

美味牛肝菌及其深层发酵液中风味物质的研究*

李平¹, 李娟¹, 汤婕²

1(安徽农业大学茶与食品科技学院教育部、农业部茶叶生物化学与生物技术重点开放实验室, 安徽合肥, 230036)

2(安徽农业大学资源与环境学院, 安徽合肥, 230036)

摘要 研究了美味牛肝菌子实体及其深层发酵液中挥发性风味物质的组分。运用同时蒸馏萃取法(SDE)提取美味牛肝菌的风味物质。通过GC/MS检测获知,美味牛肝菌子实体及其深层发酵液中分别有39种和6种组分。鉴定结果表明,其子实体中的主要挥发性物质是由八碳化合物组成,包括1-辛烯-3-醇(19.52%)和1-辛烯-3-酮(11.98%),深层发酵液中的主要组分是3-羟基-2-丁酮。在美味牛肝菌子实体及其深层发酵产物中添加外源 β -葡萄糖苷酶用于增香,从 β -葡萄糖苷酶作用后的子实体和发酵液中分别分离出48种和25种组分,其中新生成的化合物各有17种(16.63%)和19种(3.78%)种,其余组分的含量有些在原有基础上有所增加。酶解作用后的发酵液中新增的化合物如糠醛,顺茉莉酮,胡椒酮,(Z,E)-法呢醛,(Z,Z)-法呢醛对风味的贡献较大。通过感官评审和GC/MS分析发现, β -葡萄糖苷酶对美味牛肝菌子实体及其深层发酵液中的挥发性化合物有影响并且具有增香作用。

关键词 美味牛肝菌, 深层发酵, 风味组分, β -葡萄糖苷酶

在野生食用菌中,美味牛肝菌因其营养和美味而越来越受到人们的关注,相关研究涉及到美味牛肝菌的组分分析,以及一些组分的功能作用等。据报道,美味牛肝菌中含有维生素D、膳食纤维、几丁质、 β -葡聚糖、酚类、有机酸等组成成分,有些成分具有抑菌杀虫的功效^[1-4]。美味牛肝菌是菌根菌,目前还不能完全人工栽培,野生产量远远不能满足人们的需求。而液态深层发酵获得的菌丝体,已被证明与子实体营养成分相当^[5],但深层发酵后的产物风味与原子实体相比可能欠佳。这就需要通过其它方法进行风味的改进,如在发酵过程中添加酶、优化发酵工艺等。

研究表明, β -糖苷以风味前体物形式广泛存在于自然界生物体中^[6],将外源 β -葡萄糖苷酶用于食品的增香在水果、果汁和果酒中已经得到成功的应用^[7-10]。因此研究 β -葡萄糖苷酶作用食用菌及其发酵液中风味前体物的增香效果很有意义。目前,有关美味牛肝菌风味物质方面的研究报道较少,Thomas使用正己烷萃取法分析了美味牛肝菌干品的风味成分^[11],本研究使用了一种有效的获取风味全组分的方法^[12-15]——同时蒸馏萃取法(SDE)提取美味牛肝菌的风味组分,并以黑曲霉 β -葡萄糖苷酶水解其风味前体物而达到增强食品风味的效果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料及菌株

美味牛肝菌干品购自四川省绵阳市食用菌研究所(中国,四川)。美味牛肝菌菌株购自中国菌种保藏中心(中国,北京)。

1.1.2 主要仪器

岛津2010GC/MS联用仪,同时蒸馏萃取装置。

1.2 方法

1.2.1 深层发酵产物的制备

菌株经PDA斜面活化6d。取活化后的菌种接种于深层发酵培养液(黄豆粉20g/L,麦芽糖30g/L,酵母膏7g/L, KH_2PO_4 2g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g/L, CaCO_3 2g/L, VB_1 0.01mg/L, pH自然)中,装液量为60mL/250mL三角瓶,28℃,140r/min振荡培养7d。

1.2.2 β -葡萄糖苷酶制备

研究中所使用的黑曲霉菌株由本实验室保存。使用前在PDA培养基中30℃活化培养6d。取活化后的黑曲霉菌株在发酵培养基(麸皮3.9g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5g/L, KH_2PO_4 4.9g/L, CaCl_2 0.3g/L, MgSO_4 0.3g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5g/L, ZnCl_2 1.4g/L和油酸钠2g/L)中于30℃,140r/min摇瓶培养而获得 β -葡萄糖苷酶。摇瓶发酵培养6d后,取发酵液于3000r/min离心15min。上清液可加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至35%饱和度,于10000r/min离心15

