

文章编号:1001-6880(2018)8-1402-08

柘果酵素发酵过程氨基酸的变化规律研究

程勇杰^{1,2,3},陈小伟^{1,2,3},蒋立新^{1,2,3},范昊安^{1,2,3},薛淑龙^{1,2,3},
王珍珍^{1,2,3},毛旸晨⁴,沙如意^{1,2,3*},毛建卫^{1,2,3*}

¹浙江科技学院生物与化学工程学院; ²浙江省农产品化学与生物加工技术重点实验室;³浙江省农业生物资源生化制造协同创新中心,杭州 310023; ⁴杭州医学院,杭州 310053

摘要:为研究柘树酵素在天然发酵过程中蛋白质和氨基酸组成及含量的变化规律,按酵素传统制作工艺制作柘树青果酵素,在检测蛋白质含量、氨基酸种类与含量的基础上,采用聚类分析、氨基酸比值(RAA)、氨基酸比值系数(RC)和比值系数分(SRC)三种评价体系进行分析。结果表明,柘树青果酵素的蛋白质含量呈逐渐上升趋势,酵素在发酵过程中共含有16种氨基酸,且含量差异较大,总氨基酸(T)、人体必需氨基酸(E)和γ-氨基丁酸含量的变化趋势基本相同,均先上升后下降,最后处于动态稳定状态,前两者在发酵270 d时最大值分别达到了2407.9、766.7 mg/L,后者在170 d达到最大值211.5 mg/L。聚类分析结果表明氨基酸含量变化呈现明显的三个时期,分析不同发酵时期酵素的RAA、RC和SRC可知,在270 d时SRC高达59.52,随着发酵的进行,柘树青果酵素的氨基酸营养越来越均衡,但由于Tyr和Cys+Met的缺乏,影响了酵素整体的营养价值。在风味评价中,柘树青果酵素鲜味氨基酸>甜味氨基酸>苦味氨基酸>无味氨基酸。

关键词:酵素;氨基酸;营养评价;聚类分析;呈味氨基酸

中图分类号:TS255.44

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.8.020

Evaluation of Changes in Amino Acids in Fermented Jiaosu of *Cudrania tricuspidata* Green Fruits with Different Fermentation Periods

CHENG Yong-jie^{1,2,3}, CHEN Xiao-wei^{1,2,3}, JIANG Li-xin^{1,2,3}, FAN Hao-an^{1,2,3}, XUE Shu-long^{1,2,3},
WANG Zhen-zhen^{1,2,3}, MAO Yang-chen⁴, SHA Ru-yi^{1,2,3*}, MAO Jian-wei^{1,2,3*}

¹School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science & Technology;²Zhejiang Provincial key lab for Chem & Bio Processing Technology of Farm Product;³Zhejiang Provincial Collaborative Innovation Center of Agricultural Biological Resources Biochemical Manufacturing,
Hangzhou, 310023, China;⁴Hangzhou Medical College, Hangzhou 310053, China

Abstract: Naturally fermented Jiaosu of *Cudrania tricuspidata* green fruits were prepared by the same method as that for traditional fermented Jiaosu with different fermentation periods, and they were investigated for changes in protein content and amino acid composition during the fermentation. In addition to the contents of protein and amino acids, ratio of amino acids (RAA), ratio coefficients of amino acids (RC) and score of ratio coefficients (SRC) were also analyzed. The results showed that the content of protein showed a gradual upward trend, a total of 16 kinds of amino acids were measured in the naturally fermented Jiaosu of *Cudrania tricuspidata* green fruits, the contents of different amino acids were extremely different in the fermentation. The total amino acid (T), human essential amino acid (E) and γ-aminobutyric acid content were increased at first and then decreased, The first two reached 2407.9, 766.7 mg/L at 270th day and the latter reached 211.5 mg/L on the 170th day. Based on analysis of RAA, RC and SRC, the SRC reached the highest value of 59.52 on day 270th of fermentation. With the progress of fermentation, the amino acid nutrition of the Jiaosu of *Cudrania tricuspidata* green fruits became more balanced.

收稿日期:2017-12-06 接受日期:2018-05-16

基金项目:浙江省重点科技攻关项目(2006C12068);浙江省科技计划(2016C37078);浙江省重点研发计划(2017C02009);浙江省农业生物资源生化制造协同创新中心开放基金(2016KF0040,2016KF0114);浙江科技学院研究生科研创新基金(2016YJSCK016)

*通信作者 E-mail:kevinsha_0204@163.com,zjhmjw@163.com

nia tricuspidata green fruits is more and more balanced, but the lack of Tyr and Cys + Met affects the nutritional value of the whole Jiaosu. The contents of different taste-active amino acids were in the order of umami amino acid > sweet amino acid > bitter amino acid > tasteless amino acid.

