

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2025.11.009

黄山花菇蛋白的提取及其呈味前体的制备

张慧^{1,2}, 王军辉^{1,2}, 高莉², 陈晓燕², 姚改芳², 刘咏^{1,2}

(1. 合肥工业大学农产品精深加工安徽省重点实验室, 安徽合肥 230601; 2. 合肥工业大学食品与生物工程学院, 安徽合肥 230601)

摘要:文章以黄山花菇为原料,采用超声辅助提取、碱溶醇沉法及碱溶酸沉法提取黄山花菇蛋白,并采用酶解法制备天然呈味前体。实验结果表明:超声辅助提取所得的花菇蛋白质量浓度高达 (5.62 ± 0.22) mg/mL,提取率达到 29.10%,且具有较好的功能特性;采用风味蛋白酶与胃蛋白酶复合进行酶解反应,该反应的蛋白水解度达到 (50.49 ± 0.11) %,所得蛋白酶解液含有丰富的呈味氨基酸及挥发性物质,可作为呈味前体用于后续美拉德反应来制备呈味基料。

关键词:黄山花菇;超声辅助提取;酶解;呈味前体

中图分类号:TS201.1

文献标志码:A

文章编号:1003-5060(2025)11-1492-09

Extraction of protein from Huangshan floral mushroom and preparation of its flavor precursor

ZHANG Hui^{1,2}, WANG Junhui^{1,2}, GAO Li², CHEN Xiaoyan², YAO Gaifang², LIU Yong^{1,2}

(1. Key Laboratory for Agricultural Products Processing of Anhui Province, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China;

2. School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

Abstract:In this paper, Huangshan floral mushroom protein was extracted by ultrasound-assisted extraction, alkali-soluble alcohol precipitation method and alkali-soluble acid precipitation method, and then the natural flavor precursor was prepared by enzymatic hydrolysis. The experimental results showed that the protein obtained by ultrasonic-assisted extraction exhibited a high concentration of (5.62 ± 0.22) mg/mL, with a 29.10% extraction rate and excellent functional characteristics. The complex enzymatic hydrolysis of flavourzyme and pepsin was carried out, and the degree of hydrolysis of proteins reached (50.49 ± 0.11) %. The obtained protein hydrolysate was rich in flavor amino acids and volatile substances, and could be used as flavor precursor for subsequent Maillard reaction to prepare flavor base.

Key words: Huangshan floral mushroom; ultrasound-assisted extraction; enzymatic hydrolysis; flavor precursor

花菇是食用菌中的一种大型珍稀食用真菌,因其顶面有花纹而得名,享有菌中之星的美称^[1]。黄山花菇是安徽黄山地区特产的花菇,其顶面呈淡黑色,菇纹开白色暴花,菇底呈淡黄色,菇体肥大,味道鲜美、营养丰富^[2-3],蛋白质含量高且脂肪含量较低,氨基酸含量高,含有 17 种人体所需要氨基酸^[4]。

我国饮食文化一直追求“五味调和”,讲究艺术享受,艺术的灵感便来源于调味品^[5]。因此,开发兼顾风味与健康的增鲜调味品,为中国调味品市场提供天然、美味、营养的食用菌调味产品,具有十分重要的意义和价值。未来的食用菌调味品汇集美味、营养、保健于一身,在食用菌的基础上融入各种营养元素,在调味品增加菜肴色、香、味

收稿日期:2023-07-07;修回日期:2023-08-31

基金项目:国家自然科学基金资助项目(32272682);中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(PA2023GDSK0053)

作者简介:张慧(1999—),女,安徽滁州人,合肥工业大学硕士生;

王军辉(1976—),男,广西陆川人,博士,合肥工业大学教授,硕士生导师,通信作者,E-mail:junhuiwang@hfut.edu.cn;

刘咏(1968—),女,安徽凤阳人,合肥工业大学教授,硕士生导师。

的基础上添加调理功能,具有显著的社会、经济效益。

开发基于食用菌的功能型复合调味品不仅可以缓解食用菌深加工的压力,还可以满足人们对调味品营养化、功能化的要求。本研究以黄山花菇为原料,结合超声辅助提取及酶解技术,获得新型呈味前体物质,为后续美拉德反应制备呈味基料奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

干燥的黄山花菇购于华国茗人股份有限公司,分析前,样品被磨成粉末,并通过 80 目标准筛过滤;所用酶包括纤维素酶(50 000 U/g)、风味蛋白酶(20 000 U/g)、胃蛋白酶(250 000 U/g);其余试剂均为分析级和色谱级。

1.2 仪器与设备

本实验所用仪器与设备有:电热恒温鼓风干燥箱(上海三发科学仪器有限公司);色差仪(柯尼卡美能达公司);Gemini 500 扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)(德国卡尔蔡司公司);HH-S6 数显恒温水浴锅(江苏国胜实验仪器厂);傅里叶变换红外光谱仪(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)(天津市光学仪器厂);酶标仪(赛默飞实验科技有限公司);JJ-1 型定时电动搅拌器(常州国宇仪器制造有限公司);紫外分光光度计(上海棱光技术有限公司);超声波细胞破碎仪(南京先欧仪器制造有限公司);HR/T16M 台式高速冷冻离心机(湖南赫西仪器装备有限公司);旋转蒸发器(巩义市予华仪器有限责任公司);Waters Alliance e2695 高效液相色谱仪(high performance liquid chromatography, HPLC)(沃特世(Waters)公司);S-433D 氨基酸全自动分析仪(SYKAM 公司);5877B 气相色谱-质谱联用仪(gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS)(安捷伦科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 花菇蛋白的提取

超声辅助提取法。将粉碎过筛的菇粉以料液比 1 : 15 的比例加入蒸馏水,浸泡搅拌 30 min 后,利用 1 mol/L 的 NaOH 调节溶液 pH 值至 10.3;设置超声功率 380 W,冰浴时间 1.5 h,结束后 4 °C 下 8 000 r/min 离心 15 min;取上清液,利用 1 mol/L 的 HCl 调节上清液 pH 值至 7.0 后得

