

复合酶法水解香菇工艺的研究

陈海强^{1,2} 胡汝晓² 黄晓辉² 彭运祥² 王春晖^{2*} 谭周进^{3*}

(1. 湖南农业大学 生物安全科学技术学院 湖南 长沙 410128)

(2. 湖南省食用菌研究所 湖南 长沙 410013)

(3. 湖南中医药大学 湖南 长沙 410208)

摘要:【目的】高效提取香菇中的功能性成分,进一步开发利用香菇的食用价值。【方法】以香菇为原料,在单因素试验和正交试验的基础上,研究了复合酶法(纤维素酶、木瓜蛋白酶和 5'-磷酸二酯酶)水解香菇的工艺条件。【结果】第一步为纤维素酶和木瓜蛋白酶共同水解,加酶量分别为 0.2%和 0.4%,水解温度 55 °C,水解时间 3 h,初始 pH 5.5;第二步为 5'-磷酸二酯酶水解,加酶量为 0.2%,水解温度 70 °C,水解时间 2 h,初始 pH 7.0。用此法得到的香菇水解液水解度为 39.48%,游离氨基酸得率 10.25%,5'-核苷酸得率 0.768%,多糖得率 8.67%。【结论】此香菇水解液富含呈鲜味物质和其它营养物质,可进一步深加工为香菇调味品。

关键词: 香菇,呈鲜味物质,水解,正交试验

Study on hydrolysis technology of *Lentinula edodes* degraded by composite enzyme

CHEN Hai-Qiang^{1,2} HU Ru-Xiao² HUANG Xiao-Hui² PENG Yun-Xiang²
WANG Chun-Hui^{2*} TAN Zhou-Jin^{3*}

(1. Institute of Biological Safety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China)

(2. Hunan Domestic Fungus Research Institute, Changsha, Hunan 410013, China)

(3. Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划课题(No. 2008BADAIB07)

*通讯作者:王春晖:Tel: 86-731-88903718; ✉: wch998@126.com

谭周进:Tel: 86-731-85381154; ✉: tanzhjin@sohu.com

收稿日期: 2011-07-11; 接受日期: 2011-09-27

Abstract: [Objective] In order to extract the functional components from *Lentinula edodes* efficiently for the further utilization of its edible value. **[Methods]** Using *Lentinula edodes* as raw materials, the hydrolysis process conditions by composite enzyme including cellulose, papain and 5'-phosphodiesterase were studied on the basis of single factor experiment and orthogonal test. **[Results]** Firstly, it was hydrolyzed by 0.2% cellulose and 0.4% papain. The conditions were 55 °C, initial pH 5.5 and 3 h. Secondly, it was hydrolyzed by 0.2% 5'-phosphodiesterase. And the conditions were 70 °C, initial pH 7.0 and 2 h. Under these conditions, the hydrolysis degree was 39.48%, and the extracting rate of amino acids, 5'-nucleotide, polysaccharide were 10.25%, 0.768%, 8.67% respectively. **[Conclusion]** The hydrolysate was rich in umami substances and other nutrients, and it could be used for condiment.

Keywords: *Lentinula edodes*, Umami substance, Hydrolysis, Orthogonal test

香菇味道鲜美, 香气沁人, 营养丰富, 素有“菇中之王”, 享有“植物皇后”之誉^[1]。其子实体含有丰富的天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸等呈鲜味氨基酸, 以及鸟苷酸、腺苷酸、胞苷酸、尿苷酸等呈味核苷酸, 其中含有的葡萄糖、果糖、半乳糖等碳水化合物, 以及不饱和脂肪酸、维生素、无机离子等与呈鲜味物质相互作用, 形成香菇独特的鲜美滋味。此外, 还含有多糖、香菇腺嘌呤、维生素 D 等生物活性物质, 赋予了香菇的药用价值^[2]。

香菇的呈鲜味物质以鲜味氨基酸和 5'-核苷酸物质为主, 其呈鲜强的主要原因是含有 5'-核苷酸, 其中 5'-鸟苷酸的含量最为丰富^[3]。香菇富含 RNA, 菇体细胞内的 RNA 在 5'-磷酸二酯酶作用下降解为 5'-核苷酸。5'-核苷酸具有明显的药理作用, 可用于治疗冠心病、心肌梗塞及放射病^[4], 而其中的 5'-鸟苷酸和 5'-肌苷酸添加到鲜味剂氨基酸类物质中还可使鲜度提高几十倍至上百倍, 故是著名的强力助鲜剂, 同时 5'-核苷酸对咸、酸、苦、腥味有消杀作用。

近年来, 随着人们生活水平的提高和消费观念的改变, 食用菌提取物具有很大的开发利用价值, 例如将食用菌抽提物与其他调味原料复配生产的新一代复合调味品——菇精大受欢迎, 市场前景广阔。本文进行了复合酶法水解香菇工艺条

