

不同蛋白酶处理对真姬菇菌盖与菌柄鲜味物质释放的影响

黄爱云, 董晓博, 康淑芳, 陈丹, 崔梦迪, 徐怀德*

(西北农林科技大学食品科学与工程学院 陕西杨凌 712100)

摘要 目的:探究不同蛋白酶处理对真姬菇菌盖与菌柄鲜味物质释放的影响,以充分提取并利用真姬菇鲜味物质。方法:选取 3 种单酶(风味蛋白酶、复合蛋白酶、木瓜蛋白酶)和 2 种复配酶(风味蛋白酶和复合蛋白酶复配酶、风味蛋白酶和木瓜蛋白酶复配酶)对真姬菇菌盖和菌柄进行酶解,比较 5 组蛋白酶处理后真姬菇菌盖与菌柄鲜味物质释放的差异。结果:风味蛋白酶与复合蛋白酶复配酶水解液鲜味氨基酸和鲜味核苷酸含量显著高于对照组和其它处理组($P < 0.05$),菌盖与菌柄经该复配酶水解后水解液中鲜味氨基酸含量分别达 20.85 mg/g 和 10.60 mg/g,鲜味核苷酸含量分别达 8.45 mg/g 和 3.88 mg/g,菌盖的等效鲜味浓度值从食用菌的第二等级(836.90 g MSG/100 g)显著提升到第一等级(1 333.75 g MSG/100 g)。此外,电子舌系统可较好地辨别不同水解物的滋味差异。结论:利用风味蛋白酶和复合蛋白酶的复配酶水解,能够更充分释放真姬菇菌盖和菌柄中的鲜味物质,且真姬菇菌盖相较于菌柄在开发少盐鲜味调味品方面更有潜力。

关键词 蛋白酶;真姬菇;菌盖;菌柄;鲜味物质

文章编号 1009-7848(2022)08-0153-10 **DOI**: 10.16429/j.1009-7848.2022.08.017

鲜味作为 5 种基本味觉成分之一,影响着消费者对食品的偏好^[1]。自 1908 年,池田博士首次发现由谷氨酸钠引起的味道并将其命名为鲜味以来,谷氨酸钠成为最广泛使用的食品鲜味增强剂^[2]。然而,随着消费观念的转变,消费者对于添加“味精”标签的食品已产生消极认知^[3]。此外,中国成年人平均每天食盐摄入量超过 WHO 推荐的 2 倍,且多数风味调味料都存在食盐含量过高的问题,这对人体健康构成了潜在的威胁^[4]。正因如此,天然鲜味物质受到广泛关注^[5-7]。天然鲜味物质的存在会增强口腔对咸味的感知,可以达到降低食品中钠的添加量而不影响食物整体滋味的作用。使用天然存在的鲜味化合物作为风味增强剂,有利于提高消费者的接受度并预防慢性病的发生^[8]。在众多天然的鲜味物质来源中,食用菌因独特的鲜味而闻名于世。食用菌中含有的鲜味物质使其在大多数食品制剂中具有适口性和适应性,适合鲜味增强剂的开发,目前已成功运用到各种食品的提鲜增味中,如酸奶、汉堡、玉米食品等^[5-7]。

真姬菇(*Hypsizygus marmoreus*)因具有浓郁

的海鲜蟹味,故被称为海鲜菇、蟹味菇,这种独特的风味主要是由鲜味氨基酸与鲜味核苷酸引起的^[9]。由于新鲜真姬菇子实体中鲜味氨基酸含量高达 18.31~35.79 mg/g,鲜味核苷酸含量高达 4.56~5.96 mg/g,因此真姬菇是一种良好的天然鲜味物质来源^[2,10]。鲜味物质主要存在于食用菌细胞内,通过适宜的技术手段将细胞破碎,使内容物充分释放是鲜味物质提取的关键。目前,食用菌中鲜味物质的提取方式主要有酸解法、热水浸提法及超声辅助提取法等^[11-13]。Tsai 等^[11]采用酸解法提取 3 种食用菌氨基酸类风味物质,结果发现所测 3 种食用菌中总游离氨基酸含量均较低(8.97~14.91 mg/g);Poojary 等^[12]采用热水浸提法提取 6 种食用菌中的游离氨基酸及呈味核苷酸等鲜味成分,结果显示:室温下提取 180 min 时游离氨基酸的提取率最高,70 °C 下提取 30 min 时呈味核苷酸的提取率最高;林玲等^[13]采用超声波提取法对真姬菇氨基酸类风味物质进行提取,结果表明:最佳工艺条件为温度 80 °C、时间 30 min、料液比 1:16。这些方法虽提取速度快、操作简便,但能耗高、有污染,且高温条件易破坏水解产物中的热敏性成分,使鲜味物质的提取率下降。蛋白酶酶解技术可将蛋白质、多肽降解为氨基酸,促进鲜味物质的释放,且条件温和、副反应少,水解过程中无有害副

收稿日期: 2021-08-07

基金项目: 陕西省重点研发计划项目(2021NY-152)

作者简介: 黄爱云(1997—),女,硕士

通信作者: 徐怀德 E-mail: xuhuaide@aliyun.com

产物的生成^[14]。将蛋白酶酶解技术运用于食用菌风味物质的提取,是目前的研究热点^[15-16]。Poojary等^[15]采用蛋白酶酶解法提取6种食用菌中的游离氨基酸及呈味核苷酸,结果显示酶解法对这两种物质的提取率是酸解法的20倍;许锐等^[16]采用高压蒸煮法和蛋白酶酶解法提取灰树花游离氨基酸,发现复合酶酶解处理鲜味氨基酸的含量是高压蒸煮法的2~3倍。这些研究表明蛋白酶酶解技术适用于提取食用菌中的鲜味物质。真姬菇虽是一种优良的鲜味物质来源,但用不同蛋白酶处理对其鲜味物质释放的影响鲜有研究报道。另外,研究表明食用菌菌盖和菌柄所含鲜味物质有显著差异,研究蛋白酶处理对真姬菇菌盖和菌柄鲜味物质释放的影响,将促进真姬菇产品的精细化加工^[17]。

本研究以热风干燥后真姬菇菌盖与菌柄粉为原料,通过氨基酸自动分析仪、高效液相色谱仪和电子舌系统评估3种单酶酶解(风味蛋白酶、复合蛋白酶、木瓜蛋白酶)和2种双酶酶解(风味蛋白酶和复合蛋白酶复配酶、风味蛋白酶和木瓜蛋白酶复配酶)对真姬菇菌盖与菌柄鲜味物质释放的影响。真姬菇作为一种已实现工厂化栽培,风味独特的优良食用菌,目前面临产品种类单一、附加值低等问题。利用蛋白酶酶解技术充分释放真姬菇鲜味物质,可以促进真姬菇在开发天然少盐鲜味调味品方面的应用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜真姬菇,购于杨凌当地超市;木瓜蛋白酶