到超声蛋白提取液;将提取液 pH 值用 1 mol/L 的 HCl 调至 4.2 过夜沉淀,次日 4 °C 下 8 000 r/min 离心 15 min,取沉淀冻干得超声花菇蛋白(简称超声蛋白)。

碱溶醇沉法和碱溶酸沉法。将粉碎过筛的菇粉以料液比 1 : 15 的比例加入蒸馏水,浸泡搅拌 30 min 后,利用 1 mol/L 的 NaOH 调节溶液 pH 值至 10.3;室温下搅拌 1.5 h,结束后 8 000 r/min 离心 15 min;取上清液,利用 1 mol/L 的 HCl 调节上清液 pH 值至 7.0 后得到碱溶蛋白提取液。将提取液用 1 mol/L 的 HCl 调 pH 值至 4.2 过夜沉淀,次日 4 °C 下 8 000 r/min 离心 15 min,取沉淀冻干得酸沉花菇蛋白(简称酸沉蛋白)。将提取液用体积比为 1 : 4 的 80% 乙醇过夜沉淀,次日 4 °C 下 8 000 r/min 离心 15 min,取沉淀冻干得醇沉花菇蛋白(简称醇沉蛋白)。

1.3.2 蛋白酶解液的制备

取超声蛋白提取液,置于沸水中灭酶 1 min,冰水浴冷却后,调节 pH 值至 5.0,加入质量分数为 0.4% 的纤维素酶,40 °C 水浴搅拌 2 h,结束后沸水浴灭酶 1 min,冰水浴冷却后得到纤维素酶解液,离心取上清液测定还原糖质量比;取纤维素酶解液,调节 pH 值至 7.5,添加质量分数为 0.2% 的风味蛋白酶,5 °C 水浴搅拌 2 h,结束后沸水浴灭酶 1 min,冰水浴冷却,静置 3 min,调节 pH 值至 1.5,添加质量分数为 0.4% 的胃蛋白酶,5 °C 水浴搅拌 2 h,结束后沸水浴灭酶 1 min,冰水浴冷却得蛋白酶解液。

1.3.3 蛋白提取率测定

采用考马斯亮蓝法^[6]对提取液的蛋白提取率进行测定,具体公式如下:

$$E = \frac{\rho V_1}{mw} \times 100\%$$

其中: E 为蛋白提取率; ρ 为提取液中蛋白的质量浓度; V_1 为提取液的体积; m 为提取液的质量; w 为提取液中蛋白的质量分数。

1.3.4 蛋白表面形貌测定

使用 COXEM 型高分辨率 SEM 观察花菇粉及其蛋白粉末的微观形貌。先将导电胶带粘贴到试样台上,然后用试样勺取少量样品,用镊子敲击或摇动试样勺,使样品均匀落在导电胶带上,再用洗耳球吹掉没有粘贴住的样品。将待测样品置于 MC1000 离子溅射仪的试样室中,电流设置为 10 mA,喷金时间为 60 s。最后将待测样品置于 SEM 中放大 200 倍进行观察。

1.3.5 蛋白结构特性测定

1) 等电点的测定。准确量取 9 份 25 mL 蛋白提取液,加入 1 mol/L HCl 调节 pH 值至 3.4、3.6、3.8、4.0、4.2、4.4、4.6、4.8、5.0,使花菇蛋白沉淀,静置 2 h,8 000 r/min 离心 10 min,取上清液采用考马斯亮蓝于 595 nm 测定吸光度。吸光度最低溶液的 pH 值即为花菇蛋白等电点 pI。

2) Zeta 电位和粒径的测定。Zeta 电位和粒径参照文献[7],并作一些修改进行测定。蛋白粉末用超纯水稀释至 0.1 mg/mL,随后超声至看见很浅的颜色即可,用纳米粒度及 Zeta 电位分析仪在室温下测量 Zeta 电位和粒径。

3) 蛋白的 FTIR 分析根据文献[8]的方法进行,FTIR 是一种常用的测定蛋白质二级结构的振动光谱技术。在本研究中,将干燥后的蛋白研磨成粉末状,置于 FTIR 光谱仪样品仓内,扫描速率为 4 cm/s,扫描范围为 4 000~650 cm^{-1} 。

4) 蛋白的原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)分析参考文献[9],并进行一些修改。将 20 μL 蛋白溶液(1 mg/mL)滴在新剥离的云母基底表面,然后在室温下风干过夜,AFM 在 ScanAsyst 模式下,使用共振频率为 300 kHz、典型弹簧为 25.1 N/m 的 Bruker ScanAsyst 针头进行观察。使用 Nanoscope Analysis 1.4 软件分析每个样品的 15 μm^2 区域的图像。

1.3.6 蛋白功能特性测定

蛋白持水性根据文献[6]方法并作一些修改进行测定。准确称取 0.25 g 蛋白粉末于称量过的离心管中,加入 5 mL 蒸馏水,充分震荡摇匀 30 min,静置 1 h,4 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,测定离心管中残留物的质量。持水性计算公式为:

$$W = \frac{m_3 - m_2}{m_1} \quad (1)$$

其中:W 为持水性; m_1 为蛋白粉末的质量; m_2 为蛋白粉末和离心管的总质量; m_3 为持水蛋白粉末和离心管的总质量。

蛋白持油性根据文献[10]并作一些修改进行测定。准确称取 0.25 g 蛋白粉末于称量过的离心管中,加入 5 mL 大豆油,充分震荡摇匀 30 min,静置 1 h,4 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,测定离心管中残留物的质量。持油性的计算公式为:

$$O = \frac{m_4 - m_2}{m_1} \quad (2)$$

其中:O 为持油性; m_4 为持油蛋白粉末和离心管

的总质量; m_1 、 m_2 同上。

蛋白的起泡性及泡沫稳定性根据文献[11]并作一些修改进行测定。准确称取 5 份 0.8 g 蛋白粉末于 40 mL 蒸馏水中,混合均匀,调节 pH 值至 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0,利用高速分散机以 9 500 r/min 搅打 2 min,记录上层泡沫的体积 V_0 ;静置 30 min 后,再次记录上层泡沫的体积 V_{30} 。计算其起泡性 F 和泡沫稳定性 S ,具体公式如下:

$$F = \frac{V_0}{V} \times 100\%, \quad S = \frac{V_{30}}{V_0} \times 100\% \quad (3)$$

