

兰茂牛肝菌酶解液的制备工艺优化及滋味评价

张沙沙¹, 杨宁², 张微思¹, 罗晓莉¹, 周锴¹, 曹晶晶¹, 孙达锋^{1*}

(1. 中华全国供销合作总社昆明食用菌研究所, 云南昆明 650221)

(2. 云南省食用菌产业发展研究院, 云南昆明 650221)

摘要: 为了提高兰茂牛肝菌利用率和附加值, 以氨基酸态氮含量为指标, 在单因素试验基础上采用正交试验优化中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、风味蛋白酶酶解条件和复配配比, 采用全自动氨基酸分析仪和高效液相色谱技术对酶解液中游离氨基酸、有机酸、呈味核苷酸等滋味成分进行分析, 结合味觉活性值 (Taste Activity Value, TAV) 和等效鲜味浓度 (Equivalent Umami Concentration, EUC) 评价。结果表明, 最优酶解工艺为: 料液比 1:20 (*m/m*), pH 值为 7.0, 温度为 50 °C, 时间为 1.5 h, 中性蛋白酶、风味蛋白酶和木瓜蛋白酶添加量分别为 0.60%、0.90%、4.70% (以兰茂牛肝菌粉计, *m/m*), 此条件下获得的兰茂牛肝菌酶解液的氨基酸态氮为 124.01 mg/100 mL、游离氨基酸总量为 12.33 mg/g、呈味核苷酸总量为 96.48 μg/g、有机酸总量为 4 511.59 μg/g, EUC 值为 2.46 g MSG/100 g。因此, 兰茂牛肝菌经最优工艺酶解后得到的酶解液味道鲜美, 营养丰富, 满足人们的需求, 为兰茂牛肝菌的精深加工提供了理论基础。

关键词: 兰茂牛肝菌; 蛋白酶; 酶解液; 滋味

文章编号: 1673-9078(2023)09-72-80

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.9.1113

Preparation Process Optimization and Taste Evaluation of *Lanmaoa asiatica* Enzymatic Hydrolysate

ZHANG Shasha¹, YANG Ning², ZHANG Weisi¹, LUO Xiaoli¹, ZHOU Pei¹, CAO Jingjing¹, SUN Dafeng^{1*}

(1. Kunming Edible Fungi Institute of All China Federation of Supply and Marketing Cooperatives, Kunming 650221, China) (2. Yunnan Academy of Edible Fungi Industry Development, Kunming 650221, China)

Abstract: In order to improve the utilization rate and added value of *Lanmaoa asiatica*, the enzymatic hydrolysis conditions and compound ratio of neutral protease, papain and flavor protease were optimized by using amino acid nitrogen as the indicator and by the orthogonal test on the basis of single factor experiments. Then, amino acid automatic analyzer and high performance liquid chromatography were used to analyze the tasting substances such as free amino acids, organic acids and flavor-active nucleotides in the the hydrolysate, in combination with the evaluation of taste activity value (TAV) and equivalent umami concentration (EUC). The results showed that the optimal enzymatic hydrolysis process was: material-liquid ratio, 1:20 (*m/m*); pH, 7.0; temperature, 50 °C; time, 1.5 h; addition amounts of neutral protease, flavor protease and papain (by weight ratio), 0.60%, 0.90% and 4.70%, respectively. Under such conditions, the amino acid nitrogen of the enzymatic hydrolysate was 124.01 mg/100 mL, the total amount of free amino acids was 12.33 mg/g, total amount of flavor-active nucleotides was 96.48 μg/g, total amount of organic acids was 4 511.59 μg/g, and EUC value was 2.46 g MSG/100 g. Therefore, the *Lanmaoa asiatica* enzymatic hydrolysate prepared through the optimal process was delicious and nutritious, which meets people's needs. This study provides a theoretical basis for the further processing of *Lanmaoa asiatica*.

Key words: *Lanmaoa asiatica*; protease; enzymatic hydrolysate; taste

引文格式:

张沙沙, 杨宁, 张微思, 等. 兰茂牛肝菌酶解液的制备工艺优化及滋味评价[J]. 现代食品科技, 2023, 39(9): 72-80

ZHANG Shasha, YANG Ning, ZHANG Weisi, et al. Preparation process optimization and taste evaluation of *Lanmaoa asiatica* enzymatic hydrolysate [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(9): 72-80

收稿日期: 2022-09-05

基金项目: 云南省科技厅创新引导与科技型企业培育计划项目 (202104AR040011); 云南省重大科技专项计划项目 (202002AE320003; 202002AE320003-04)

作者简介: 张沙沙 (1985-), 女, 硕士, 副研究员, 研究方向: 食用菌加工与贮藏, E-mail: 540747056@qq.com

通讯作者: 孙达锋 (1977-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 食用菌, E-mail: 2942336@qq.com

兰茂牛肝菌 (*Lanmaoa asiatica*), 隶属于牛肝菌科 (Boletaceae)、兰茂牛肝菌属 (*Lanmaoa*), 盛产于云南、贵州等地, 俗称“红葱”^[1]。兰茂牛肝菌营养丰富, 其子实体粗蛋白含量为 56%、粗纤维 17%、氨基酸总量为 33.40%、矿物质元素为 3 820 mg/kg、粗多糖 7.20%^[2]。兰茂牛肝菌滋味鲜爽, 具有独特而浓郁的香气, 深受当地人喜爱, 目前以鲜食为主, 其组织脆嫩, 易腐烂变质, 保藏困难^[3]。但是兰茂牛肝菌有微毒性, 烹饪不当可能导致恶心、呕吐、产生幻觉等症状, 经适当加热处理后毒性减弱或消失^[4-6], 因此对兰茂牛肝菌进行深加工, 提取其滋味成分制作调味品, 为广大消费者提供方便快捷、安全的兰茂牛肝菌制品。