Key words: Jiaosu; amino acid; nutrition evaluation; cluster analysis; taste-active amino acids

柘树 *Cudrania tricuspidata* Bur. 为桑科(Moraceae)柘属(*Cudrania*)植物,又名柘木、柘桑、刺桑、奴柘等,全世界存在约6种柘属植物,而我国存在5个品种和2个变种^[1]。柘树全身都是宝,其茎皮可为造纸原料,木材可作染料,心材可做高档家具材料,其叶可饲喂蚕虫,根皮可药用,治肾虚耳鸣、腰膝冷痛、黄痘、疮疖、咯血等^[2-4]。以前的研究主要集中在柘树的根、根皮、树皮以及柘木,而对柘果的研究较少。现有研究表明,柘果含有很多活性物质,如山柰、芦丁、槲皮素等,具有清凉活血,舒经活络的作用^[4,5],同时具有可食用、可煎汤内服和外敷的特性。

食用植物酵素(*Plant Jiaosu*)是以一种或多种新鲜蔬菜、水果和谷豆类、海藻类、食药两用本草类、菌菇类等食材为原料,加(或不加)糖类物质,经多种有益菌通过较长时间发酵而生产的功能性微生物发酵产品^[6,7],含有丰富的次生代谢产物、植物本身营养成分和益生菌等功能成分,特别是富有小分子功能成分^[8]。

氨基酸是食用植物酵素品质的重要组成,其种类和含量是影响柘果酵素营养价值的主要指标。高学玲^[9]对不同品种的菊花进行了氨基酸组成及营养价值分析。氨基酸在参与酵素其它品质特征成分和风味物质合成的同时,自身也表现出一定的呈味特性,许伟^[10]对氨基酸风味物质变化进行了分析。因此,氨基酸的含量与组成对柘果酵素营养与风味具有重要的影响。目前未见关于对柘树青果以及柘树青果酵素发酵过程中的氨基酸及营养综合评价的文献报道,本研究为进一步对于柘树的高值化生物利用以及食用植物酵素功能性产品的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

柘果采自2016年10月10日采自浙江省长兴县柘树合作社;复合糖浆由浙江省农产品化学与生物加工技术重点实验室提供。

茚三酮(分析纯)购置于国药化学试剂有限公司(上海,中国);混合氨基酸标准液购置于日本和光纯业工业株式会社; γ -氨基丁酸(色谱纯)购置于上海长哲生物科技有限公司;牛血清白蛋白(分析纯)购置于

上海阿拉丁生化科技股份有限公司;考马斯亮蓝(分析纯)购置于上海长哲生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

PHS-3C 精密酸度计(杭州齐威仪器有限公司);PTX-FA210 电子天平(福州华志科学仪器有限公司);GZX-9140MBE 电热恒温鼓风干燥箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);SW-CJ 型超净工作台(无锡易纯净化设备有限公司);KQ-300E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);日立 L-8900 氨基酸自动分析仪(日本日立公司);真空干燥箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);JT-DCY-12Y 水浴氮吹仪(杭州聚同电子有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 柘树植物酵素的制备

参考蒋增良^[8]方法,在无菌条件下轻轻冲洗除去柘果表面的沙子和灰尘,常温晾干。柘果与糖浆按质量比3:4,加入到已灭菌的发酵瓶中,封口,放在暗处,常温下发酵,取液体样于10 000 rpm 离心10 min后,保留上清液待用。

1.3.2 蛋白质含量测定

取300 μ L样品,用去离子水补至1 mL于10 mL试管中,加入考马斯亮蓝溶液5 mL,漩涡混匀,放置10 min,于595 nm处测定其吸光度,同时以1 mL去离子水作为空白对照。牛血清蛋白标准曲线方程: $y = 0.0055x + 0.0064$,其中相关系数 $R^2 = 0.9994$,其中:y为吸光度,x为牛血清白蛋白等价物(μ g/mL)。

1.3.3 氨基酸含量测定

1.3.3.1 仪器条件

日立L-8900氨基酸分析仪;色谱柱:日立2622C磺酸型阳离子树脂分离柱(4.6 mm \times 60 mm,3 μ m);检测器:荧光检测器;流动相:柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液;流速:0.4 mL/min;分离柱柱温:57 $^{\circ}$ C;反应柱柱温:135 $^{\circ}$ C;进样量:20 μ L;检测波长:通道一570 nm,通道二440 nm。