其中: V 为初始蛋白溶液的体积; V_0 为搅打停止时泡沫的体积; V_{30} 为搅打 30 min 后泡沫的体积。

蛋白的乳化性及乳化稳定性根据文献[11],并作一些修改进行测定。准确称取 5 份 0.25 g 蛋白粉末于 12.5 mL 蒸馏水中混合均匀,调节 pH 值至 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0,加入等体积菜籽油,利用高速分散机以 9 500 r/min 搅打 2 min,随后迅速量取 15 mL 于离心管中,2 000 r/min 离心 10 min,记录乳化层的高度 h_0 以及离心管中液体的总高度 h ;再将离心管放入 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min,冷却至室温后以 2 000 r/min 离心 10 min,记录乳化层的高度 h_{30} 。计算其乳化内性 E 及乳化稳定性 S' ,即

$$E = \frac{h_0}{h} \times 100\%,$$

$$S' = \frac{h_{30}}{h_0} \times 100\% \quad (4)$$

其中: h_0 为搅打停止时乳化层高度; h 为离心管中液体总高度; h_{30} 为搅打停止后 30 min 的乳化层高度。

蛋白的抗氧化性参考文献[12],并作一些修改进行测定。将蛋白提取液稀释成 5 个不同浓度,探究不同浓度的花菇蛋白对 DPPH· 清除率的影响。每管加入不同浓度的蛋白提取液和 0.125 mmol/L 的 DPPH 无水乙醇溶液各 2 mL,混匀避光 30 min,于 517 nm 处测定吸光度 A_2 ;用 2 mL 无水乙醇代替样液,于 517 nm 处测定吸光度 A_1 ;用 2 mL 无水乙醇代替 DPPH 无水乙醇溶液,于 517 nm 处测定吸光度 A_0 ;配制不同浓度的 VC 溶液,同时测定 VC 对 DPPH· 的清除率作为对照。清除率 C 的计算公式为:

$$C = [1 - (A_2 - A_1)/A_0] \times 100\% \quad (5)$$

1.3.7 酶解液的测定

采用二硝基水杨酸(DNS)法[13]对纤维素酶解液中的还原糖质量分数进行测定,具体计算公式为:

$$\omega(\text{糖}) = \rho V' / m \quad (6)$$

其中: $\omega(\text{糖})$ 为还原糖质量分数; ρ 为上清液中还原糖质量浓度; V' 为上清液体积; m 为酶解液质量。

采用甲醛滴定法^[14]对蛋白酶解液的蛋白水解度 D 进行测定,其计算公式为:

$$D = \frac{c_1(V_1 - V_2)}{8\rho_2 V_3} \times 100\% \quad (7)$$

其中: c_1 为 NaOH 标准溶液的浓度; V_1 为滴定终点时使用 NaOH 标准溶液的体积; V_2 为滴定空白使用 NaOH 标准溶液的体积; ρ_2 为酶解液中蛋白的质量浓度; V_3 为蛋白酶解液的体积;8 mmol 为每克蛋白质含有肽键的物质的量。

蛋白和酶解产物的颜色参数采用 LS171 色差仪测量,测量前需用白板进行校准,每个样品重复测定 5 次,记录 L^* 、 a^* 、 b^* 值。其中: L^* 为酶解液的亮度值; a^* 为酶解液的红绿度值; b^* 为酶解液的黄蓝度值。

酶解液的挥发性化合物参考^[15]并作一些修改进行测定。每个样品取 5 mL 到顶空瓶中,在捕获之前加入内标(1 μL 0.55 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 1,2-二氯苯甲醇溶液)。挥发性化合物采用手动顶空固相微萃取装置(solid-phase microextraction, SPME),使用 50/30 μm CAR/PDMS 光纤获得。在 SPME 存在下,每个样品在 60 $^{\circ}\text{C}$ 下平衡 30 min,提取后,SPME 光纤在 250 $^{\circ}\text{C}$ 的 GC 注入器中以分流模式解析 8 min。柱温程序为:40 $^{\circ}\text{C}$ 保持 3 min;40 \sim 90 $^{\circ}\text{C}$ (5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$),90 $^{\circ}\text{C}$ 保持 4 min;90 \sim 230 $^{\circ}\text{C}$ (10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$),230 $^{\circ}\text{C}$ 保持 7 min。氦气流量为 0.8 mL/min。

质谱仪参数为:电离方式为 EI,电子能量为 70 eV;进样口温度为 250 $^{\circ}\text{C}$,离子源温度为 200 $^{\circ}\text{C}$;检测器电压为 1 000 V,发射电流为 80 μA 。通过质谱结果和 NIST 20 库的比较鉴定挥发性化合物,挥发性化合物通过与 1,2-二氯苯

甲醇的峰面积比较来定量。挥发性化合物的质量浓度计算公式如下:

$$\rho_x = f' \frac{A_x m_s}{A_s} / V(\text{样品}) \quad (8)$$

其中: ρ_x 为化合物 x 的质量浓度; f' 为相对修正因子 1; m_s 为内标质量; $V(\text{样品})$ 为样品体积; A_x 和 A_s 分别为化合物 x 和内标的峰面积。

花菇粉末、蛋白及其酶解液中的氨基酸分析按照文献^[16]的方法并作一些修改进行测定。

取 5 mL 蛋白提取液和蛋白酶解液,加入 5 mL 6 mol/L 的 HCl 并封管,置于烘箱内 165 $^{\circ}\text{C}$ 加热 1 h;冷却后混匀并过滤定容至 10 mL,置于 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中至完全干燥,加入 2 mL 0.02 mol/L 的 HCl 以溶解;稀释 50 倍后,取 1 mL 过 0.22 μm 膜后上机。

取 1 mL 蛋白提取液和蛋白酶解液,加入 1 mL 80% 的乙醇,混匀后,以 4 000 r/min 离心 15 min,取 1 mL 上清过 0.22 μm 膜后上机。

