

doi:10.3969/j.issn.2095-6002.2017.03.012

文章编号:2095-6002(2017)03-0078-05

引用格式:沈文凤,王月明,徐志祥,等.香菇调味料酶解工艺研究[J].食品科学技术学报,2017,35(3):78-82.



SHEN Wenfeng, WANG Yueying, XU Zhixiang, et al. Study on enzymolysis technology of shiitake mushroom seasoning [J]. Journal of Food Science and Technology, 2017,35(3):78-82.

香菇调味料酶解工艺研究

沈文凤^{1,2}, 王月明², 徐志祥¹, 崔文甲², 弓志青²,
石贤权², 王文亮^{1,2,*}

(1. 山东农业大学食品科学与工程学院, 山东 泰安 271018;

2. 山东省农业科学院农产品研究所/山东省农产品精深加工技术重点实验室, 山东 济南 250100)

摘要:为提高香菇酶解液的酶解效率和感官品质,研究了3种酶复合酶解香菇的较佳工艺。首先通过正交试验优化了纤维素酶的酶解条件,纤维素酶的较佳酶解条件为温度40℃、时间1h、加酶的质量分数0.5%。然后以感官评分和 α -氨基态氮含量为指标筛选出菠萝蛋白酶和风味蛋白酶2种蛋白酶,最后通过响应面法优化了复合酶的较佳酶解条件。结果表明,3种酶同时酶解香菇液为较佳酶解方式,复合酶的较佳酶解条件为温度58.6℃、时间2.02h、质量浓度15.24 mL/g(即超纯水体积与香菇粉质量的比例)。在此条件下得到的 α -氨基态氮的密度为0.0901 g/100 mL,感官评分为7.4,属于喜欢范畴。

关键词:香菇;蛋白酶;水解; α -氨基态氮**中图分类号:**TS202.3**文献标志码:**A

香菇又名花菇、香蕈等^[1]是一种常见的大型真菌,药食同源,具有很高的保健和药用价值^[2-4],不仅含有丰富的蛋白质、多糖,还含有较多的双链核糖核酸、香菇嘌呤^[5]、麦角甾醇、维生素、钙、铁、磷等多种功能性成分^[6],具有降血脂、抗肿瘤等功效^[7-8],被誉为“菇中皇后”^[9]。香菇中含有丰富的呈味物质,但存在多数小分子呈味物质提取不完全,营养成分损失严重、主要非挥发性呈味物质呈味效果差、综合利用率低,产品质量不高等问题。酶解工艺是解决这一问题的关键^[10],高珊^[11]研究了有效破壁对酶解的作用。王丽君^[12]研究了微波等辅助作用对酶解的影响。程玉^[13]利用响应面得出了酶解的最佳工艺条件。另外,其他团队也对酶解工艺进行了研究^[14-16]。本文利用多种酶复合酶解香菇,从而提高其酶解液的风味物质含量,为香菇的精

深加工提供理论与技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

香菇,购于济南大润发超市;纤维素酶,南宁庞博生物工程有限公司;菠萝蛋白酶、风味蛋白酶、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、复合蛋白酶,上海源叶生物科技有限公司;其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器设备

ZN-20L型小型粉碎机,北京兴时利和科技发展有限公司;GZX-9240MBE型电热鼓风干燥机,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;UV-6100型紫外可见分光光度计,上海元析仪器有限公司;CR22D III型高速冷冻离心机,日立有限公司;SG2型便携式pH计,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;pk-

收稿日期:2016-09-08

基金项目:山东省现代农业产业技术体系食用菌产后加工岗位专家项目(SDAIT-07-08);山东省农业重大应用技术创新课题(鲁财农指[2014]38)。

作者简介:沈文凤,女,硕士研究生,研究方向为食品加工与安全;

*王文亮,男,副研究员,主要从事食用菌精深加工等方面的研究,通信作者。

8D型电热恒温水浴锅,上海精宏实验设备有限公司;AR423CN型天平,奥豪斯仪器(上海)有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 酶解操作