1.3.3.2 样品处理

氨基酸分析的条件参考国标GB/T 5009.124-2003^[11],取1 mL样品加到玻璃水解管中,加入10

mL 6 mol/L 的 HCl 溶液, 加重蒸酚 3~4 滴, 冷却 5 min, 向水解管中充入一定量的氮气, 在氮气环境下迅速封管, 在 110 ℃ 下水解 22 h。冷却之后打开水解管, 将水解液全部移至 50 mL 容量瓶中, 用去离子水清洗、过滤及定容。再取 2 mL 滤液真空干燥, 反复 2 次, 最后蒸干, 然后加 0.02 mol/L 柠檬酸钠缓冲液 1 mL, 过 0.22 μm 滤膜过滤后上机。

1.3.3.3 定性定量分析

采用外标法测定柘果酵素的氨基酸种类及含量。

1.3.3.4 营养评价

氨基酸的含量以浓度 (mg/L) 来表示, 计算样品中必需氨基酸的比值 (Ratio of amino acids, RAA)、氨基酸比值系数 (Ratio coefficients of amino acids, RC) 及比值系数分 (Score of ratio coefficients, SRC)^[12]。其中 RAA 和 RC 的数值越接近 1, 表明该必需氨基酸越接近世界卫生组织/联合国粮食与农业组织 (World Health Organization/Food and Agriculture Organization, WHO/FAO) 的推荐值^[13], RC > 1 时, 说明此种氨基酸相对过剩, 而 RC < 1 时, 说明此种氨基酸不足。SRC 的数值越接近 100, 表明该食品中各种必需氨基酸的含量越均衡, 其营养价值就越高。计算公式如下:

$$\text{RAA} = \frac{\text{某必需氨基酸的含量(g/100 g粗蛋白)}}{\text{模式中该必需氨基酸的含量(g/100 g粗蛋白)}} \quad (1)$$

表 1 柘树青果酵素发酵过程中氨基酸的种类与含量分析

Table 1 Analysis of types and concentration for amino acids from green fruits of *Cudrania Tricuspidata* Jiaosu with different natural fermentation periods

氨基酸 Amino acid (mg/L)	发酵时间 Fermentation time (d)							均值 Mean value	标准差 Standard deviation	变异系数 Coefficient of variation
	10	30	60	90	120	170	220			
Asp	11.0	347.5	509.7	524.7	658.6	663.2	492.7	697.0	488.0	224.4
Thr *	4.3	33.1	55.1	62.7	86.6	91.7	76.3	108.8	64.8	33.9
Ser	4.8	34.4	49.1	57.1	80.5	84.2	74.7	107.9	61.6	32.3
Glu	6.4	51.4	89.2	102.2	143.4	153.2	135.7	197.6	109.9	60.9
Gly	5.0	44.2	69.3	78.6	109.3	113.2	92.5	129.2	80.2	40.6
Ala	7.5	99.4	142.1	158.8	214.0	223.0	181.3	248.9	159.4	77.9
Cys	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Val *	2.9	38.5	65.7	78.3	108.9	116.7	103.6	146.7	82.7	46.3
Met *	-	0.8	2.2	2.0	3.3	3.7	2.8	6.1	2.6	1.9
Ile *	3.0	22.0	42.3	50.5	74.4	79.3	72.4	102.8	55.8	32.8
Leu *	5.2	31.0	59.2	75.2	104.0	120.0	116.3	170.7	85.2	53.4
Tyr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

$$\text{RC} = \frac{\text{RAA}}{\overline{\text{RAA}}} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{SRC} = 100 \times \left[1 - \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (\text{RC}_i - \overline{\text{RC}})^2}}{\overline{\text{RC}}} \right] \quad (3)$$

2 结果与分析

2.1 柘树青果酵素发酵过程中蛋白质含量变化

由图 1 可知, 柘树青果酵素在发酵过程中蛋白质含量整体呈逐渐上升的趋势, 前 60 天蛋白质含量急剧增加。发酵第 10 天柘树青果酵素的蛋白质含量为 23.23 mg/L, 发酵至 270 天蛋白质含量为 300 mg/L, 整个发酵过程中蛋白质的含量增加了 1191.4%。

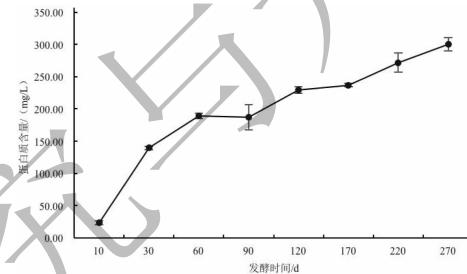


图 1 柘果自然发酵过程中蛋白质含量变化

Fig. 1 Changes in protein contents of fruits of *Cudrania Tricuspidata* Jiaosu during natural fermentation

2.2 柘树青果酵素发酵过程中氨基酸含量变化

续表 1(Continued Tab. 1)