1.4 数据处理

数据以平均值 \pm 标准差表示,采用 SPSS、Origin 9.0 和 GraphPad Prism 8 软件对数据进行分析处理。

2 结果与分析

2.1 花菇蛋白提取率

食用菌除了富含多糖、膳食纤维等功能性成分外,还含有丰富的蛋白质^[17]。目前,国内外对于香菇蛋白在食品加工中的功能性质研究较少,对于香菇蛋白提取和香菇肽仅有初步研究。因此本文对香菇蛋白提取率进行了研究。在酶解前,测定了每 100 g 黄山花菇干粉中含有(24.52 \pm 0.46) g 粗蛋白,见表 1 所列。用超声辅助碱提法得到的蛋白质量浓度较高,为(5.62 \pm 0.22) mg/mL,说明超声波的机械和空化作用可以促进蛋白质的溶解,从而提高了蛋白的提取率。

表 1 不同提取方法所得花菇蛋白的功能特性参数

方法	$\rho/(\text{mg}/\text{mL})$	Zeta 电位/ mV	粒径/ nm	持水性/ (g/g)	持油性/ (g/g)
超声辅助提取法	(5.62 \pm 0.22) ^a	(-17.90 \pm 7.91) ^a	(164.03 \pm 1.90) ^c	(4.42 \pm 0.26) ^{ab}	(5.82 \pm 0.13) ^a
碱溶醇沉法	(4.53 \pm 0.13) ^b	(-18.63 \pm 0.31) ^a	(206.37 \pm 1.16) ^a	(3.26 \pm 0.40) ^{bc}	(4.94 \pm 0.23) ^{bc}
碱溶酸沉法	(4.21 \pm 0.10) ^c	(-21.27 \pm 2.06) ^b	(175.37 \pm 2.20) ^b	(4.89 \pm 0.86) ^a	(5.62 \pm 0.25) ^{ab}

注:不同字母表示差异显著。

2.2 蛋白形貌分析

利用 SEM 在 200 倍的低倍镜下观察花菇及其蛋白粉末的形貌,如图 1 所示。

从图 1a 可以看出,超微粉碎得到的花菇粉颗

粒分布较密集,且分散不均匀;从图 1b 可以看出,超声辅助提取的蛋白颗粒明显出现了破碎现象,且分散均匀;而图 1c 中,碱溶醇沉的蛋白没有出现破碎的现象,呈现团状;图 1d 中碱溶酸沉蛋白被少量

破碎,但还是出现分布不均匀的现象。说明超声处理能够对细胞壁起到一定程度的破坏作用,使一些营养成分释放出来。

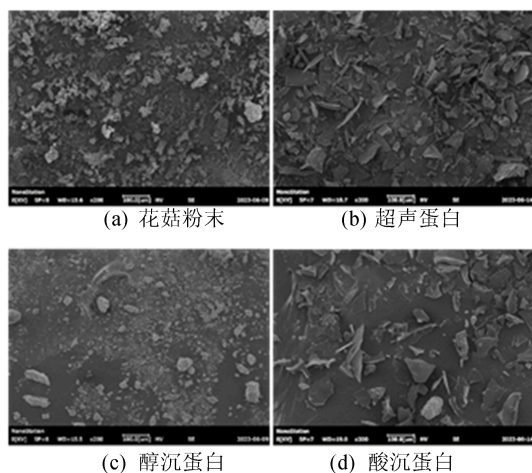


图 1 花菇蛋白的 SEM 图

2.3 蛋白结构特性

2.3.1 蛋白等电点

当蛋白所处体系 pH 值等于 pI 时,蛋白分子所带净电荷数为 0,溶解度最低,极易析出沉淀。因此,为了最大限度地提高花菇蛋白的提取率,必须先确定蛋白质的等电点。花菇蛋白的等电点如图 2 所示,可以看出,随 pH 值升高上清液中剩余蛋白的量先减少再增加,当体系 pH 值等于 4.2 时,吸光度最低,蛋白质沉淀量最大,即上清液吸光度最小。由此可知,花菇蛋白等电点为 4.2。

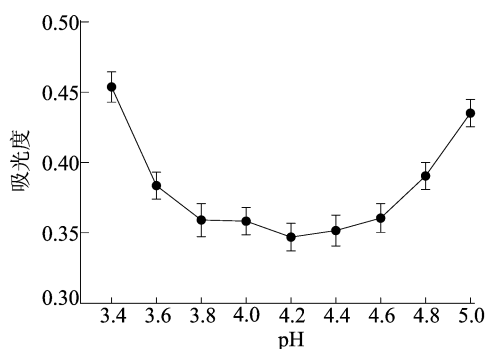


图 2 花菇蛋白的等电点

2.3.2 粒径和 Zeta 电位

由表 1 可知,与醇沉和酸沉蛋白相比,超声蛋白的粒径显著减小($P < 0.05$),与文献[18]报道的一致,这是由于超声过程中产生较强的空化力,超声处理后花菇蛋白的粒径减小。Zeta 电位降低可能是由于超声处理后蛋白质二级结构的膨

胀,从而导致非极性疏水残基的暴露^[19]。

2.3.3 FTIR 分析

花菇蛋白的 FTIR 谱图如图 3 所示。从图 3 可以看出:花菇蛋白在 1 640、1 534、1 234 cm^{-1} 处的特征吸收峰分别为蛋白质的酰胺 I、II、III 带特征吸收峰;花菇蛋白在 1 026 cm^{-1} 处的吸收峰是 C—OH 基团由 C—O 伸缩振动表征出来的,这是多糖在红外光谱中的特征吸收,说明蛋白中有多糖分子存在^[20]。综上所述,FTIR 谱图显示该蛋白具有蛋白质在酰胺带的特征吸收峰,且 3 种方法提取的蛋白结构无显著差异。