人们为有效提高牛肝菌呈味物质释放率, 增加呈味作用较为明显的小分子物质含量, 在产品加工中会采用超声、酶解等多种提取方法^[7,8]。其中, 酶解法是比较常用的生物提取法, 具有污染小、耗能低、反应可控等优点^[9]。刘佳等^[10]利用白牛肝菌边角料, 采用正交试验优化白牛肝菌边角料酶解工艺, 其蛋白质水解度为 20.16%。黄典等^[11]以美味牛肝菌为试验材料, 通过响应面法优化酶解工艺, 制得的酶解液水解度为 34.12%, DPPH·清除率为 55.91%。本团队在新鲜兰茂牛肝菌呈味物质研究中, 发现兰茂牛肝菌含有丰富的氨基酸、呈味核苷酸、有机酸等可溶性呈味物质, 是一种较好的鲜味物质来源^[12]。但尚不清楚兰茂牛肝菌酶解液的滋味成分。

本文以兰茂牛肝菌为试验材料, 以氨基酸态氮含量为指标, 研究中性蛋白酶、风味蛋白酶、木瓜蛋白酶酶解兰茂牛肝菌的最适条件和添加量, 分析酶解产物的游离氨基酸、呈味核苷酸、有机酸等非挥发性风味物质组成及含量, 为满足人们的需求, 丰富兰茂牛肝菌精深加工产品类型, 提高产品附加值提供重要理论基础。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

兰茂牛肝菌鲜品, 统货, 购于昆明木水花野生菌交易市场。

50 000 U/g 中性蛋白酶、30 000 U/g 木瓜蛋白酶, 南宁庞博生物工程有限公司; 50 000 U/g 风味蛋白酶, 沧州夏盛酶生物技术有限公司。氢氧化钠容量分析用标准溶液, 坛墨质检科技股份有限公司; 甲醛溶液, 西陇科学股份有限公司; HPLC 级甲醇溶液、HPLC 级乙腈溶液, 上海百灵威化学技术有限公司; 呈味核苷酸标准品、酒石酸等 8 种有机酸标准品, 上海源叶生物科技有限公司; 盐酸 (体积分数 $\geq 36\%$), 优级纯, 重庆川东化工 (集团) 有限公司; 氮气 (纯度 99.9%), 昆明石头人气体产品有限公司; 缓冲溶液, 英国 biochrom 公司; 氢氧化钠 (优级纯), 西陇化工试剂有限公司; 苯酚 (优级纯)、氨基酸标准品溶液 (纯度 $\geq 99.9\%$), 默克化工技术 (上海) 有限公司。

1.2 主要仪器设备

5HG-0.3CK 果蔬烘干机, 云南种业集团有限责任公司; EasyPlus Titrator ET18 自动电位滴定仪、FiveEasy Plus FE28 pH 计, 梅特勒-托利多仪器有限公司; HH-6 恒温水浴锅, 上海立辰科技有限公司; HR/T20MM 离心机, 湖南赫西仪器装备有限公司; TYM-30L 超微粉碎机, 济南天宇专用设备有限公司; RIGOL L-3000 高效液相色谱仪, 北京普源精仪科技有限责任公司; HT190R 高速冷冻离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; MIX-25 旋涡混合器, 杭州佑宁仪器有限公司; Biochrom 30+ 全自动氨基酸分析仪, 英国 biochrom 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 酶解液制备

新鲜兰茂牛肝菌干燥后, 采用超微粉碎机粉碎 20 min, 按料液比 1:20 (*m/m*) 加水溶解, 选取中性蛋白酶、风味蛋白酶、木瓜蛋白酶用于兰茂牛肝菌的酶解, 酶添加量 (以兰茂牛肝菌粉计, *m/m*)、pH 值、酶解温度、酶解时间见表 1~6, 酶解结束后 100 °C 灭酶 5 min, 离心 (4 000 r/min、60 °C、15 min) 取上清液备用, 酶解液制备重复 3 次。

1.3.2 酶解液制备单因素试验

表 1 单因素试验因素水平表

Table 1 Factor level design table of single factor test

酶种类	酶添加量/%	pH 值	酶解温度/°C	酶解时间/h
中性蛋白酶	0.40、0.60、0.80、1.00、1.20	6.0、6.5、7.0、7.5、8.0	45、50、55、60、65	1.0、2.0、3.0、4.0、5.0
风味蛋白酶	0.40、0.60、0.80、1.00、1.20	5.0、5.5、6.0、6.5、7.0	45、50、55、60、65	1.0、2.0、3.0、4.0、5.0
木瓜蛋白酶	3.10、3.40、3.70、4.00、4.30	5.0、5.5、6.0、6.5、7.0	45、50、55、60、65	0.5、1.0、1.5、2.0、2.5

1.3.3 酶解液制备正交试验设计

在单因素试验基础上,中性蛋白酶、风味蛋白酶、木瓜蛋白酶分别选取 pH 值、时间、酶添加量、温度四个因素设计 $L_9(3^4)$ 正交试验,以氨基酸态氮含量为指标分别确定最佳酶解条件(见表 2~表 4)。

表 2 中性蛋白酶正交试验因素水平表

Table 2 Factor levels of orthogonal test of neutral protease

水平	因素			
	酶添加量/%	pH 值	温度/°C	时间/h
1	0.70	7.0	45	2.5
2	0.80	7.5	50	3.0
3	0.90	8.0	55	3.5

表 3 风味蛋白酶正交试验因素水平表

Table 3 Factor levels of orthogonal test of flavoring protease

水平	因素			
	酶添加量/%	pH 值	温度/°C	时间/h
1	0.70	6.0	48	2.5
2	0.80	6.5	50	3.0
3	0.90	7.0	52	3.5

表 4 木瓜蛋白酶正交试验因素水平表

Table 4 Factor levels of orthogonal test of papain

水平	因素			
	酶添加量/%	pH 值	温度/°C	时间/h
1	3.40	6.0	50	1.0
2	3.70	6.5	55	1.5
3	4.00	7.0	60	2.0