氨基酸 Amino acid (mg/L)	发酵时间 Fermentation time (d)								均值 Mean value	标准差 Standard deviation	变异系数 Coefficient of variation
	10	30	60	90	120	170	220	270			
Phe *	37.1	47.3	54.6	67.6	83.8	89.1	87.6	111.8	72.4	25.1	34.7
GABA	3.0	123.9	161.7	170.5	210.9	211.5	148.9	194.4	153.1	67.9	44.3
Lys *	7.2	28.7	60.5	71.0	99.2	102.6	86.6	119.9	72.0	38.5	53.5
His	-	-	-	-	2.2	2.9	-	9.7	4.9	3.4	68.6
Arg	5.3	14.4	39.4	50.1	76.3	86.8	79.1	114.5	58.2	37.6	64.5
Pro	1.2	30.8	65.9	66.4	98.5	107.3	85.9	136.5	74.1	43.2	58.3
T	100.8	823.6	1304.2	1445.2	1943.0	2037.0	1687.5	2407.9			
E	59.6	201.5	339.5	407.3	560.3	603.2	545.6	766.7			
N	41.1	622.1	964.7	1037.9	1382.7	1433.9	1141.9	1641.2			
E/T	59.2%	24.5%	26.0%	28.2%	28.8%	29.6%	32.3%	31.8%			
E/N	145.0%	32.4%	35.2%	39.2%	40.5%	42.1%	47.8%	46.7%			

注:“-”表示未检出,“*”表示必需氨基酸,T:氨基酸总量(不含GABA),E:必需氨基酸总量,N:非必需氨基酸总量。

Note: “-” indicating that undetected, “*” indicating that essential amino acid, T:total amino acid (no GABA), E:total essential amino acids, N:total amount of non essential amino acids.

由表 1 可知,测定的柘树青果酵素发酵过程中的 17 种氨基酸(不包括 GABA),各含量在发酵过程中发生了显著的变化且含量差异较大。其中,氨基酸含量最高的是天冬氨酸,在 270 天达到了 697.0 mg/L。组氨酸只在 120、170、270 天有检出且含量较少,平均只有 4.9 mg/L。氨基酸含量普遍较低的是半胱氨酸、酪氨酸、蛋氨酸和组氨酸,平均值为未检出到 4.9 mg/L;其余氨基酸的含量普遍较高,平均值在 55.8~488.0 mg/L 之间。柘树青果酵素在天然发酵过程中总氨基酸(T)、人体必需氨基酸(E)的变化趋势非常相似,整体呈逐渐上升趋势(图 2);发酵 270 天总氨基酸和人体必需氨基酸含量分别为 2407.9、766.7 mg/L,含量达到了最大值,柘树青果酵素的总氨基酸和人体必需氨基酸含量由

第 10 天的 100.8、59.6 mg/L 分别上升到 270 天的 2407.9、766.7 mg/L,分别上升了 2288.79%、1186.40%。

从图 2 中可以看出,发酵初期柘树青果酵素发酵液中 GABA 含量呈上升趋势。GABA 从发酵初期的 3.0 mg/L 升到 211.5 mg/L,升高了 6950.00%,含量较高,在此浓度范围内的 GABA 具有抑制疼痛等的效果^[14]。发酵后期 GABA 又有所下降。

2.3 发酵过程中氨基酸变化时间特性的聚类分析

对柘树青果酵素不同发酵时间的氨基酸含量进行聚类分析,结果如图 3 所示,判定 I、II、III 三大类。第 I 类由 10 天组成,其特点是氨基酸含量处于低水平,100.8 mg/L,可能原因是发酵前期微生物还未适应该反应环境,还处于生长的,因此产生的一些破解细胞壁的酶类物质较少以及由微生物代谢产生的氨基酸也较少;第 II 类由 30、60 天组成,其特点是氨基酸含量处于中等水平,在 823.6~1304.2 mg/L 之间,可能原因是发酵初期微生物的大量繁殖分泌了大量的纤维素酶、果胶酶、蛋白酶等酶类物质,使得原料中蛋白质、氨基酸等物质流出,同时微生物的代谢产生了大量的氨基酸;第 III 类由 90、120、170、220、270 天组成,其特点是氨基酸含量处于高水平,在 1445.2~2407.9 mg/L 之间。随着发酵的进行和营养限制性环境的形成,微生物的生长受抑制,酶的活性降低使得蛋白质等物质的分解率降低,同时部分氨基酸被分解成氨,很多酯类、醇类等物质都在此阶段形成,部分氨基酸也会参与其它风味物质的

