

沙蚕不同蛋白酶酶解产物滋味特征及 聚类分析研究

刘天红^{1,2}, 王颖^{1,2*}, 李红艳^{1,2}, 纪蕾^{1,2}, 姜晓东^{1,2}, 李晓^{1,2}, 孙元芹^{1,2}, 于晓清¹
(1. 山东省海洋科学研究院, 青岛 266104; 2. 青岛市水产生物品质评价与利用工程研究中心, 青岛 266104)

摘要: **目的** 研究沙蚕不同酶解产物中氨基酸和呈味核苷酸的含量、组成与呈味效果差异。**方法** 以酱油粉为对照, 采用味道强度值、味精当量、主成分分析法、聚类分析法进行分析和综合评价。**结果** 沙蚕不同蛋白酶酶解产物中游离氨基酸总量在(90.84±1.12)~(151.25±0.95) mg/g 之间; 风味蛋白酶酶解产物的游离氨基酸和呈味氨基酸含量最高; 胰蛋白酶的味精当量值远高于酱油粉组; 各组氨基酸对滋味有较大贡献, 风味、胰蛋白酶组中谷氨酸的味道强度值与酱油粉组中该值接近, 分别为 37.13 和 35.40 mg/g。提取了 4 个主成分, 累计方差贡献率达 92.537%, 较好地反应了酶解产物中游离氨基酸的综合信息, 风味蛋白酶组综合得分最高, 基于电子舌的滋味轮廓也支撑了这一结论。采用聚类分析将实验组分为 4 类, 较直观地反映了不同酶解产物间的差异。**结论** 风味蛋白酶和胰蛋白酶酶解沙蚕的产物游离氨基酸品质较好, 且鲜味氨基酸含量和呈味核苷酸含量较高, 可开发呈味基料。

关键词: 沙蚕蛋白酶酶解产物; 游离氨基酸; 味道强度值; 主成分分析; 电子舌技术

Study on taste characteristics and cluster analysis of enzymatic hydrolysates of *Perinereis aibuhitensis* with different proteases

LIU Tian-Hong^{1,2}, WANG Ying^{1,2*}, LI Hong-Yan^{1,2}, JI Lei^{1,2}, JIANG Xiao-Dong^{1,2}, LI Xiao^{1,2}, SUN Yuan-Qin^{1,2}, YU Xiao-Qing¹

(1. Marine Science Research Institute of Shandong Province, Qingdao 266104, China; 2. Qingdao Municipal Engineering Research Center of Aquatic Biological Quality Evaluation and Application, Qingdao 266104, China)

ABSTRACT: Objective To study the content, composition and taste effect of amino acids and taste nucleotides in different enzymatic hydrolysates of *Perinereis aibuhitensis*. **Methods** Taking soy sauce powder as reference, the taste intensity value, monosodium glutamate equivalent, principal component analysis and clustering analysis were adopted for analysis and comprehensive evaluation. **Results** The total free amino acids content in the hydrolysates of different proteases of *Perinereis aibuhitensis* were (90.84±1.12)-(151.25±0.95) mg/g; the content of free amino acids and flavor-forming amino acids in the hydrolysate of flavor protease were the highest, the monosodium glutamate equivalent value in trypsin group was much higher than that in soy sauce powder group; amino acids in each group contributed significantly to the taste, and the taste strength values of glutamic acid in the flavor and

基金项目: 山东省重点研发计划项目(2016YYSP014)、山东省现代农业虾蟹产业技术体系项目(SDAIT-13-07)

Fund: Supported by the Key Research and Development Project of Shandong Province (2016YYSP014), and the Shrimp & Crab Innovation Team of Shandong Agriculture Research System (SDAIT-13-07)

*通信作者: 王颖, 硕士, 研究员, 主要研究方向为水产品加工及质量控制研究。E-mail: food_rc@sina.com

*Corresponding author: WANG Ying, Master, Professor, Marine Science Research Institute of Shandong Province, Qingdao, Shandong 266104, No.7, Youyun Road, Laoshan District, Qingdao 266104, China. E-mail: food_rc@sina.com

trypsin groups were close to those in the soy sauce powder group, 37.13 and 35.40 mg/g, respectively. Four principal components were extracted, and the cumulative variance contribution rate was 92.537%, which reflected the comprehensive information of free amino acids in the enzymolysis products well, and the comprehensive score of the flavor protease group was the highest, which was also supported by the taste profile based on electronic tongue. Cluster analysis was used to divide the experimental groups into four categories, which directly reflected the differences among different enzymatic hydrolysates. **Conclusion** The free amino acid quality of the products hydrolyzed by flavourzyme and trypsin is better, and the content of delicious amino acid and taste nucleotide is higher, which can be used to develop taste base material.

KEY WORDS: protease hydrolysates of *Perinereis aibuhitensis*; free amino acid; taste intensity value; principal component analysis; electronic tongue technology

0 引言

双齿围沙蚕(*Perinereis aibuhitensis*)俗称海蜈蚣,属环节动物门、沙蚕科、围沙蚕属。目前关于沙蚕加工利用研究多集中于沙蚕水煮液的抗凝血功效^[1]、沙蚕提取物可抑制肺癌细胞生长^[2]、沙蚕蛋白酶酶解产物具有抗氧化活性^[3]等方向。研究表明^[4],沙蚕氨基酸含量较高,其天冬氨酸、谷氨酸占呈味氨基酸的 67.13%,因此可作为生产海鲜呈味基料的优质原料。