1.3.4 三种酶复配条件的确定

1.3.4.1 复合酶复配酶解条件优化

基于三种酶的正交试验结果,选取中性蛋白酶、风味蛋白酶、木瓜蛋白酶添加量 (m/m) 分别为 0.70%、0.90%、3.70%,以氨基酸态氮为指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验将三种蛋白酶酶解条件进行复配(见表 5)。

表 5 复合酶解条件正交试验因素水平表

Table 5 Factor levels of orthogonal test of complex enzyme

水平	因素		
	pH 值	温度/°C	时间/h
1	6.5	45	1.5
2	7.0	50	2.5
3	7.5	55	3.5

1.3.4.2 复合酶添加比例优化

在 pH 值 7.0、温度 50 °C、时间 1.5 h 的条件下,以中性蛋白酶、风味蛋白酶、木瓜蛋白酶三种酶添加量 (m/m) 为因子,氨基酸态氮为指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验将三种蛋白酶进行复配(见表 6)。

表 6 复合酶添加比例正交试验因素水平表

Table 6 Factor levels of orthogonal test of complex enzyme

水平	因素		
	中性蛋白酶/%	风味蛋白酶/%	木瓜蛋白酶/%
1	0.60	0.80	2.70
2	0.70	0.90	3.70
3	0.80	1.00	4.70

1.3.5 氨基酸态氮含量测定

参照 GB 5009.235-2016《食品中氨基酸态氮的测定》,采用自动电位滴定仪测定。

1.3.6 氨基酸测定

参照 GB 5009.124-2016《食品中氨基酸的测定》,采用全自动氨基酸分析仪测定。

1.3.7 呈味核苷酸、有机酸含量测定

参照孙达锋等^[12]的方法。

1.3.8 滋味贡献评价

采用味觉活性值 (TAV) 法评价呈味物质对兰茂牛肝菌酶解液滋味的贡献, TAV 指样品中各呈味物质的测定值与该物质味道阈值之比^[13],计算见公式 (1)。

$$TAV = \frac{C1}{C2} \quad (1)$$

式中:

C1——滋味化合物的含量, mg/g;

C2——为滋味阈值浓度, mg/g。

1.3.9 等效鲜味浓度分析

Yamaguchi 等^[14,15]提出用等效鲜味浓度 (EUC) 来评价食品的呈鲜味作用。EUC 值越大,表示食品鲜味越强。计算公式见公式 (2)。

$$EUC = \sum a_i b_i + 1218 \times (\sum a_i b_i) \times (\sum a_j b_j) \quad (2)$$

式中:

EUC——等效鲜味浓度, g MSG/100 g;

a_i ——呈鲜氨基酸 (谷氨酸或天冬氨酸) 的质量, g/100 g;

a_j ——呈味核苷酸 (5'-AMP、5'-IMP、5'-GMP) 的质量, g/100 g;

b_i ——呈鲜氨基酸相对谷氨酸的值 (谷氨酸=1.00、天冬氨酸=0.077);

b_j ——呈味核苷酸相对 5'-IMP 的值 (5'-IMP=1.00、5'-AMP=0.18、5'-GMP=2.30);

1 218——协同作用常数。

1.4 数据分析

试验数据采用 Excel 处理, GraphPad prism5 做差异性分析及作图。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 酶添加量对三种蛋白酶酶解效果的影响

酶添加量过少会导致底物酶解不彻底,氨基酸态氮含量过低,但酶添加过多又会导致底物过度酶解,部分以氮形式存在的氨基酸也有可能被进一步分解,导致氨基酸态氮含量的降低。由图1可知,三种蛋白酶酶解液的氨基酸态氮含量均随着酶添加量的增加呈先上升后下降的趋势,所以选取中性蛋白酶、风味蛋白酶、木瓜蛋白酶最适添加量(m/m)分别为0.80%、0.80%、3.70%。

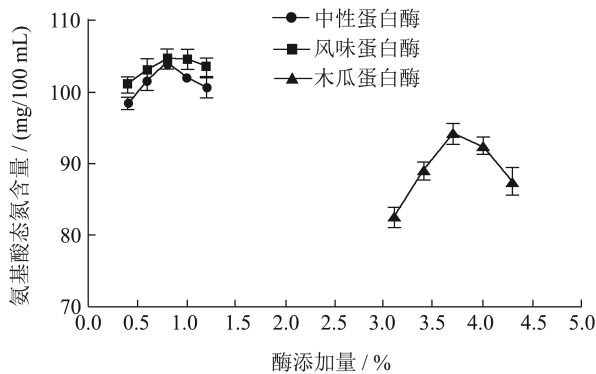


图1 酶添加量对三种蛋白酶酶解液氨基酸态氮含量的影响

Fig.1 Effects of enzyme dosage on amino acid nitrogen content of enzymatic hydrolysate

2.1.2 pH 值对三种蛋白酶酶解效果的影响

不同的蛋白酶其最适 pH 值不同,对于不同的酶解底物,其所需 pH 值也会略有改变。由图2可知,三种蛋白酶酶解液的氨基酸态氮含量随着 pH 值的升高呈先升高后下降的趋势。因此中性蛋白酶、风味蛋白酶、木瓜蛋白酶最适 pH 值分别为: 7.5、6.5、6.5。

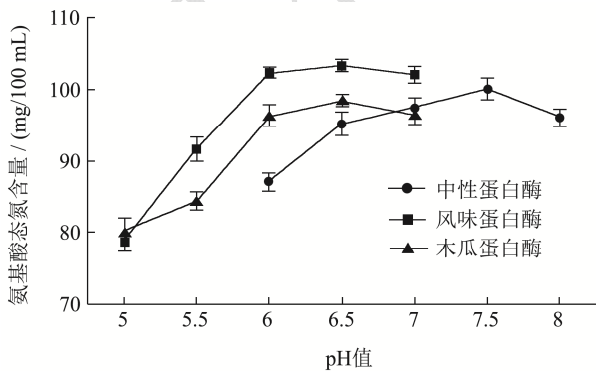


图2 pH 值对三种蛋白酶酶解液的氨基酸态氮含量的影响

Fig.2 Effects of pH values on amino acid nitrogen content of enzymatic hydrolysate