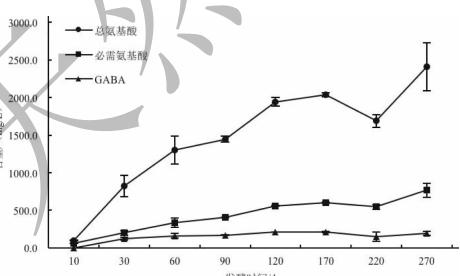


图 2 柘树青果酵素发酵过程中总氨基酸、必需氨基酸和 γ -氨基丁酸含量的变化

Fig. 2 The changes of total amino acids, essential amino acids and GABA in the fermentation of green fruits of *Cudrania Tricuspidata Jiaosu*

形成,使得氨基酸的含量增长缓慢,部分氨基酸含量下降。对不同发酵时间氨基酸含量进行聚类分析的结果很好地反映出柘树青果酵素不同发酵时间氨基酸含量的差异性,为柘树青果酵素发酵时间的选择提供了良好的理论参考。

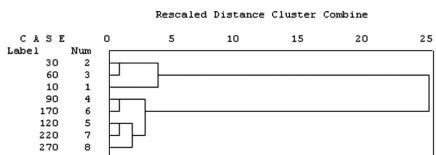


图3 柘树青果酵素发酵时间聚类树状图

Fig. 3 Dendrogram obtained from clustering analysis of fermentation time of green fruits of *Cudrania Tricuspidata Jiaosu*

2.4 发酵过程中氨基酸种类特性的聚类分析

聚类分析结果见图4,判定氨基酸种类可分为I、II、III、IV四大类。第I类由天冬氨酸组成,其特

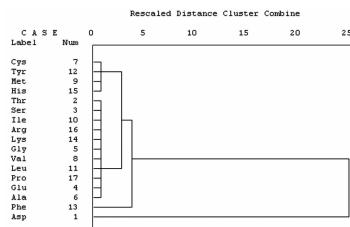


图4 柘树青果酵素氨基酸种类聚类树状图

Fig. 4 Dendrogram obtained from clustering analysis of amino acid species of green fruits of *Cudrania Tricuspidata Jiaosu*

点是属于高含量氨基酸,但变化率较低;第II类由苯丙氨酸组成,其特点是属于中等含量氨基酸,变化率小;第III类由半胱氨酸、蛋氨酸、酪氨酸、组氨酸组成,其特点是属于低含量氨基酸,但变化率高;第IV类由苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、精氨酸、缬氨酸组成,其特点是属于中等或较高含量的氨基酸,且变化率也中等或较高。该聚类分析结果很好的反映了柘树青果酵素不同发酵时间下各类氨基酸的变化情况,为柘树青果酵素的发酵机理研究以及柘树青果开发利用提供了较好的理论参考。

2.5 柘树青果酵素发酵过程中氨基酸营养价值评价

由表2可知,在柘树青果酵素不同发酵时期,除酪氨酸和半胱氨酸+蛋氨酸之外,RAA和RC必需氨基酸均大于1,营养过剩;在整个发酵过程中均未检测到酪氨酸,而半胱氨酸+蛋氨酸在第10天也未检测到且随着发酵的继续其含量均低于其他必需氨基酸,所以酪氨酸为第一限制性氨基酸,半胱氨酸+蛋氨酸为第二限制性氨基酸。比较不同发酵时间柘树青果酵素的SRC可知,柘树青果酵素发酵10、30、60、90、120、170、220、270天中SRC分别为-38.15、49.98、54.03、54.82、54.37、54.97、56.06、59.52,随着发酵的延长其SRC也随之升高,说明发酵时间的延长有利于柘树青果酵素营养均衡的提升;由于酪氨酸(Tyr)和半胱氨酸+甲硫氨酸(Cys+Met)的缺乏,影响了酵素整体的营养价值。

表2 不同发酵时期柘树青果酵素的氨基酸评分

Table 2 Amino acid scores of green fruits of *Cudrania Tricuspidata Jiaosu* with different fermentation periods

发酵时间 (d)	指标	Thr	Val	Ile	Leu	Lys	Cys + Met	Tyr + Phe
10	(m/m) (%)	18.34	12.44	12.96	22.32	30.95	0.00	159.69
	RAA	4.58	2.49	3.24	3.19	5.63	0.00	26.62
	RC	0.70	0.38	0.50	0.49	0.86	0.00	4.07
	SRC	-38.15						
30	(m/m) (%)	23.77	27.62	15.79	22.26	20.60	0.57	33.92
	RAA	5.94	5.52	3.95	3.18	3.74	0.16	5.65
	RC	1.48	1.37	0.98	0.79	0.93	0.04	1.41
	SRC	49.98						
60	(m/m) (%)	29.13	34.72	22.39	31.29	31.99	1.15	28.87
	RAA	7.28	6.94	5.60	4.47	5.82	0.33	4.81
	RC	1.45	1.38	1.11	0.89	1.15	0.07	0.96