第一作者:博士,教授。

*国家自然科学基金(20576002)和安徽省自然科学基金(050410303)资助项目

收稿日期:2007-05-09,改回日期:2007-09-11

min 后取上清液,用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 调整到 80%饱和度,再 10 000 r/min 离心 15 min。收集沉淀并将其制成悬液于磷酸缓冲液中(pH4.5, 0.2mol/L)透析过夜。经纯化后的 β -葡萄糖苷酶酶活可达 160 U/mL,酶液于 4℃冰箱保存待用^[16~18]。

1.2.3 挥发性化合物提取

1.2.3.1 美味牛肝菌挥发性成分制备

取粉碎的美味牛肝菌干粉 50 g 与 500 mL 蒸馏水混匀,注入 Likens-Nickerson 同时蒸馏萃取装置中,加入 50 $\mu\text{g/mL}$ 癸酸乙酯为内标,乙醚为提取溶剂。在 40℃下收集挥发物,用无水硫酸钠干燥过夜后用氮气浓缩至 1 mL 可直接进样。

1.2.3.2 美味牛肝菌经 β -糖苷酶水解后的挥发性成分制备

美味牛肝菌干粉 50 g 与 500 mL 蒸馏水混合后加入 1 mL 酶液于密闭容器中,50℃下反应 2h。提取挥发物程序如上。

1.2.3.3 美味牛肝菌深层发酵液挥发性成分制备

将发酵液 500 mL 注入 Likens-Nickerson 同时蒸馏萃取装置中,同以上程序提取挥发物。

1.2.3.4 美味牛肝菌深层发酵液经过 β -糖苷酶水解后的挥发性成分制备

取 500 mL 发酵液,加入 1 mL 酶液于密闭容器中,在 50℃反应 2h。如上法提取挥发物。

1.2.4 感官评估

实验中邀请 12 位评审人,对采用上述方法制备的美味牛肝菌子实体、发酵液及其酶解精油样品进行感官评审,同时对样品进行打分。将 4 个样品分成 2 组,美味牛肝菌子实体及酶解后提取的风味物为一组,美味牛肝菌深层发酵液及酶解后的提取物为另一组。较好者达 2 分,较差者打 1 分,如果认为 2 个样品差别不大,则每个都打 1.5 分^[19]。

1.2.5 气相色谱和质谱(GC-MS)条件

挥发性物质通过 Shimadzu 2010 气相色谱质谱连用仪分析。气相和质谱的操作条件如下:DB-5 (30 m \times 0.32 mm i. d., 膜厚 0.25 μm) 熔融石英柱涂 5% 甲基硅氧烷。升温程序:40℃保持 3 min,然后以 2 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 升到 80℃保持 2 min,5 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 升到 220℃保持 10 min。载气:氮气,速率 1.0 mL/min;检测口温度 250℃;注入量 1 μL (分流比 10:1);离子化电压是 70 eV;离子源温度为 250℃。

2 结果与讨论

2.1 感官评估

12 位评审员对 4 个样品(表 1)进行评估打分,通过定序测试,评审人数和样品数分别是 12 和 4。评审结果如表 2 所示,2 组样品分别与 maxRI 和 minRI 的上限和下限比较,对于美味牛肝菌子实体风味物质评定后获得如下顺序:15 \leq minRI $<$ maxRI \leq 21,这表明,经 β -葡萄糖苷酶酶解处理和原子实体样品在 5%水平上达到显著。美味牛肝菌深层发酵液及其酶解后样品风味物质评定结果:13 \leq minRI $<$ maxRI \leq 23,在 1%水平上达到显著。同时评审员认为,经 β -葡萄糖苷酶水解后的样品闻起来香气更饱满、圆润和柔和,因此 β -葡萄糖苷酶对美味牛肝菌子实体及其深层发酵液均有增香效果。

表 1 评价员 J = 12,样品数为 2 时的临界值

p		显著水平 5%	显著水平 1%
2	上段	15~21	14~22
	下段	15~21	14~22

表 2 美味牛肝菌及其发酵液的定序实验结果

序号	美味牛肝菌		美味牛肝菌发酵产物	
	β -葡萄糖苷酶处理	未处理	β -葡萄糖苷酶处理	未处理
1	2	1	2	1
2	2	1	2	1
3	2	1	2	1
4	1	2	2	1
5	1	2	1	2
6	2	1	2	1
7	1	2	2	1
8	2	1	2	1
9	2	1	2	1
10	2	1	2	1
11	2	1	2	1
12	2	1	2	1
总和	21	15	23	13