(酶活力为100 000 U/g)、复合蛋白酶(酶活力为100 000 U/g)、风味蛋白酶(酶活力30 000 U/g),北京索莱宝科技有限公司;5'-腺苷酸(5'-AMP)、5'-胞苷酸(5'-CMP)、5'-鸟苷酸(5'-GMP)、5'-肌苷酸(5'-IMP)、5'-尿苷酸(5'-UMP)标准品,阿拉丁试剂有限公司;氨基酸混合标准品,美国Sigma-Aldrich公司。

1.2 仪器与设备

水浴恒温振荡器,金坛市宏华仪器厂;高速冷冻离心机,安徽中科中佳科学仪器有限公司;L-8900氨基酸自动分析仪,日立公司;LC-2030 PLUS高效液相色谱仪,日本岛津公司; α -ASTREE电子舌系统,法国ALPHA MOS公司。

1.3 试验方法

1.3.1 材料预处理 挑选大小一致、无腐败病变的新鲜真姬菇作为试验材料。将真姬菇菌盖与菌柄分离后在60℃下进行热风干燥,待水分含量降至12%以下时,粉碎过50目筛,密封储存于干燥器中。

1.3.2 蛋白酶酶解试验设计 称取一定量的真姬菇菌盖与菌柄粉,按料液比1:15加蒸馏水,搅匀后分别选用风味蛋白酶(风味)、复合蛋白酶(复合)、木瓜蛋白酶(木瓜)、风味蛋白酶和复合蛋白酶复配酶(风+复)、风味蛋白酶和木瓜蛋白酶复配酶(风+木)对真姬菇菌盖和菌柄进行酶解处理。各酶的水解条件见表1,水浴震荡,待水解结束后将酶解液置于90~100℃条件下灭酶10 min,并于10 000 r/min离心10 min,收集上清液待测^[9,18]。

表1 不同蛋白酶处理组的酶解条件

Table 1 Enzymolysis conditions of different proteases treatment groups

酶种类	加酶量/U·g ⁻¹	pH	温度/℃	时间/h
对照	-	-	50	2
风味蛋白酶	4 000	7.0	50	2
复合蛋白酶	4 000	7.0	50	2
木瓜蛋白酶	4 000	7.0	50	2
复合蛋白酶+风味蛋白酶	2 000+2 000	7.0	50	2
木瓜蛋白酶+风味蛋白酶	2 000+2 000	7.0	50	2

1.3.3 游离氨基酸含量的测定 参照GB 5009.124-2016《食品安全国家标准 食品中氨基酸的测

定》中的方法测定游离氨基酸的含量^[19]。

1.3.4 呈味核苷酸含量的测定 依照Hu等^[20]的

方法采用高效液相色谱仪测定呈味核苷酸含量。色谱条件: 色谱柱 Inertsustain-C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温 30 ℃; 流动相为 KH₂PO₄(0.02 mol/L, pH=4.55)-乙腈(99.5:0.5, 体积比); 检测波长 254 nm; 流速 1.0 mL/min; 进样量 20 μL。

1.3.5 等效鲜味浓度的计算 等效鲜味浓度(EUC)具体计算公式如下^[21]:

$$EUC(g \text{ MSG}/100 g) = \frac{\sum a_i b_i + 1218 (\sum a_i b_i)}{(\sum a_i b_i)} \quad (1)$$

式中, a_i ——呈鲜氨基酸的量【谷氨酸(Glu)或天冬氨酸(Asp)], g/100 g; a_j ——呈鲜核苷酸的量(5'-AMP, 5'-GMP, 5'-IMP), g/100 g; b_i ——呈鲜氨基酸相对谷氨酸的值(Glu=1, Asp=0.077); b_j ——呈味核苷酸相对于 5'-肌苷酸的值(5'-AMP=0.18, 5'-GMP=2.3, 5'-IMP=1); 1218——协同作用常数。

1.3.6 电子舌分析 采用法国 α-ASTREE 电子舌系统, 配有 ZZ, JE, BB, CA, GA, HA, JB 共 7 个传感器, 它们对样品的鲜、咸、酸、甜和苦味敏感。

将真姬菇酶解液稀释 10 倍后利用电子舌系统检测并分析其味觉特性^[22]。

1.4 统计分析

使用 Excel、SPSS 进行数据整理分析及显著性检验, $P < 0.05$ 表示差异显著, 采用 Origin 2018 软件绘图。电子舌测试数据采用法国 α-ASTREE 电子舌系统自带软件进行处理, 并利用 PCA 法对样品进行辨识分类。每组试验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 蛋白酶处理对真姬菇菌盖与菌柄酶解液游离氨基酸的影响

2.1.1 蛋白酶处理对真姬菇菌盖与菌柄酶解液游离氨基酸组成的影响 鲜味活性成分使食用菌味道鲜美, 其中占主导成分的是游离氨基酸^[9]。不同蛋白酶处理的真姬菇菌盖与菌柄酶解液的游离氨基酸含量如表 2 和表 3 所示。由表 2 和表 3 可知, 真姬菇菌盖中 17 种游离氨基酸总量约为菌柄的 2.5 倍, 达到了 90.84 mg/g, 其中各游离氨基酸含量

表 2 不同蛋白酶处理真姬菇菌盖酶解液游离氨基酸含量

Table 2 Contents of free amino acids in the pileus hydrolysates of *Hypsizygus marmoreus* treated with different proteases

