谷氨酸含量在总氨基酸含量中最高, 为 10.04 g/100 g。谷氨酸除了作为鲜味氨基酸提供鲜味外, 还能够提升食品的甜味滋味以及滋味的厚度和持久性, 提供圆润饱满的口感。

螺蛳呈味基料除了具有较高的营养价值外,还具有丰富的游离氨基酸。游离氨基酸是风味的主要贡献者之一,这些游离氨基酸不仅自身具有一定的风味能力,而且还能与其他风味物质产生协同效应,影响螺蛳呈味基料的整体风味^[26]。由表5可知,螺蛳呈味基料游离氨基酸总量为10.93 g/100 g。说明螺蛳肉蛋白在酶的作用下被分解成小分子肽和氨基酸等产物,提高风味滋味物质。在螺蛳呈味基料游离氨基酸中精氨酸含量最高,为3.23 g/100 g。Zhang等^[27]发现精氨酸与蔗糖、味精溶液在暗纹东方鲀的鲜味评价中呈现协同作用,添加精氨酸可以增强蔗糖的感知效果,并提升鲜味、咸味和苦味的强度,有助于产生整体愉悦的味道。综上所述,螺蛳呈味基料不仅具有很高的营养价值,而且风味良好,有望作为呈鲜调味料的原料基料。

表5 螺蛳呈味基料总氨基酸含量分析

Table 5 Analysis of total amino acid content of the flavor base material of snails

氨基酸种类	总氨基酸含量/(g/100 g)	游离氨基酸含量/(g/100 g)
谷氨酸 (Glu) #	10.04	0.13
天冬氨酸 (Asp) #	5.79	0.02
丙氨酸 (Ala) #	3.64	0.21
甘氨酸 (Gly) #	3.44	0.02
苏氨酸 (Thr) **	2.58	0.30
丝氨酸 (Ser) #	2.21	0.12
脯氨酸 (Pro) #	1.84	0.21
精氨酸 (Arg)	2.25	3.23
组氨酸 (His)	1.05	0.10
蛋氨酸 (Met)	1.01	0.31
异亮氨酸 (Ile) *	2.02	0.46
苯丙氨酸 (Phe) *	1.58	0.99
缬氨酸 (Val) *	2.54	0.51
亮氨酸 (Leu) *	4.31	1.76
胱氨酸 (Cys)	1.75	0.21
赖氨酸 (Lys)	3.63	1.18
酪氨酸 (Tyr)	1.71	1.17
鲜甜味氨基酸含量	29.54	1.01
必需氨基酸含量 EAA	13.03	4.02
氨基酸总量 TAA	51.39	10.93
EAA/TAA	25.36	36.78

注:“#”表示鲜甜味氨基酸;“*”表示必需氨基酸;“—”表示未检出。

2.3 螺蛳呈味基料感官评价

在最优酶解条件下制备的螺蛳呈味基料颜色呈黄褐色,质地澄清透明,螺蛳特征香气和鲜味(6.64)明显,味道鲜美,有少许苦涩味(5.8),具有典型的螺蛳风味。具体感官评分如图8所示。螺蛳呈味基料含有丰富的谷氨酸和较高鲜甜味氨基酸总量,是螺蛳呈味基料呈现鲜味的主要原因。少量的苦涩味可能与呈味基料中较高的疏水性氨基酸含量有关。