蛋白质酶解能生成许多易与味蕾接触产生滋味的短肽、氨基酸等呈味物质^[5]。徐永霞等^[6]认为蓝蛤复合蛋白酶酶液游离氨基酸(free amino acids, FAAs)含量较高、滋味最佳。钱琴莲等^[7]研究发现木瓜蛋白酶、风味蛋白酶和胰蛋白酶对金枪鱼内脏酶解液具有明显的去腥效果,滋味改善明显。因此,蛋白酶对酶解产物的滋味、营养价值等具有重要影响。关于沙蚕蛋白的研究多集中于抗氧化^[3,8]、降血糖^[9]活性等方面,而利用沙蚕蛋白生产呈味基料的相关研究鲜见报道。本研究以双齿围沙蚕为原料,分别采用碱性蛋白酶、中性蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、风味蛋白酶、胰蛋白酶酶解,测定其中 FAAs 和 5'-核苷酸的种类、含量,采用味道强度值(taste active value, TAV)、味精当量(equivalent umami concentration, EUC)、主成分分析法(principal component analysis, PCA)、聚类分析法对其滋味差异进行分析和综合评价,旨在为沙蚕呈味基料生产及深加工利用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验材料:酶解干粉来自实验室前期制备^[4],分别为 40 °C 空白组(CKI)、50 °C 空白组(CKII)、碱蛋白酶组(AP)、中性蛋白酶组(NP)、风味蛋白酶组(FP)、胰蛋白酶组(TR)、木瓜蛋白酶组(PA)、胃蛋白酶组(PE)。根据需要制备不同浓度样品进行后续测定。

鲜味对照:酿造酱油粉(以下简称酱油粉,编号 SP)(河南新乡科兴添加剂有限责任公司)。

试剂:游离氨基酸混标液[A 型:B 型=1:1 (V:V),临用前以 0.02 mol/L HCl 释 25 倍](日本和光纯药工业株式会社);5'-腺苷酸(5'-adenylic acid, AMP, 美国药典标准级)、5'-肌苷酸(inosine 5'-monophosphate, IMP, 纯度>98%)、鸟苷 5'-单磷酸二钠盐水合物(guanosine 5'-monophosphate disodium salt hydrate, GMP, 纯度>99%)[西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司];其他试剂(优级纯,国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

L-8900 氨基酸自动分析仪(日本日立高新技术公司);LC-20A 高效液相色谱(日本岛津公司);TS-5000Z 味觉分析系统(日本 INSENT 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 FAAs 测定方法

准确称取各组样品 5 mg 溶于 1 mL 3% (V:V)三氯乙酸水溶液中,混匀,8000 r/min 离心 15 min,上清液过 0.22 μm 滤膜,采用氨基酸自动分析仪 PF 系统测试。

1.3.2 呈味核苷酸测定方法

分别称取各组样品 0.05 g,加 1 mL 三氟乙酸超声 30 min,加入 3 mL 去离子水,调 pH 至中性,定容至 10 mL,过 0.22 μm 滤膜,参照文献^[10],测定 IMP、GMP、AMP 含量。

1.3.3 TAV 和 EUC 计算方法

参照文献计算 TAV^[10]和 EUC^[11]。

1.3.4 电子舌测定

各样品使用娃哈哈纯净水配制成 2 mg/mL 溶液,测定 5 种基本味(酸、甜、苦、咸、鲜)和涩味及回味。参比溶液(无味点):30 mmol/L 氯化钾+0.3 mmol/L 酒石酸,酸味无味点为-13,咸味无味点为-6,每个样品测 4 次,剔除第一次数据。

1.4 数据处理

每组实验重复 3 次,结果以平均值±标准偏差表示,

使用 SPSS 16.0 对方差齐性的数据进行统计学处理、主成分分析和聚类分析, 采用 GraphPad prism 5.0 作图。

2 结果与分析

2.1 不同酶解产物(以下简称实验组)FAAs 组成与含量

不同蛋白酶酶切位点不同, 产物中 FAAs 组成及含量有较大差异^[12]。由表 1 可见, 各组间 FAAs 种类和总量差异较大, PE 组和 NP 组含有的 FAAs 种类最多, 除 20 种常见氨基酸外, 还测出含量较高的牛磺酸、肌氨酸、瓜氨酸、β 丙氨酸等多种参与调节机体正常生理活动的氨基酸。FP 组 FAAs 总量最高, SP 组中总量最低。CKI、CKII 的 FAAs

总量存在显著差异, 推测主要由内源酶酶解引起的, 海洋生物内源酶酶活受 pH 和温度影响。目前未见关于沙蚕内源酶的报道, 有学者研究了刺参内源酶活性稳定温度为 35~45 °C^[13]和 pH 为 3~7^[14], 可作为酶空白组差异原因的参考。推断沙蚕内源性蛋白酶 40 °C 酶活较 50 °C 时高。实验组中, PA 组呈味氨基酸含量最低, 占 FAAs 总量的 52.10%, CKI 组含量最高, 占 FAAs 总量的 55.47%。FP 组必需氨基酸含量最高, 占 FAAs 总量的 43.65%, 最低是 PA 组, 占 FAAs 总量的 37.52%; 限制性氨基酸 AP 组含量最低, 占 FAAs 总量的 10.09%, TR 组含量最高, 占 FAAs 总量的 15.51%。因此, FP 和 TR 组的游离氨基酸总量、呈味氨基酸、必需氨基酸、限制性氨基酸含量是最高的。

表 1 不同实验组中游离氨基酸组成
Table 1 Compositions of FAAs in different groups

组别	FAAs 总量/(mg/g)	氨基酸种类/种	呈味氨基酸/(mg/g)	必需氨基酸/(mg/g)	限制性氨基酸/(mg/g)
CKI	150.67±1.99 ^a	31 ^b	83.58±0.39 ^a	58.63±0.45 ^a	21.43±0.06 ^a
CKII	138.59±1.33 ^b	29 ^c	73.16±0.23 ^c	57.76±0.32 ^b	20.49±0.05 ^b
AP	113.12±0.46 ^c	30 ^c	55.88±0.09 ^d	45.53±0.11 ^c	11.41±0.02 ^c
NP	114.03±1.19 ^c	33 ^a	54.52±0.22 ^d	45.75±0.25 ^c	12.45±0.04 ^d
FP	151.25±0.95 ^a	31 ^b	77.96±0.18 ^{bc}	66.02±0.21 ^d	20.56±0.03 ^b
TR	150.07±0.65 ^a	31 ^b	76.21±0.13 ^b	60.65±0.15 ^c	23.28±0.02 ^c
PA	90.84±1.12 ^d	27 ^c	47.33±0.25 ^e	34.08±0.29 ^f	11.46±0.04 ^c
PE	101.51±1.16 ^c	33 ^a	49.14±0.21 ^e	36.44±0.25 ^e	13.32±0.04 ^f
SP	35.18±0.48 ^f	23 ^c	18.95±0.10 ^f	9.57±0.13 ^h	2.15±0.02 ^g