名称	游离氨基酸含量/mg·g ⁻¹					
	对照	风味	复合	木瓜	风+复	风+木
天冬氨酸	1.83 ± 0.03 ^b	4.02 ± 0.20 ^a	1.78 ± 0.02 ^b	1.79 ± 0.08 ^b	3.78 ± 0.12 ^a	3.71 ± 0.20 ^a
谷氨酸	13.61 ± 0.60 ^c	15.73 ± 0.63 ^{ab}	14.43 ± 0.93 ^{bc}	13.63 ± 0.80 ^c	17.07 ± 0.77 ^a	15.38 ± 0.78 ^{abc}
苏氨酸	5.66 ± 0.34 ^b	8.47 ± 0.32 ^a	5.78 ± 0.21 ^b	5.58 ± 0.41 ^b	7.99 ± 0.32 ^a	7.94 ± 0.44 ^a
丝氨酸	3.94 ± 0.32 ^b	5.81 ± 0.21 ^a	4.02 ± 0.4 ^b	3.95 ± 0.23 ^b	5.73 ± 0.31 ^a	5.53 ± 0.23 ^a
甘氨酸	3.39 ± 0.29 ^b	4.78 ± 0.28 ^a	3.48 ± 0.21 ^b	3.43 ± 0.30 ^b	4.64 ± 0.12 ^a	4.53 ± 0.23 ^a
丙氨酸	12.61 ± 1.01 ^b	16.02 ± 0.81 ^a	12.61 ± 0.29 ^b	12.73 ± 0.87 ^b	15.27 ± 1.07 ^a	15.01 ± 1.23 ^a
缬氨酸	7.32 ± 0.42 ^c	11.54 ± 1.02 ^a	9.32 ± 0.80 ^{bc}	7.66 ± 0.66 ^c	11.94 ± 0.90 ^a	11.08 ± 0.80 ^{ab}
甲硫氨酸	ND	1.79 ± 0.02 ^a	1.07 ± 0.05 ^b	0.62 ± 0.02 ^c	1.79 ± 0.10 ^a	1.70 ± 0.11 ^a
异亮氨酸	4.60 ± 0.21 ^c	8.38 ± 0.38 ^a	6.76 ± 0.60 ^b	4.89 ± 0.30 ^c	8.55 ± 0.54 ^a	7.83 ± 0.61 ^{ab}
亮氨酸	7.70 ± 0.20 ^b	13.43 ± 1.01 ^a	11.84 ± 0.82 ^a	8.31 ± 0.64 ^b	13.73 ± 0.98 ^a	12.78 ± 0.76 ^a
苯丙氨酸	1.72 ± 0.12 ^c	3.77 ± 0.21 ^{ab}	3.12 ± 0.12 ^b	1.99 ± 0.71 ^c	4.04 ± 0.18 ^a	3.62 ± 0.21 ^{ab}
组氨酸	1.97 ± 0.10 ^c	3.69 ± 0.21 ^a	2.59 ± 0.12 ^b	2.10 ± 0.12 ^c	3.30 ± 0.21 ^a	3.43 ± 0.20 ^a
精氨酸	9.33 ± 0.20 ^c	13.44 ± 0.21 ^a	10.86 ± 0.84 ^b	9.56 ± 0.60 ^c	13.21 ± 0.70 ^a	12.97 ± 0.80 ^a
脯氨酸	2.59 ± 0.21 ^a	2.73 ± 0.02 ^a	2.33 ± 0.12 ^a	2.40 ± 0.21 ^a	2.57 ± 0.08 ^a	2.46 ± 0.14 ^a
赖氨酸	7.74 ± 0.41 ^c	10.68 ± 0.43 ^a	8.45 ± 0.61 ^b	7.73 ± 0.61 ^c	10.54 ± 0.82 ^a	10.17 ± 0.57 ^a
酪氨酸	1.80 ± 0.07 ^d	3.25 ± 0.12 ^a	2.25 ± 0.04 ^c	1.90 ± 0.02 ^d	3.27 ± 0.02 ^a	2.91 ± 0.01 ^b
半胱氨酸	5.03 ± 0.33 ^a	4.88 ± 0.21 ^a	5.10 ± 0.31 ^a	4.70 ± 0.29 ^a	4.62 ± 0.21 ^a	3.77 ± 0.02 ^b
必需氨基酸	34.74 ± 2.12 ^c	58.08 ± 3.01 ^a	46.34 ± 3.21 ^b	36.79 ± 2.10 ^c	58.58 ± 4.21 ^a	55.12 ± 3.87 ^a
总游离氨基酸	90.84 ± 6.42 ^c	132.43 ± 8.21 ^a	105.80 ± 7.20 ^b	92.98 ± 5.41 ^c	132.03 ± 7.69 ^a	124.82 ± 9.30 ^a

注: 同一行中不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$); ND 表示低于检出限。

表3 不同蛋白酶处理真姬菇菌柄酶解液游离氨基酸含量

Table 3 Contents of free amino acids in the stipe hydrolysates of *Hypsizygus marmoreus* treated with different proteases

名称	游离氨基酸含量/mg·g ⁻¹					
	对照	风味	复合	木瓜	风+复	风+木
天冬氨酸	ND	2.27 ± 0.04 ^a	ND	ND	1.82 ± 0.10 ^b	1.77 ± 0.05 ^b
谷氨酸	5.62 ± 0.12 ^d	8.09 ± 0.40 ^{ab}	6.68 ± 0.16 ^c	5.80 ± 0.24 ^d	8.78 ± 0.46 ^a	7.57 ± 0.30 ^b
苏氨酸	2.23 ± 0.08 ^b	4.33 ± 0.04 ^a	2.63 ± 0.21 ^b	2.43 ± 0.13 ^b	3.96 ± 0.32 ^a	3.91 ± 0.08 ^a
丝氨酸	1.54 ± 0.03 ^c	2.98 ± 0.08 ^a	1.86 ± 0.14 ^c	1.61 ± 0.08 ^c	2.77 ± 0.20 ^{ab}	2.62 ± 0.12 ^b
甘氨酸	1.40 ± 0.02 ^c	2.55 ± 0.03 ^a	1.71 ± 0.08 ^b	1.50 ± 0.12 ^{bc}	2.37 ± 0.14 ^a	2.28 ± 0.16 ^a
丙氨酸	5.12 ± 0.20 ^c	8.09 ± 0.40 ^a	6.33 ± 0.38 ^{bc}	5.70 ± 0.46 ^c	7.80 ± 0.50 ^a	7.44 ± 0.67 ^{ab}
缬氨酸	3.44 ± 0.04 ^d	6.53 ± 0.13 ^a	5.02 ± 0.20 ^c	3.39 ± 0.30 ^d	6.04 ± 0.34 ^{ab}	5.61 ± 0.41 ^{bc}
甲硫氨酸	ND	ND	ND	ND	ND	ND
异亮氨酸	1.61 ± 0.10 ^c	4.00 ± 0.40 ^a	3.18 ± 0.18 ^b	1.86 ± 0.06 ^c	4.13 ± 0.20 ^a	3.63 ± 0.23 ^{ab}
亮氨酸	2.77 ± 0.20 ^c	6.52 ± 0.42 ^{ab}	5.64 ± 0.40 ^b	3.48 ± 0.28 ^c	6.62 ± 0.40 ^a	6.02 ± 0.10 ^{ab}
苯丙氨酸	1.13 ± 0.10 ^b	2.47 ± 0.14 ^a	2.21 ± 0.20 ^a	1.53 ± 0.10 ^b	2.54 ± 0.20 ^a	2.39 ± 0.30 ^a
组氨酸	0.81 ± 0.11 ^c	2.10 ± 0.20 ^a	1.28 ± 0.11 ^b	0.98 ± 0.06 ^{bc}	2.12 ± 0.12 ^a	1.83 ± 0.13 ^a
精氨酸	4.73 ± 0.03 ^d	7.68 ± 0.18 ^a	6.37 ± 0.27 ^b	5.60 ± 0.20 ^c	7.44 ± 0.20 ^a	7.22 ± 0.22 ^a
脯氨酸	1.11 ± 0.08 ^{bc}	1.34 ± 0.04 ^a	1.27 ± 0.06 ^{ab}	1.25 ± 0.10 ^{ab}	1.12 ± 0.02 ^{bc}	1.06 ± 0.06 ^c
赖氨酸	3.55 ± 0.30 ^c	5.65 ± 0.20 ^a	4.43 ± 0.20 ^b	3.96 ± 0.17 ^{bc}	5.49 ± 0.30 ^a	5.28 ± 0.28 ^a
酪氨酸	ND	ND	ND	ND	2.37 ± 0.11 ^a	2.20 ± 0.08 ^a
半胱氨酸	2.71 ± 0.51 ^c	3.83 ± 0.04 ^{ab}	3.68 ± 0.21 ^{ab}	3.20 ± 0.17 ^{bc}	4.17 ± 0.16 ^a	3.20 ± 0.24 ^{bc}
必需氨基酸	14.74 ± 1.22 ^c	29.50 ± 1.89 ^a	23.12 ± 1.41 ^b	16.64 ± 0.86 ^c	28.78 ± 1.94 ^a	26.84 ± 1.20 ^{ab}
总游离氨基酸	37.78 ± 1.34 ^c	68.43 ± 3.42 ^a	52.29 ± 3.10 ^b	42.27 ± 2.10 ^c	69.54 ± 4.80 ^a	64.02 ± 3.40 ^a

