

苦荞蛋白水解物对腐乳理化品质及生物胺形成的影响

黄雁冰¹, 孟凡冰¹, 李云成^{1*}, 周 闯¹, 尹礼国², 刘达玉¹

(1. 成都大学食品与生物工程学院, 四川成都 610106; 2. 宜宾学院固态发酵资源利用四川省重点实验室, 四川宜宾 644000)

摘要 [目的]提高腐乳的品质及安全性。[方法]通过向腐乳发酵后熟过程中添加 3% 苦荞蛋白水解物, 探究其对腐乳理化品质和生物胺的影响。[结果]3% 苦荞蛋白水解物的添加对腐乳水分含量不会产生显著影响, 但当发酵进行到第 60 天, 其总酸含量即可达到 24.7 g/kg, 接近相关行业标准的要求。0.3% 苦荞蛋白水解物的添加显著提高了腐乳氨基酸态氮的含量, 当发酵到 90 d 时, 其氨基酸态氮含量达到 13.7 g/kg, 远高于行业标准的规定, 有效缩短了发酵周期。与对照组相比, 3% 苦荞蛋白水解物的添加显著降低了腐乳生物胺的生成, 其总生物胺含量较对照组降低了 22.92%。[结论]苦荞蛋白水解物的添加, 可以有效提高腐乳的理化品质和安全性。

关键词 腐乳; 苦荞蛋白水解物; 理化品质; 生物胺

中图分类号 TS 264.2⁺5 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2023)06-0163-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2023.06.039

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Effect of Tartary Buckwheat Protein Hydrolysates on Physicochemical Properties and Biogenic Amines of Fermented Bean Curd
HUANG Yan-bing, MENG Fan-bing, LI Yun-cheng et al (College of Food and Biological Engineering, Chengdu University, Chengdu, Sichuan 610106)

Abstract [Objective] To improve the quality and safety of fermented bean curd. [Method] The effects of tartary buckwheat protein hydrolysates (BPH) on the physicochemical properties and biogenic amines of fermented bean curd were studied by adding 3% BPH to the post ripening process of fermented bean curd. [Result] The results showed that the addition of 3% BPH had no significant effects on the water content of fermented bean curd, but the total acid content could reach 24.7 g/kg when fermented to 60 d, which was closed to the requirements of relevant industry standards. At the same time, the addition of BPH significantly increased the content of amino acid nitrogen, and the content of amino acid nitrogen reached 13.7 g/kg after 90 d fermentation, which was much higher than that of industry standard, and the fermentation cycle was effective shorten. Compared with the control group, the BPH addition of group reduced the production of biogenic amine in fermented bean curd, and the total amine content decreased by 22.92% compared with the control group. [Conclusion] The above results indicated that the addition of BPH could effectively improve the physicochemical properties and safety of fermented bean curd.

Key words Fermented bean curd; Tartary buckwheat protein hydrolysates; Physicochemical properties; Biogenic amines

腐乳是我国传统的发酵豆制品, 至今已有 1 000 多年历史, 为我国特有的发酵制品之一。腐乳是以大豆为主要原料, 经过加工磨浆、制坯、培菌、发酵而制成的调味、佐餐食品^[1-2]。豆腐发酵过程中霉菌产生蛋白酶、淀粉酶等酶系, 将蛋白、淀粉等生物大分子分解成小分子化合物, 促使豆腐坯中的淀粉转化成乙醇和有机酸, 还有辅料中的酒及香料也参与作用, 共同生成了带有香味的酯类及其他一些风味成分, 从而构成腐乳所特有的风味, 造就了腐乳具有鲜美的滋味、细腻的质地, 且因为发酵过程中分解了豆类中的植酸, 使得大豆中原本吸收率很低的铁、锌等矿物质也更容易被人体吸收, 易于消化^[3-4]。此外, 经发酵的腐乳还富含生物、生理活性物质^[5], 如内源性黄酮、皂苷以及发酵代谢产生的多肽等, 赋予其一定的功能特性。随着人们生活水平的提高和国民经济的发展, 人们对腐乳的质量要求越来越高, 腐乳也正在向低盐化、营养化、方便化、系列化等精加工方面发展。

在腐乳的自然发酵过程中, 霉菌(特别是毛霉菌)、细菌(特别是乳酸菌)对腐乳品质起着至关重要的作用。传统的腐乳制作方法是先将豆腐培菌后加 10% 以上的食盐, 及五香料、辣椒粉、花椒粉等调味料进行腌制后熟^[6]。高浓度的食