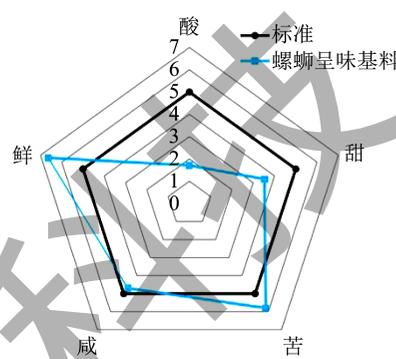


图8 螺蛳呈味基料的感官评价

Fig.8 Sensory evaluation of the flavor base material of snails

2.4 酶解型螺蛳粉汤料风味调配

由图9a可知,将不同质量浓度的螺蛳呈味基料溶解在原汤(质量分数)中,探究螺蛳呈味基料质量浓度对酶解型螺蛳粉汤料基料感官评价的影响,分别从外观、气味、滋味、总分四个部分对其进行感官评价。在螺蛳呈味基料质量浓度为25 g/L时,感官总分(86)最高,所制作出的螺蛳粉汤料螺蛳特征香气浓郁,口感饱满圆润。随着添加的螺蛳呈味基料质量浓度增加,外观和气味变化无显著差异,滋味和感官总分呈逐渐降低趋势。主要原因是在低质量浓度时螺蛳呈味基料已呈现出十分浓郁的特有风味,质量浓度过高反而会出现苦味。因此,酶解式螺蛳粉汤料的螺蛳呈味基料质量浓度选择为25 g/L。

选择盐、糖和味精设置单因素实验对螺蛳粉汤料进行风味调配,结果见图9。可以看出,随着调味料质量分数的增加,感官评分都呈先增加后减少的趋势。由图9b可知,盐带来的咸味给螺蛳粉汤料增加底味,当盐质量分数超过3%时,咸味过重导致感官评分降低。由图9c可知,适当的甜味能增加鲜味的强度和降低苦味,当糖质量分数超过1.25%时,螺蛳粉汤料口感变得甜腻,产品的口感协调性降低,也不符合传统螺蛳粉汤料的咸鲜味型。由图9d可得,味精质量分数超过1.5%时,螺蛳粉汤

料的感官评分降低, 由于味精加入过多, 口感变得鲜涩, 产生口干的不适感觉^[28]。所以, 综上所述, 酶解型螺蛳粉汤料调味料选择盐、糖和味精的添加质量分数分别为 3%、1.25% 和 1.5%。