注:同一行中不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$);ND表示低于检出限。

均高于菌柄。天冬氨酸在菌柄中并未检出,而在菌盖中含量达到了 1.83 mg/g,谷氨酸在真姬菇菌盖中的含量为 13.61 mg/g,是菌柄的 2.4 倍。Hu 等^[20]在研究干燥对大球盖菇非挥发性味觉成分的研究中发现大球盖菇菌盖中各游离氨基酸的含量均显著高于菌柄,这与本试验结果一致。与粮农组织/世界卫生组织的标准相比(食物中必需氨基酸含量与非必需氨基酸含量比例为 4:6 最适于人体消化吸收),真姬菇菌盖与菌柄的必需氨基酸总量均占总游离氨基酸的 38%左右,表明其具有良好的营养品质^[23]。

由表 2 和表 3 可知,与未处理组相比,除木瓜蛋白酶外其它各酶解处理组的游离氨基酸含量均显著提升($P < 0.05$)。经蛋白酶酶解后(除木瓜蛋白酶外),菌柄中游离氨基酸的总量从 37.78 mg/g 显著提升至 52.29~69.54 mg/g,菌盖中游离氨基酸的总量从 90.84 mg/g 显著提升至 105.80~132.43 mg/g。在单酶酶解处理组中,从最终酶解液的各游离

氨基酸含量来看,无论是菌盖和菌柄,风味蛋白酶的酶解效果都是最佳,其次是复合蛋白酶和木瓜蛋白酶。从两种鲜味氨基酸来看,风味蛋白酶处理组天冬氨酸和谷氨酸的含量显著高于其它各单酶处理组($P < 0.05$),特别是天冬氨酸,其在菌柄对照组、复合和木瓜处理组中并未检出,而经风味蛋白酶酶解后含量达到了 2.27 mg/g,菌盖经风味蛋白酶处理后天冬氨酸的含量相较于对照组显著提高约 120%。在双酶酶解处理组中,在相同的总酶浓度下,酶解 2 h 后,2 种复配酶处理组的总游离氨基酸含量均相较于复合蛋白酶和木瓜蛋白酶有显著提高($P < 0.05$),而与风味蛋白酶处理组没有显著性差异($P > 0.05$)。以上结果表明蛋白酶处理对于促进真姬菇菌盖和菌柄中游离氨基酸的释放具有显著效果,与许锐等^[16]在研究酶解对灰树花呈味物质释放影响和常诗洁等^[18]研究 4 种蛋白酶水解双孢蘑菇中的结果一致。Poojary 等^[15]分别采用传统酸提法和酶提法提取了香菇、白色双孢蘑菇、

棕色双孢蘑菇、平菇、茶树菇的总游离氨基酸,结果显示酶提法使得提取效率提高了 20 倍。不同蛋白酶处理的真姬菇菌盖与菌柄酶解液的游离氨基酸含量不同的原因可能与不同蛋白酶不同的酶切位点有关,风味蛋白酶同时具有内切蛋白酶和外切肽酶两种活性,相较于复合蛋白酶和木瓜蛋白酶可以更大程度地将真姬菇的蛋白质和多肽降解为游离氨基酸^[18,24]。

2.1.2 蛋白酶处理对真姬菇菌盖与菌柄酶解液游离氨基酸呈味特征影响 17 种游离氨基酸可按其滋味特征分为 5 类,包括鲜味、甜味、苦味、甜/苦味和无味,鲜味氨基酸包括天冬氨酸(Asp)和谷氨酸(Glu),甜味氨基酸包括苏氨酸(Thr)、丝氨酸(Ser)、甘氨酸(Gly)、丙氨酸(Ala),苦味氨基酸包括缬氨酸(Val)、甲硫氨酸(Met)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、苯丙氨酸(Phe)、组氨酸(His)、精氨酸(Arg),甜/苦味氨基酸包括脯氨酸(Pro)、赖氨酸(Lys),无味氨基酸包括苏氨酸(Tyr)、半胱氨酸(Cys)^[2]。由图 1 可知,对照组真姬菇菌盖和菌柄中鲜味氨基酸的含量分别为 15.44 mg/g 和 5.62 mg/g,约占总游离氨基酸的 17%和 15%。除木瓜蛋白酶和复合蛋白酶处理组外,菌盖与菌柄其余 3 组