盐以及香辛料对后熟微生物代谢具有一定的抑制作用, 因此传统腐乳发酵时间较长。另外, 这种抑制作用还会导致腐乳发酵优势微生物生长缓慢, 污染菌滋生, 带来食品安全风险。因此, 如何快速促进腐乳发酵后熟优势微生物的生长, 以提高产品品质及安全性, 是腐乳加工中需重点关注的问题。

利用外源添加营养基质或生物活性成分可大力提高微生物环境耐受性^[7]。其中, 植物蛋白水解物已被证明是改善微生物生长、发酵能力及环境耐受性的有效成分。植物蛋白水解物主要提供丰富的氮源如游离氨基酸, 还可以提供一些具有促发酵功能的生物活性肽, 从而促进酿造微生物的生长和代谢^[8]。鉴于此, 笔者探究了苦荞蛋白水解物的添加对腐乳发酵品质的影响, 旨在为改善腐乳酿造工艺提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 豆腐、食盐、花椒、辣椒等调味料购自成都市十陵镇好乐购超市。乙腈(HPLC 级)购自美国 ThermoFisher 公司, 丹磺酰氯(HPLC, ≥98%)购自上海源叶生物科技有限公司。其他试剂均购自成都市科龙化工试剂厂。

1.2 仪器与设备 1260 高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; BDS C18 液相色谱柱(5 mm, 250 mm×4.6 mm), 美国 ThermoFisher 公司; GFL-125 电热鼓风干燥箱, 天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司; MJ-250-II 型霉菌培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司。

1.3 苦荞蛋白水解物的制备

1.3.1 苦荞蛋白的提取。参照已建立的方法制备苦荞蛋白

基金项目 四川省重点研发项目(2020YFG0379); 固态发酵资源利用四川省重点实验室开放基金项目(2020GJ001)。

作者简介 黄雁冰(1998—), 女, 四川雅安人, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全。* 通信作者, 副教授, 从事发酵调味品加工研究。

收稿日期 2022-05-11; **修回日期** 2022-07-05

水解液^[7],使用正己烷(1:5, w/v)对经过 100 目筛过滤的苦荞面粉进行脱脂,然后悬浮在蒸馏水中(1:12, w/v)。使用 1 mol/L NaOH 将悬浮液调节至 pH 11.0,然后在 45 ℃ 下超声提取 1 h。将提取混合物在 6 000 r/min 下离心 15 min。使用 0.1 mol/L HCl 将上清液调节至 pH 4.5,并在 6 000 r/min 下离心 15 min,以等电沉淀蛋白质^[3]。

1.3.2 苦荞蛋白的酶解。将苦荞蛋白粉溶解在蒸馏水中(1:10),然后将 pH 调节至 8.0。蛋白质溶液首先在 80 ℃ 下预处理 10 min。然后添加 1%胰酶,在 50 ℃ 下酶解 24 h。所得浆液在 8 500 r/min 和 4 ℃ 下离心 15 min;将上清液真空冷冻干燥以获得苦荞蛋白水解物(BPH)^[7]。

1.3.3 腐乳的制备。市场上购买同一批制作的含水量合适的新鲜豆腐坯,用无菌水清洗干净,然后沥干水分,再均匀切成小块,最后均匀喷洒 10^5 CFU/mL 霉菌孢子悬浮液到处理好的豆腐上。取不锈钢托盘清洗并消毒,铺上经灭菌的双层纱布。取出豆腐块均匀摆放在托盘上,在 28 ℃ 下培养 3 d,制得毛坯。将毛坯浸酒后,在表面裹上辅料以及 0.3%苦荞蛋白水解物,然后装入土陶坛中,在常温下发酵 90 d 后即得腐乳成品。

1.4 测定项目与方法

1.4.1 理化指标的测定。参照 SB/T 10170—2007《腐乳》^[9]中的理化指标规定,主要考察腐乳的水分、总酸、氨基酸态氮、水溶性蛋白质指标。其中,水分含量采用直接烘干恒重法测定;总酸含量采用氢氧化钠标准溶液滴定法,腐乳中含有多种有机酸,用氢氧化钠标准溶液滴定,以酸度计测定终点,结果以乳酸表示;氨基酸态氮含量采用甲醛滴定法测定,利用氨基酸的两性作用,加入甲醛以固定氨基的碱性,使羧基显示出酸性,用氢氧化钠标准溶液滴定后定量,以酸度计测定终点。