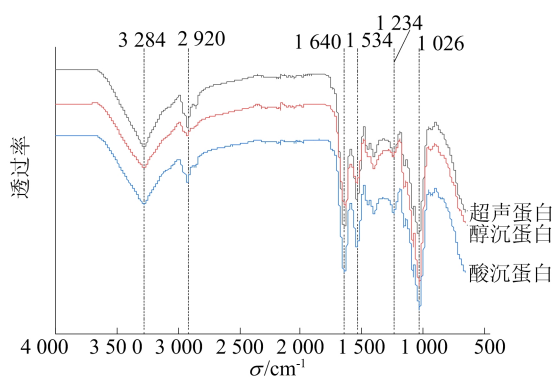
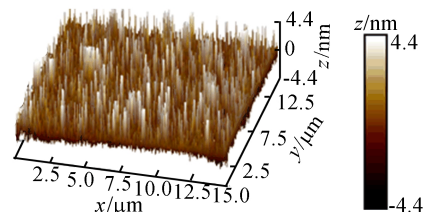


图 3 不同提取方法所得花菇蛋白的 FTIR 谱图

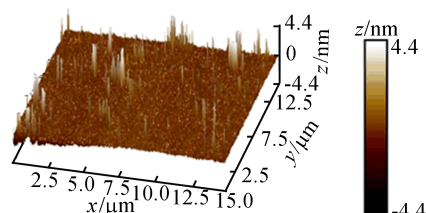
2.3.4 AFM 分析

蛋白质分子的粒径、形状和粗糙度可以通过 AFM 直接观察^[21]。花菇蛋白的 AFM 图如图 4 所示。

从图 4 可以看出,超声蛋白的分散度相对于酸沉和醇沉蛋白显著增加,而粒径显著减小,这与文献[22]的研究结果一致。



(a) 超声蛋白



(b) 醇沉蛋白

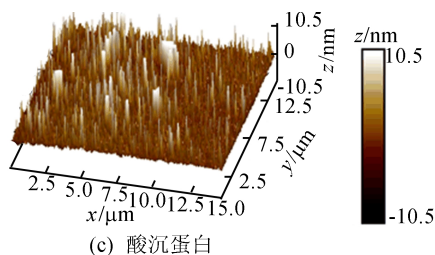


图 4 花菇蛋白的 AFM 图

由图 4 可知,在超声辅助提取中,蛋白质从大聚集体分散到更均匀的针状突起的形态。这可能是由于超声过程中产生的机械搅拌和剪切力将蛋白质降解为更小的颗粒^[23]。

2.4 蛋白的功能特性分析

2.4.1 持水性分析

持水性是指蛋白质分子结合水的能力^[24]。从表 1 可以看出,超声蛋白的持水性显著高于醇沉蛋白($P < 0.05$),与酸沉蛋白的持水性没有显著差别,这说明超声蛋白中极性氨基酸含量较高于酸沉蛋白和醇沉蛋白中的含量,因而水合能力

较高。

2.4.2 持油性分析

持油性是指蛋白质分子结合油的能力^[25]。由表 1 可知,超声蛋白的持油性高于醇沉蛋白和酸沉蛋白的,差异显著($P < 0.05$),蛋白吸附油脂能够防止产品渗油,保持产品良好的口感。

2.4.3 起泡性及泡沫稳定性分析

花菇蛋白的起泡性及泡沫稳定性如图 5 所示。图 5 中:大写字母表示同一处理方式下不同 pH 值之间的差异;小写字母表示同一 pH 值下不同处理方式之间的差异。下同。由图 5 可知,当 pH 值为 4,即接近 pI 时,蛋白的起泡性最小,而此时泡沫的稳定性最高,此现象同时出现在 3 种方法提取的花菇蛋白中。超声蛋白具有较高的起泡性,但其泡沫稳定性较低,可能是由于黏度的变化影响着泡沫重力排液的松弛时间、气体扩散松弛时间和泡沫的半衰期。蛋白提取液黏度的降低致使蛋白质分子间不能形成稳定的网状结构,导致泡沫稳定性降低。