蛋白酶处理组酶解液中鲜味氨基酸含量均较对照组有显著提升($P<0.05$),其含量从高到低分别为风+复(菌盖含量为 20.85 mg/g、菌柄含量为 10.60 mg/g)>风味(菌盖含量为 19.75 mg/g、菌柄含量为 10.36 mg/g)>风+木(菌盖含量为 19.09 mg/g、菌柄含量为 9.34 mg/g)。Yang 等^[25]报道食用菌中鲜味氨基酸的含量可分为 3 个范围:低(<5 mg/g)、中($5\sim 20$ mg/g)和高范围(>20 mg/g),真姬菇菌盖和菌柄所含鲜味氨基酸均处于中范围(菌盖含量为 15.44 mg/g,菌柄含量为 5.62 mg/g),这表明真姬菇菌盖和菌柄均具有潜在的鲜味利用价值。对照组中菌盖与菌柄苦味氨基酸分别占总游离氨基酸的 38%和 35%左右,经 2 h 酶解处理后,除木瓜蛋白酶处理组外,其它各处理组中苦味氨基酸均占总游离氨基酸的 43%左右,显著高于对照组($P<0.05$)。蛋白酶处理在提高酶解产物中鲜味氨基酸含量的同时不可避免地生成苦味氨基酸,Poojary 等^[19]和李雪^[20]在利用酶法提取食用菌鲜味氨基酸的研究中也发现苦味氨基酸的生成,这一现象可能是由于蛋白酶处理使某些含有苦味氨基酸的肽的裂解导致的^[27]。

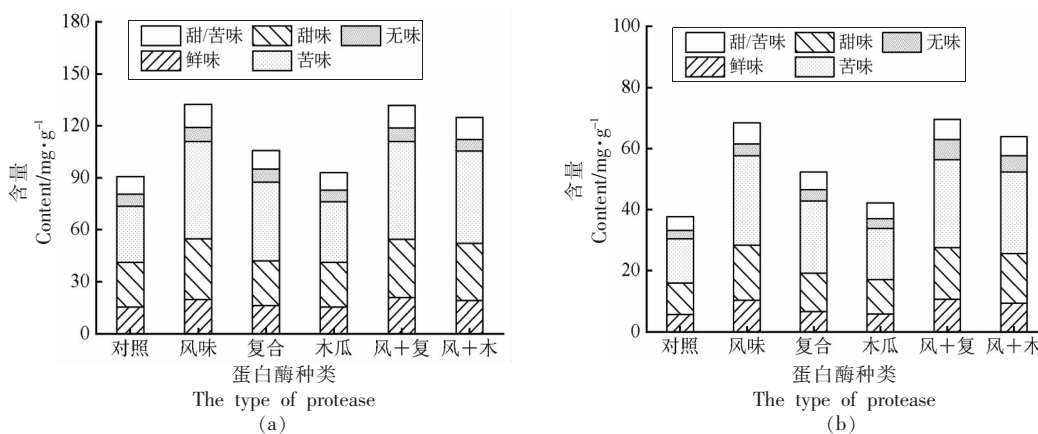


图 1 不同蛋白酶处理真姬菇菌盖(a)和菌柄(b)酶解液呈味氨基酸含量

Fig.1 Contents of delicious amino acids in the pileus (a) and stipe (b) hydrolysates of *Hypsizygus marmoreus* treated with different proteases

2.2 蛋白酶处理对真姬菇菌盖与菌柄酶解液呈味核苷酸的影响

不同蛋白酶处理的真姬菇菌盖与菌柄酶解液呈味核苷酸的含量见表 4。由表 4 可知,真姬菇菌盖和菌柄中一共检测出 5 种呈味核苷酸,分别为

5'-AMP、5'-UMP、5'-IMP、5'-GMP、5'-CMP。真姬菇菌柄中的 5 种 5'-核苷酸总量显著低于菌盖中的含量($P<0.05$),菌盖中的含量约是菌柄的 2.6 倍。食用菌中的呈鲜核苷酸包括 5'-AMP、5'-IMP、5'-GMP^[28],除风味蛋白酶菌盖处理组外,其

余真姬菇酶解液处理组中总5'-核苷酸含量与对照组没有显著性差异($P>0.05$),鲜味核苷酸的含量与对照组存在显著性差异($P<0.05$)。由表4可知,风+复处理组的真姬菇菌盖与菌柄酶解液拥有最高的鲜味核苷酸含量(菌盖含量为8.45 mg/g、菌柄含量为3.88 mg/g),显著高于对照组和其它蛋白酶处理组($P<0.05$)。Chen等^[17]在研究不同生长阶段香菇菌盖和菌柄中5'-核苷酸含量时发现在

各个阶段香菇菌盖中的5'-核苷酸含量均高于菌柄,这与本研究结果一致。真姬菇菌盖中呈味核苷酸的含量显著高于香菇、双孢蘑菇、平菇等食用菌^[1],表明真姬菇菌盖是潜在的制备食品调味料或食品风味增强剂的优质原料。除木瓜蛋白酶菌柄处理组外,其它蛋白酶酶解处理均显著提高了真姬菇菌盖和菌柄的呈味核苷酸含量,主要原因是由于酶解处理显著提高了酶解液中5'-AMP的含量。

表4 不同蛋白酶处理真姬菇菌盖与菌柄酶解液呈味核苷酸含量

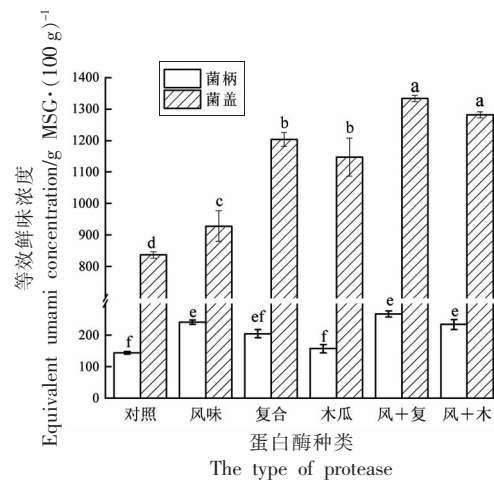
Table 4 Contents of nucleotides in the pileus and stipe hydrolysates of *Hypsizygus marmoreus* treated with different proteases