1.4.2 生物胺的测定。利用高效液相色谱法(HPLC)检测腐乳中常见的 8 种生物胺,生物胺提取方法参照李大伟等^[10]的方法并进行修改。准确称取 2 g 腐乳冻干粉,然后加入 20 mL 0.1 mol/L HCl,用 10 000 r/min 均质分散器均质 2 min(过程中每均质 30 s 停止 5 s,再进行均质),然后 4 ℃ 6 000 r/min 离心 20 min,取上清液 1 mL,依次加入 100 μ L 1 mol/L NaOH, 1 mL 饱和 NaHCO_3 , 1 mL 10 mg/mL 丹磺酰氯溶液,涡旋混匀 1 min 后置于 60 ℃ 水浴锅中水浴 20 min,然后加入 100 μ L 氨水,避光反应 30 min 后,用乙腈定容至 5 mL,并用 0.22 μ m 有机滤膜过滤,然后进行 HPLC 测定。

生物胺的 HPLC 测定方法参考 GB 5009.208—2016《食品中生物胺的测定》^[11],紫外检测波长 254 nm,进样量 20 μ L,柱温 35 ℃,流动相 A 为 90%乙腈/10%含 0.1%乙酸的 0.01 mol/L 乙酸铵溶液,流动相 B 为 10%乙腈/90%含 0.1%乙酸的 0.01 mol/L 乙酸铵溶液,流速 0.8 mL/min。梯度洗脱程序:0~22.00 min, A:B=60:40;22.00~25.00 min, A:B=85:15;25.00~32.01 min, A:B=100:0;32.01~37.00 min, A:B=60:40。

2 结果与讨论

2.1 苦荞蛋白水解物添加对腐乳水分含量的影响

可以看出,由于腐乳发酵是在密闭坛中进行,因此随着发酵的进行,腐乳中水分含量下降,但是降低幅度并不显著。水分一方面是微生物生长的必备条件,同时也是腐乳口感的重要保证。如果水分含量过低,就会导致腐乳后感过硬。而腐乳水分含量过高,则不易成形且易被其他微生物污染。因此从发酵结果来看,0.3%苦荞蛋白水解物的添加不会影响腐乳水分含量的变化。

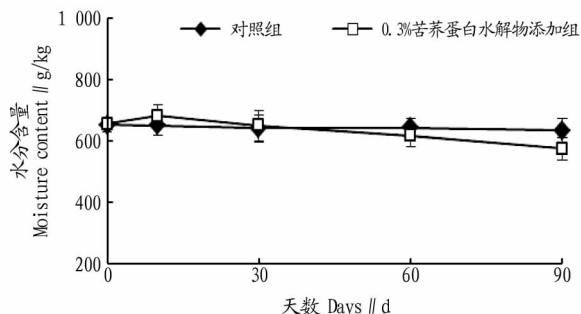


图1 苦荞蛋白水解物添加对腐乳水分含量的影响

Fig.1 Effect of tartary buckwheat protein hydrolysate addition on the moisture content of fermented bean curd

2.2 苦荞蛋白水解物添加对腐乳总酸的影响 腐乳中的总酸主要来自前期霉菌分泌的蛋白酶、脂肪酶等酶类,作用于腐乳中的蛋白质、脂肪产生氨基酸、有机酸等,同时在腐乳发酵过程中微生物代谢也会产生有机酸等物质,因此发酵后总酸含量会升高^[12]。由图 2 可以看出,随着发酵的进行,腐乳总酸整体呈升高趋势,并且苦荞蛋白水解物的添加有加速总酸产生的作用,特别当发酵进行到第 30 天时,苦荞蛋白水解物添加组的总酸达到对照组的 1.11 倍。当发酵到第 60 天时,苦荞蛋白水解物添加组和对照组总酸差距最大达到 1.15 倍。总酸可以起到调节腐乳口味,使之更加柔和的作用,对腐乳风味至关重要,但是如果总酸含量过高,会影响腐乳的保存,随之出现酸腐味,因此根据行业标准 SB/T 10170—2007 规定,腐乳产品中的总酸不超过 25.0 g/kg。根据结果可知,苦荞蛋白水解物添加组发酵至 90 d 时,总酸含量达到 25.8 g/kg,超过了行业标准限度,这可能是由于水解物中具有丰富的氨基酸和促发酵肽^[7],可以促进微生物的生长和代谢,加速了腐乳的成熟。故而根据总酸含量的要求,在添加苦荞蛋白水解物发酵时,其发酵时间应控制在 90 d 以下,避免总酸含量超标。