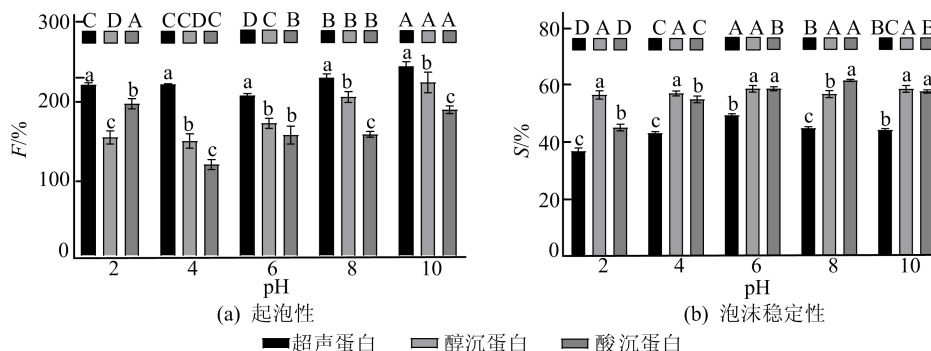


图 5 花菇蛋白的起泡性及泡沫稳定性分析

2.4.4 乳化性及乳化稳定性分析

花菇蛋白的乳化性及乳化稳定性分析如图 6 所示。由图 6 可知,当 pH 值达到 pI 时,其乳化

性和乳化稳定性最低,在等电点两侧,数值开始增加,但是 3 种方法所提取的花菇蛋白的乳化性及乳化稳定性没有显著差异。

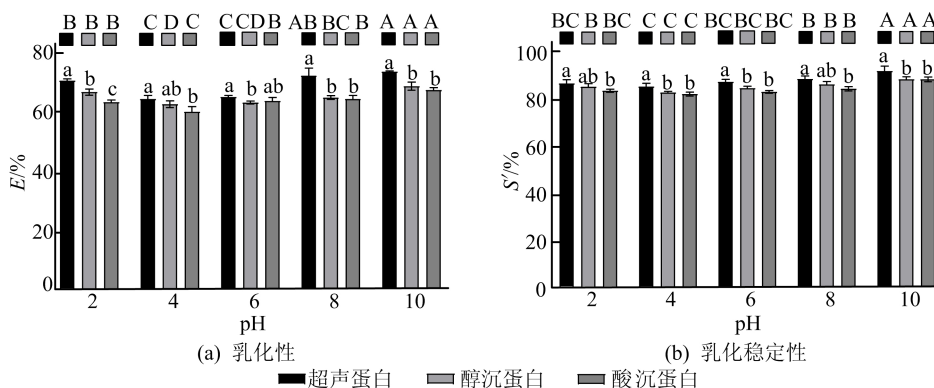


图 6 花菇蛋白的乳化性及乳化稳定性分析

2.4.5 抗氧化性分析

花菇蛋白对 DPPH· 的清除效果如图 7 所示。从图 7 可以看出,测定结果表明:随着花菇蛋白质量浓度的增加,其 DPPH· 清除率增加,与同质量浓度的 VC 相比,超声蛋白的清除效果优于醇沉和酸沉蛋白,超声蛋白的抗氧化性较好。

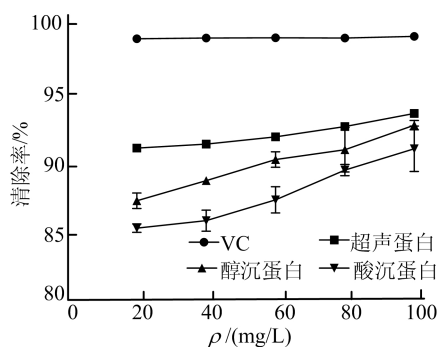


图 7 花菇蛋白的 DPPH· 清除效果

2.5 酶解液的测定结果分析

2.5.1 还原糖质量分数

采用纤维素酶解之后,用 DNS 法测定还原糖质量浓度为 (2.46 ± 0.06) mg/mL,质量分数为 $(26.47 \pm 1.37)\%$ 。

2.5.2 蛋白水解度

蛋白质分子量大,很难进入味蕾刺激味觉细胞,味觉呈现能力较弱;分子量较小的氨基酸和寡肽味觉能力强、味觉阈值低,可以直接与味蕾细胞接触,产生愉悦味道。食用菌富含蛋白质,经酶水解后可产生短链肽和游离氨基酸,提供特定的香气、风味和质地。采用风味酶与胃蛋白酶对蛋白进行复合酶解,蛋白水解度高达 $(50.49 \pm 0.11)\%$ 。

2.5.3 色泽差异

花菇蛋白提取液及酶解液的色泽差异见表 2 所列。从表 2 可以看出:酶解之后, L^* 值显著增加,表明亮度增大; a^* 值显著减小,表明变绿; b^* 值也出现增大的现象,表明变黄。整体上符合酶解液为黄褐色的特征^[26]。

表 2 花菇蛋白提取液及酶解液的色泽差异

色泽	提取液	酶解液
L^*	63.40 ± 0.05	68.03 ± 0.07
a^*	4.49 ± 0.02	2.36 ± 0.03
b^*	12.26 ± 0.24	13.24 ± 0.36

2.5.4 挥发性化合物分析

经过酶解后得到的蛋白酶解液香气浓郁、饱

满诱人,略带奶油甜味。利用 SPME-GC-MS 对酶解液进行挥发性风味物质鉴定,结果见表 3 所列。

表 3 蛋白酶解液挥发性成分分析

种类	名称	CAS 号	$\rho/(\mu\text{g/mL})$
醇类	正戊醇	71-41-0	0.08 ± 0.03
	正己醇	111-27-3	0.04
	2-乙基己醇	104-76-7	0.27 ± 0.01
酮类	2,3-丁二酮	431-03-8	0.11
	丙酮	67-64-1	0.12 ± 0.03
	2,3-戊二酮	600-14-6	0.17 ± 0.01
	3-乙基-2-戊酮	6137-03-7	0.04
	3,4-二甲基-2-戊酮	1000202-23-1	0.05
	甲基庚烯酮	110-93-0	0.04 ± 0.01
醛类	异戊醛	590-86-3	0.63 ± 0.01
	2-甲基丁醛	96-17-3	0.31 ± 0.03
	正戊醛	110-62-3	0.36 ± 0.01
	正己醛	66-25-1	0.19 ± 0.06
	2-甲基戊醛	123-15-9	0.07 ± 0.02
	苯甲醛	100-52-7	0.17 ± 0.04
	2-苯基乙醛	122-78-1	0.04 ± 0.01
	阿托醛	4432-63-7	0.03 ± 0.01
	异丁醛	78-84-2	0.06 ± 0.02
	正庚醛	111-71-7	0.05 ± 0.01
酯类	乙酸乙酯	108-05-4	0.01
	乙酸乙酯	141-78-6	0.25 ± 0.01
	二硫化碳	75-15-0	3.845 ± 0.39
含硫化物	1,2,4-三硫环戊烷	289-16-7	0.72 ± 0.10
	1,2,4,5-四硫环己烷	291-22-5	0.26 ± 0.03
	1,2,4,6-四硫环己烷	292-45-5	0.01
	香菇素	292-46-6	0.24
	1,3,5-三噻烷	291-21-4	0.02
酸类	乙酸	64-19-7	1.90 ± 0.04
	异戊酸	503-74-2	0.19 ± 0.01
	正戊酸	109-52-4	0.05 ± 0.02
其他	二甲醚	115-10-6	3.84 ± 0.23
	甲苯	108-88-3	0.05 ± 0.01
	糠醛	98-01-1	0.15 ± 0.02
	3-糠醛	498-60-2	0.10 ± 0.01
	乙缩醛二甲醇	534-15-6	0.01

经 GC-MS 分析发现,酶解液中检出 35 种挥发性物质,包括 3 种醇类、6 种酮类、1 种醛类、2 种酯类、6 种含硫化物、3 种酸类、5 种其他化合物,总质量浓度为 (14.41 ± 0.09) $\mu\text{g/mL}$ 。其中质量浓度较高的 2,3-丁二酮^[27] 是奶油香精的主要香料,也可用于牛奶、乳酪及其他一些香味中; 2,3-戊二酮^[27] 提供黄油、草莓、焦糖、水果、朗姆酒或奶酪的香味;异戊醛有果味香气;香菇中主要的环状结构和非环状结构的含硫化物包括 1,2,4-三硫环戊烷、1,2,4,5-四硫环己烷、1,2,4,6-四硫环己烷、1,2,3,5,6-五硫环庚烷(香菇素)、二