2.2 GC-MS 分析

使用同时蒸馏萃取法(SDE)分别提取美味牛肝菌子实体、深层发酵液及经 β -葡萄糖苷酶处理后的样品的挥发性组分,采用 GC-MS 分析其化合物组成。结果如表 3 和表 4 所示,组分排序由样品在 DB-5 柱中洗脱的先后顺序列出。从美味牛肝菌子实体和经酶作用后的样品中分别分离出 39 和 48 个组分(图 1 和图 2),其中相同组分 31 个,在 β -葡萄糖苷酶作用后的样品中有 17 种新化合物生成(16.63%),经鉴定有 6 种组分主要属于吡嗪类或/和脂肪族化合物。

在美味牛肝菌子实体中,主要的风味组分是 1-辛烯-3-醇(19.52%) 和 1-辛烯-3-酮(11.98%), (Z)-

2-辛烯-1-醇(6.68%)和苯乙酮(5.92%)的含量次之。在 β -葡萄糖苷酶水解后的美味牛肝菌子实体中,其主要的组分仍是1-辛烯-3-醇(19.61%)和1-辛烯-3-酮(9.65%),但是酶解后的样品中苯乙酮的含量有很大程度的提高,增加了124.78%。

Thomas报道了美味牛肝菌子实体中的风味物质,其中有6种组分与本研究结果相同,它们分别是己醛,2,5-二甲基吡嗪,2-庚酮,糠醛,1-辛烯-3-醇和3-癸烯-2-酮。而美味牛肝菌中的一种重要风味物质1-辛烯-3-酮在其研究结果中未被检出。分析检验结果的差异可能有2个原因:不同的提取方法和原料产地的差异。Thomas使用的是正己烷萃取法,本实验采用的是SDE法;Thomas实验所使用的样品来自波兰,而本实验中所用的样品来自中国四川。

表3 美味牛肝菌经 β -葡萄糖苷酶处理前后的风味物质组分

序号	组分	RT /min	质量百分含量/%	
			未处理	β -葡萄糖苷酶处理
1	己醛	6.44	3.43	3.28
2	2-乙基-1-丁醇	6.89	0.24	0.70
3	1-乙基-1H-吡咯	6.98	0.15	0.31
4	未知峰	7.23	nd	2.07
5	糠醛	7.92	3.19	2.05
6	苯乙酮	10.55	0.33	0.41
7	2-庚酮	10.87	0.46	0.72
8	庚醛	11.34	3.17	3.17
9	2,5-二甲基吡嗪	12.65	nd	0.28
10	丙酮酸丁酯	13.97	0.66	0.88
11	苯甲醛	14.86	3.41	3.32
12	1-辛烯-3-酮	16.14	11.98	10.65
13	1-辛烯-3-醇	16.23	19.52	19.61
14	2-甲基丙酸-2-丙稀酯	16.22	0.11	nd
15	未知峰	16.63	nd	0.36
16	3-辛酮	16.77	0.13	1.345
17	2-戊基-呋喃	16.88	0.80	1.08
18	2-噻吩甲醛	17.69	0.20	0.14
19	辛醇	17.83	0.47	0.81
20	三甲基吡嗪	18.48	nd	0.11
21	苯乙醛	20.65	4.94	0.29
22	1-丁基-1H-吡咯	21.1	0.32	0.85
23	2-N-丁基-呋喃	21.41	0.31	0.96
24	(E)-2-辛烯醛	21.7	2.43	1.04
25	苯乙酮	22.09	5.92	9.03
26	(Z)-2-辛烯-1-醇	22.46	6.68	2.78
27	2-己基呋喃	23.89	0.32	nd
28	壬醛	25.02	2.46	0.72
29	未知峰	26.66	nd	0.47
30	3-亚甲基-庚烷	28.74	nd	0.21
31	苯乙酸乙酯	29.67	1.41	0.67