取已制备好的香菇粉2.0 g(以干质量计),按较佳酶活力加入相应的酶,按适当质量浓度加入超纯水,自然pH值,在适当的温度下酶解适当的时间,后于100℃水中灭酶10 min,7 000 r/min,4℃条件下冷冻离心15 min,取上清液测 α -氨基态氮的密度含量。做3组平行实验。

1.3.2 蛋白质测定

使用考马斯亮蓝法^[17]。

1.3.3 α -氨基态氮含量的测定

使用甲醛电位滴定法^[18]。

1.3.4 感官评定

选实验室经过训练的11人(5男6女)进行实验。评定员对不同风味的样品的总体接受程度按照9点快感类别量表测定方法评分。评分标准:1,极不喜欢;2,非常不喜欢;3,不喜欢;4,较不喜欢;5,一般不喜欢;6,较喜欢;7,喜欢;8,非常喜欢;9,极喜欢。

1.3.5 纤维素酶的优化

1.3.5.1 纤维素酶的单因素设计

温度的单因素实验。酶活力按200 U/g,质量浓度按10 mL/g加入超纯水,控制温度分别在35,40,45,50,55℃条件下酶解1 h。

时间的单因素实验。酶活力按200 U/g,质量浓度按10 mL/g加入超纯水,控制温度在45℃条件下分别酶解0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 h。

加酶量的单因素实验。控制加酶的质量分数分别为底料的0.3%,0.5%,1.0%,质量浓度按10 mL/g加入超纯水,在45℃条件下酶解1 h。

1.3.5.2 纤维素酶的正交设计

实验以香菇水解后的蛋白含量为考察指标,采用正交试验的方法优化纤维素酶,通过单因素实验确定纤维素酶的温度、时间、加酶量3个因素,根据酶的性质,每个因素设定3个水平。

1.3.6 确定较优蛋白酶组合的实验

取制备好的香菇粉4组,每份各2.0 g,选择菠萝蛋白酶分别与复合蛋白酶、中性蛋白酶、风味蛋白酶和木瓜蛋白酶复合,调节质量浓度为20 mL/g,各加酶量为2 000 U/g,自然pH值,各自最适温度下酶解3 h后,测 α -氨基态氮的密度含量,同时根据感官评分选出较优蛋白酶组合。每组做3次平行实验。

1.3.7 纤维素酶添加方式的确定

实验分4组进行,第1组不加纤维素酶直接加风味蛋白酶和菠萝蛋白酶,40℃条件下酶解3 h;第2组同时加入纤维素酶、风味蛋白酶和菠萝蛋白酶40℃条件下酶解3 h;第3组先加入纤维素酶45℃条件下酶解1 h后,加风味蛋白酶、菠萝蛋白酶40℃条件下酶解3 h;第4组先加风味蛋白酶和菠萝蛋白酶40℃条件下酶解3 h后,再加纤维素酶45℃条件下酶解1 h,4组实验的质量浓度都按20 mL/g的比例添加超纯水40 mL,测定 α -氨基态氮的密度含量,同时根据感官评分选出较优蛋白酶组合。每组做3次平行实验。

1.3.8 复合酶条件的优化

1.3.8.1 复合酶的单因素设计

取已制备好的香菇粉2.0 g,按纤维素酶的200 U/g酶活添加纤维素酶,按风味蛋白酶的2 000 U/g酶活添加风味蛋白酶,按复合蛋白酶的2 000 U/g酶活添加复合蛋白酶,按10,15,20,25 mL/g的质量浓度加入超纯水,分别在35,40,45,50,55,60,65℃条件下酶解0.5,1,1.5,2,2.5,3 h,后测定 α -氨基态氮的密度含量,同时根据感官评分选出较佳复合酶解条件。每组做3次平行实验。

1.3.8.2 复合酶的响应面设计

通过单因素实验确定复合酶的温度、时间、液料比3个因素,根据每个因素设计3个水平,以 α -氨基态氮的密度为指标,利用响应面进行优化实验,根据感官评分选出复合酶的较佳酶解条件。