续表2(Continued Tab. 2)

发酵时间 (d)	指标	Thr	Val	Ile	Leu	Lys	Cys + Met	Tyr + Phe
	SRC	54.03						
90	(m/m) (%)	33.59	41.97	27.03	40.28	38.01	1.08	36.23
	RAA	8.40	8.39	6.76	5.75	6.91	0.31	6.04
	RC	1.38	1.38	1.11	0.95	1.14	0.05	0.99
	SRC	54.82						
120	(m/m) (%)	37.77	47.49	32.44	45.36	43.27	1.44	36.57
	RAA	9.44	9.50	8.11	6.48	7.87	0.41	6.09
	RC	1.38	1.39	1.19	0.95	1.15	0.06	0.89
	SRC	54.37						
170	(m/m) (%)	38.76	49.33	33.53	50.74	43.37	1.57	37.65
	RAA	9.69	9.87	8.38	7.25	7.89	0.45	6.28
	RC	1.36	1.39	1.18	1.02	1.11	0.06	0.88
	SRC	54.97						
220	(m/m) (%)	28.08	38.14	26.64	42.80	31.87	1.03	32.25
	RAA	7.02	7.63	6.66	6.11	5.79	0.29	5.37
	RC	1.26	1.37	1.20	1.10	1.04	0.05	0.97
	SRC	56.06						
270	(m/m) (%)	24.17	32.60	22.84	37.93	26.64	2.05	37.25
	RAA	6.04	6.52	5.71	5.42	4.84	0.59	6.21
	RC	1.20	1.29	1.13	1.07	0.96	0.12	1.23
	SRC	59.52						
FAO/WHO 模式谱		4	5	4	7	5.5	3.5	6

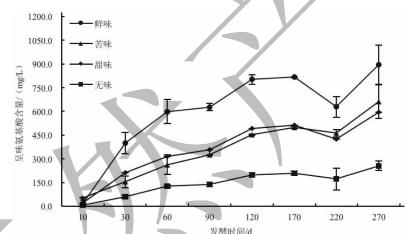


图 5 枳果青果酵素自然发酵过程中呈味氨基酸变化

Fig. 5 Changes in taste-active amino acids of green fruits of *Cudrania Tricuspidata* Jiaosu in natural fermentation process

2.6 枳果青果酵素发酵过程中呈味氨基酸的变化

由图 5 可知, 枳果青果酵素在整个发酵过程中鲜味氨基酸、苦味氨基酸、甜味氨基酸和无味氨基酸的整体含量变化趋势基本相同, 整体呈先上升的趋势, 均在 270 天达到最大值, 分别为 894.5、662.3、594.8、256.3 mg/L, 这一趋势与枳果青果酵素发酵

过程中总氨基酸含量和必需氨基酸变化相一致。通过对该四类呈味氨基酸含量进行比较, 发现枳树青果酵素中鲜味氨基酸 > 甜味氨基酸 > 苦味氨基酸 > 无味氨基酸, 发酵前 10 天四类呈味氨基酸的含量差距很小, 随着发酵的进行, 整个发酵体系中鲜味氨基酸占的比例高达 41.30%。

3 结论与讨论

蛋白质是人体不可或缺的一类营养物质, 其营养价值可作为评价产品价值的标准之一^[15]。测定枳树青果酵素发酵过程中蛋白质的含量变化可以反映发酵过程营养物质变化程度。

本实验中在发酵过程中, 蛋白质含量呈逐渐上升趋势, 一方面可能是枳树青果原料本身的蛋白质在不断溶出, 另一方面在微生物发酵过程中, 菌体能通过代谢产生蛋白质, 且菌体自溶也会增加发酵液中的蛋白质含量^[16], 因而增加了枳树青果酵素的营