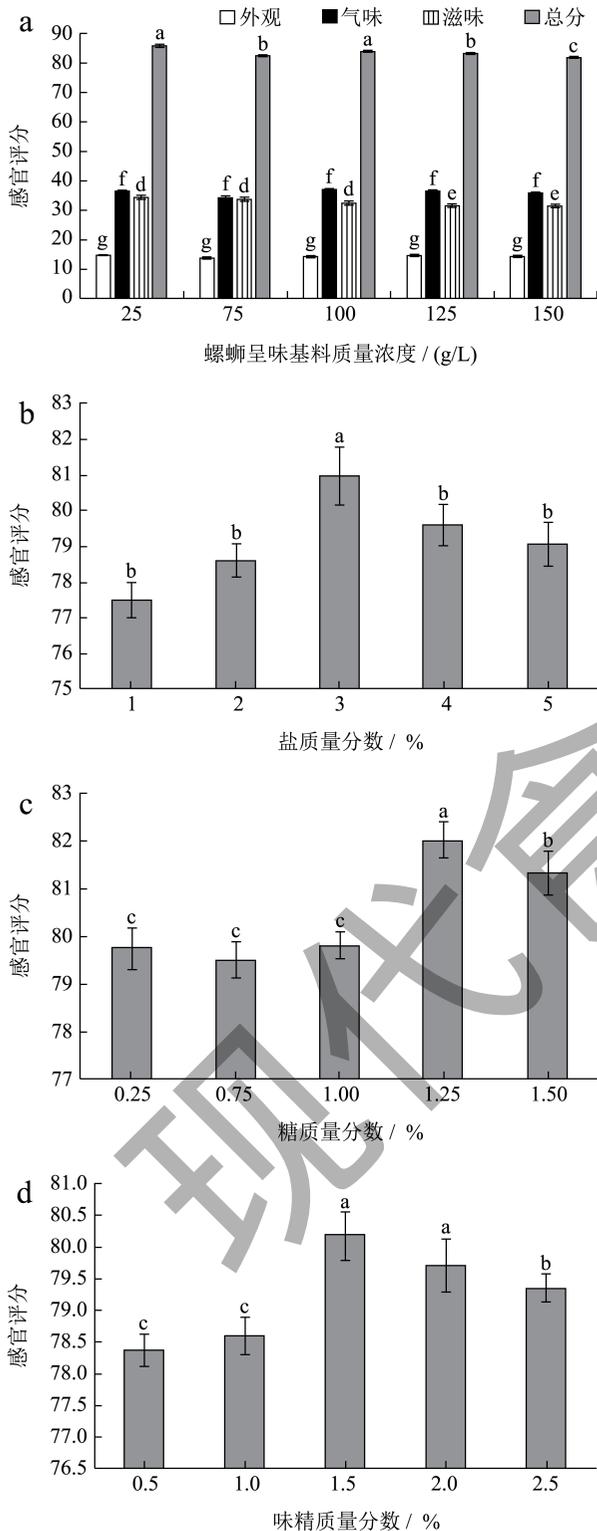


图 9 风味调配对酶解型螺蛳粉汤料感官影响

Fig.9 Effect of flavor distribution on the sensory quality of enzymolysis snail soup

2.5 酶解型螺蛳粉汤料与水煮型螺蛳粉汤料感官评价及氨基酸组成对比分析

由图 10 可知, 酶解型螺蛳粉汤料从外观 (15)、气味 (37) 和滋味 (34) 的感官评分都显著高于水煮型螺蛳粉汤料 ($P < 0.05$), 证明酶解型螺蛳粉汤料比传统水煮型的螺蛳粉汤料拥有更好的滋味效果, 而且酶解式的螺蛳粉汤料基料制作简单高效, 节约大量的人力和能源成本, 在未来食品开发中拥有广阔的前景。

由表 6 可知, 水煮型螺蛳粉汤料与酶解式螺蛳粉汤料总氨基酸分析中均检出 17 种氨基酸。酶解型和水煮型螺蛳粉汤料鲜甜味总氨基酸总量分别为 17.28 g/100 g 和 13.48 g/100 g, 其中谷氨酸含量最高, 分别为 4.82 g/100 g 和 3.04 g/100 g。说明酶解可提升谷氨酸等鲜味氨基酸的呈味作用, 提升螺蛳粉汤料的鲜味, 使整体风味更佳。

由表 6 可知, 酶解型螺蛳粉汤料游离氨基酸总含量 142.21 mg/100 g, 是水煮型的 8.46 倍, 表明酶解可以将螺肉中更多的蛋白质酶解成游离氨基酸, 提高了蛋白质的利用率和汤料的风味价值。Umayaparvathi 等^[29]发现牡蛎酶解产物富含甘氨酸和谷氨酸等鲜味氨基酸, 使得牡蛎具有鲜甜的滋味。酶解型螺蛳汤料游离谷氨酸和天冬氨酸含量分别为 10.25 mg/100 g 和 2.97 mg/100 g, 分别是水煮型螺蛳粉汤料的 2.19 和 3.23 倍。相关研究表明, 鲜甜味氨基酸可以赋予食物鲜味的滋味, 鲜甜味氨基酸的含量与食物的鲜味味道呈正相关。高含量的鲜甜味氨基酸使食物更加美味^[30]。酶解型螺蛳粉汤料游离必需氨基酸含量和游离鲜甜味氨基酸总量分别为 78.27 mg/100 g 和 35.02 mg/100 g, 酶解型螺蛳粉汤料在风味价值和营养价值都明显优于水煮型螺蛳粉汤料。