2.1.3 酶解温度对三种蛋白酶酶解效果的影响

酶解温度影响酶的活性及酶催化反应的进程。由

图3可知,三种蛋白酶酶解液的氨基酸态氮含量均随着温度的升高呈先上升后降低的趋势。因此,中性蛋白酶、风味蛋白酶、木瓜蛋白酶最适温度分别为: 50、50、55 °C。

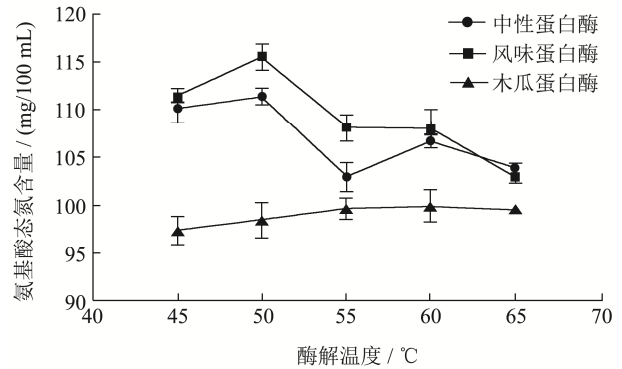


图3 酶解温度对三种酶酶解液氨基酸态氮含量的影响

Fig.3 Effects of temperature on amino acid nitrogen content of enzymatic hydrolysate

2.1.4 酶解时间对三种蛋白酶酶解效果的影响

由图4可知,酶解液中氨基酸态氮的含量随着酶解时间的延长而增加,但到达一定值时,氨基酸态氮含量则随着时间的延长开始减少,这可能是因为酶对底物的酶解是逐渐进行的,需要经过一定时间,但酶解时间过长,会使部分以氮形式存在的氨基酸被水解,导致氨基酸态氮含量进一步降低。因此,中性蛋白酶、风味蛋白酶、木瓜蛋白酶选取的最适酶解时间分别为: 3.0、3.0、1.5 h。

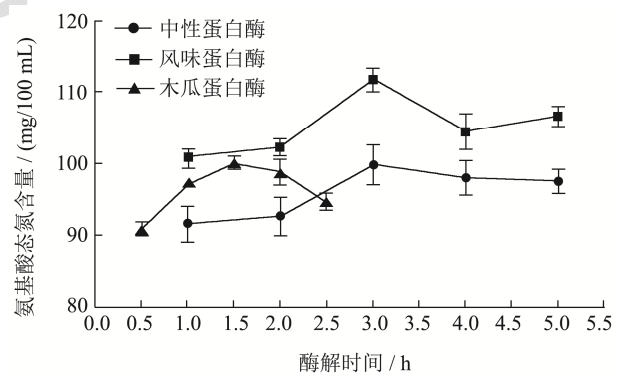


图4 酶解时间对三种蛋白酶酶解液的氨基酸态氮含量的影响

Fig.4 Effects of time on amino acid nitrogen content of enzymatic hydrolysate

2.2 正交试验结果与分析

2.2.1 单一蛋白酶正交试验优化

由表7可知,中性蛋白酶酶添加量、pH 值、温度、时间四个因素对氨基酸态氮含量的影响顺序为时间>温度>pH 值>酶添加量,最佳工艺组合为A1B2C2D1,即酶添加量 0.70%、pH 值 7.5、温度 50 °C、酶解时间 2.5 h。在该条件下进行验证试验,酶解液氨基酸态氮含

量为 113.72 mg/100 mL。风味蛋白酶四个因素对氨基酸态氮的影响顺序为 pH 值>时间>温度>酶添加量, 最佳工艺组合为 A3B3C1D3, 即酶添加量 0.90%、pH 值 7.0、温度 48 ℃、时间 3.5 h, 在该条件下进行验证试验, 兰茂牛肝菌酶解液氨基酸态氮含量为 115.65 mg/100 mL。

木瓜蛋白酶四个因素对氨基酸态氮的影响顺序为 pH 值>温度>酶添加量>时间, 最佳工艺 A2B3C2D2, 即酶添加量 3.70%、pH 值 7.0、温度 55 ℃、时间 1.5 h, 在该条件下进行木瓜蛋白酶酶解验证试验, 兰茂牛肝菌酶解液氨基酸态氮含量为 110.48 mg/100 mL。

表 7 单一蛋白酶正交试验结果

Table 7 Results of single protease orthogonal test

试验号	A(酶添加量/%)	B(pH 值)	C(温度/℃)	D(时间/h)	氨基酸态氮含量/(mg/100 mL)		
					中性蛋白酶	风味蛋白酶	木瓜蛋白酶
1	1	1	1	1	112.21	100.87	94.30
2	1	2	2	2	111.38	111.00	101.75
3	1	3	3	3	107.42	110.79	97.79
4	2	1	2	3	110.50	103.49	99.21
5	2	2	3	1	111.27	107.31	98.91
6	2	3	1	2	109.12	111.09	102.59
7	3	1	3	2	107.46	101.94	94.64
8	3	2	1	3	109.20	115.65	101.28
9	3	3	2	1	110.87	111.04	101.74

中性蛋白酶	K1	110.34	110.06	110.18	111.45	A1B2C2D1	
	K2	110.30	110.62	110.92	109.32		
	K3	109.18	109.14	108.72	109.04		
	R	1.16	1.48	2.20	2.41		

风味蛋白酶	K1	107.55	102.10	109.20	106.41	A3B3C1D3	
	K2	107.30	110.32	108.51	108.01		
	K3	109.54	110.97	106.68	109.98		
	R	2.25	9.22	2.52	3.57		