续表3

序号	组分	RT /min	质量百分含量/%	
			未处理	β -葡萄糖苷酶处理
32	2-癸酮	30.38	0.46	0.78
33	癸醛	30.93	0.24	nd
34	未知峰	31.53	nd	0.48
35	未知峰	31.65	nd	0.49
36	未知峰	31.8	nd	1.85
37	2,4-二乙基-1-庚醇	32.05	nd	2.16
38	3-癸烯-2-酮	32.44	1.18	1.90
39	4-乙基愈创木酚	33.88	0.38	0.20
40	未知峰	34	nd	1.53
41	1-甲氧基-4-(1-丙烯基)苯	34.10	0.25	nd
42	未知峰	34.17	2.50	5.01
43	Adamantan-2-ol	34.35	2.49	nd
44	2-十一酮	34.39	nd	1.08
45	2-糠基二硫化物	35.22	tr	nd
46	2-丁基-3,5-二乙基-吡咯	35.23	0.19	nd
47	未知峰	35.25	nd	1.43
48	未知峰	35.35	nd	1.61
49	未知峰	35.42	nd	0.77
50	未知峰	35.47	nd	0.61
51	未知峰	35.56	nd	1.12
52	香叶基丙酮	39.26	5.01	4.43
53	cis- α -没药烯	40.59	0.37	0.20
54	对甲酚	40.89	4.62	4.21
58	(E)-橙花叔醇	42.12	2.77	nd
56	雪松醇	43.27	0.47	0.26
总计/%			93.97	98.435

注:RT,保留时间;tr,痕量(<0.05%);nd,未检出。

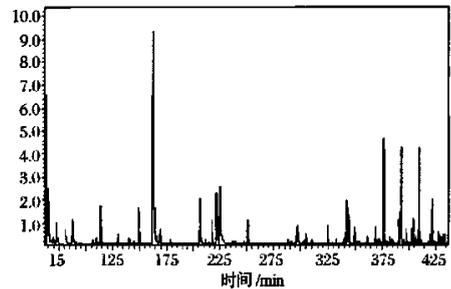


图1 美味牛肝菌子实体未酶解气相色谱图

在美味牛肝菌深层发酵液及酶解后的风味物质中分别分离出6种和25种组分(图3),2个样品中的主要组分均是3-羟基-2-丁酮,分别占总面积的95.15%和90.26%。经酶作用后新增的组分有9种,占总面积的3.78%。其中新增加的风味物质如糠醛、顺茉莉酮、胡椒酮、(Z,E)-法呢醛、(Z,Z)-法呢醛等,虽然它们占总风味物质的比例相对较小,但是由于其阈值较低,对香气的贡献却较大。

美味牛肝菌发酵液中的风味物质组分与子实体的差别较大,一些特征风味物质如1-辛烯-3-醇在发

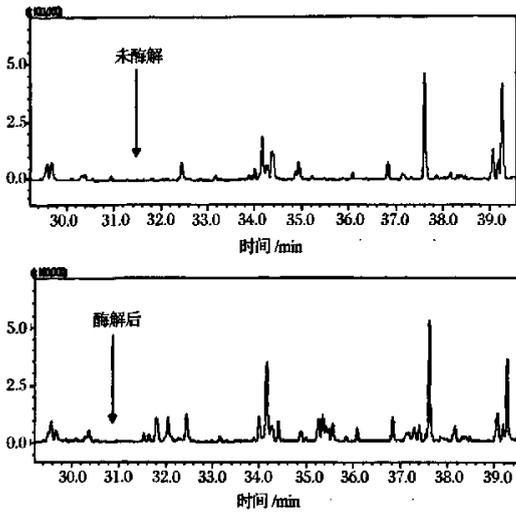


图2 美味牛肝菌子实体酶解前后主要差异部分气相色谱图

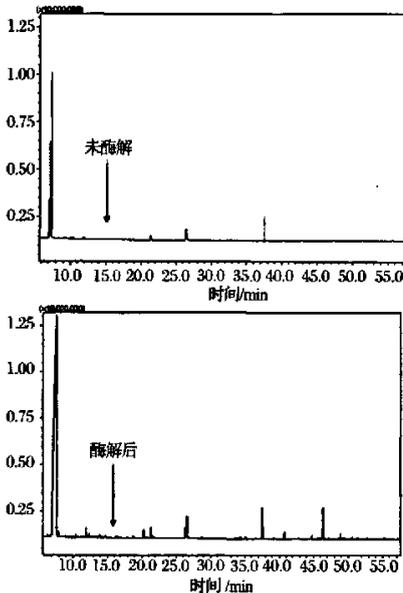


图3 美味牛肝菌发酵液及其经过酶作用后的风味物质气相色谱图

酵液中没有检出。因为1-辛烯-3-醇的前体物质是亚油酸,亚油酸通常是食用菌体内的酶——脂肪氧化酶和过氧化氢裂解酶氧化的产物^[20]。虽然在发酵培养基中额外添加了亚油酸,可能由于美味牛肝菌在发酵过程中难以形成足量的相关酶类,所以无1-辛烯-3-醇生成。与芒果、苹果汁和草莓酒的 β -葡萄糖苷酶水解产物相比^[8],美味牛肝菌酶解后风味物质的增加总量并不多,估计与美味牛肝菌子实体及其深层发酵液中存在的风味前体物糖苷相对较少有关。但是一