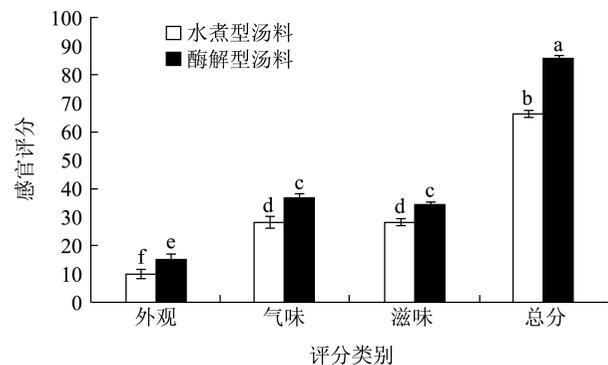


图 10 水煮型汤料与酶解型汤料滋味对比

Fig.10 Comparison of taste between boiled and enzymatic soup

表 6 两种汤料氨基酸含量比较

Table 6 Comparison of acid contents in two kinds of soup

氨基酸种类	游离氨基酸含量 (mg/100 g)		总氨基酸含量 (g/100 g)	
	水煮型	酶解型	水煮型	酶解型
谷氨酸 (Glu) #	4.67	10.25	3.04	4.82
天冬氨酸 (Asp) #	0.92	2.97	1.43	2.59
丙氨酸 (Ala) #	2.80	9.78	2.32	2.63
甘氨酸 (Gly) #	1.67	2.52	3.75	3.42
胱氨酸 (Cys)	0.01	0.85	0.49	1.07
苏氨酸 (Thr) **	0.69	7.28	0.55	1.03
丝氨酸 (Ser) #	0.29	1.64	1.90	1.72
酪氨酸 (Tyr)	0.43	17.42	1.42	1.43
脯氨酸 (Pro) #	0.21	0.58	0.76	0.86
缬氨酸 (Val) #	0.69	8.51	0.18	0.48
精氨酸 (Arg)	0.78	5.34	0.37	0.90
组氨酸 (His)	0.32	4.08	0.34	0.64
蛋氨酸 (Met) *	0.24	6.04	0.58	1.18
苯丙氨酸 (Phe) *	0.41	14.27	0.85	1.81
亮氨酸 (Leu) *	0.85	26.71	0.63	0.80
异亮氨酸 (Ile) *	0.48	8.29	0.92	1.65
赖氨酸 (Lys) *	1.00	15.68	0.19	0.65
鲜甜味氨基酸总量	11.25	35.02	13.48	17.28
必需氨基酸含量 EAA	3.67	78.27	3.73	7.12
氨基酸总量 TAA	16.46	142.21	19.72	27.68
EAA/TAA	22.30	55.04	18.91	25.72

注：“#”表示鲜甜味氨基酸；“*”表示必需氨基酸。

3 结论

本实验通过优化螺蛳酶解工艺，在单因素试验的基础上，通过响应面法进行优化，确定了最佳酶解工艺为胰蛋白酶底质量比为 0.19%、料液比为 1:2 g/mL、酶解温度为 50 ℃、酶解 pH 值为 8.0、酶解时间为 3 h。螺蛳呈味基料味道鲜美，具有传统螺蛳汤料特征风味，其中必需氨基酸占总氨基酸总量 25.36%，鲜甜味氨基酸占总氨基酸总量的 57.48%，游离氨基酸总量为 10.93 g/100 g。通过优化螺蛳肉酶解工艺制备螺蛳呈味基料，并在此基础上开发为酶解型螺蛳粉汤料，其游离氨基酸总含量 142.21 mg/100 g，是水煮型的 8.46 倍。相比于传统水煮法具有更高的螺蛳资源利用率，为产业化袋装螺蛳粉汤料包的开发提供了工艺参数和新思路。后续将其多肽和呈味小分子组成的呈味物质基础和呈味机制深入研究。