木瓜蛋白酶	K1	94.95	96.05	99.39	98.32	A2B3C2D2	
	K2	100.24	100.65	100.90	99.66		
	K3	99.22	100.71	97.11	99.43		
	R	2.29	4.66	3.79	1.34		

2.2.2 三种酶复配酶解条件优化

由表 8 可知, pH 值、温度、时间三因素对三种复合酶酶解液氨基酸态氮的影响顺序为时间>温度>pH 值。其最佳工艺组合为 A2B2C1, 即 pH 值 7.0, 温度 50 ℃, 时间 1.5 h。在该条件下进行三种酶复配酶解条件的验证试验, 兰茂牛肝菌酶解液氨基酸态氮含量为 122.24 mg/100 mL。

2.2.3 三种酶复配配比正交试验结果

由表 9 可知, 三种酶添加量对氨基酸态氮的影响顺序为中性蛋白酶添加量>木瓜蛋白酶添加量>风味蛋白酶添加量。其最佳工艺组合为 A1B2C3, 即中性蛋白酶添、风味蛋白酶和木瓜蛋白酶加量 (m/m) 分别为 0.60%、0.90%、4.70%。在该条件下进行三种酶复配酶解条件的验证试验, 兰茂牛肝菌酶解液氨基酸态氮含量为 124.01 mg/100 mL。

2.3 酶解液滋味分析

2.3.1 酶解液氨基酸分析

游离氨基酸不仅是营养成分, 还可以改变食品的风味, 是食品的滋味成分^[16], 呈现出鲜味、甜味、苦味等。五种酶解液中游离氨基酸组成及含量如表 10 所示。兰茂牛肝菌酶解液中共检出 17 种游离氨基酸, 鲜味氨基酸含量和游离氨基酸总量均高于郝志林等^[17]检测的鸡胸肉样品的游离氨基酸含量, 所以兰茂牛肝菌酶解液适合做调味料。且五种酶解液的游离氨基酸中均是谷氨酸含量最高, 单一蛋白酶中风味蛋白酶酶解液的总游离氨基酸含量最高 (11.50 mg/g), 蛋白酶复配后酶解液中总游离氨基酸含量显著高于单一蛋白酶 ($P<0.01$), 因此蛋白酶复配后酶解有利于游离氨基酸的释放。

表 8 三种酶复配条件正交试验结果

Table 8 Results of three enzyme composite conditions

orthogonal test				
试验号	A pH 值	B 温度/°C	C 时间/h	氨基酸态氮 含量/(mg/100 mL)
1	1	1	1	116.42
2	1	2	2	115.97
3	1	3	3	112.61
4	2	1	2	120.86
5	2	2	3	116.64
6	2	3	1	116.93
7	3	1	3	115.36
8	3	2	1	121.24
9	3	3	2	114.35

K1	115.00	117.55	118.20	
K2	118.14	117.95	117.06	
K3	116.98	114.63	114.87	
R	3.14	3.32	3.33	

表 9 三种蛋白酶复配配比正交试验结果

Table 9 Results of three protease compounding ratios

orthogonal test				
试验号	A 中性 蛋白酶/%	B 风味 蛋白酶/%	C 木瓜 蛋白酶/%	氨基酸态氮 含量/(mg/100 mL)
1	1	1	1	122.44
2	1	2	2	125.93
3	1	3	3	124.16
4	2	1	2	120.60
5	2	2	3	121.98
6	2	3	1	121.76
7	3	1	3	123.22
8	3	2	1	121.15
9	3	3	2	121.20

K1	124.18	122.09	121.78	
K2	121.45	123.02	122.58	
K3	121.86	122.37	123.12	
R	2.73	0.93	1.38	

表 10 酶解液游离氨基酸的组成及含量

Table 10 Composition and content of amino acids of enzymatic hydrolysate

呈味特性	氨基酸	游离氨基酸含量/(mg/g)				
		中性蛋白酶	风味蛋白酶	木瓜蛋白酶	复配条件正交	复配配比正交
鲜味	天冬氨酸(Asp)	0.64±0.01 ^b	0.81±0.05 ^a	0.37±0.01 ^c	0.86±0.07 ^a	0.87±0.06 ^a
	谷氨酸(Glu)	1.69±0.12 ^b	2.05±0.07 ^a	1.42±0.10 ^c	2.57±0.11 ^a	3.20±0.42 ^a
	总量	2.33±0.06 ^c	2.86±0.06 ^b	1.79±0.05 ^d	3.02±0.09 ^a	3.07±0.24 ^a

甜味	甘氨酸(Gly)	0.33±0.02 ^b	0.40±0.02 ^a	0.17±0.01 ^c	0.42±0.02 ^a	0.43±0.02 ^a
	丙氨酸(Ala)	0.66±0.03 ^b	0.73±0.02 ^a	0.41±0.01 ^c	0.77±0.03 ^a	0.78±0.05 ^a
	苏氨酸(Thr)	0.44±0.01 ^b	0.51±0.02 ^a	0.25±0.01 ^c	0.54±0.02 ^a	0.55±0.02 ^a
	丝氨酸(Ser)	0.81±0.03 ^a	0.94±0.11 ^b	1.05±0.13 ^b	0.99±0.10 ^b	1.01±0.05 ^b
	总量	2.24±0.04 ^b	2.58±0.08 ^a	1.88±0.08 ^c	2.73±0.09 ^a	2.77±0.07 ^a