2 结果与分析

2.1 纤维素酶条件的优化

在单因素实验基础上确定了纤维素酶的适合酶解条件是在温度45℃的条件下酶解1 h,加酶的质量分数为0.5%,为进一步确定纤维素酶的较佳酶解条件运用 $L_9(3^3)$ 正交试验表进行进一步优化,结果见表1。

由表1极差分析可以看出, $R_c > R_A > R_B$ 各因素影响的主次依次为:加酶量、温度、时间。根据各因素的 k_1, k_2, k_3 选择各因素的较优组合:温度40℃、时间1 h、加酶的质量分数0.5%。

2.2 较优蛋白酶组合的确定

选择菠萝蛋白酶分别与复合蛋白酶、中性蛋白酶、风味蛋白酶和木瓜蛋白酶进行复合,以 α -氨基态氮的密度为指标测定酶解液,结果见图1。

表1 纤维素酶的正交试验因素水平表
Tab.1 Factors and levels in the orthogonal array design of cellulase

实验号	A 温度/℃	B 时间/h	C 加酶量/%	蛋白含量/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
1	40	0.5	0.3	84.75
2	40	1.0	0.5	91.36
3	40	1.5	1.0	82.20
4	45	0.5	0.5	87.08
5	45	1.0	1.0	78.95
6	45	1.5	0.3	81.75
7	50	0.5	1.0	84.88
8	50	1.0	0.3	86.57
9	50	1.5	0.5	82.75
k_1	86.10	85.57	84.36	
k_2	82.60	85.63	87.06	
k_3	84.73	82.24	82.01	
R	3.51	3.34	5.05	

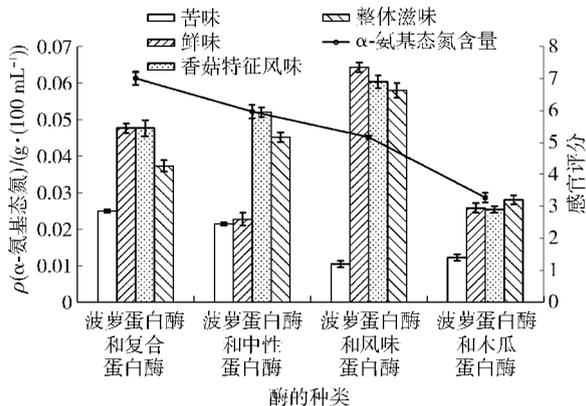


图1 4组蛋白酶对香菇酶解液 α -氨基态氮含量和感官评分的影响

Fig.1 Effect of proteases on α -amino nitrogen content and sensory evaluation of mushroom hydrolysis

由图1可知,4组蛋白酶对于香菇 α -氨基态氮的密度含量和感官评分均有显著的影响。显然,菠萝蛋白酶与复合蛋白酶和中性蛋白酶复合的酶解液中 α -氨基态氮的密度含量高,表明蛋白酶酶解出了较多的呈味物质,但同时也酶解出了较多的苦味物质,这严重影响了酶解液的整体感官评分。菠萝蛋白酶与木瓜蛋白酶水解出的呈味物质少导致感官评分低,综上所述,选菠萝蛋白酶和风味蛋白酶组合对香菇进行下一步的酶解实验。