参考文献

- [1] 兰青叶,谢德富,杨明.柳州螺蛳粉在东盟国家跨境电商平台营销策略研究[J].法制与经济,2022,31(1):110-116.
- [2] 卿明义,王丽凤,黄海,等.柳州螺蛳粉汤料高压熬汤工艺的研究[J].食品安全导刊,2022,22:116-120.
- [3] 郑艳燕,陈瑶,邓香,等.南宁市售螺蛳粉中亚硝酸盐含量的检测及食用安全性分析[J].现代食品,2020,17:213-215.
- [4] ZHANG L, MIAO J, GUO J, et al. Two novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from rice (*Oryza sativa* L.) bran protein [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(9): 4153-4162.
- [5] YE H, XU Y, SUN Y, et al. Purification, identification, and hypolipidemic activities of three novel hypolipidemic peptides from tea protein [J]. Food Research International, 2023, 165: 112450.
- [6] CHEN B, MIAO J, YE H, et al. Purification, identification, and mechanistic investigation of novel selenium-enriched antioxidant peptides from *Moringa oleifera* seeds [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(11): 4625-4637.
- [7] WEN L, JIANG Y, ZHOU X, et al. Structure identification of soybean peptides and their immunomodulatory activity [J]. Food Chemistry, 2021, 359: 129970.
- [8] DONG X, WAN C, HUANG A, et al. Novel umami peptides from *Hypsizygus marmoreus* and interaction with umami receptor T1R1/T1R3 [J]. Foods, 2023, 12(4): 703.
- [9] CHEN M, PAN D, ZHOU T, et al. Novel umami peptide IPIPATKT with dual dipeptidyl peptidase-IV and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(19): 5463-5470.
- [10] CHEN R, LIU X, XIANG J, et al. Prospects and challenges for the application of salty and saltiness-enhancing peptides in low-sodium meat products [J]. Meat Science, 2023, 204: 109261.
- [11] 甘瑞卿,何燕富,李永成,等.罗非鱼副产物蛋白水解肽的呈味分析[J].现代食品科技,2022,38(7):291-300.
- [12] LIU Z, ZHU Y, WANG W, et al. Seven novel umami peptides from *Takifugu rubripes* and their taste characteristics [J]. Food Chemistry, 2020, 330: 127204.
- [13] SUN Y, ZHANG M, FANG Z. Efficient physical extraction of active constituents from edible fungi and their potential bioactivities: A review [J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 105: 468-482.
- [14] 唐霄,孙杨赢,江雪婷,等.不同蛋白酶制备鹅肉呈味肽的对比分析[J].食品科学,2019,40(22):141-146.
- [15] 沈金鹏,王珂雯,黄潘钿,等.珍珠贝水解肽的制备、氨基酸组成及抗炎活性[J].食品与机械,2023,39(2):132-

- 139,206.
- [16] GB/T 5009.124-2016,食品安全国家标准食品中氨基酸的测定[S].
- [17] SHEN Q, SUN L, HE Z, et al. Isolation, taste characterization and molecular docking study of novel umami peptides from *Lactarius volemus* (Fr.) [J]. Food Chemistry, 2023, 401: 134137.
- [18] JIANG L, HUA D, WANG Z, et al. Aqueous enzymatic extraction of peanut oil and protein hydrolysates [J]. Food and Bioproducts Processing, 2010, 88(2-3): 233-238.
- [19] GUÉRARD F, GUIMAS L, BINET A. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2002, 19: 489-498.
- [20] WANG S, LIU F, WU J, et al. Study on optimization of extraction process and resistance to oxidation of polypeptide from sea cucumber waste liquid [C]// IOP Conference Series: Earth and Environmental Science: IOP Publishing, 2020: 12025.
- [21] 李莉,张赛,何强,等.响应面法在试验设计与优化中的应用.[J].实验室研究与探索,2015,34(8):41-45.
- [22] 侯珮琳,赵肖通,张彦青,等.绿豆蛋白降血脂水解物的制备及纯化工艺[J].食品工业科技,2020,41(9):186-192.
- [23] 赵丛枝,寇天舒,张子德.发酵型无花果果酒加工工艺的研究[J].食品研究与开发,2014,35(13):79-82.
- [24] 付雪媛,郭晓华,董浩,等.不同工艺下北极甜虾头调味基料的特征风味分析[J].中国调味品,2023,48(4):90-95.
- [25] 姚玉静,杨昭,黄佳佳,等.复合酶深度酶解牡蛎制备呈味基料的研究[J].食品与机械,2017,33(6):180-184,206.
- [26] CHEN Z, GAO H, WU W, et al. Effects of fermentation with different microbial species on the umami taste of Shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) [J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 141: 110889.
- [27] ZHANG N, WANG W, LI B, et al. Non-volatile taste active compounds and umami evaluation in two aquacultured pufferfish (*Takifugu obscurus* and *Takifugu rubripes*) [J]. Food Bioscience, 2019, 32: 100468.
- [28] 高巍,罗之纲.味精的安全性评估[J].中国调味品,2009, 34(7):31-33.
- [29] UMAPARVATHI S, MEENAKSHI S, VIMALRAJ V, et al. Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptide from enzymatic hydrolysate of oyster (*Saccostrea cucullata*) [J]. Biomedicine & Preventive Nutrition, 2014, 4(3): 343-353.
- [30] 程泽宇,赵佳锐,肖翰,等.单环刺螠的活性成分及其在调味品开发中的应用研究进展[J].食品科技,2020,45(4): 253-258.