件的研究, 为香菇调味品的开发提供试验基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

干香菇, 来源于湖南省食用菌研究所; 木瓜蛋白酶(2.8×10^5 U/g), 纤维素酶(1×10^4 U/g), 5'-磷酸二酯酶(1×10^4 U/g), 南宁庞博生物工程有限公司。

1.2 主要试剂

(1) 定氮试剂: 质量浓度为 0.01 mg/L 的 H_2SO_4 标准溶液; 体积分数为 1% 的硼酸吸收液; 质量分数为 1% 的 $CuSO_4$ 溶液; K_2SO_4 ; 质量分数为 25% 的 NaOH 溶液; 甲基红-次甲基蓝混合指示剂。

(2) 滴定试剂: 中性甲醛溶液; 体积分数为 0.5% 的酚酞酒精溶液(指示剂); 质量分数为 0.05% 的溴麝香草酚蓝溶液; 浓度为 0.1 mol/L 的标准 NaOH 溶液; 酚酞指示剂。

(3) 其它试剂: 过碘酸试剂; 体积分数为 30% 的乙二醇; 浓度为 2 mol/L 的甲胺溶液; 标准磷溶液; 定磷试剂。

1.3 仪器和设备

Ps-25 型酸度计, 上海雷磁仪器厂; 79-1 型磁力搅拌器, 江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司; DFD-700 型电热恒温水浴箱, 101-3AB 型电热

鼓风干燥箱, FW80 型高速万能粉碎机, 南京泰斯特试验设备公司; Sigma2-16 型高速冷冻离心机, Sigma 公司; 日立 L8800 型氨基酸自动分析仪, 日本日立公司; AB204-N 型电子天平, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; 2 mL 微量滴定管, SKD-100 型凯氏定氮仪, 上海沛欧分析仪器有限公司; 754 紫外可见分光光度计, 上海舜宇恒平科学仪器有限公司。

1.4 试验方法

1.4.1 工艺流程: 干香菇→粉碎→浸泡→复合酶法提取→灭酶→冷却→过滤→离心→香菇水解液。

1.4.2 单酶水解单因素试验: 以水解液的水解度^[5]为衡量指标, 采用单因素试验, 探讨了纤维素酶和木瓜蛋白酶的加酶量(酶质量占原料质量的百分比)、水解温度、水解时间、初始 pH 及对水解香菇的影响^[6-9]。纤维素酶各因素设如下水平: 加酶量(0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%); 水解温度(40 °C、45 °C、50 °C、55 °C、60 °C); 水解时间(1、2、3、4、5 h); 初始 pH (4.0、4.5、5.0、5.5、6.0)。木瓜蛋白酶各因素设如下水平: 加酶量(0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%); 水解温度(45 °C、50 °C、55 °C、60 °C、65 °C); 水解时间(1、2、3、4、5 h); 初始 pH (5.0、5.5、6.0、6.5、7.0)。

以水解液中 5'-核苷酸含量为衡量指标, 采用单因素试验探讨了 5'-磷酸二酯酶的酶浓度、水解时间、初始 pH 及水解温度对水解香菇的影响。5'-磷酸二酯酶各因素设如下水平: 加酶量(0.10%、0.15%、0.20%、0.25%、0.30%); 水解温度(55 °C、55 °C、60 °C、65 °C、70 °C); 水解时间(1、2、3、

4、5 h); 初始 pH (5.5、6.0、6.5、7.0、7.5)。

1.4.3 正交试验: 根据单酶水解试验结果, 在使用纤维素酶和木瓜蛋白酶共同作用时, 以前者用量作为基准, 后者分别以 1:1、1:2、1:3 与之合用, 同时又考虑了这两种酶的水解温度, 水解时间和初始 pH 的影响, 分别选取三水平, 依据 L₉(3⁴) 表安排试验, 正交试验因素与水平设计见表 1。

1.4.4 复合酶法试验: 为了提高水解液中 5'-核苷酸的含量, 提高呈鲜物质的含量, 在前面单因素试验和正交试验的基础上, 进行复合酶法试验, 该试验分为两步: 第一步为纤维素酶和木瓜蛋白酶共同水解; 第二步为 5'-磷酸二酯酶进行水解。