2.3 纤维素酶添加方式的确定

将纤维素酶以不同方式添加到香菇粉中进行酶解,得到如下4组实验,结果见图2。

由图2可以看出不加纤维素酶与加纤维素酶有明显的不同。先加纤维素酶的酶解液中虽然 α -氨

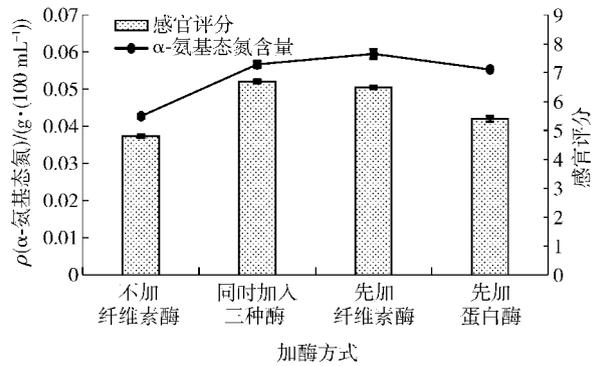


图2 纤维素酶添加方式对 α -氨基态氮含量的影响

Fig.2 Effects of cellulase adding ways on α -amino nitrogen content

基态氮密度高,但水解出的苦味呈味物质影响了感官评分,所以选同时加入3种酶的方式,该酶解方式不仅 α -氨基态氮密度含量与感官评分高,同时能缩短酶解时间,提高酶解效率,降低生产成本。

2.4 复合酶酶解条件的优化

2.4.1 响应面试验设计及结果

在单因素实验基础上确定了复合酶的适合酶解条件是在温度 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的条件下酶解 2 h ,质量浓度为 15 mL/g ,为进一步确定复合酶的较佳酶解条件运用响应面试验进行进一步优化,结果见表2。

表2 响应面试验设计及结果

Tab.2 Design of response surface experiment and results

标准序	运行序	温度/℃	时间/h	质量浓度/ ($\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$)	$\rho(\alpha\text{-氨基态氮})/(\text{g}\cdot(100\text{ mL}^{-1}))$
3	1	50	2.5	15	0.084
4	2	60	2.5	15	0.086
14	3	55	2.0	15	0.099
5	4	50	2.0	10	0.087
11	5	55	1.5	20	0.084
2	6	60	1.5	15	0.086
1	7	50	1.5	15	0.085
15	8	55	2.0	15	0.097
7	9	50	2.0	20	0.081
12	10	55	2.5	20	0.083
16	11	55	2.0	15	0.097
8	12	60	2.0	20	0.087
17	13	55	2.0	15	0.097
13	14	55	2.0	15	0.098
10	15	55	2.0	10	0.086
9	16	55	1.5	10	0.084
6	17	60	2.0	10	0.084

2.4.2 方差分析与显著性分析

在单因素实验的基础上,采用 Design-Expert 8.0.6.0 软件,以 α -氨基态氮的密度为响应值,对数据进行分析得到回归方程为:

$$y = -0.73336 + 0.025492x_1 + 0.096415x_2 + 4.06820 \times 10^{-3}x_3 + 1.47080 \times 10^{-4}x_1x_2 + 8.46052 \times 10^{-5}x_1x_3 - 2.36400 \times 10^{-4}x_2x_3 - 2.44611 \times 10^{-4}x_1^2 - 0.025166 \times 10x_2^2 - 2.80623 \times 10^{-4}x_3^2。$$

该方程回归系数 $R^2 = 0.9933$,说明实验的 99.33% 可以被模型所解释^[19],该方程 y 与实际的拟合度较高。模型的方差分析结果见表 3。由表 3 可知,模型的 $p < 0.01$,说明其具有极显著性,回归方程模型中失拟项为 0.8800 (>0.05),说明失拟项不显著,得到的回归模型比较理想,方程有极高可靠性。在实验的 3 个影响因素中,温度与加液量的交互作用的 p 值均小于 0.01,说明对 α -氨基态氮密度的影响极显著,相比较,温度、加液量的单因素对 α -氨基态氮的密度也有显著影响,但不如温度和质量浓度的交互作用影响大。模型中 $R_{Adj}^2 - R_{Pred}^2 < 0.2$ 说明模型预测值与实际值有较高的相关性,模型准确。综上所述,该实验模型合理,复合酶的较佳酶解条件可以用该模型来很好的模拟。