些对香气有较大贡献的特征风味物质的含量有所增加,经过感官评审和GC-MS分析均证实 β -葡萄糖苷酶对改良美味牛肝菌的风味有一定效果。

表4 美味牛肝菌发酵液经 β -葡萄糖苷酶处理前后风味物质组分

序号	组分	RT /min	相对百分含量/%	
			未处理	β -葡萄糖苷酶处理
1	己醛	6.38	0.25	0.10
2	丁醇	6.64	nd	0.08
3	二乙二醇甲酯	6.95	nd	0.15
4	3-羟基-2-丁酮	7.64	95.15	90.26
5	糠醛	7.88	nd	0.74
6	乙苯	8.88	0.06	0.09
7	二甲苯	9.27	nd	0.08
8	苯乙烯	10.48	0.25	0.06
9	二乙醇缩乙醛	12.65	nd	0.34
10	苯甲醛	13.97	nd	0.23
11	2-乙酰基噻唑	18.70	nd	0.14
12	苯乙醛	20.35	nd	0.81
13	胡椒酮	34.44	nd	0.04
14	2,4-癸烯醛	35.10	nd	0.08
15	顺茉莉酮	37.75	nd	0.28
16	(E)-香叶基丙酮	39.17	nd	0.04
17	兰桉醇	44.71	nd	0.16
18	(Z,E)-法呢醛	45.64	nd	0.04
19	(Z,Z)-法呢醛	46.24	nd	0.09
20	十八碳烷	47.28	0.05	0.05
21	异丁基邻苯二甲酸酯	48.90	nd	0.29
22	未知峰	49.45	nd	0.05
23	棕榈烯酸	50.60	nd	0.08
24	十八醇	52.62	0.05	0.46
25	未知峰	55.22	nd	0.06
总和/%			95.81	94.80

注:RT,保留时间;tr,痕量(<0.05%);nd,未检出。

3 结论

通过实验得出,美味牛肝菌子实体及其深层发酵液中分别有39种和6种组分。美味牛肝菌子实体的主要挥发性组分是由八碳化合物组成,包括1-辛烯-3-醇(19.52%)和1-辛烯-3-酮(11.98%),深层发酵液中的主要组分是3-羟基-2-丁酮。在美味牛肝菌子实体及其深层发酵液中添加外源 β -葡萄糖苷酶用于增香,从 β -葡萄糖苷酶作用后的子实体和发酵液中分别分离出48种和25种组分,各有17种(16.63%)和19种(3.78%)种新化合物生成,其它有些组分在原有基础上有不同程度增加。通过感官评审和GC/MS分析证实, β -葡萄糖苷酶能够有效改良美味牛肝菌子实体及其深层发酵液中的挥发性物质组分,并具有强化风味的效果。

参考文献

- 1 Patricia V, Graciliana L, Miguel V, et al. Quantitation of nine organic acids in wild mushrooms[J]. Journal of Agri-