苦味	异亮氨酸(Ile)	0.26±0.01 ^b	0.32±0.01 ^a	0.10±0.01 ^c	0.34±0.01 ^a	0.34±0.01 ^a
	亮氨酸(Leu)	0.79±0.03 ^b	0.95±0.04 ^a	0.31±0.02 ^c	1.00±0.15 ^a	1.02±0.04 ^a
	蛋氨酸(Met)	0.06±0.00 ^b	0.10±0.01 ^a	0.12±0.01 ^a	0.11±0.01 ^a	0.11±0.01 ^a
	苯丙氨酸(Phe)	0.68±0.05 ^a	0.73±0.04 ^a	0.68±0.03 ^a	0.77±0.02 ^a	0.78±0.03 ^a
	组氨酸(His)	0.19±0.01 ^a	0.21±0.01 ^a	0.13±0.01 ^b	0.22±0.01 ^a	0.23±0.01 ^a
	缬氨酸(Val)	1.06±0.11 ^b	1.31±0.32 ^a	0.81±0.04 ^c	1.38±0.14 ^a	1.40±0.21 ^a
	精氨酸(Arg)	0.57±0.03 ^b	0.68±0.04 ^a	0.30±0.01 ^c	0.72±0.03 ^a	0.73±0.02 ^a
	酪氨酸(Tyr)	0.24±0.01 ^b	0.43±0.02 ^a	0.19±0.01 ^b	0.45±0.02 ^a	0.46±0.01 ^a
	总量	3.85±0.14 ^c	4.73±0.25 ^b	2.64±0.07 ^d	5.00±0.20 ^a	5.07±0.17 ^a

无味	赖氨酸(Lys)	0.31±0.00 ^b	0.42±0.01 ^a	0.15±0.01 ^c	0.44±0.02 ^a	0.45±0.00 ^a
	脯氨酸(Pro)	0.47±0.02 ^b	0.63±0.03 ^a	0.44±0.02 ^b	0.67±0.03 ^a	0.68±0.02 ^a
	胱氨酸(Cys)	0.27±0.01 ^a	0.28±0.00 ^a	0.29±0.01 ^a	0.30±0.00 ^a	0.30±0.01 ^a
	总量	1.05±0.02 ^b	1.33±0.02 ^a	0.88±0.02 ^c	1.41±0.03 ^a	1.43±0.02 ^a

氨基酸总量		9.47±0.13 ^c	11.50±0.21 ^b	7.19±0.11 ^d	12.16±0.12 ^a	12.33±0.25 ^a

注：同行不同上标小写字母表示组间差异显著 (P<0.05)。表 11、12 同。

表 11 酶解液呈味核苷酸组成及含量

Table 11 Composition and content of flavor nucleotides of enzymatic hydrolysate

呈味核苷酸	含量/($\mu\text{g/g}$)				
	中性蛋白酶	风味蛋白酶	木瓜蛋白酶	复配条件正交	复配配比正交
5'-CMP	28.14 \pm 0.06 ^c	24.97 \pm 0.05 ^d	161.10 \pm 0.44 ^a	23.87 \pm 0.07 ^e	38.03 \pm 0.03 ^b
5'-UMP	11.69 \pm 0.15 ^b	11.39 \pm 0.05 ^b	25.72 \pm 0.17 ^a	11.59 \pm 0.07 ^b	10.88 \pm 0.15 ^b
5'-GMP	22.87 \pm 0.25 ^c	19.44 \pm 0.13 ^d	43.84 \pm 0.20 ^a	25.51 \pm 0.13 ^b	22.97 \pm 0.17 ^c
5'-IMP	0.48 \pm 0.00 ^b	0.64 \pm 0.01 ^b	1.96 \pm 0.02 ^a	0.58 \pm 0.03 ^b	0.53 \pm 0.02 ^b
5'-AMP	24.22 \pm 0.10 ^c	18.41 \pm 0.09 ^d	43.31 \pm 0.38 ^a	26.61 \pm 0.19 ^b	23.08 \pm 0.22 ^c
总量	87.40 \pm 0.11 ^c	74.85 \pm 0.07 ^d	275.93 \pm 0.24 ^a	90.15 \pm 0.10 ^c	96.48 \pm 0.12 ^b

表 12 酶解液有机酸组成及含量

Table 12 Composition and content of organic acids in of enzymatic hydrolysate

有机酸	含量/($\mu\text{g/g}$)				
	中性蛋白酶	风味蛋白酶	木瓜蛋白酶	复配条件正交	复配配比正交
草酸	59.97 \pm 0.66 ^d	167.63 \pm 1.64 ^c	30.64 \pm 0.92 ^e	177.18 \pm 0.91 ^b	181.76 \pm 1.38 ^a
酒石酸	142.48 \pm 0.35 ^e	220.65 \pm 0.07 ^d	498.77 \pm 1.29 ^a	233.22 \pm 1.23 ^c	236.60 \pm 1.12 ^b
甲酸	280.59 \pm 1.37 ^c	484.94 \pm 3.81 ^b	235.27 \pm 5.15 ^d	512.57 \pm 2.20 ^a	519.99 \pm 0.09 ^a
苹果酸	829.03 \pm 6.59 ^d	1 073.83 \pm 9.65 ^c	716.73 \pm 3.28 ^e	1 135.02 \pm 9.36 ^b	1 151.45 \pm 1.67 ^a
乙酸	618.74 \pm 5.47 ^d	1 058.04 \pm 23.83 ^c	162.63 \pm 4.56 ^e	1 118.33 \pm 0.17 ^b	1 134.52 \pm 1.78 ^a
柠檬酸	190.08 \pm 0.66 ^a	171.97 \pm 1.41 ^d	137.38 \pm 1.88 ^e	181.77 \pm 1.74 ^c	184.40 \pm 2.57 ^b
富马酸	746.94 \pm 11.46 ^d	1 014.76 \pm 9.01 ^c	623.76 \pm 1.23 ^e	1 072.58 \pm 6.01 ^b	1 088.19 \pm 5.34 ^a
琥珀酸	17.00 \pm 0.51 ^b	13.68 \pm 0.13 ^c	25.03 \pm 0.61 ^a	14.46 \pm 0.99 ^c	14.67 \pm 0.40 ^c
总量	2 884.83 \pm 3.32 ^d	4 205.50 \pm 6.19 ^c	2 430.21 \pm 2.36 ^e	4 445.14 \pm 2.83 ^b	4 511.59 \pm 1.80 ^a

