

# 微波辅助复合酶法提取草菇中的风味物质

Preparation of flavor compounds from *Volvariella volvacea*  
by microwave-composite enzyme synergistic extraction

揭广川<sup>1</sup> 陈红杰<sup>1</sup> 李必金<sup>2</sup>

JIE Guang-chuan<sup>1</sup> CHEN Hong-jie<sup>1</sup> LI Bi-jin<sup>2</sup>

(1. 广东轻工职业技术学院, 广东 广州 510300; 2. 江西泰来食品有限公司, 江西 吉安 343700)

(1. Guangdong Industry Technical College, Guangzhou, Guangdong 510300, China;

2. Tailai Food Co., Ltd., Ji'an, Jiangxi 343700, China)

**摘要:**先用复合酶对草菇进行水解,再采用微波辅助提取草菇风味物质。以  $\alpha$ -氨基氮含量为指标,通过正交试验确定了微波辅助酶法提取草菇中风味物质的最佳工艺条件:食用菌水解酶 1 号和食用菌水解酶 2 号的用量为 1:2( $m:m$ ),初始 pH 为 5.5,水解温度 55 °C,水解时间 120 min;微波功率 800 W,微波温度 70 °C,微波时间 10 min。利用微波辅助复合酶法提取的提取液中  $\alpha$ -氨基氮平均值达到 0.181 g/100 g,比只用复合酶解提取增幅达 83.0%。

**关键词:**草菇;酶解;微波提取;风味物质; $\alpha$ -氨基氮

**Abstract:** First, hydrolyzing the *Volvariella volvacea* by multi-enzyme complex hydrolysis technology, and then using microwave technology to hydrolyze, using orthogonal design method to determine the optimum extraction process of the *Volvariella volvacea* with microwave-enzymatic hydrolysis technology and the extract amount of  $\alpha$ -Amino nitrogen as observing indexes and the optimum extraction process were as followed: hydrolysis time 120 min, hydrolysis temperature 55 °C, edible fungus hydrolase No. 1 to No. 2 dosage 1:2( $m:m$ ), initial pH 5.5, microwave power 800 W, microwave temperature 70 °C, microwave time 10 min. The content of  $\alpha$ -amino nitrogen in the orthogonal experiments of microwave-assisted extraction under multi-enzyme was 0.181 g/100 g, and increased 83.0% higher than with the process under multi-enzyme.

**Keywords:** *Volvariella volvacea*; microwave extraction; flavor compounds;  $\alpha$ -amino nitrogen

草菇是生长在稻草堆上的一种腐生真菌,发现于广东曲江县的南华寺中,又名南华菇<sup>[1]</sup>。草菇为真菌植物门真菌草菇的子实体,属担子菌纲伞菌科。草菇具有肉质肥嫩肉滑、味道鲜美、口感佳等特点,同时具有较高的营养价值,有“放

一片,香一锅”之美誉。草菇高温容易开伞降低商品价值,低温又容易自溶,目前草菇不易保藏,绝大部分是鲜食。草菇中所含的核苷酸及鲜味氨基酸等呈味成分的含量比较高,所含食用菌特有的芳香成分醇类、酮类丰富,十分适于从中提取草菇抽提物。

对草菇的提取工艺研究主要有水浸法提取和酶法提取,而微波辅助复合酶法提取草菇风味物质的研究鲜见报道。赵谋明等<sup>[2]</sup>研究利用草菇自身酶系和外加复合蛋白酶与纤维素酶的共同作用把草菇中的有效成分提取出来并部分降解为小分子的呈味物质。其最佳提取工艺条件:加水量为草菇的 8 倍,蛋白酶与纤维素酶的酶活比为 400/200, pH 值为 6.0,在 55 °C 下恒温 120 min 可获得最佳提取效果。固形物提取率、蛋白提取率和蛋白水解率分别为 83.5%, 67.6%, 28.1%, 3 个指标分别比对照样(未加酶)提高了 53.8%, 72.4%, 112.9%。

在复合酶酶解草菇之后再通过微波提取,微波能对提取体系中不同组分进行选择性的加热,使目标组分直接从基体分离,具有较好的选择性。微波利用分子极化或离子导电效应直接对物质加热,而空气和容器对微波不吸收,因此热效率高,升温快速均匀,大大缩短了提取时间,提高了提取效率<sup>[3-7]</sup>。据此,本研究拟在复合酶解的基础上,增加微波提取草菇风味物质,以期达到缩短时间、降低能耗、提高提取率的目的,从而为草菇的深加工提供理论依据和试验参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器和试剂