组织	蛋白酶	呈味核苷酸含量/mg·g ⁻¹						
		5'-AMP	5'-UMP	5'-IMP	5'-GMP	5'-CMP	鲜味核苷酸	总核苷酸
菌盖	对照	4.72 ± 0.04 ^d	6.37 ± 0.08 ^a	1.08 ± 0.02 ^a	1.33 ± 0.01 ^c	2.56 ± 0.60 ^{cd}	7.13 ± 0.10 ^d	16.06 ± 1.20 ^b
	风味	5.58 ± 0.04 ^a	6.38 ± 0.40 ^a	1.07 ± 0.06 ^a	1.16 ± 0.01 ^c	4.94 ± 0.01 ^a	7.81 ± 0.03 ^c	19.13 ± 2.13 ^a
	复合	4.87 ± 0.06 ^c	6.39 ± 0.19 ^a	1.09 ± 0.02 ^a	2.09 ± 0.01 ^a	4.52 ± 0.03 ^{ab}	8.05 ± 0.10 ^{bc}	18.96 ± 1.04 ^{ab}
	木瓜	4.78 ± 0.04 ^{cd}	6.61 ± 0.61 ^a	1.12 ± 0.21 ^a	2.11 ± 0.17 ^a	3.62 ± 0.22 ^{bc}	8.01 ± 0.03 ^{bc}	18.20 ± 2.24 ^{ab}
	风+复	5.54 ± 0.02 ^a	6.45 ± 0.36 ^a	1.07 ± 0.09 ^a	1.84 ± 0.04 ^b	2.93 ± 0.08 ^{cd}	8.45 ± 0.11 ^a	17.83 ± 0.10 ^{ab}
	风+木	5.13 ± 0.03 ^b	6.06 ± 0.10 ^a	1.00 ± 0.07 ^{ab}	2.08 ± 0.04 ^a	2.78 ± 0.25 ^{cd}	8.21 ± 0.08 ^{ab}	17.00 ± 0.50 ^{ab}
菌柄	对照	1.97 ± 0.03 ^g	1.38 ± 0.10 ^{bc}	0.66 ± 0.07 ^c	0.47 ± 0.14 ^d	1.51 ± 0.16 ^e	3.10 ± 0.10 ^e	5.99 ± 0.10 ^e
	风味	2.19 ± 0.11 ^f	1.33 ± 0.14 ^c	0.77 ± 0.01 ^{bc}	0.53 ± 0.02 ^d	2.97 ± 0.04 ^c	3.49 ± 0.12 ^f	7.79 ± 0.09 ^e
	复合	2.17 ± 0.01 ^f	1.50 ± 0.11 ^{bc}	0.78 ± 0.09 ^{bc}	0.58 ± 0.04 ^d	1.83 ± 0.02 ^{bc}	3.53 ± 0.06 ^f	6.86 ± 0.12 ^e
	木瓜	1.99 ± 0.01 ^g	1.29 ± 0.01 ^c	0.64 ± 0.02 ^c	0.53 ± 0.02 ^d	1.64 ± 0.10 ^e	3.16 ± 0.10 ^e	6.09 ± 0.09 ^e
	风+复	2.60 ± 0.00 ^e	2.16 ± 0.04 ^{bc}	0.74 ± 0.02 ^{bc}	0.54 ± 0.04 ^d	1.56 ± 0.06 ^e	3.88 ± 0.10 ^e	7.60 ± 0.60 ^e
	风+木	2.20 ± 0.03 ^f	2.51 ± 0.70 ^b	0.75 ± 0.02 ^{bc}	0.58 ± 0.02 ^d	1.55 ± 0.03 ^e	3.53 ± 0.03 ^f	7.59 ± 0.20 ^e

注:同一列中不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

2.3 蛋白酶处理对真姬菇菌盖与菌柄酶解液等效鲜味浓度的影响

Yamaguchi等^[21]在1971年已经证实鲜味核苷酸和鲜味氨基酸有协同增鲜作用,后来研究发现这种协同增鲜作用的主要原因是由于少量的5'-核苷酸就可以将低于阈值含量的鲜味氨基酸显现出鲜味。EUC值可对鲜味氨基酸与鲜味核苷酸协同作用所产生的鲜味强度进行评价,食用菌中的EUC值可分为4个等级:1)>1 000 g MSG/100 g; 2)100~1 000 g MSG/100 g; 3)10~100 g MSG/100 g; 4)<10 g MSG/100 g^[2]。由图2可知,对照组真姬菇菌盖与菌柄的EUC值均处于第2等级(菌盖为836.90 g MSG/100 g、菌柄为144.01 g MSG/100 g)。与对照组相比,除了复合蛋白酶和木瓜蛋白酶处理的菌柄组外,其它各处理组的EUC值均显著高



注:图中不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

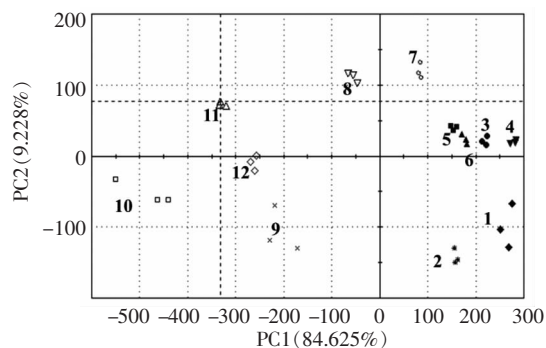
图2 不同蛋白酶处理真姬菇菌盖与菌柄酶解液等效鲜味浓度值

Fig.2 Equivalent umami concentration in the pileus and stipe hydrolysates of *Hypsizygus marmoreus* treated with different proteases

于对照组 ($P < 0.05$), 双酶处理组菌盖酶解液的 EUC 值最高 (风+复蛋白酶处理组为 1 333.75 g MSG/100 g、风+木蛋白酶处理组为 1 281.39 g MSG/100 g), 这一结果显著高于干燥后杏鲍菇和双孢蘑菇的 EUC 值 (分别为 52.52 g MSG/100 g 和 776.00 g MSG/100 g)^[28-29], 原因可能与蘑菇品种以及加工方式的不同有关。菌盖的 EUC 值显著高于菌柄的 EUC 值的主要原因是真姬菇菌盖的呈鲜氨基酸和呈鲜核苷酸含量均高于菌柄, 这与 Chen 等^[17]和 Hu 等^[20]的研究一致。根据以上结果, 可以确定在相同的总酶浓度和各自最适的酶解条件下, 风+复蛋白酶处理相较于其它 4 组蛋白酶处理更适于真姬菇菌盖以及菌柄呈鲜物质的释放。

2.4 蛋白酶处理对真姬菇菌盖与菌柄酶解液电子舌味感值的影响

采用主成分分析法 (PCA) 对不同蛋白酶处理真姬菇菌盖与菌柄酶解液的滋味进行分析, 结果如图 3 所示。由图 3 可知, PCA 结果中第 1 主成分占比 84.625%, 第 2 主成分占比 9.228%, 前 2 个主成分总贡献率占比超过 90%, 不同蛋白酶酶解产物与对照组分布在不同区域表明不同蛋白酶处理真姬菇菌盖与菌柄酶解液及对照组的滋味特征存在明显差异。与其它处理组相比, 风味蛋白酶处理组更接近于对照组, 这说明在整体滋味上风味蛋白酶处理的真姬菇菌盖与菌柄酶解液更接近对照