表 13 酶解液游离氨基酸、呈味核苷酸、有机酸 TAV 分析

Table 13 TAV analysis of free amino acids, flavoring nucleotides and organic acids in of enzymatic hydrolysate

成分	特征滋味 ^[23]	呈味阈值/ (mg/g) ^[24,25]	TAV/(mg/g)				
			中性蛋白酶	风味蛋白酶	木瓜蛋白酶	复配条件正交	复配配比正交
天冬氨酸(Asp)	鲜/甜 (+)	1.00	0.64	0.81	0.37	0.86	0.87
谷氨酸(Glu)	鲜 (+)	0.30	5.63	6.83	4.73	8.57	10.67
甘氨酸(Gly)	甜 (+)	1.30	0.25	0.31	0.13	0.32	0.33
丙氨酸(Ala)	甜 (+)	0.60	1.10	1.22	0.68	1.28	1.30
苏氨酸(Thr)	甜 (+)	2.60	0.17	0.20	0.10	0.21	0.21
丝氨酸(Ser)	甜 (+)	1.50	0.54	0.63	0.70	0.66	0.67
异亮氨酸(Ile)	苦 (-)	0.90	0.29	0.36	0.11	0.38	0.38
亮氨酸(Leu)	苦 (-)	1.90	0.42	0.50	0.16	0.52	0.53
蛋氨酸(Met)	苦/甜/硫 (-)	0.30	0.20	0.33	0.40	0.37	0.37
苯丙氨酸(Phe)	苦 (-)	0.90	0.76	0.81	0.76	0.86	0.87
组氨酸(His)	苦 (-)	0.20	0.95	1.05	0.65	1.10	1.15
缬氨酸(Val)	甜/苦 (+)	0.40	2.65	3.28	2.03	3.45	3.50
精氨酸(Arg)	苦/甜 (+)	0.50	1.14	1.36	0.60	1.44	1.46
酪氨酸(Tyr)	苦 (-)	2.60	0.09	0.17	0.07	0.17	0.18
赖氨酸(Lys)	苦/甜 (-)	0.50	0.62	0.84	0.30	0.88	0.90
脯氨酸(Pro)	甜/苦 (+)	3.00	0.16	0.21	0.15	0.22	0.23

续表 13

成分	特征滋味 ^[23]	呈味阈值/ (mg/g) ^[24,25]	TAV/(mg/g)					
			中性蛋白酶	风味蛋白酶	木瓜蛋白酶	复配条件正交	复配配比正交	
呈味核苷酸	5'-GMP	鲜(+)	0.125	0.18	0.16	0.35	0.20	0.18
	5'-IMP	鲜(+)	0.25	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00
	5'-AMP	鲜(+)	0.5	0.05	0.04	0.09	0.05	0.05
有机酸	酒石酸	酸/刺激(+)	0.015	9.50	14.71	33.25	15.55	15.77
	苹果酸	酸/苦(+)	0.50	1.66	2.15	1.43	2.27	2.30
	乙酸	酸/刺激(+)	0.106	5.84	9.98	1.53	10.55	10.70
	柠檬酸	酸/温和(+)	0.45	0.42	0.38	0.31	0.40	0.41
	琥珀酸	酸/鲜味(+)	0.106	0.16	0.13	0.24	0.14	0.14

注: +表示对滋味有好的贡献; -表示对滋味有不好的贡献; 其他注同表 10。

目前, 采用呈味强度值 (TAV) 法评价单个滋味成分对酶解液滋味的贡献大小, 通常认为, 当 TAV 大于 1 时, 该成分对样品呈味有重要影响, 并且数值越大, 贡献越大^[18]。由表 13 可知, 兰茂牛肝菌五种酶解液 TAV 均大于 1 的游离氨基酸为谷氨酸 (Glu)、丙氨酸 (Ala)、缬氨酸 (Val)、精氨酸 (Arg), 且谷氨酸最高, 说明谷氨酸对兰茂牛肝菌酶解液呈味贡献最大。

2.3.2 酶解液呈味核苷酸分析

核苷酸是产生鲜味的重要物质, 与游离氨基酸、无机盐等具有协同作用, 能够使鲜味增强^[19]。五种酶解液中呈味核苷酸组成及含量见表 11。木瓜蛋白酶酶解液的呈味核苷酸含量最高, 主要是因为 5'-CMP 含量和 5'-AMP 较高, 这与庄金达^[20]的研究结果一致。5'-AMP 可以使食用菌呈现甜味并抑制苦味^[21]。由表 13 可知, 呈味核苷酸 TAV 均小于 1, 所以单独呈味核苷酸对兰茂牛肝菌酶解液滋味影响不大, 主要起协同作用。

2.3.3 酶解液有机酸分析

食用菌有机酸与酯类、氨基酸、芳香物质的代谢有关^[20], 其种类和含量影响食用菌独特的风味。五种酶解液中有机酸种类和含量见表 12。兰茂牛肝菌酶解液中苹果酸含量最高, 乙酸次之, 二者占复合蛋白酶酶解液有机酸总量的 50%以上, 这与庄金达、谷镇等^[20,22]的研究一致。由表 13 可知, 酒石酸、苹果酸、乙酸 TAV 均大于 1, 且酒石酸 TAV 在 9.50~33.25 之间。所以酒石酸、苹果酸、乙酸对兰茂牛肝菌酶解液的风味有贡献, 且酒石酸贡献最大。