1.4.5 测定分析: 氨基酸态氮含量的测定: 中性甲醛电位滴定法^[10]。总氮含量的测定: 采用 GB5009.5-85 中的凯氏定氮法测定总氮含量。

$$\text{水解度} = \frac{\text{水解液中的氨基氮含量}}{\text{总氮量}} \times 100\%$$

游离氨基酸的测定: 用氨基酸自动分析仪进行测定; 5'-核苷酸的测定: 过碘酸氧化法^[11]; 多糖的测定: 采用蒽酮-硫酸法^[12]。

2 结果

2.1 单酶水解香菇条件的确定

通过单因素试验, 以加酶量、水解温度、水解时间、初始 pH 为 4 个因素条件, 以水解液的水解度为指标, 分别确定出纤维素酶、木瓜蛋白酶水解香菇的最适水平条件; 另以水解液的 5'-核苷酸含量为指标, 确定出 5'-磷酸二酯酶水解香菇的最适水平, 各自的最适水平条件见表 2。

表 1 正交试验因素与水平表
Table 1 Factors and levels of orthogonal test

序号 Serial number	A 加酶量 Add enzyme quantity (%)	B 水解温度 Hydrolysis temperature (°C)	C 水解时间 Hydrolysis time (h)	D 初始 pH Initial pH
1	0.2:0.2	45	3	5.0
2	0.2:0.4	50	4	5.5
3	0.2:0.6	55	5	6.0

注: 加酶量为纤维素酶: 木瓜蛋白酶。

Note: Add enzyme quantity for cellulose: papain.

表 2 单酶水解香菇的最适水平表
Table 2 The optimal level table of single enzyme hydrolysis mushroom

	A 加酶量 Add enzyme quantity (%)	B 水解温度 Hydrolysis temperature (°C)	C 水解时间 Hydrolysis time (h)	D 初始 pH Initial pH
纤维素酶 Cellulase	0.2	50	3	4.5
木瓜蛋白酶 Papain	0.5	55	3	6.0
5'-磷酸二酯酶 5'-Phosphodiesterase	0.2	65	2	7.0

由表 2 可知, 通过对三者最适水平条件比较当中可知, 5'-磷酸二酯酶水解香菇的最适水平条件较其它两种酶的差异性比较大, 因此如果进行复合酶法试验, 需要和另外两种酶分步进行。纤维素酶和木瓜蛋白酶二者比较, 水解温度和水解时间差异不大, 但是加酶量和初始 pH 有一定的差异, 可作为下一步正交试验各因素水平条件选择的参考。

2.2 正交试验结果

按照 1.4.3 进行试验, 正交试验结果表及方差分析表分别见表 3 和表 4。

由表 3 可知, 按级差(R)大小, 影响水解度的各因素的主次顺序分别为: $A > B > D > C$, 即加酶

量 $>$ 水解温度 $>$ 初始 pH $>$ 水解时间。根据各水平下 K_1 、 K_2 、 K_3 确定各因素的最优水平组合为: $A_2B_3C_2D_2$, 即最佳条件为加酶量为纤维素和木瓜蛋白酶分别为 0.2% 和 0.4%, 水解温度为 55 °C, 水解时间为 3 h, 初始 pH 为 5.5, 在最适条件下进行试验, 得到香菇水解液的水解度为 39.48%, 高于正交试验的所有结果, 说明正交试验成功。另外测得氨基酸得率为 10.03%, 5'-核苷酸得率为 0.236%, 多糖得率为 8.53%。

由表 4 可知, 加酶量、水解温度、水解时间和初始 pH 对水解度均有影响, 其中加酶量影响显著, 水解温度、水解时间和初始 pH 影响不显著。

表 3 正交试验结果
Table 3 Results of orthogonal design tests

序号 Serial number	A 加酶量 Add enzyme quantity	B 水解温度 Hydrolysis temperature	C 水解时间 Hydrolysis time	D 初始 pH Initial pH	水解度 Degree of hydrolysis (%)
1	1	1	1	1	33.96
2	1	2	2	2	35.97
3	1	3	3	3	36.21
4	2	1	2	3	38.04
5	2	2	3	1	37.83
6	2	3	1	2	38.98
7	3	1	3	2	37.75
8	3	2	1	3	38.24
9	3	3	2	1	38.62
K_1	35.380	36.583	37.060	36.803	
K_2	38.283	37.347	37.543	37.567	
K_3	38.203	37.937	37.263	37.497	
R	2.903	1.354	0.483	0.764	

表4 正交试验方差分析表
Table 4 The anova analysis table of orthogonal test

方差来源 Variance source	df	偏差平方和 Bias squares	F 比 Fratio	显著性 Significant
加酶量 Add enzyme quantity	2	16.407	46.479	*
水解温度 Hydrolysis temperature	2	2.762	7.824	
水解时间 Hydrolysis time	2	0.353	1.000	
初始 pH Initial pH	2	1.068	3.025	
误差 Residual	2	0.350		

Note: *: The difference reached 0.05 significant level.