注: 每列中不同字母间表示差异显著(P<0.05)。

2.2 不同实验组呈味特征及 TAV 分析

FAAs 对水产品滋味的形成贡献较大。WU 等^[15]认为酶解产物中呈味氨基酸含量与蛋白酶种类有直接关系。氨基酸是呈味产品中的重要滋味物质, 也是重要的营养物质^[16]。由图 1 可知, FP 组呈味氨基酸含量最高, 其次为 TR 和 CKI 组。呈味氨基酸主要由甜味氨基酸[丝氨酸(serine, Ser)、苏氨酸(threonine, Thr)、组氨酸(histidine, His)、甘氨酸(glycine, Gly)、脯氨酸(proline, Pro)]、鲜味氨基酸[天冬氨酸(aspartic acid, Asp)、谷氨酸(glutamic acid, Glu)、丙氨酸(alanine, Ala)、赖氨酸(lysine, Lys)]、苦味氨基酸[精氨酸(arginine, Arg)、缬氨酸(valine, Val)、蛋氨酸(methionine, Met)、异亮氨酸(isoleucine, Ile)、亮氨酸(leucine, Leu)]、芳香族氨基酸[半胱氨酸(cysteine, Cys)、酪氨酸(tyrosine, Tyr)、苯丙氨酸(phenylalanine, Phe)]构成。鲜味氨基酸含量最高为 CKI 组, 其次为 TR 组和 FP 组, 均远高于同等浓度酱油粉中鲜味氨基酸含量。PA 组中苦味氨基酸含量为实验组中最低, FP 组最高。有研究表明, 苦味氨基酸低于阈值

时可与其他物质产生协同作用进一步增强食品的鲜味和甜味^[17]。FP 组的甜味氨基酸含量最高, 是实验组中含量最低组 PE 组的 2.1 倍。芳香族氨基酸为食品提供香味, TR 组芳香族氨基酸含量最高, 远高于酱油粉。综上, TR 组和 FP 组具有较好的呈味效果, 可用于开发呈味基料。

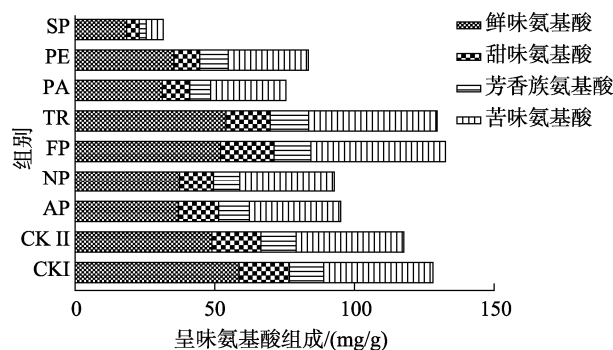


图 1 不同实验组呈味氨基酸组成
Fig.1 Composition of taste amino acids in different experimental groups

氨基酸呈味特征与阈值有直接关系, 各组呈味氨基酸 TAV 如表 2 所示, TAV 值越大对呈味贡献越大。从表 2 可知, 各组中除 Pro 外, 其余各氨基酸的 TAV 均大于 1, 对酸、甜、苦、鲜味均有贡献。其中 Glu、Ala 对滋味贡献最大, 是沙蚕鲜美的味道来源之一。CKI 和 CKII 组的 Glu 的 TAV 值较高, 可与同等浓度的酱油粉媲美。甜味是海产品的味道特征之一, 各组中 Gly 和 His 的 TAV 均高于 1, 对甜味贡献很大。FP 和 TR 组的 Gly 的呈味 TAV 值是酶解组中较高的, 且 FP 组的 His 的 TAV 值是各组中最高的。各组样品中苦味氨基酸 (+、-) 种类较多, 与酶解产生疏水性氨基酸较多有关^[18], SP 组无 Cys 检出, 与酱油粉使用新鲜酱油调味、调香后再喷雾干燥的生产工艺有关^[19]。Asp 可与呈味核苷酸等并用于食品调味中, 在发达国家中逐步作为味精替代品^[20]。

由表 3 可知, 除 PE 外, 各组中 IMP 的 TAV 值均大于

1, 说明 IMP 对沙蚕酶解产物鲜味贡献较大, TR 组、FP 组、CKII 组 AMP、GMP 对沙蚕酶解产物滋味贡献不大。研究表明, 大部分 IMP 是由水产品中 AMP 的降解和脱氨作用形成的^[21], 所以各组基本无 AMP 检出。推断 50 °C 时, IMP 在内源酶作用下产出速率较高(CKII 组)。酱油组中 GMP 对鲜味贡献较 IMP 大。

通常情况下, TAV 能比较客观地评价产品中各成分的呈味强度, 但没有考虑各成分之间的掩蔽、相抵、增强或协同作用等。MAEHASHI 等^[22]认为呈味核苷酸与呈鲜味氨基酸会产生鲜味协同增效作用, 通常用 EUC 的大小来衡量。表 4 为各组的 EUC 值, CKII 组和 TR 组的值远高于酱油粉组, 其次为 FP 组, PE 组交互作用最弱, 因此, CKII 组和 TR 组呈味核苷酸与鲜味氨基酸的交互作用更为明显。