表 3 方差分析结果

Tab.3 Variance analysis results

方差来源	平方和	自由度	均方和	F 值	p 值
模型	6.237×10^{-4}	9	6.930×10^{-5}	115.28	<0.0001
x_1	4.352×10^{-6}	1	4.352×10^{-6}	7.24	0.0311
x_2	1.749×10^{-7}	1	1.749×10^{-7}	0.29	0.6064
x_3	5.781×10^{-6}	1	5.781×10^{-6}	9.62	0.0173
x_1x_2	5.408×10^{-7}	1	5.408×10^{-7}	0.90	0.3745
x_1x_3	1.790×10^{-5}	1	1.790×10^{-5}	29.77	0.0009
x_2x_3	1.397×10^{-6}	1	1.397×10^{-6}	2.32	0.1712
x_1^2	1.575×10^{-4}	1	1.575×10^{-4}	261.95	<0.0001
x_2^2	1.667×10^{-4}	1	1.667×10^{-4}	277.25	<0.0001
x_3^2	2.072×10^{-4}	1	2.072×10^{-4}	344.75	<0.0001
残差	4.208×10^{-6}	7	6.011×10^{-7}		
失拟项	5.891×10^{-7}	3	1.964×10^{-7}	0.22	0.8800
净误差	3.619×10^{-6}	4	9.047×10^{-7}		
总和	6.279×10^{-4}	16			
R_{Pred}^2					0.9760
R_{Adj}^2					0.9847

2.4.3 响应面结果验证实验

利用 Design-Expert 8.0.6.0 软件得到复合酶的较佳酶解条件为温度 58.64 °C,时间 2.02 h,质量浓度 15.24 mL/g,得到的 α -氨基态氮密度含量最高为 0.09497 g/100 mL。根据实际情况,较佳酶解条件为温度 58.6 °C,时间 2.02 h,质量浓度为 15.24 mL/g,在此条件下进行验证实验,重复 3 次,得到的 α -氨基态氮的密度为 0.0901 g/100 mL,酶解液具有较强的香菇特征风味和较强的鲜味,几乎无苦味,感官评分为 7.4,属于喜欢范畴,与预测值有较好拟合性,说明响应面优化试验得到的复合酶酶解条件具有实际参考价值。

3 结 论

纤维素酶水解的较佳条件为温度 40 °C、时间 1 h、加酶的质量分数 0.5%。综合考虑 α -氨基态氮的密度和感官评分结果,选择菠萝蛋白酶和风味蛋白酶组合对香菇进行酶解。考虑 α -氨基态氮的密度和感官评分,再加上生产流程和生产成本综合考虑,选择 3 种酶同时加入的酶解方式。优化的较佳酶解条件为温度 58.6 °C,时间 2.02 h,质量浓度为 15.24 mL/g,在此条件下得到的 α -氨基态氮的密度含量为 0.0901 g/100 mL,酶解液具有较强的香菇特征风味和较强的鲜味,几乎无苦味,感官评分为 7.4,属于喜欢范畴。

参考文献:

- [1] 王贺祥,刘庆洪.食用菌栽培学[M].2版.北京:中国农业出版社,2014:1-4.
- [2] 刘晓艳,杨国力,于纯森.功能型复合食用菌调味品的工艺开发研究[J].中国调味品,2016,41(1):121-124.
LIU X Y, YANG G L, YU C M. Process development of functional compound edible fungus flavoring [J]. China Condiment, 2016, 41(1):121-124.
- [3] BECHARA M A, HEINEMANN P, WALKWE P N, et al. Cultivation of *Agaricus bisporus* on a mixture of cereal grain spawn and delayed-release nutrient supplement [J]. Mushroom News, 2005, 53(8):6-10.
- [4] 刘威,刘立强.浅谈香菇营养及药用保健价值[J].农业与技术,2009,29(5):10.
- [5] ROKUJO T, KIKUCHI H, TENSHO A, et al. Lentysine: a new hypolipidemic agent from a mushroom [J]. Life Sciences, 1970, 9(7):379-385.
- [6] 艾有伟.香菇与平菇酶解特性研究及产品制备[D].武汉:武汉工业学院,2012.