#### 1.1.1 主要仪器

紫外可见分光光度计:UV-1801 型,北京瑞利分析仪器有限公司;

电子天平:BS210 型,北京赛多利斯天平有限公司;

基金项目:广东高校特色调味品工程技术开发中心开放课题项目(编号:T20120905)

作者简介:揭广川(1964—),男,广东轻工职业技术学院副教授。

E-mail: JGC8015@163.com

收稿日期:2014-05-26

微波化学反应仪:COOLPEX-E型,上海屹尧仪器科技发展有限公司。

### 1.1.2 材料与试剂

草菇:市售;

甘氨酸:分析纯,广州化学试剂厂;

木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶:80万U/g,广州欲立宝生物科技有限公司;

食用菌水解酶1号:2万U/g,南宁庞博生物工程有限公司;

食用菌水解酶2号:10万U/g,南宁庞博生物工程有限公司。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 微波辅助复合酶法提取草菇风味物质的工艺流程

清洗→称重→护色处理→打浆→调配(按液料比补足水,调整pH值,添加一定量的酶)→酶解(置于恒温水浴锅中,恒温水解一定时间)→微波辅助酶解(置于微波化学反应仪中,在一定功率和温度下,水解一定时间)→灭酶→过滤→离心分离→测定 $\alpha$ -氨基氮含量

#### 1.2.2 复合酶法试验方法

(1) 单因素试验设计方案:每个酶催化反应体系都有一个最合适的底物浓度、初始pH、酶用量、温度和水解时间。本试验以草菇为底物,按一定的料液比,探讨其它各个因素对酶水解效果的影响,以游离 $\alpha$ -氨基氮含量为考察指标,分别确定木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、食用菌水解酶1号和食用菌水解酶2号的最佳酶解条件。① 初始pH值对水解效果的影响:料液比为1:8( $m:V$ ),加酶量为0.2%( $m:m$ ),水解温度为50℃,水解时间为120min,初始pH值分别调为4.0,4.5,5.0,5.5,6.0。② 酶用量对水解效果的影响:初始pH值为5.0,料液比为1:8( $m:V$ ),水解温度为50℃,水解时间为120min,加酶量分别为0.1%,0.2%,0.3%,0.4%,0.5%( $m:m$ )。③ 水解温度对水解效果的影响:初始pH值为5.0,料液比为1:8( $m:V$ ),加酶量为0.2%( $m:m$ ),水解时间为120min,水解温度分别为30,40,50,60,70℃。④ 水解时间对水解效果的影响:初始pH值为5.0,料液比为1:8( $m:V$ ),加酶量为0.2%( $m:m$ ),水解温度为50℃,水解时间分别为60,90,120,150,180min。

(2) 正交试验设计方案:在单因素试验的基础上,以水解液中 $\alpha$ -氨基氮含量为指标,同时考虑酶用量、水解初始pH、水解时间和水解温度的影响,选用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,优化提取工艺。

#### 1.2.3 微波辅助复合酶法试验方法

(1) 单因素试验设计方案:为进一步破坏草菇酶解液中存在的蛋白质与纤维素等不溶性物质的紧密结构,提高蛋白质的提取得率,将在酶解最佳工艺条件下得到的草菇处理液,放入微波化学反应仪中,考察微波功率、温度和时间对处理液中 $\alpha$ -氨基氮含量的影响。① 微波功率对水解效果的影响:微波时间为10min,温度为60℃,功率分别为600,700,

800,900,1000W。② 温度对水解效果的影响:微波时间为10min,功率为600W,温度分别为40,50,60,70,80℃。

③ 时间对水解效果的影响:微波温度为60℃,功率为600W,时间分别为5,10,15,20,25min。

(2) 正交试验设计方案:在单因素试验的基础上,以水解液中 $\alpha$ -氨基氮含量为指标,同时考虑微波功率、温度和时间的影响,选用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,优化提取工艺。

1.2.4  $\alpha$ -氨基氮测定 采用茚三酮法<sup>[8]</sup>。先配制甘氨酸标准储备液(1.072g/L),再用甘氨酸标准储备液配制浓度分别为0.00,2.00,4.00,8.00,12.00,16.00,20.00 $\mu\text{g/mL}$ 的 $\alpha$ -氨基氮标准系列溶液。分别取 $\alpha$ -氨基氮标准溶液2.00mL于试管中,分别加入显色剂1mL,并分别放一粒玻璃球于试管口上,将试管放入沸水中,准确加热16min,在 $(20\pm 0.1)^\circ\text{C}$ 水浴中冷却20min。再各加入稀释溶液5mL,充分摇匀。用空白试管调节仪器零点,于波长570nm下,测量吸光度,绘制 $\alpha$ -氨基氮标准曲线,计算回归方程和线性相关系数。样品的测定方法与标准液的一致,平行做3份。