表 2 不同实验组中呈味氨基酸 TAV 值
Table 2 TAV values of flavor amino acids in different groups

氨基酸	滋味贡献	阈值	CKI	CKII	AP	FP	PA	PE	NP	TR	SP
Asp	鲜/酸(+)	1.00	7.29	/	4.95	5.75	3.44	4.93	4.52	6.14	2.11
Thr	鲜/酸(+)	2.60	2.54	2.49	1.88	2.87	1.44	1.07	1.85	2.28	0.41
Ser	鲜/甜(+)	1.50	3.45	3.40	2.80	3.65	1.98	1.52	2.45	3.06	0.92
Glu	鲜/甜(+)	0.30	43.97	41.61	26.04	37.13	21.86	31.16	29.47	35.40	41.92
Gly	甜(+)	1.30	3.59	3.24	2.42	2.95	2.42	1.76	2.31	2.97	0.52
Ala	甜(+)	0.60	20.17	19.67	16.41	18.11	11.13	9.41	14.42	16.95	2.70
Val	苦(-)	0.40	12.06	12.39	12.73	16.36	7.23	4.91	11.18	12.58	3.97
Cys	苦(-)	0.02	9.40	11.32	7.84	10.39	0.00	17.97	8.17	14.48	0.00
Met	苦(+)	0.30	15.08	14.66	12.44	16.00	9.33	9.34	12.94	14.34	1.21
Ile	甜/苦(+)	0.90	4.77	4.85	4.47	6.28	2.82	1.46	4.69	4.77	1.50
Leu	苦(-)	1.90	5.02	5.06	5.19	6.50	3.31	4.41	5.22	5.24	1.14
Tyr	苦(-)	2.60	1.87	1.92	1.67	1.67	1.16	1.55	1.30	2.17	0.34
Phe	甜/苦(-)	0.90	8.06	8.03	7.20	9.59	4.92	6.54	6.59	8.70	1.36
Lys	甜/苦/硫(-)	0.50	42.80	40.90	22.82	41.11	22.94	26.64	24.88	46.54	4.28
His	苦/甜(+)	0.20	19.75	19.02	21.13	22.31	10.52	15.02	11.69	18.26	2.97
Arg	甜/苦(-)	0.50	31.40	30.00	20.04	37.58	25.03	28.28	22.51	44.69	1.96
Pro	甜(+)	3.00	0.71	0.65	0.27	0.57	0.38	0.35	0.40	0.55	0.49

注: +令人愉快的口味; -令人不快的口味; /表示未检出该种氨基酸。

表 3 不同实验组中呈味核苷酸 TAV 值
Table 3 TAV values of flavor nucleotides in different groups

核苷酸	阈值	CKI	CKII	AP	FP	PA	PE	NP	TR	SP
AMP	50.00	0.16	0.36	ND	0.09	ND	ND	0.09	0.61	ND
IMP	25.00	3.63	66.00	2.06	7.24	3.32	ND	3.77	41.20	2.35
GMP	12.50	ND	0.10	ND	0.11	ND	ND	ND	0.14	3.02

注: ND 表示该核苷酸未检出。

表 4 不同实验组中 EUC 值(g MSG/100 g)
Table 4 EUC values in different experimental groups (g MSG/100 g)

	CKI	CKII	AP	FP	PA	PE	NP	TR	SP
味精当量 EUC	155.71	2519.08	52.11	207.84	118.25	1.11	79.72	1232.88	227.37

2.3 不同实验组中氨基酸的主成分分析

从图 2 可以看出, 因子 1 与 2 之间的特征值差值较大, 因子 2 与 3 特征值差值次之, 因子 6~19 之间特征差值比较小, 明显的拐点为因子 6, 结合表 5 中特征值大于 1 的原则, 故取前 4 个因子就可以对大多数数据给出充分的概括, 可解释的方差占总方差的 92.537%, 仅丢失 7.463% 的信息。

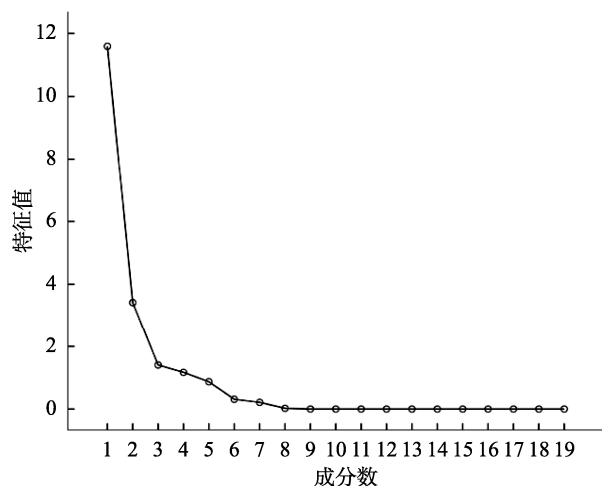


图 2 各特征值的碎石图

Fig.2 Gravel diagram of each eigenvalue

表 5 总方差分解结果

Table 5 Total variance explained

主成分	全部初始特征值	方差贡献率/%	累计方差贡献率/%
1	11.591	61.007	61.007
2	3.418	17.987	78.994
3	1.404	7.389	86.383
4	1.169	6.153	92.537
5	0.869	4.575	97.111
6	0.311	1.638	98.749
7	0.214	1.128	99.878
8	0.023	0.122	100.000