- [7] SEKIYA A, FUKADA S, MORITA T, et al. Suppression of methionine-induced hyperhomo-cysteinemia by dietary eritadenine in rats [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2006, 70(8):1987-1991.
- [8] FUKADA S, SETOUE M, MORITA T, et al. Dietary eritadenine suppresses guanidinoacetic acid-induced hyperhomocysteinemia in rats[J]. *Journal of Nutrition*, 2006, 136(11):2797-2802.
- [9] 张瑜,赵金红,丁洋,等. 不同解冻技术对冷冻香菇品质的影响[J]. *现代食品科技*, 2016, 32(9):1-10.
ZHANG Y, ZHAO J H, DING Y, et al. Effects of different thawing methods on the quality attributes of frozen (*Lentinusedodes cubes*) [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2016, 32(9):1-10.
- [10] 沈文凤,王月明,王文亮,等. 食用菌调味料加工工艺研究现状[J]. *农产品加工*, 2016(7):65-67.
SHEN W F, WANG Y M, WANG W L, et al. Research status on process technology of edible fungi seasoning [J]. *Farm Products Processing*, 2016(7):65-67.
- [11] 高珊. 茶树菇味复合发酵调味品的研究[D]. 无锡:江南大学, 2008.
- [12] 王丽君. 香菇制取天然调味基料及系列食品开发[D]. 洛阳:河南科技大学, 2013.
- [13] 程玉. 酶解法制备海鲜菇调味料的研究[D]. 杭州:浙江大学, 2013.
- [14] 周书来,刘学文. 鸡枞菌复合调味料制备工艺研究[J]. *中国调味品*, 2011, 36(4):56-58, 65.
ZHOU S L, LIU X W. Study on preparation technology of *Termitomyces albuminosus* complex seasoning[J]. *China Condiment*, 2011, 36(4):56-58, 65.
- [15] 张全珍. 酶解法生产动物蛋白复合调味料工艺研究[J]. *发酵科技通讯*, 2014, 43(1):9-10.
- [16] 黄雯. 香菇风味物质研究及酶解香菇技术探索[D]. 杭州:浙江大学, 2012.
- [17] 李建武,余瑞元,袁明秀,等. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京:北京大学出版社, 1994:160-176.
- [18] 穆华荣. 食品检验技术[M]. 北京:化学工业出版社, 2005:91-921.
- [19] PERRY A, RASMUSSEN H, JOHNSON E J. Xanthophyll (lutein, zeaxanthin) content in fruits, vegetables and corn and egg products[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2009, 22(1):9-15.

Study on Enzymolysis Technology of Shiitake Mushroom Seasoning

SHEN Wenfeng^{1,2}, WANG Yueming², XU Zhixiang¹, CUI Wenjia², GONG Zhiqing²,
SHI Xianquan², WANG Wenliang^{1,2,*}

(1. College of Food Science and Technology, Shandong Agriculture University, Tai'an 271018, China;

2. Institute of Agro-Products Processing Science and Technology/Shandong Provincial Key Laboratory of Agro-Products Processing Technology, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China)

Abstract: In this study, the optimal processing of enzymatic hydrolysis of shiitake mushrooms has been studied using three enzymes, in order to improve the enzymatic efficiency and sensory evaluation. First, the hydrolysis conditions of cellulase were optimized by orthogonal experiments. The results showed that the optimum hydrolysis conditions were temperature 40 °C, hydrolysis time 1 h, and enzyme dosage 0.5%. Second, bromelain and flavourzyme were screened out using α -amino nitrogen content and sensory evaluation as indicators. Third, the enzyme hydrolysis conditions were optimized by the response surface test. The results showed that the optimum conditions were hydrolysis temperature 58.6 °C, hydrolysis time 2.02 h, and concentration 15.24 mL/g (water volume: shiitake mushroom powder quantity). Under the optimum conditions, the α -amino nitrogen content was 0.090 1 g/100 mL and the sensory score was 7.4, belonging to the category of favorite.

Keywords: shiitake mushroom; protease; hydrolysis; α -amino nitrogen

(责任编辑:李 宁)