营养价值,提高了酵素的质量。

总氨基酸(T)与人体必需氨基酸(E)趋势基本相同,均先上升后下降,最后处于动态稳定状态,前两者在发酵 270 天时最大值分别达到了 2 407.9、766.7 mg/L,这是由于发酵前期,微生物分泌的纤维素酶、果胶酶等和酵素发酵体系中高糖含量所得高渗透压作用使得胞内氨基酸流出以及酵素中的相关蛋白质水解和微生物产生的次级代谢产物有关,而在此之前一些消耗氨基酸的反应如美拉德反应还未开始或者进行的程度较低使得氨基酸开始积累^[16]。随着发酵的进行 E/T 先上升后下降,发酵前期供微生物可利用的糖分较多,较易合成必需氨基酸碳架所需的还原型辅酶,而发酵后期可利用的糖分减少,还原型辅酶很难再生成,且必需氨基酸大部分为疏水性,其碳骨架的氧化程度比非必需氨基酸低,所以必需氨基酸降解之后更加难以合成^[17]。不同发酵时间的氨基酸含量差异较大,氨基酸含量较高的 4 中氨基酸平均值在 109.9~488.0 mg/L 之间,氨基酸含量较低的种氨基酸平均值在未检出到 4.9 mg/L 之间,其中半胱氨酸和酪氨酸为柘树青果酵素第 1 限制性氨基酸,组氨酸为第 2 限制性氨基酸。

γ -氨基丁酸是一种重要的抑制性神经递质^[17],为新型的功能食品因子,具有改善脑功能、降血压,健肝利肾,促进生长激素分泌等功能^[18]。 γ -氨基丁酸在 170 天达到最大值 211.5 mg/L。发酵后期 γ -氨基丁酸又有所下降,可能是 L-谷氨酸在谷氨酰胺酶及磷酸吡哆醛的作用下转化为 GABA, GABA 经过 γ -氨基丁酸- α 酮戊二酸转氨酶作用,生产谷氨酸^[19]。

比值系数分(SRC)描述了食品中各种人体所需氨基酸偏离氨基酸模式谱的离散度,SRC 越大表明食物蛋白质的氨基酸组成与氨基酸模式更一致^[12]。本实验随着发酵的进行柘树青果酵素的氨基酸营养评价越来越均衡,但由于 Tyr 和 Cys + Met 的缺乏,影响了酵素整体的营养价值。

氨基酸的类型与含量是影响风味的因素之一,氨基酸在结构上侧链基团的不同影响了氨基酸的口味感官。D-型氨基酸大多以甜味为主;L-型氨基酸中,当侧基较大并带碱基时,通常苦味为主;当侧基很小时,一般为甜感占优势,当侧基带有芳香基团时,通常具有香味按照氨基酸的味觉强度^[20],可以大致把氨基酸分为甜味氨基酸(Ser、Thr、Gly、Ala)、苦味氨基酸(Leu、Val、Arg、Ile、Met、His、Tyr、Phe)、

鲜味氨基酸(Glu、Asp)、无味氨基酸(Lys、Pro、Cys)^[16]。氨基酸除了本身具有酸、甜、苦、鲜等味道,可以增加产品的滋味,同时还是产品的风味前体物,如与二羰基化合物发生 Strecker 反应,与 Maillard 反应的中间产物发生交互作用,生成一些特殊的香味物质,同时还赋予产品一些典型的色泽^[21,22]。本实验风味评价中,柘树青果酵素鲜味氨基酸>甜味氨基酸>苦味氨基酸>无味氨基酸。

此前少见关于对柘树青果以及柘树青果酵素的氨基酸及营养评价的文献报道,因此本研究为进一步开发柘树果实以及食用植物酵素功能性产品提供理论依据。

参考文献

- Li HR(李贺然), Zou ZM(邹忠梅), Xu LZ(徐丽珍), et al. Progress in medicinal chemistry and pharmacology of *Cudrania tricuspidata* [J]. *Int J Tradit Chin Med*(国际中医中药杂志), 2003, 25:203-207.
- Suh DH, Jung ES, Park HM, et al. Comparison of metabolites variation and antiobesity effects of Fermented versus nonfermented mixtures of *Cudrania tricuspidata*, *Lonicera caerulea*, and soybean according to fermentation *in vitro* and *in vivo* [J]. *PloS One*, 2015, 11:2.
- Choi SR, You DH, Kim JY, et al. Antioxidant Activity of methanol extracts from *Cudrania tricuspidata* Bureau according to harvesting parts and time [J]. *Kr J Med Cro Sci*, 2009, 17:2.
- Cao CT(曹春廷). Studies on antioxidant chemicals of the fruits of *Cudrania Tricuspidata* and research the anti-breast cancer apoptosis pathway of Scandenolone [D]. Yaan: Sichuan Agricultural University(四川农业大学), 2015.
- Kang DH, Kim JW, Youn KS. Antioxidant activities of extracts from Fermented Mulberry (*Cudrania tricuspidata*) Fruit. and inhibitory actions on elastase and tyrosinase [J]. *Kr J Food Pre*, 2011, 18:236-243.
- Mao JW(毛建卫), Wu YF(吴元锋), Fang S(方晟). Progress of microbe ferment research [J]. *Bull Ferment Sci Technol(发酵科技通讯)*, 2010, 39(3):42-44.
- China Biotech Fermentation Industry Association(中国生物发酵产业协会). T/CBFIA 08003-2017. Edible plant source Jiaosu[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.
- Jiang ZL(蒋增良). Study on mechanism, metabolic process and bioactivities of microbial natural-ferments during fermentation [D]. Hangzhou: Zhejiang Sci-Tech University(浙江理工大学), 2012.
- Gao XL(高学玲), He MM(贺曼曼), Zou ML(邹敏亮), et