由表 6 可知, Met、Phe、Ala、Thr、Ser、Lys、Tyr、Leu、His 在主成分 1 中具有较高载荷值, 均大于 0.9, 且主成分 1 的方差贡献率最大, 因上述氨基酸皆为必需氨基酸, 因此, 第 1 主成分命名为必需氨基酸因子, 对酶解 FAAs 贡献最大。第 2 主成分中瓜氨酸(citrulline, Cit)正载荷值最大, 其次为 Glu 和 Pro, 由于 Glu 和 Pro 分别有鲜味和甜味, Cit 具有提高免疫力的功效, 第 2 主成分命名为呈味氨基酸因子。主成分 3 中, β -氨基丁酸(β -aminoisobutyric acid, β AiBA)、羟赖氨酸(5-hydroxylysine, Hylys)含量的正载荷较高, β AiBA 具有改善 II 型糖尿病小鼠肝细胞内质网应激和凋亡及肝脏脂代谢紊乱的功效; 主成分 4 中 γ -氨基丁酸

(γ -aminoisobutyric acid, γ -AiBA)是一种天然存在的非蛋白组成氨基酸, 具有促进人体内氨基酸代谢的平衡、调节免疫功能, 合并命名为功能氨基酸因子。

表 6 主成分载荷矩阵

Table 6 Principal component load matrix

氨基酸	主成分 1	主成分 2	主成分 3	主成分 4
Met	0.984	0.071	0.083	0.092
Phe	0.974	-0.142	0.055	-0.074
Ala	0.967	0.081	0.027	0.168
Thr	0.967	0.168	0.056	0.159
Ser	0.956	0.209	0	0.185
Lys	0.955	0.049	-0.085	-0.22
Tyr	0.931	-0.198	-0.172	-0.184
Leu	0.915	-0.202	0.196	0.048
His	0.91	-0.148	-0.005	0.006
Arg	0.879	-0.224	-0.144	-0.249
Val	0.876	0.172	-0.021	0.316
Orn	0.81	-0.04	-0.439	0.095
γ -AiBA	-0.599	0.575	-0.045	0.537
Cit	-0.198	0.909	0.283	0.092
Glu	0.165	0.851	0.029	-0.471
Pro	0.494	0.771	-0.022	-0.249
Hylys	-0.105	-0.770	0.612	-0.044
β AiBA	0.509	0.239	0.798	-0.085
磷酸丝氨酸 (phosphoserine, PSer)	0.561	-0.064	0.079	0.471

由图 3a 得知, 各实验组区分明显, 大致分为 4 类, TR、CKI、CKII、SP 聚为一类, 说明其氨基酸组成接近, 因 SP 为鲜味的阳性对照, 因此, TR、CKI、CKII 3 组因可呈现出鲜味而区别于其他各组, 后期可进一步开展鲜味活性组分的研究。FP 和 PE 均各自聚为一类, 且远离其他组别, 说明其氨基酸组成和含量差异较大。图 3b 可以看出, 除 Hylys、Cit、 γ -AiBA、Val, 其他 FAAs 基本都分布在第 1 主成分和第 2 主成分的正轴, Glu 位于分隔线上, 说明其含量主要受主成分 1 影响, 是由氨基酸组成与含量造成差异。

2.4 不同实验组氨基酸的综合评价

当提取 4 个主成分时, 累计方差达 92.537%(表 5), 因此, 选用前 4 个主成分已足够描述不同实验组的 FAAs 总体水平。以方差齐性的 19 个 FAAs 指标为初始自变量, 经过 PCA 降维度, 得出 4 个主成分综合方程, 使用加权平均计算综合评价分值, 反映不同实验组的 FAAs 综合质量高低。如表 7 所示, 沙蚕各组酶解氨基酸质量均高于 SP 组, FP 组综合得分最高, 其次为 TR 组和 CKI 组, SP 组最低。

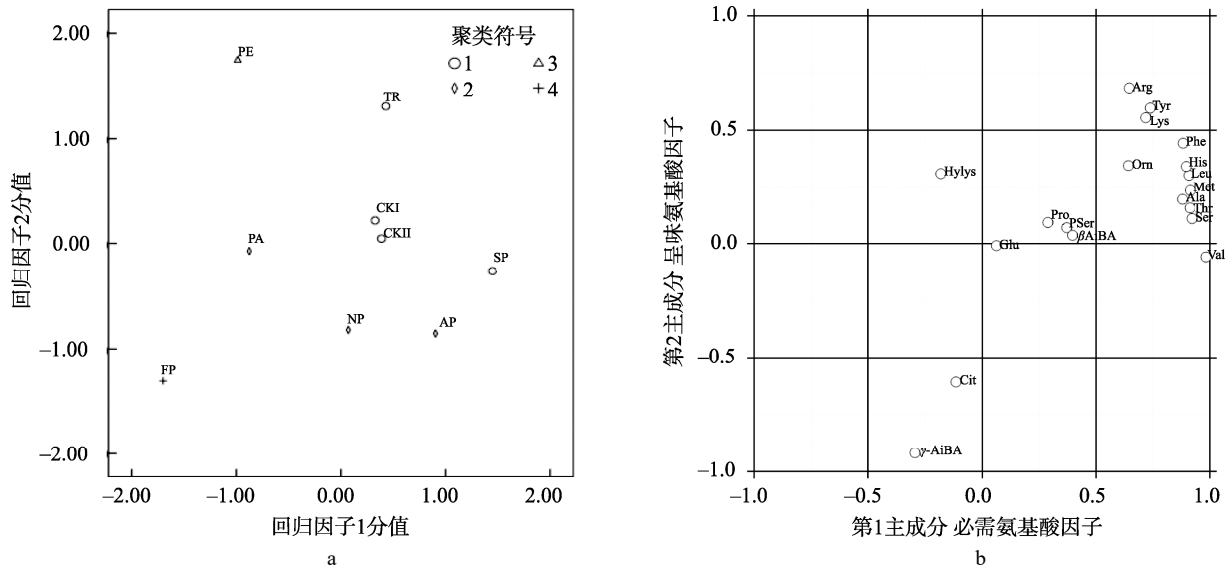


图3 不同实验组 PCA 得分图(a)和氨基酸载荷图(b)