2.3 复合酶法试验

第一步经过纤维素酶和木瓜蛋白酶的水解后,破壁率增大,有利于胞内核酸的释放。如果没有 5'-磷酸二酯酶的参与作用,香菇细胞内的 RNA 将会被非定向水解,产物较多,可能为 5'-核苷酸,也可能为 3'-核苷酸。在第二步使用了 5'-磷酸二酯酶后,该酶专一定向的水解香菇中 RNA 成为 5'-核苷酸,使其含量提高,对其含量产生了一定的影响^[13]。添加 5'-磷酸二酯酶的香菇水解液比不使用该酶得到的 5'-核苷酸含量提高了 3 倍多,见表 5,复合酶法可以在很大程度上提高香菇水解液的鲜味。

用该复合酶法水解香菇所得到的香菇水解液中,水解度为 39.48%,氨基酸得率为 10.25%,5'-核苷酸得率为 0.768%,多糖得率为 8.67%。该水解液中呈鲜味物质种类多且含量丰富,以及富含其它的功能性物质,例如多糖、多肽、维生素等。

表5 香菇水解液中 5'-核苷酸含量
Table 5 The 5'-nucleotide content in hydrolyzed mushrooms

水解液 Hydrolysate	5'-核苷酸含量 5'-Nucleotide content (g/L)
不添加 5'-磷酸二酯酶 No 5'-phosphodiesterase	0.118
添加 5'-磷酸二酯酶 Add 5'-phosphodiesterase	0.384

3 讨论

随着人们生活水平的提高和消费观念的改变,对食品的安全、风味和品质提出了更高的要求。生物技术转化、降解和提取食用菌功能性成分具有重要的实用价值。目前国内有一些利用酶法提取香菇功能性物质的研究^[5,7-9],但是存在提取效果差和提取物质单一的问题,本研究的创新之处就在于利用纤维素酶、木瓜蛋白酶和 5'-磷酸二酯酶共同提取,特别是 5'-磷酸二酯酶的利用,这在国内外相关研究中鲜有报道。

香菇子实体自身酶活力较低,难以有效作用使菌丝体自溶。因而,在抽提胞内水溶性呈味物质时,必须外加相应酶类。纤维素酶可将纤维素部分降解为葡萄糖并有破坏菇体细胞壁的作用,可促进细胞内物质(蛋白质、核酸、多糖等)的溶出,因此,外加纤维素酶可明显提高香菇固形物溶出率和蛋白溶出率,对蛋白水解也有一定的促进作用。蛋白酶可将菌体蛋白和溶出的胞内蛋白质分解为一些水溶性的小分子含氮物质,提高固形物溶出率和呈鲜味氨基酸的含量。外加 5'-磷酸二酯酶能专一定向的水解 RNA 成为 5'-核苷酸,大幅度提高 5'-核苷酸的含量。

本研究在很大程度上解决了现有技术中存在

的香菇提取物中所含营养物质单一及浓度低、提取效果差的问题, 所提取的水解液中呈鲜味物质和营养物质含量丰富。提取液一方面可经真空浓缩后, 采用喷雾干燥工艺获得粉末, 相对于真空冷冻干燥, 可大大节约成本和延长贮存时间。另一方面可以通过添加其它调味原料开发新一代的复合调味品。

参 考 文 献

- [1] 杨胜敖. 发酵型香菇奶的工艺研究[J]. 食用菌, 2006(4): 57-59.
- [2] 刘春如, 易诚. 香菇的营养价值和药用价值[J]. 中国林副特产, 2002(1): 52-53.
- [3] 王维亮. 香菇的烹饪应用[J]. 中国烹饪研究, 1996(2): 37-39.
- [4] 邹耀洪. 香菇中 5'-核苷酸的高效液相色谱-质谱分析[J]. 食品科学, 2005, 26(1): 196-198.
- [5] 闫欲晓, 粟桂娇. 双酶法水解香菇蛋白的工艺研究[J]. 食品科技, 2003(12): 14-16.
- [6] 高珊, 余晓斌. 双酶法水解茶树菇工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(1): 181-183.
- [7] 李波, 宋江良, 赵森, 等. 酶法提取香菇多糖工艺研究[J]. 食品科学, 2007, 28(9): 274-277.
- [8] 董彩霞, 黄建华, 祝勇, 等. 酶解法提取香菇多糖的探讨[J]. 光谱实验室, 2005, 22(5): 947-950.
- [9] 余冬生, 纪卫章. 酶法提取香菇多糖[J]. 江苏食品与发酵, 2001(4): 10-11.
- [10] 穆华荣. 食品检验技术[M]. 北京: 化学工业出版社教育出版中心, 2005: 91-92.
- [11] 陈钧辉, 陶力, 李俊, 等. 生物化学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 131-134.
- [12] 陈均辉, 李俊, 张太平, 等. 生物化学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 15-19.
- [13] 秦楠, 郝林. 酶法香菇抽提物的营养及功能成分分析[J]. 农产品加工·学刊, 2007(4): 80-82, 90.

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。