以 $\alpha$ -氨基氮质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,结果见图1。由图1可知,在试验范围内, $\alpha$ -氨基氮浓度与吸光值之间呈良好的线性关系,其线性方程为: $y=0.033x$ 。

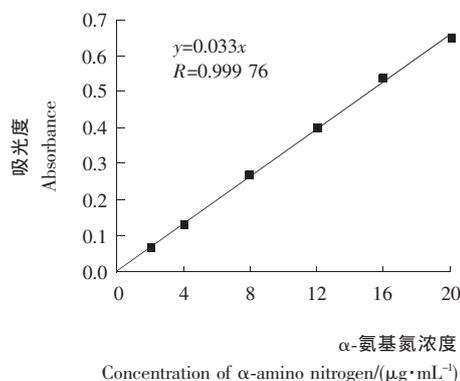


图1  $\alpha$ -氨基氮标准曲线

Figure 1 The standard curve of  $\alpha$ -Amino

## 2 结果与讨论

### 2.1 复合酶法最佳工艺条件的优化

2.1.1 酶制剂对草菇水解效果的影响 由表1可知:4种酶水解产物的 $\alpha$ -氨基氮含量不同,以食用菌水解酶1号为最高,其中木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、食用菌水解酶2号主要成分均为蛋白酶,仅有食用菌水解酶1号是以纤维素酶为主。草菇的子实体由菌盖、菌柄、菌托组成,其中蛋白质与纤维素结合紧密,由于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、多糖类、脂肪等)的溶出,因此添加纤维素酶可明显提高草菇的固形物溶出率和蛋白溶出率,对蛋白水解有一定的促进作用。由此可知,食用菌水解酶1号的水解率较高,宜采用食用菌水解酶1号和食用菌水解酶2号的复合酶系进行水解,以提高草菇细胞壁的破碎率。

表 1 不同种类酶在最佳条件下水解草菇的结果

Table 1 Results of hydrolyzing the *Volvariella volvacea* in the optimum extraction process

种类	初始 pH	水解温度/℃	水解时间/min	酶质量浓度/%	$\alpha$ -氨基氮含量/( $10^{-2} \text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )
木瓜蛋白酶	5.0	50	120	0.3	0.040
菠萝蛋白酶	5.0	50	120	0.3	0.035
食用菌水解酶 1 号	5.5	55	120	0.2	0.054
食用菌水解酶 2 号	5.5	60	120	0.2	0.045

2.1.2 复合酶法最佳工艺条件的确定 在单因素试验的基础上,以水解液中游离  $\alpha$ -氨基酸的含量为考察指标,选择食用菌水解酶 1 号的用量为草菇质量的 0.2%,食用菌水解酶 2 号的用量分别为 0.2%(1:1)、0.4%(1:2)和 0.6%(1:3),同时又考虑了水解初始 pH、水解时间和水解温度的影响,选用  $L_9(3^4)$  正交表进行试验,所有试验均重复 3 次,数据取平均值,正交试验因素水平表见表 2,结果见表 3。

表 2 复合酶解正交试验因素水平表

Table 2 Factors and levels in the orthogonal experiments of composite enzyme

水平	A 复合酶比例 (m:m)	B 初始 pH	C 时间/ min	D 温度/ ℃
1	1:1	4.5	60	50
2	1:2	5.5	120	55
3	1:3	6.5	180	60

表 3 复合酶解正交试验结果

Table 3 Results of the orthogonal experiments of composite enzyme

试验号	A	B	C	D	$\alpha$ -氨基氮含量/ ( $10^{-2} \text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )
1	1	1	1	1	0.053
2	1	2	2	2	0.097
3	1	3	3	3	0.061
4	2	1	2	3	0.078
5	2	2	3	1	0.090
6	2	3	1	2	0.070
7	3	1	3	2	0.078
8	3	2	1	3	0.045
9	3	3	2	1	0.067
$k_1$	0.070	0.070	0.056	0.070	
$k_2$	0.079	0.077	0.080	0.081	
$k_3$	0.063	0.066	0.076	0.061	
R	0.016	0.011	0.024	0.020	