Fig.3 PCA score map (a) and amino acid loading map (b) of different hydrolysates

表7 不同实验组氨基酸得分和综合得分

Table 7 Amino acid scores and comprehensive scores of different experimental groups

组别	F1	F2	F3	F4	F	排序
CKI	4.423	8.472	7.442	0.708	5.200	3
CKII	4.506	7.929	6.945	0.578	5.101	4
AP	5.129	3.654	3.130	-0.779	4.288	5
FP	6.459	8.314	6.001	-0.640	6.307	1
PA	2.595	5.591	3.575	1.849	3.203	8
PE	2.513	7.775	4.992	-0.683	3.519	7
NP	4.259	4.627	3.861	-0.790	3.961	6
TR	4.147	11.397	6.609	0.132	5.481	2
SP	0.558	1.630	5.654	-0.659	1.093	9

FAAs 品质差异与蛋白酶有直接关系, 聚类结果与 PCA 结果和氨基酸呈味分析结果较为一致, 均能较好地反映各组差异。

2.5 电子舌结果

图4是采用电子舌绘制的不同实验组的滋味轮廓(去除无味点)。酶解产物的酸味值在无味点以下, 涩味和涩味回味与无味点接近, 表明酸味、涩味、涩味回味对实验组的滋味基本没有贡献。鲜味、咸味、鲜味回味、苦味、苦味回味均在无味点以上, 共同组成了实验组的滋味。不同实验组的特征滋味为鲜味和鲜味回味, 其中 CKI 的鲜味值最高, 其次为 CKII, SP 组最小(9.01), SP 组鲜味值与其他各组差异显著 ($P<0.05$); FP 组具有较强的丰富性, SP 组最小(1.8, $P<0.05$), 这与 EUC 的分析结果较为一致。鲜味回味的差异可能与酶解产物的 FAAs 组成差异有关。NP 组的苦味、苦味回味值最大, 其次为 CKI 和 CKII, SP 组苦味回味值低于无味点。综上,

酶解产物的鲜味和鲜味回味等令人愉悦的滋味强度更高, 在滋味方面较酱油粉更为丰富, 但同时苦味也较大, 若将酶解产品开发为海鲜呈味基料, 后续可通过添加一定比例木糖和葡萄糖进行美拉德反应以降低苦味, 增加产品浓郁鲜香味^[23]。

3 结论与讨论

3.1 蛋白酶种类对产品酶解产物滋味的影响

原料蛋白质种类、蛋白酶、酶解条件等是酶解液滋味差异的主要因素。本研究中得到 CKII 组滋味明显优于 SP 组, 其次为 TR 组和 FP 组。水产品酶解会产生多种游离氨基酸和多肽, 既可以呈现出水产品的鲜味, 又可以提高人体消化吸收利用率^[24]。内源性酶在水产品气味产生方面具有不可替代的作用^[25], 但关于沙蚕滋味产生方面的研究几乎未见报道。碱性蛋白酶属于内切酶, 可酶解液中疏水性氨基酸为终端的多肽; 胃蛋白酶作用位点广泛, 主要作用于 Phe、Trp、Tyr 等疏水性氨基酸, 这 2 种酶均可增加酶解液中疏水性氨基酸含量, 使酶解液苦味较高^[3]。胰蛋白酶是一种内肽酶, 能切割多肽链中赖氨酸和精氨酸残基的羧基侧, 赖氨酸和精氨酸均呈现甜味, 可赋予酶解液较佳的感官品质。这与杨昭等^[18]在利用胰蛋白酶酶解牡蛎时得到的结果一致。风味蛋白酶属于兼具内、外切作用的复合蛋白酶, 可切断苦味肽末端的疏水性氨基酸, 从而降低苦味。本研究中风味蛋白酶组的苦味氨基酸含量较其他组高, 可能与原料蛋白质种类有关, 但该组电子舌结果鲜味回味较高, 与其含有较多的呈味核苷酸有一定的关系。研究表明, 氨基酸可与小肽在酶解过程中发生美拉德反应, 也会不同程度上改善产品的滋味^[26]。前期研究表明^[3], 沙蚕胰蛋白酶酶解产物和风味蛋白酶酶解产物中分别有 70.47% 和 54.77% 的小分子肽, 这部分小分子肽可能会与 FAAs 发生美拉德反应而改善了风味。

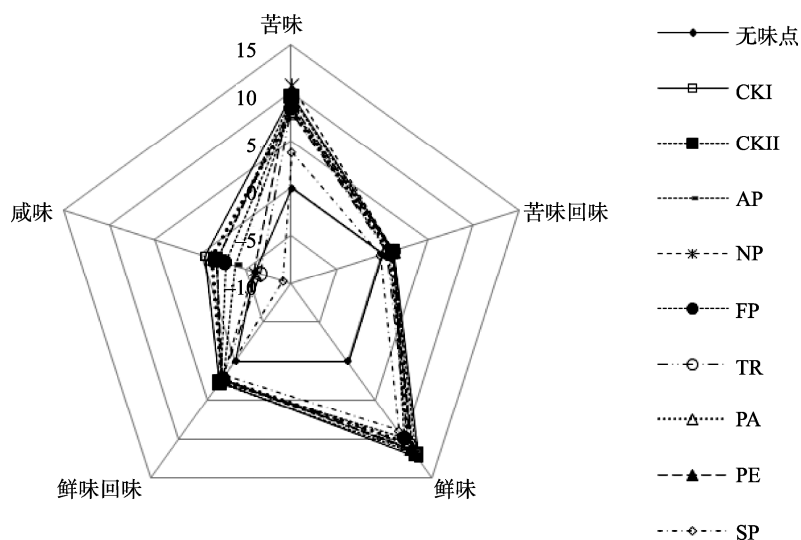


图 4 基于电子舌的不同实验组的滋味轮廓(去除无味点)

Fig.4 Taste profiles of different experimental groups based on electronic tongue (Remove tasteless)