注: 1. 菌柄对照组; 2. 菌柄风味蛋白酶处理组; 3. 菌柄复合蛋白酶处理组; 4. 菌柄木瓜蛋白酶处理组; 5. 菌柄风+复蛋白酶处理组; 6. 菌柄风+木蛋白酶处理组; 7. 菌盖对照组; 8. 菌盖风味蛋白酶处理组; 9. 菌盖复合蛋白酶处理组; 10. 菌盖木瓜蛋白酶处理组; 11. 菌盖风+复蛋白酶处理组; 12. 菌盖风+木蛋白酶处理组。

图 3 不同蛋白酶处理真姬菇菌盖与菌柄酶解产物电子舌 PCA 图

组^[30]。图 4 反应了不同处理组真姬菇菌盖与菌柄酶解产物电子舌传感器响应值的差异。由图 4 可知, 相较于菌柄, 不同处理组的菌盖酶解产物滋味特征相差更大, 这可能与菌盖的高蛋白含量相关, 蛋白质经过不同蛋白酶酶解后, 产生了更加复杂多样的滋味物质, 导致其整体滋味物质变化大, 这与主成分分析结果一致。

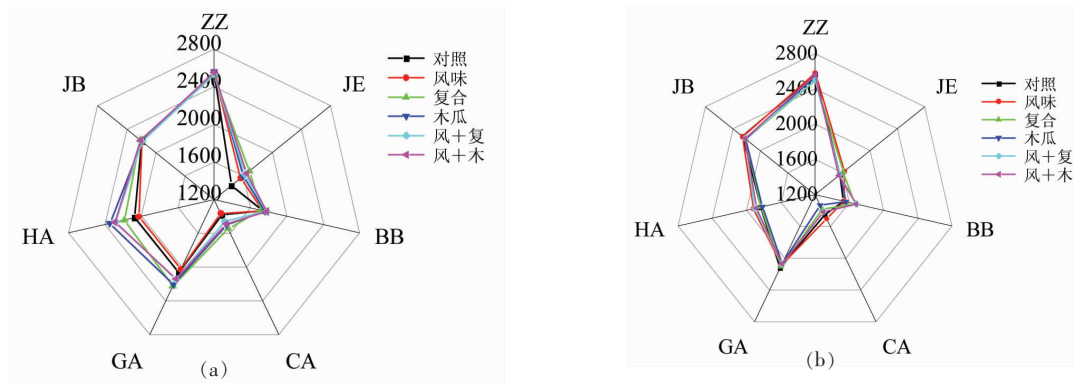


图 4 不同蛋白酶处理真姬菇菌盖(a)与菌柄(b)酶解产物电子舌雷达图

Fig.4 Radar graph for the electronic tongue in the pileus (a) and stipe (b) hydrolysates of *Hypsizygus marmoreus* treated with different proteases

3 结论

本研究对不同蛋白酶处理对真姬菇菌盖与菌柄鲜味物质释放的效果进行分析, 得出以下结论: 1) 不同蛋白酶处理会引起真姬菇菌盖与菌柄鲜味

物质释放的不同, 主要表现在游离氨基酸组成与含量以及呈味核苷酸含量差异显著, 且电子舌系统能够较好地地区分出不同蛋白酶处理的真姬菇酶解物的滋味差异; 2) 在相同的总酶浓度和各自最

适的酶解条件下,风+复蛋白酶处理相较于其它4组蛋白酶处理更利于真姬菇菌盖和菌柄中鲜味物质的释放;3)真姬菇菌盖相较于菌柄在开发鲜味物质方面更有潜力。本研究为后续酶解技术应用于真姬菇天然少盐鲜味调味品方面的应用提供了数据支撑和理论依据,促进真姬菇产品多样化。

参 考 文 献

- [1] MIYAKI T, RETIVEAU-KROGMANN A, BYRNES E, et al. Umami increases consumer acceptability, and perception of sensory and emotional benefits without compromising health benefit perception [J]. *Journal of Food Science*, 2016, 81(2): 483-493.
- [2] PHAT C, MOON B K, LEE C. Evaluation of umami taste in mushroom extracts by chemical analysis, sensory evaluation, and an electronic tongue system [J]. *Food Chemistry*, 2016, 192: 1068-1077.
- [3] RADAM A, YACOB M R, BEE T S, et al. Consumers' perceptions, attitudes and willingness to pay towards food products with 'No Added Msg' labeling [J]. *International Journal of Marketing Studies*, 2010, 2(1): 65.
- [4] TAN M, HE F J, WANG C, et al. Twenty-four-hour urinary sodium and potassium excretion in China: A systematic review and meta-analysis [J]. *Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease*, 2019, 8(14): 1-12.
- [5] FRANCISCO C R L, HELENO S A, FERNANDES I P M, et al. Functionalization of yogurts with *Agaricus bisporus* extracts encapsulated in spray-dried maltodextrin crosslinked with citric acid [J]. *Food Chemistry*, 2018, 245(15): 845-853.
- [6] THAYANA V M, CARLA S G, RAFAELA C P, et al. A shiitake mushroom extract as a viable alternative to NaCl for a reduction in sodium in beef burgers: A sensory perspective [J]. *British Food Journal*, 2018, 6(120): 1366-1380.
- [7] HARADA-PADERMO S D, DIAS-FACETO L S, SELANI M M, et al. Umami ingredient, a newly developed flavor enhancer from shiitake byproducts, in low-sodium products: A study case of application in cornextruded snacks [J]. *LWT*, 2021, 138(5): 110806.
- [8] WONG K M, DECKER E A, AUTIO W R, et al. Utilizing mushrooms to reduce overall sodium in taco filling using physical and sensory evaluation [J]. *Journal of Food Science*, 2017, 82(10): 2379-2386.
- [9] 李雪, 冯涛, 宋诗清, 等. 不同处理方法对蟹味菇呈味物质释放的影响 [J]. *食品科学*, 2020, 41(10): 198-205.
- LI X, FENG T, SONG S Q, et al. Effect of different pretreatment methods on the flavor substances release of *Hypsizygus marmoreus* [J]. *Food Science*, 2020, 41(10): 198-205.
- [10] 王丽, 罗红霞, 李淑荣, 等. 海鲜菇氨基酸组成分析及营养评价 [J]. *食品工业科技*, 2016, 37(21): 338-341, 346.
- WANG L, LUO H X, LI S R, et al. Amino acid composition and nutritional evaluation of different *Hypsizygus marmoreus* samples [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(21): 338-341, 346.
- [11] TSAI S Y, TSAI H L, MAU J L. Non-volatile taste components of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea* and *Boletus edulis* [J]. *Food Chemistry*, 2008, 107(3): 977-983.
- [12] POOJARY M M, ORLIEN V, PASSAMONTI P, et al. Improved extraction methods for simultaneous recovery of umami compounds from six different mushrooms [J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2017, 63: 171-183.
- [13] 林铃, 张琪辉, 马涛, 等. 真姬菇氨基酸类风味物质超声波提取工艺优化 [J]. *福建农业科技*, 2020(3): 17-21.
- LIN L, ZHANG Q H, MA T, et al. Optimization on ultrasonic extraction technology of amino acid flavor substances in *Hypsizygus marmoreus* [J]. *Fujian Agriculture Science and Technology*, 2020(3): 17-21.
- [14] AMZA T, BALLA A, TOUNKARA F, et al. Effect of hydrolysis time on nutritional, functional and antioxidant properties of protein hydrolysates prepared from gingerbread plum (*Neocarya macrophylla*) seeds [J]. *International Food Research Journal*, 2013, 20(5): 2081.
- [15] POOJARY M M, ORLIEN V, PASSAMONTI P, et al. Enzyme-assisted extraction enhancing the umami taste amino acids recovery from several cultivated mushrooms [J]. *Food Chemistry*, 2017, 234: 236-244.