- cultural and Food Chemistry, 2005, 53:3 626~3 630
- 2 Manzi P, Marconi S, Aguzzi A, et al. Commercial mushrooms: nutritional quality and effect of cooking[J]. Food Chemistry, 2004, 84:201 ~206
 - 3 Mattila P, Piironen V I, Uusi-Rauva E J, et al. Vitamin D contents in edible mushrooms[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 42:2 449 ~2 453
 - 4 Mier N, Canete S, Klaebe A, et al. Insecticidal properties of mushroom and toadstool carpophores[J]. Phytochemistry, 1996, 41:1 293 ~1 299
 - 5 邓百万, 陈文强. 美味牛肝菌营养菌丝体与野生子实体品质分析[J]. 中国食用菌, 2004, 23(5):44 ~46
 - 6 Gunata Y Z. Recherches sur la fraction liée de nature glycosidique de l'arôme du raisin: importance des terpényglycosides, action des glycosidases (Research on bound glycosidic of grape aroma; importance of terpenylglycosides, action of glycosidases)[D]. The University of Montpellier, 1984
 - 7 Belancic A, Gunata Z, Vallier M J, et al. β -Glucosidase from the grape native yeast *Debaryomyces Vanrijaie*: purification, characterization, and its effect on monoterpene content of a Muscat grape juice[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51:1 453 ~1 459
 - 8 Yannick Gueguen P C, Pien S, Arnaud A, et al. Enhancement of aromatic quality of Muscat wine by the use of immobilized β -glucosidase[J]. Journal of Biotechnology, 1997, 55:151 ~156
 - 9 Yannick G P C, Stephane P, Alain A, et al. A very efficient β -glucosidase catalyst for the hydrolysis of flavor precursors of wine and fruit juices[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996, 44:2 336 ~2 340
 - 10 Shoseyov O, Bravdo B A, Siegel D, et al. Immobilized endo- β -glucosidase enriches flavor of wine and passion fruit juice[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1990, 39:1 387~1 390
 - 11 Thomas A F. An analysis of the flavor of the dried mushroom, *Boletus edulis* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1973, 21:955 ~958
 - 12 Wojtasiak R Z. Optical purity of (R)-(-)-1-octen-3-ol in the aroma of various species of edible mushrooms [J]. Food Chemistry, 2004, 86:113 ~118
 - 13 黄菁, 黄琼, 罗汝南, 等. 西番莲香味及主要糖酸物质含量的季节性变化规律研究[J]. 华南农业大学学报(自然科学版), 2003, 24(4):84 ~87
 - 14 龚正礼, 童华荣. 珠兰花香气化合物的组分研究[J]. 茶叶科学, 2006, 26(3):215 ~218
 - 15 梁新红, 赵功玲. 猕猴桃干酒香气成分的 GC/MS 分析[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(19):5 022 ~5 023
 - 16 李平, 宛晓春, 陶文沂, 等. 复合诱变黑曲霉选育 β -葡萄糖苷酶高产菌株[J]. 菌物系统, 2000, 19(1):117 ~121
 - 17 李平, 宛晓春, 丁霄霖, 等. 黑曲霉 β -葡萄糖苷酶活力测定和酶学性质[J]. 安徽农业大学学报, 1998, 3(25):304 ~307
 - 18 李平, 宛晓春, 陶文沂, 等. 丝素蛋白膜固定 β -葡萄糖苷酶及其改良食品风味的研究[J]. 菌物学报, 2004, 23(1):73 ~78
 - 19 朱红, 黄一贞, 张弘. 食品感官分析入门[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1990
 - 20 Christian C, Catherine NS, Michel M. Fatty acid content and some flavor compound release in two strains of *Agaricus bisporus*, according to three stages of development[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45:64 ~67

Study on the Flavor Components of Fruiting Bodies and Fermentation Products of *Boletus edulis*

Li Ping¹, Li Juan¹, Tang Jie²

¹(Key Laboratory of Tea Biochemistry & Biotechnology of Ministry of Agriculture & Ministry of Education, Collage of Tea & Food, Hefei 230036, China),

²(School of Resources & Environment, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

ABSTRACT The components of volatile flavor from dry fruiting bodies and fermentation products of *Boletus edulis* were studied in this paper. The volatile compounds of *Boletus edulis* were isolated using simultaneous distillation and extraction (SDE). 39 compounds and 6 compounds were identified by GC/MS from fruiting bodies and fermentation products of *Boletus edulis*, respectively. The results indicated that the volatile compounds in dry *Boletus edulis* were mainly eight carbon components containing 1-octen-3-ol (19.52%) and 1-octen-3-one (11.98%), while the major volatile compound from the fermentation products was 3-hydroxy-2-butanone. The exogenous β -glucosidase was added to the fruiting bodies and fermentation products of *Boletus edulis* to improve volatile flavor components. The results showed that after the materials were hydrolyzed by β -glucosidase, 48 and 25 volatile components were identified from the fruiting bodies and fermentation products, respectively. Meanwhile, 17 (16.63%) and 19(3.78%) components were identified as new compounds, respectively. The contents of other components also improved to some extent. The new compounds generated through the enzyme hydrolyzing such as furfural, cis-Jasmone, piperitone (Z,E)- farnesal, (Z,Z)- farnesal, contributed significantly to the flavor. Based on the sensory evaluation and the GC/MS analysis, it is concluded that the exogenous β -glucosidase can affect the volatile compounds of fruiting bodies and fermentation products of *Boletus edulis* and can also enhance the flavor.

Key words *Boletus edulis*, submerged fermentation, flavor components, β -glucosidase