3.2 电子舌技术结合氨基酸聚类分析对不同酶解液滋味的评价

电子舌技术用于区分不同样品之间的差异性,已经在食品工业领域得到了广泛的研究和应用^[27]。在食品滋味评价时,感官评定具有直观、快速的优点,但易受评价人的主观影响、数据信息量较小,生化检测信息量大、但过程烦琐、周期长。电子舌技术是多技术融合体,可以量化感官数据,与其他评价方式结合可真实反映滋味轮廓^[28]。本研究中电子舌测定结果与 TAV 和 EUC 评价结果一致,可以真实地反映酶解产物滋味轮廓,大部分酶解产物以鲜味和鲜味回味为主。如 FP 组和 TR 组中 TAV 值较高的 Gly 是酶解产物呈味的重要氨基酸。这与付娜等^[29]利用电子舌和感官评价得出 Ala、Gly、Met 是影响蟹肉滋味的重要氨基酸结论一致。本研究利用必需氨基酸、呈味氨基酸和功能氨基酸因子的主成分分析,对酶解产物的品质进行比较,能较好区分不同蛋白酶的酶解产物,得出风味蛋白酶酶解产物的呈味最佳。刘伟等^[20]利用氨基酸聚类分析成功分辨出黄花菜不同种质间的差异性。因此,电子舌分析结合氨基酸聚类分析等评价方法,可用于水产品酶解产物的滋味评价研究,为酶解产物的开发利用提供数据支持。

4 结 论

胰蛋白酶、风味蛋白酶组在味觉氨基酸上有较高的呈味效果,且两组酶解产物的综合品质评分较高,与氨基酸聚类分析和滋味评价结果类似。风味蛋白酶和胰蛋白酶酶解沙蚕产物的 FAAs 品质较高,且鲜味氨基酸含量和呈味核苷酸含量高,可用于开发呈味基料。

参考文献

- [1] LI Y, LI J, LIU TH, *et al.* Preparation and antithrombotic activity identification of *Perinereis aibuhitensis* extract: A high temperature and wide pH range stable biological agent [J]. *Food Funct*, 2017, 8(10): 3533–3541.
- [2] 贾盈露, 丁国芳, 杨最素, 等. 双齿围沙蚕多肽的制备及其抗肺癌 A549 细胞活性[J]. *食品科学*, 2017, 38(12): 27–35.
JIA YL, DING GF, YANG ZS, *et al.* Anticancer activity of a novel peptide derived from hydrolysates of *Perinereis aibuhitensis* against lung cancer A549 cells [J]. *Food Sci*, 2017, 38(12): 27–35.
- [3] 刘天红, 王颖, 孙元芹, 等. 沙蚕不同酶解产物抗氧化效果研究[J]. *中国农业科技导报*, 2020, 22(1): 149–161.
LIU TH, WANG Y, SUN YQ, *et al.* Research on the antioxidant effect of different enzymatic hydrolysis products of *Nereis succinea* [J]. *J Agric Sci Technol*, 2020, 22(1): 149–161.
- [4] 刘天红, 于道德, 李红艳, 等. 东营养殖双齿围沙蚕营养成分分析及膳食营养评价[J]. *水产科学*, 2017, 36(2): 160–166.
LIU TH, YU DD, LI HH, *et al.* Nutrition analysis and dietary nutrition evaluation of culture clamworm (*Perinereis aibuhitensis* Grube) [J]. *Fish Sci*, 2017, 36(2): 160–166.
- [5] 于芳珠, 薄存美, 刘登勇. 食品中鲜味物质研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(16): 5554–5561.
YU FZ, BO CM, LIU DY. Research progress of umami substances in food [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(16): 5554–5561.
- [6] 徐永霞, 曲诗瑶, 李涛, 等. 不同蛋白酶对蓝蛤酶解液风味特性的影响[J]. *食品科学*, 2021, 42(4): 190–196.
XU YX, QU SY, LI T, *et al.* Effects of different proteases on the flavor characteristics of *Aloididae aloidii* muscle hydrolysates [J]. *Food Sci*, 2021, 42(4): 190–196.
- [7] 钱琴莲, 李晔, 王求娟, 等. 基于 GC-MS 和电子鼻技术的金枪鱼胰脏酶解气味解析[J]. *食品科学*, 2016, 37(8): 121–126.
QIAN QL, LI Y, WANG QJ, *et al.* Analysis of volatile flavor compounds of tuna pancreatic protein hydrolysates produced by different proteases [J]. *Food Sci*, 2016, 37(8): 121–126.