- [16] 许锐, 徐晓东, 宋泽, 等. 不同提取方法对灰树花呈味物质释放的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(11): 88-94.
XU R, XU X D, SONG Z, et al. Effects of different extraction methods on the release of flavor substances from *Grifola frondosa*[J]. Food Science, 2019, 40(11): 88-94.
- [17] CHEN W C, LI W, YANG Y, et al. Analysis and evaluation of tasty components in the pileus and stipe of *Lentinula edodes* at different growth stages [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2015, 63(3): 795-801.
- [18] 常诗洁, 高娟, 方东路, 等. 4种蛋白酶水解双孢蘑菇效果比较及风味蛋白酶水解工艺优化[J]. 食品科学, 2018, 39(24): 276-283.
CHANG S J, GAO J, FANG D L, et al. Comparison of efficiencies of four proteases in hydrolyzing *Agaricus bisporus* and optimization of flavorzyme hydrolysis process [J]. Food Science, 2018, 39(24): 276-283.
- [19] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品中氨基酸的测定: GB 5009.124-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, State Food and Drug Administration. Determination of amino acids in food; GB 5009.124-2016[S]. Beijing: China Standard Press, 2016.
- [20] HU S, FENG X, HUANG W, et al. Effects of drying methods on non-volatile taste components of *Stropharia rugoso-annulata* mushrooms[J]. LWT, 2020, 127(3): 109428.
- [21] YAMAGUCHI S, YOSHIKAWA T, IKEDA S, et al. Measurement of the relative taste intensity of some α -amino acids and 5'-nucleotides[J]. Journal of Food Science, 1971, 36(6): 846-849.
- [22] ALIM A, YANG C, SONG H L. The behavior of umami components in thermally treated yeast extract [J]. Food Research International, 2019, 120: 534-543.
- [23] Food and Agriculture Organization of the United Nations. Amino-acid content of foods and biological data on proteins[J]. Fao Nutritional Studies, 1968, 26(24): 1-285.
- [24] 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.
TANG X, SUN Y Y, JIANG X T, et al. Comparative analysis of flavor peptides prepared by enzymatic hydrolysis of goose meat with different proteases [J]. Food Science, 2019, 40(22): 141-146.
- [25] YANG J H, LIN H C, MAU J L. Non-volatile taste components of several commercial mushrooms [J]. Food Chemistry, 2001, 72(4): 465-471.
- [26] 李雪. 蟹味菇风味物质研究及其呈味肽的提取鉴定 [D]. 上海: 上海应用技术大学, 2020.
LI X. Research of flavor substance of *Hypsizygus marmoreus* and its taste peptides preparation [D]. Shanghai: Shanghai University of Technology, 2020.
- [27] ERIK P L, GLORIA I D O, ABRAM B A D, et al. Effects of sequential enzymatic hydrolysis on structural, bioactive and functional properties of *Phaseolus lunatus* protein isolate [J]. Food Science and Technology, 2014, 34(3): 441-448.
- [28] LI X B, FENG T, ZHOU F, et al. Effects of drying methods on the tasty compounds of *Pleurotus eryngii*[J]. Food Chemistry, 2015, 166(1): 358-364.
- [29] PEI F, SHI Y, GAO X Y, et al. Changes in non-volatile taste components of button mushroom (*Agaricus bisporus*) during different stages of freeze drying and freeze drying combined with microwave vacuum drying [J]. Food Chemistry, 2014, 165(15): 547-554.
- [30] DANG Y, HAO L, ZHOU T Y, et al. Establishment of new assessment method for the synergistic effect between umami peptides and monosodium glutamate using electronic tongue[J]. Food Research International, 2019, 121(5): 20-27.

Effects of Different Protease Treatments on the Release of Umami Compounds in the Pileus and Stipe of *Hypsizygus marmoreus*

Huang Aiyun, Dong Xiaobo, Kang Shufang, Chen Dan, Cui Mengdi, Xu Huaide*
(College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi)

Abstract Objective: In order to extract and utilize the umami compounds of *Hypsizygus marmoreus* fully, the effects of different protease treatments on the release of umami substances in the pileus and stipe of *Hypsizygus marmoreus* were studied. Methods: Three single-protease (flavourzyme, protamex, papain) and two double-protease (protamex/flavourzyme, papain/flavourzyme) were used to hydrolyze the pileus and stipe of *Hypsizygus marmoreus*. Then, the changes on the release of umami compounds in the pileus and stipe of *Hypsizygus marmoreus* treated with five protease groups were analyzed. Results: Enzymatic treatment by protamex/flavourzyme showed the highest level of umami amino acids and umami nucleotides ($P<0.05$). The contents of umami amino acids and umami nucleotides were 20.85 mg/g and 10.06 mg/g, 8.45 mg/g and 3.88 mg/g in the pileus and stipe after hydrolysis by protamex/flavourzyme. Therefore, the equivalent umami concentration of pileus was significantly increased from the second grade (836.90 g MSG/100 g) to the first grade (1 333.75 g MSG/100 g) after hydrolysis by protamex/flavourzyme. Furthermore, the electronic tongue system could distinguish the taste difference of different hydrolysates. Conclusion: The hydrolysis of protamex/flavourzyme can release the umami compounds in the pileus and stipe of *Hypsizygus marmoreus* more effectively, and the pileus of *Hypsizygus marmoreus* has greater potential than the stipe in developing flavoring with salt-less condiment.

Keywords protease; *Hypsizygus marmoreus*; pileus; stipe; umami substances