甲基二硫醚、二甲基三硫醚等。香菇素则被认为是干香菇的主要香气成分,其香味强烈,特征性强,目前被作为主要成分应用于香菇风味产品及香菇香精中^[28]。浓郁的清香气息不是由单一的化合物所体现出来的,而是由众多组分相互作用、相互协调的结果。上述这些化合物共同作用形成酶解液浓郁诱人的清香气息,且大多数挥发性化合物呈现果香、花香和植物的清香,这也奠定了酶解液整体香气的基调。

2.5.5 氨基酸分析

所有样品中的氨基酸种类及其质量比见表 4 所列。由表 4 可知:黄山花菇中总氨基酸质量比为(136.63±0.11) mg/g,经过超声辅助提取处理得到的花菇蛋白粉末的总氨基酸质量比达到了(779.93±0.82) mg/g;已知天冬氨酸 Asp 和谷

氨酸 Glu 能增强鲜味^[29],蛋白粉末中 Asp 和 Glu 的质量比明显比花菇蛋白粉末分别增加了 5 倍多和 3 倍多,呈味氨基酸质量比明显增加;蛋白提取液和蛋白酶解液中的总氨基酸质量比分别为(39.71±0.94) mg/g 和(52.14±0.03) mg/g。

从表 4 还可以看出,黄山花菇中游离氨基酸质量比为(8.20±0.03) mg/g,经过超声辅助提取得到的花菇蛋白粉末的游离氨基酸质量比达到了(28.54±1.55) mg/g。蛋白提取液中的游离氨基酸质量比为(3.93±0.04) mg/g,酶解后质量比增加至(7.09±0.04) mg/g,且蛋白酶解液中的 Asp、Glu 质量比和呈味氨基酸比例相较于蛋白提取液来说明显增加。蛋白酶解液中鲜味和甜味氨基酸的增加赋予了酶解液更加浓厚的味道。

表 4 总氨基酸和游离氨基酸的质量比分析

单位:mg/g

种类	总氨基酸				游离氨基酸				
	花菇	花菇蛋白粉末	蛋白提取液	蛋白酶解液	花菇	花菇蛋白粉末	蛋白提取液	蛋白酶解液	
鲜味	Asp	11.83±0.06	68.90±0.73	3.65±0.07	4.78	0.01	0.03	0.12	0.25±0.01
	Glu	33.07±0.04	141.70±0.35	7.18±0.22	8.19	0.14±0.01	0.84±0.05	1.42±0.03	2.03±0.04
	总量	44.90±0.01	210.60±0.39	10.83±0.29	12.97	0.16±0.01	0.87±0.05	1.54±0.03	2.28±0.05
甜味	Ala	7.09	43.71	2.36	2.93	1.34±0.06	4.13	0.11	1.25
	Gly	6.28	30.65	2.19	2.45	0	0.06	0.13	0.14
	Thr	4.03	37.57	1.72	2.33	2.50±0.15	5.09	0.01	0.38
	Ser	20.26±0.02	193.14±0.01	7.73±0.01	11.59±0.01	2.55±0.15	12.67±0.01	1.30±0.01	1.21±0.01
	Pro	2.27±0.07	10.06±0.03	1.13±0.03	1.20±0.03	0	0.11±0.03	0.00±0.03	0
	总量	39.94±0.09	315.13±0.73	15.14±0.43	20.50±0.03	6.40±0.05	22.05±1.22	1.55	2.98
苦味	Arg	6.73±0.01	30.77±0.67	1.79±0.05	2.60	0.13±0.01	0.41±0.03	0.07	0.59
	His	3.09±0.01	42.21±0.11	0.25±0.02	1.59	0.22±0.01	1.26±0.03	0.18±0.01	0.48±0.04
	Met	5.92±0.02	13.78±0.79	0.40±0.01	0.63±0.03	0	0.14±0.01	0.07	0.02
	Phe	4.82	24.22±0.94	1.44±0.03	1.94±0.01	0.30±0.02	0.92±0.06	0.10±0.01	0.13±0.01
	Ile	5.07±0.01	24.92±0.42	1.67±0.02	2.03±0.07	0.13±0.01	0.61±0.03	0.06	0.08
	Leu	8.79±0.02	46.39±0.53	2.65±0.05	3.35±0.02	0.15±0.01	0.85±0.05	0.07	0.12
无味	Val	6.52±0.01	22.41±0.96	2.16	2.19±0.07	0.31±0.02	0.84±0.04	0.13	0.17
	Lys	7.35±0.01	31.92±0.25	2.26±0.07	2.84	0.09±0.01	0.43±0.03	0.14±0.01	0.17±0.01
	Cys	0.48±0.03	0.55±0.05	0.05	0.02	0.03	0.08±0.01	0.01	0.01
	Tyr	3.03±0.09	17.05±0.21	1.06±0.01	1.48±0.01	0.28±0.02	0.07	0.01	0.06
氨基酸	136.63±0.11	779.93±0.82	39.71±0.94	52.14±0.03	8.20±0.03	28.54±1.55	3.93±0.04	7.09±0.04	
呈味氨基酸	84.84±0.11	525.73±0.34	25.97±0.72	33.47±0.03	6.56±0.06	22.92±1.27	3.09±0.03	5.26±0.04	
呈味比例/%	62.09±0.03	67.41±0.03	65.40±0.27	64.20±0.09	80.01±0.50	80.33±0.09	78.68	74.14±0.17	

3 结 论

本文以黄山花菇为原料,采用超声辅助提取及酶解技术制备天然调味基料。实验结果表明,超声波辅助提取所得的花菇蛋白,提取率高达 29.10%,具有较好的持水力、持油力、起泡及泡沫稳定性、乳化性及乳化稳定性和 DPPH·清除能力;采用风味蛋白酶与胃蛋白酶进行复合酶解,蛋