- [8] WU X, ZHOU Z, WU W, *et al.* A temperature resistant extracts prepared from the *Perinereis aibuhitensis* and its antioxidative characterization [J]. *Aquat Sci Technol*, 2019, 7(2): 17.
- [9] 李雪, 刘春娥, 罗永康, 等. 沙蚕多肽提取及功能研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(8): 257–261.
LI X, LIU CER, LUO YK, *et al.* Extraction and function of polypeptides from *Nereis diversicolor* [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(8): 257–261.
- [10] ROTZOLL N, DUNKEL A, HOFMANN T. Quantitative studies, taste reconstitution, and omission experiments on the key taste compounds in *Morel mushrooms (Morchella deliciosa Fr.)* [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(7): 2705–2711.
- [11] ZHANG N, WANG W, LI B, *et al.* Non-volatile taste active compounds and umami evaluation in two aquacultured pufferfish (*Takifugu obscurus* and *Takifugu rubripes*) [J]. *Food Biosci*, 2019, 32(7): 135448–135456.
- [12] 赵谋明, 雷芬芬, 钟泓波, 等. 微小杆菌属 SWJS2 蛋白酶对鱼肉酶解特性的研究[J]. *现代食品科技*, 2014, 30(2): 153–158.
ZHAO MM, LEI FF, ZHONG HB, *et al.* Enzymatic hydrolysis of fish proteins using protease produced by *Exiguobacterium* sp. SWJS2 [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2014, 30(2): 153–158.
- [13] 董秀芳. 低温辅助内源酶主导的海参嫩化分子机理研究[D]. 大连: 大连工业大学, 2019.
DONG XF. Endogenous enzyme regulated molecular mechanism of tenderization in sea cucumber *Apostichopus japonicus* assisted by low-temperature [D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2019.
- [14] 郭晓坤. 刺参肠组织蛋白酶D和分离蛋白的提取及特性研究[D]. 大连: 大连工业大学, 2018.
GUO XK. Extraction and characteristics of cathepsin D and protein isolates from sea cucumber (*Stichopus japonicus*) guts [D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2018.
- [15] WU HC, CHEN HM, SHIAU CY. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*) [J]. *Food Res Int*, 2003, 36(9/10): 949–957.
- [16] 张璟琳, 黄明泉, 孙宝国. 四大名醋的游离氨基酸组成成分分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2014, 5(10): 3124–3131.
ZHANG JL, HUANG MQ, SUN BG. Study on free amino acid composition of 4 famous vinegars in China [J]. *J Food Saf Qual*, 2014, 5(10): 3124–3131.
- [17] CHEN DW, ZHANG M. Non-volatile taste active compounds in the meat of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. *Food Chem*, 2007, 104(3): 1200–1205.
- [18] 杨昭, 姚玉静, 黄佳佳, 等. 五种蛋白酶对牡蛎酶解产物滋味特性的影响[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(21): 53–57, 66.
YANG Z, YAO YJ, HUANG JJ, *et al.* Effects of five proteases on the taste characteristics of oyster hydrolysates [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2020, 41(21): 53–57, 66.
- [19] YUNIA VGT, VÍCTOR BF. Least squares fitting-polynomials for determining inflection points in adsorption isotherms of spray-dried açai juice (*Euterpe oleracea* Mart.) and soy sauce powders [J]. *Powder Technol*, 2019, 342. DOI: 10.1016/j.powtec.2018.10.058
- [20] 刘伟, 张群, 李志坚, 等. 不同品种黄花菜游离氨基酸组成的主成分分析及聚类分析[J]. *食品科学*, 2019, 40(10): 243–250.
LIU W, ZHANG Q, LI ZJ, *et al.* Principal component analysis and cluster analysis for evaluating free amino acids of different cultivars of daylily buds [J]. *Food Sci*, 2019, 40(10): 243–250.
- [21] 王晓燕, 潘晓场, 焦阳, 等. 通电加热过程中凡纳滨对虾肌肉的游离氨基酸和核苷酸含量变化研究[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(20): 71–75, 87.
WANG XY, PAN XY, JIAN Y, *et al.* Changes of free amino acid and nucleotide in minced shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during ohmic heating [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2019, 40(20): 71–75, 87.
- [22] MAHASHI K, MATSUZAKI M, YAMAMOTO Y, *et al.* Isolation of peptides from an enzymatic hydrolysate of food proteins and characterization of their taste properties [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1999, 63(3): 555–559.
- [23] 杨调调, 何志勇, 秦昉, 等. 美拉德反应对产品风味品质的影响及其衍生危害物研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(3): 854–861.
YANG TT, HE ZY, QIN F, *et al.* Research progress of the effects of Maillard reaction on flavor and quality of products as well as derivatized harmful substances [J]. *J Food Saf Qual*, 2017, 8(3): 854–861.
- [24] 丁慧璞, 欧阳伟虹, 黄玉婷, 等. 小黄鱼边角料的酶解工艺及酶解液性能研究[J]. *核农学报*, 2020, 34(34): 2021–2031.
DING HP, OUYANG WH, HUANG YT, *et al.* Enzymatic hydrolysis technology of small yellow croaker scraps and properties of its enzymatic hydrolysis solution [J]. *J Nucl Agric Sci*, 2020, 34(34): 2021–2031.
- [25] 吴燕燕, 曹松敏, 魏涯, 等. 腌制鱼类中内源性酶类对制品品质影响的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(8): 358–363.
WU YY, CAO SM, WEI Y, *et al.* Research progress on the effect of endogenous enzymes on the quality of salted fish [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2016, 37(8): 358–363.
- [26] YANG B, LIU XL, ZHAO MM. Effects of pretreatment on silkworm pupae protein hydrolysis and umami-taste enhancement of hydrolysates [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2017, 33(6): 222–227.
- [27] 朱红, 孙健, 钮福祥, 等. 基于电子舌技术的不同甘薯雪花粉滋味品质评价[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(24): 9201–9206.
ZHU H, SUN J, NIU FX, *et al.* Evaluation of taste quality of sweet potato flour from different varieties based on electronic tongue technology [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(24): 9201–9206.
- [28] 苗晓丹, 刘源, 马垒, 等. 结合感官评价与电子舌技术优化酶水解养殖暗纹东方鲀肌肉制备呈味肽[J]. *现代食品科技*, 2015, 31(8): 268–272.
MIAO XD, LIU Y, MA L, *et al.* Optimized enzymatic hydrolysis for flavor peptide preparation from cultured obscure pufferfish (*Takifugu obscurus*) using sensory evaluation and electronic tongue [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2015, 31(8): 268–272.
- [29] 付娜, 王锡昌. 电子舌分析和感官评价在游离氨基酸对中华绒螯蟹整体滋味贡献评价中的研究[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(20): 91–96.
FU N, WANG XC. Study on the contribution of free amino acid composition to the Chinese mitten crab taste by sensory evaluation and the electronic tongue [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2014, 35(20): 91–96.

(责任编辑: 张晓寒 于梦娇)

作者简介



刘天红, 硕士, 副研究员, 主要研究方向为水产品加工及质量控制研究。
E-mail: oucthl@126.com



王颖, 硕士, 研究员, 主要研究方向为水产品加工及质量控制研究。
E-mail: food_rc@sina.com