- al. Analysis of free sugars and amino acids in different kinds of medicinal flos chrysanthemi [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2012, 24: 639-643.
- 10 Xu W(许伟). Analysis of the microbial diversity and function during acetic acid fermentation process of Zhenjiang aromatic vinegar [D]. Wuxi: Jiangnan University(江南大学), 2011.
- 11 General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Standardization Administration of the People's Republic of China(中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会). GB/T 5009. 124-2003, Determination of amino acids in food [S]. Beijing: Standards Press of China, 2015.
- 12 Pellett PL. Nutritional evaluation of protein foods [M]. Japan: The United National University, 1980.
- 13 World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations, and the United Nations University. Energy and protein requirement [R]. Geneva: World Health Organization, 1973.
- 14 Bassoli A, Borgonovo G, Caremoli F, et al. The taste of D-and L-amino acids: *In vitro* binding assays with cloned human bitter (TAS2Rs) and sweet (TAS1R2/TAS1R3) receptors [J]. *Food Chem*, 2014, 150(2): 27-33.
- 15 Song XQ(宋晓青), Zhang TB(张天博), Jia YH(贾云虹), et al. Progress in nutritional evaluation and amino acid com-
- position analysis of proteins in infant formula milk power [J]. *Food Sci(食品科学)*, 2016, 37: 292-298.
- 16 Wu JR(武俊瑞), Gu CD(顾采东), Tian T(田甜), et al. Evaluation of changes in protein and amino acids in naturally fermented soybean pastes with different fermentation periods [J]. *Food Sci(食品科学)*, 2017, 38: 139-144.
- 17 Giachino C. GABA B receptors [J]. *Neurogenesis*, 2014, 1; 1.
- 18 Jiang B(江波). Gamma-aminobutyric acid—a novel functional factor for nutraceuticals [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol(中国食品学报)*, 2008, 8(2): 1-4.
- 19 Christina Hanack, Mirko Moroni, Wanessa C. Lima, et al. GABA blocks pathological but not acute TRPV1 pain signals [J]. *Cell*, 2015, 160: 4.
- 20 Bassoli A, Borgonovo G, Caremoli F, et al. The taste of D-and L-amino acids: *In vitro* binding assays with cloned human bitter (TAS2Rs) and sweet (TAS1R2/TAS1R3) receptors [J]. *Food Chem*, 2014, 150(2): 27-33.
- 21 Bai YJ(白羽嘉), Tao YX(陶永霞), Zhang L(张莉). Effect of ferula assafoetida on amino acids and volatile components of the edible mushroom pleurotus ferulaceae [J]. *Food Sci(食品科学)*, 2013, 34: 198-204.
- 22 Yu WQ(于文清), Peng YF(彭艳芳), Xu YY(许迎迎), et al. Analysis and evaluation of nutritional and flavor components of five wild dried edible fungi [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 27: 271-276.

(上接第 1426 页)

- 7 Huang GJ, Deng JS, Liao JC, et al. Inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 participate in anti-inflammatory activity of imperatorin from Glehnia littoralis [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60: 1673-1681.
- 8 Yu Y(余盈), He W(何蔚). Effects of imperatorin on the learning and memory impairment of $\text{A}\beta_{1-42}$ -induced model of Alzheimer's disease in mice [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2017, 29: 1030-1034.
- 9 Choi SH, Bosetti F. Cyclooxygenase-1 null mice show reduced neuroinflammation in response to β -amyloid [J]. *Ag-ing*, 2009, 1: 234-244.
- 10 Russo I, Caracciolo L, Tweedie D, et al. 3,6'-Dithiothalidomide, a new TNF- α synthesis inhibitor, attenuates the effect of $\text{A}\beta_{1-42}$ intracerebroventricular injection on hippocampal neurogenesis and memory deficit [J]. *J Neurochem*, 2012, 122: 1181-1192.
- 11 Johnson JA, Johnson DA, Kraft AD, et al. The Nrf2-ARE pathway: an indicator and modulation of oxidative stress in neurodegeneration [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, 1147: 61-69.
- 12 Prince M, Li Y, Childers A, et al. Comparison of citrus coumarins on carcinogen-detoxifying enzymes in Nrf2 knockout mice [J]. *Toxicol Lett*, 2009, 185: 180-186.