由表 3 可知,以  $\alpha$ -氨基氮作为考察指标时,各因素影响的大小为  $C > D > A > B$ ,即水解时间对草菇提取影响最大,初始 pH 对草菇提取的影响最小。在试验范围内,最佳提取工艺条件为  $C_2 D_2 A_2 B_2$ 。

2.1.3 验证实验 由表 3 可知,最佳组合方案为  $C_2 D_2 A_2 B_2$ ,而正交表中没有该组合方案,为了进一步考察酶解提取工艺条件的准确性,按照最佳组合方案  $C_2 D_2 A_2 B_2$  进行 3 次重复实验,取平均值,在此最佳工艺条件下, $\alpha$ -氨基氮的含量为 0.098 9 g/100 g,比所有组合方案的结果都高,说明经优化后的组合方案  $C_2 D_2 A_2 B_2$  是准确的。

## 2.2 微波辅助复合酶法最佳工艺条件的优化

在单因素试验的基础上,以水解液中游离  $\alpha$ -氨基酸的含量为考察指标,同时考虑微波功率、时间和温度的影响,选用  $L_9(3^4)$  正交表进行试验,所有试验均重复 3 次,数据取平均值,正交试验因素水平见表 4,结果见表 5。

由表 5 可知,以  $\alpha$ -氨基氮作为考察指标时,各因素影响的大小为  $A > C > B$ ,即微波功率对草菇提取影响最大,微波时间对草菇提取的影响最小。在试验范围内,最佳微波提取工艺条件为  $A_2 C_3 B_2$ ,与表 5 中试验号为 5 的方案相同,即微波功率 800 W,微波温度 70 ℃,微波时间 10 min。表 5 中试验号为 5 的试验结果  $\alpha$ -氨基氮含量最高,也验证了此因素水平组合为最佳提取工艺,在此最佳工艺条件下, $\alpha$ -氨基氮含量为 0.181 g/100 g,比复合酶法增加了 83.0%,提取率明显提高。

## 3 结论

(1) 本研究最大特点在于将微波与复合酶共同作用应用到草菇风味物质的提取中,提取率比只采用复合酶法提取增加了 83.0%,表明微波提取破壁效果明显,有助于酶解氨

表 4 微波辅助复合酶提取正交试验

Table 4 Factors and levels in the orthogonal experiments of microwave-assisted extraction under multi-enzyme complex

水平	A 功率/W	B 时间/min	C 温度/℃
1	700	5	50
2	800	10	60
3	900	15	70

(下转第 243 页)

济效益分析[J]. 压缩机技术, 2005(5): 24~26.

41 杨光, 祁影霞. 低温冷库中压缩机选择及其节能效果探讨[J]. 流体机械, 2009, 37(11): 42~45.

42 王衍智, 周丹, 韩伟. 单机双级变频螺杆机组在速冻装置中的应用分析[C]//中国制冷学会冷藏冻结专业委员会. 2011 年全国冷冻冷藏行业与山东制冷空调行业年会暨绿色低碳新技术研讨会论文集. 青岛: 中国制冷学会冷藏冻结专业委员会, 2011: 10~14.

43 蔡宗莲, 焦玉学, 于志强, 等. 复叠式螺杆压缩机组的变频控制[J]. 制冷与空调, 2008, 8(4): 81~84.

44 李敏霞, 马一太, 李丽新, 等. CO<sub>2</sub> 跨临界循环制冷压缩机的研究进展[J]. 压缩机技术, 2004(5): 38~42.

45 Stosic N, Smith I K, Kovacevic A. A twin screw combined compressor and expander for CO<sub>2</sub> refrigeration systems[C]// International Compressor Engineering Conference, Proceedings of the 2002. Purdue: Purdue University, 2002: 1 591~1 594.

46 Hiwata A. Development of accumulator-less CO<sub>2</sub> scroll compressor[C]//The International Symposium on New Refrigerant and Environmental Technology, Proceedings of the 2004. Kobe, Japan: IIR, 2004: 45~48.

47 Yamaguchi K. Development of the CO<sub>2</sub> compressor for large output heat pump system[C]//The International Symposium on New Refrigerant and Environmental Technology, Proceedings of the 2004. Kobe, Japan: IIR, 2004: 22~26.

48 Liu H S, Chen J P, Chen Z J. Experimental evaluation of the optimal refrigerant mass charge in a carbon dioxide automotive air conditioner[C]// Gustav Lorenzten Conference on Natural Working Fluids, 2004 6th International Conference at Glasgow, UK: IIR, 2004: 32~37.