2.3.4 酶解液 EUC 值计算结果

由图 5 可以看出, 复配配比正交优化的酶解液 EUC 值最高, 但与复配条件正交优化和中性蛋白酶

解液的 EUC 值没有显著差异 ($P>0.05$)。

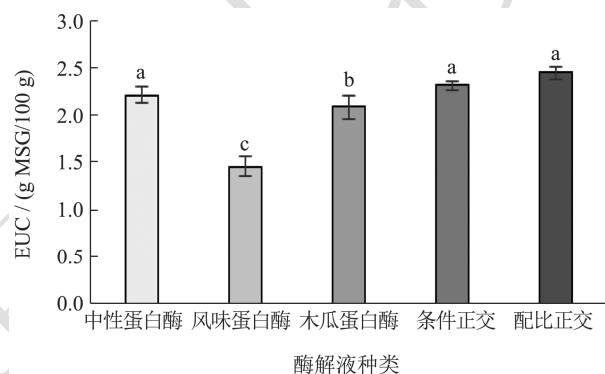


图 5 酶解液等效鲜味浓度值 EUC

Fig.5 EUC values of enzymatic hydrolysate

注: 图中不同小写字母表示组间差异显著 ($P<0.05$)。

3 结论

本研究采用单因素和正交试验优化兰茂牛肝菌酶解液制备工艺, 获得的最优酶解条件为: pH 值 7.0, 温度 50 °C, 时间 1.5 h, 中性蛋白酶添加量为 0.60%、风味蛋白酶添加量为 0.90%、木瓜蛋白酶添加量为 4.70%, 此条件下获得的酶解液的氨基酸态氮为 124.01 mg/100 mL、游离氨基酸总量为 12.33 mg/g、呈味核苷酸总量为 96.48 μg/g、有机酸总量为 4 511.59 μg/g, EUC 值为 2.46 g MSG/100 g, 均高于单一蛋白酶酶解液。谷氨酸 (Glu)、丙氨酸 (Ala)、缬氨酸 (Val)、精氨酸 (Arg) 对兰茂牛肝菌酶解液呈味有直接贡献, 且谷氨酸贡献最大; 呈味核苷酸对酶解液呈味无直接贡献; 酒石酸是酶解液中对呈味贡献最大的有机酸。本研究为酶解法制备食用菌调味精基料提供了理论基础, 丰富产品类型, 满足了人们的需求, 提高产品附加值。

参考文献

- [1] 苏璐,苏冀彦,李丹,等.兰茂牛肝菌含药血清对小鼠脾淋巴细胞的影响[J].食用菌学报,2018,25(2):113-120.
- [2] 伍燕,汪伟,王燕,等.2种牛肝菌分子鉴定及营养成分分析[J].现代食品科技,2021,37(9):102-108.
- [3] 郭磊,阚欢,范方宇,等.牛肝菌的营养价值及综合利用现状与前景[J].食品研究与开发,2021,2(1):199-203.
- [4] 卯晓岚.中国毒菌物种多样性及其毒素[J].菌物学报,2006,25(3):345-363.
- [5] 丁小维,刘开辉,邓百万,等.中国有毒牛肝菌研究进展[J].安徽农业科学,2010,38(3):1114-1115.
- [6] 郭永红,朱萍,赵博,等.不同热处理的绒柄牛肝菌 HPLC 图谱分析[J].中国食用菌,2008,27(2):27-30.
- [7] 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.
- [8] 王文亮,宋莎莎,宋康,等.食用菌呈鲜呈味物质提取工艺研究进展[J].食品工业,2015,36(7):237-240.
- [9] 黄百祺,黄创成,吴巨贤,等.4种龟肉酶解液的氨基酸及呈味特性比较[J].食品研究与开发,2021,42(8):12-17.
- [10] 刘佳,王桂瑛,程志斌,等.云南白牛肝菌酶解工艺优化[J].食品工业科技,2016,37(21):222-227.
- [11] 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.
- [12] 孙达锋,胡小松,张沙沙.气调贮藏对兰茂牛肝菌呈味物质的影响[J].食用菌学报,2021,28(6):150-158.
- [13] 刘云,宫向红,徐英江,等.烟台近海3种贝类中呈味核苷酸和氨基酸的测定及比较分析[J].中国水产科学,2014,21(2):351-360.
- [14] Yamaguchi Shizuko, Yoshujawa Tomoko, Ikeda Shingo, et al. Measurement of the relative taste intensity of some 1- α -amino acids and 5'-nucleotides [J]. Journal of Food Science, 1971, 36(6): 846-849.
- [15] 尤梦晨,徐欣如,薛丹丹,等.10种食用菌对高汤风味品质的影响[J].食品科学,2018,39(14):282-287.
- [16] KONG Yan, ZHANG Lili, SUN Ying, et al. Determination of the free amino acid, organic acid, and nucleotide in commercial vinegars [J]. Journal of Food Science, 2017, 82(5): 1116-1123.
- [17] 郝志林,梁莉,刘贺,等.热预处理对鸡胸肉和鸡骨泥滋味物质的影响[J].食品科学技术学报,2022,40(4):107-115.
- [18] 陈德慰,苏键,刘小玲,等.广西北部湾3种贝类中主要呈味物质的测定及呈味作用评价[J].食品科学,2012,33(10):165-168.
- [19] 党亚丽,张中建,闫小伟.金华火腿水溶物的滋味成分分析[J].食品工业科技,2013,34(9):82-85.
- [20] 庄金达.四种牛肝菌特征风味物质和鲜味肽鉴定及其呈味机制研究[D].上海:上海应用技术大学,2021.
- [21] Pattarin Leksrisompong, Patrick Gerard, Kannapon Lopetcharat, et al. Bitter taste inhibiting agents for whey protein hydrolysate and whey protein hydrolysate beverages [J]. Journal of Food Science, 2012, 77(8): 282-287.
- [22] 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.
- [23] 马东林,郭全友,李保国,等.香糟大鲩冷冻调理制品工艺优化及滋味评价[J].食品与发酵工业,2022,48(10):140-148.
- [24] CHEN Dewei, ZHANG Min. Non-volatile taste active compounds in the meat of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. Food Chemistry, 2007, 104(3): 1200-1205.
- [25] LIU Tiantian, XIA Ning, WANG Qinzhi, et al. Identification of the non-volatile taste-active components in crab sauce [J]. Foods, 2019, 8(8): 324-334.