白水解度达到(50.49±0.11)%;酶解液中检出了 35 种挥发性物质,包括 3 种醇类、6 种酮类、10 种醛类、2 种酯类、6 种含硫化合物、3 种酸类、5 种其他化合物;总氨基酸质量比为(52.14±0.03) mg/g,呈味氨基酸质量比为(33.47±0.03) mg/g,游离氨基酸质量比为(7.09±0.04) mg/g,呈味游离氨基酸质量比为(5.26±0.04) mg/g;酶解液具有较好的风味特性,可作为呈味前体用于后续美

拉德反应来制备大量呈味基料。

[参 考 文 献]

- [1] 刘婷,王祥发. 菜中珍品花菇为王:访湖北戴氏农业生态发展有限公司总经理代红斌[J]. 长江蔬菜,2017(24):8-9.
- [2] 徐金龙. 黄山花菇多糖的化学成分及理化性质研究[D]. 合肥:合肥工业大学,2016.
- [3] WANG J H, XU J L, ZHANG J C, et al. Physicochemical properties and antioxidant activities of polysaccharide from floral mushroom cultivated in Huangshan Mountain [J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 131: 240-247.
- [4] 兰天康,顾浩峰,王燕. 食用菌中主要营养素与硒元素含量的相关性分析[J]. 陕西农业科学, 2017, 63(1): 42-46.
- [5] 高苏敏. 浅谈食之五味调和[J]. 现代食品, 2020(8): 34-35.
- [6] 胡丹慧. 香菇柄蛋白质的提取、性质和新型营养面包的开发[D]. 沈阳:辽宁大学, 2019.
- [7] ZOU Y, XU P, LI P, et al. Effect of ultrasound pre-treatment on the characterization and properties of collagen extracted from soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*) [J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 82: 72-81.
- [8] KUMOSINSKI T F, FARRELL H M. Determination of the global secondary structure of proteins by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy[J]. Trends in Food Science & Technology, 1993, 4(6): 169-175.
- [9] ZHAO Y, WEN C, FENG Y, et al. Effects of ultrasound-assisted extraction on the structural, functional and antioxidant properties of *Dolichos lablab* L. protein[J]. Process Biochemistry, 2021, 101: 274-284.
- [10] MUNE MUNE M A, MINKA S R, MBOME I L. Optimising functional properties during preparation of cowpea protein concentrate[J]. Food Chemistry, 2014, 154: 32-37.
- [11] 李晓明,陈凯,黄占旺,等. 白玉菇蛋白提取工艺优化及其功能特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(4): 239-246.
- [12] 杨明朗,吴姝洁,董祺祺,等. 芋艿蛋白提取工艺的响应面优化及其抗氧化性研究[J]. 食品工业, 2022, 43(10): 61-66.
- [13] 李佳佳. 秀珍菇水解物美拉德反应制备调味核心基料的研究[D]. 无锡:江南大学, 2017.
- [14] 柳倩. 猪血酶解物热反应制备猪肉香精及其风味改善研究[D]. 无锡:江南大学, 2016.
- [15] 杨肖,张莉莉,孔琰,等. 应用 SPME-GC-MS 对比分析 4 种不同处理模式下香菇中的挥发性风味成分[J]. 食品科技, 2017, 42(11): 300-307.
- [16] JEONG S C, JEONG Y T, YANG B K, et al. White button mushroom (*Agaricus bisporus*) lowers blood glucose and cholesterol levels in diabetic and hypercholesterolemic rats [J]. Nutrition Research, 2010, 30(1): 49-56.
- [17] JIANG Q, ZHANG M, MUJUMDAR A S. UV induced conversion during drying of ergosterol to vitamin D in various mushrooms: effect of different drying conditions[J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 105: 200-210.
- [18] ZOU Y, XU P, WU H, et al. Effects of different ultrasound power on physicochemical property and functional performance of chicken actomyosin[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 113: 640-647.
- [19] JIANG L, WANG J, LI Y, et al. Effects of ultrasound on the structure and physical properties of black bean protein isolates [J]. Food Research International, 2014, 62: 595-601.
- [20] CHAKINALA A G, BREMNER D H, GOGATE P R, et al. Multivariate analysis of phenol mineralisation by combined hydrodynamic cavitation and heterogeneous advanced Fenton processing[J]. Applied Catalysis B: Environmental, 2008, 78(1/2): 11-18.
- [21] ADAMCZYK Z, KUJDA M, NATTICH-RAK M, et al. Revealing properties of the KfrA plasmid protein via combined DLS, AFM and electrokinetic measurements [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2013, 103: 635-641.
- [22] WEN C, ZHANG J, ZHANG H, et al. Effects of divergent ultrasound pretreatment on the structure of watermelon seed protein and the antioxidant activity of its hydrolysates [J]. Food Chemistry, 2019, 299: 125-165.
- [23] YU H, MEI J, XIE J. New ultrasonic assisted technology of freezing, cooling and thawing in solid food processing: a review[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2022, 90: 106-185.
- [24] FEYZI S, VARIDI M, ZARE F, et al. Fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seed protein isolate: extraction optimization, amino acid composition, thermo and functional properties[J]. Journal of The Science of Food and Agriculture, 2015, 95(15): 3165-3176.
- [25] L'HOCINE L, BOYE J I, ARCAND Y. Composition and functional properties of soy protein isolates prepared using alternative defatting and extraction procedures[J]. Journal of Science of Food, 2006, 71(3): C137-C145.
- [26] CHEN H Z, ZHANG M, BHANDARI B, et al. Applicability of a colorimetric indicator label for monitoring freshness of fresh-cut green bell pepper[J]. Postharvest Biology and Technology, 2018, 140: 85-92.
- [27] FUCHSMANN P, STERN M T, BRÜGGER Y A, et al. Olfactometry profiles and quantitation of volatile sulfur compounds of Swiss tilsit cheeses[J]. J Agric Food Chem, 2015, 63(34): 7511-7521.
- [28] 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.
- [29] 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.

(责任编辑 闫杏丽)