49 杨军, 陆平, 张利, 等. 新型全封闭旋转式 CO<sub>2</sub> 压缩机的开发及性能测试[J]. 上海交通大学学报, 2008(3): 426~429, 435.

50 高联斌, 李征涛, 陈忆喆, 等. CO<sub>2</sub> 跨临界压缩机性能实验台的设计[J]. 低温与超导, 2014(1): 82~86.

51 叶琼娟, 余铭, 张全凯, 等. 速冻技术在食品工业中的应用研究进展[J]. 农产品加工·学刊, 2013(12): 97~100.

52 谢晶, 汤元睿. 金枪鱼气调保鲜技术的研究进展[J]. 食品科学, 2014(9): 296~300.

53 杨富华. 金枪鱼冷冻冷藏链研究及开发[D]. 大连: 大连理工大学, 2006.

54 杨利艳, 曹文红, 章超桦, 等. 冷冻方式对凡纳滨对虾品质特性的影响[J]. 食品与机械, 2011, 27(5): 149~152.

55 Keleci N N, Pascut S, Waniska R D. The effects of storage temperature on the staling of wheat flour tortillas[J]. Journal of Cereal Science, 2003, 37(3): 377~380.

56 Bassols J, Kuckelkorn B, Langreck J, et al. Trigeneration in the food industry[J]. Applied Thermal Engineering, 2002, 22(6): 595~602.

57 Rocco C, Planas J, Guinea G V, et al. Fracture properties of concrete in cryogenic conditions[C]//Fourth International Conference on Fracture Mechanics of Concrete and Concrete Structures. Proceeding of the 2001. Roman: FIB, 2001: 411~416.

(上接第 166 页)

表 5 微波辅助复合酶提取正交试验结果表

Table 5 Results of the orthogonal experiments

试验号	A	B	C	空列	$\alpha$ -氨基氮含量/ (10 <sup>-2</sup> g·g <sup>-1</sup> )
1	1	1	1	1	0.107
2	1	2	2	2	0.121
3	1	3	3	3	0.131
4	2	1	2	3	0.158
5	2	2	3	1	0.181
6	2	3	1	2	0.137
7	3	1	3	2	0.120
8	3	2	1	3	0.132
9	3	3	2	1	0.120
$k_1$	0.120	0.128	0.125	0.136	
$k_2$	0.159	0.145	0.133	0.126	
$k_3$	0.124	0.129	0.144	0.140	
R	0.039	0.016	0.018	0.014	

基酸、核酸风味物质的释放。

(2) 采用正交试验优化了微波辅助复合酶提取草菇风味物质的最佳工艺条件: 水解时间 120 min, 水解温度 55 °C, 食用菌水解酶 1 号和食用菌水解酶 2 号的用量为 1 : 2 ( $m$  :

$m$ ), 初始 pH 为 5.5, 微波功率 800 W, 微波温度 70 °C, 微波时间 10 min。

(3) 在今后的试验需要进一步研究草菇中各种主要风味物质如特有的芳香成分醇类、酮类的提取效果和损失程度。

参考文献

1 郭勇, 彭卫红, 甘炳成, 等. 我国草菇生产现状及四川草菇发展面临的问题[J]. 西南农业学报, 2001, 14(增刊 1): 124~126.

2 赵谋明, 平燕超, 邱慧霞, 等. 草菇抽提物最佳提取工艺条件的研究[J]. 食品工业科技, 1997(2): 35~39.

3 徐怀德. 天然产物提取工艺学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2006: 49.

4 苏慧, 郑明珠, 蔡丹, 等. 微波辅助技术在食品工业中的应用研究进展[J]. 食品与机械, 2011, 27(2): 165~167.

5 黄琼, 丁玲. 微波协同酶法提取金针菇多糖工艺的优化[J]. 食品与机械, 2013, 29(1): 128~130.

6 李磊, 陈均志, 张海平. 微波复合酶水解植物蛋白制取小分子多肽的研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(19): 5 655~5 656, 5 660.

7 韦寿莲, 刘君红, 严子军, 等. 微波辅助—旋转回流提取仪的组装及其在叶下珠有机酸提取中的应用[J]. 分析测试学报, 2009, 28(7): 773~779.

8 中国轻工业联合会. QB/T 1686—2008 啤酒麦芽[S]. 北京: 中国轻工业出版社, 2008.