2.3 苦荞蛋白水解物添加对腐乳氨基酸态氮的影响 腐乳鲜美的滋味是在后期发酵过程中,由毛霉或根霉等分泌的蛋白酶将豆腐中的蛋白质水解为多种氨基酸所形成的。因此,腐乳中的氨基酸态氮含量是腐乳质量综合评定的重要评定指标,同时氨基酸态氮含量也是判断腐乳发酵成熟的关键指标,其含量的高低可以代表原料中蛋白质被酶分解的程度^[12]。氨基酸态氮越高,腐乳的鲜味越好^[12-13]。从图 3 可以看出,随着发酵的进行,对照组中氨基酸态氮逐渐升高,当发酵进行到 60 d 后,氨基酸态氮趋于平缓。而 0.3%苦荞蛋白水解物添加组中的氨基酸态氮显著高于对照组,当发酵到 90 d 时,其氨基酸态氮含量为 13.7 g/kg,远远高于行业标准

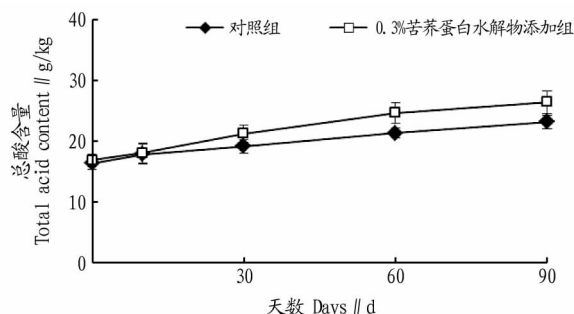


图2 苦荞蛋白水解物添加对腐乳总酸含量的影响

Fig.2 Effect of tartary buckwheat protein hydrolysate addition on total acid content of fermented bean curd

SB/T 10170—2007 中对氨基酸态氮的规定。

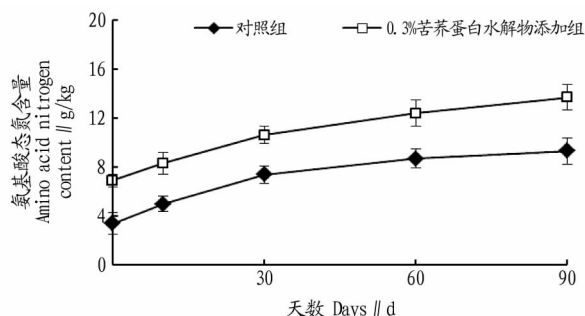


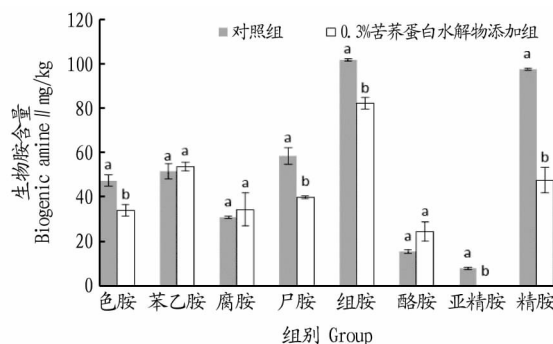
图3 苦荞蛋白水解物添加对腐乳氨基酸态氮含量的影响

Fig.3 Effect of tartary buckwheat protein hydrolysate addition on amino acid nitrogen content of fermented bean curd

2.4 苦荞蛋白水解物添加对腐乳生物胺含量的影响 生物胺是一类有机含氮低分子化合物,主要由氨基酸的脱羧或醛酮的转化产生^[6,14],是传统发酵食品(如腐乳、酱油、豆酱等)中常见的一种物质。过量摄入生物胺对人体健康具有一定的危害作用^[15]。因此,在发酵食品生产过程中,如何有效控制生物胺生成是研究者们关注的重点之一。由图4可以看出,当发酵进行到第90天时,8种常见的生物胺均在对照组样品中检出,其中含量最高的是组胺和精胺,组胺含量达到101.70 mg/kg,精胺达到97.60 mg/kg,总生物胺含量达到411.89 mg/kg。对于0.3%苦荞蛋白水解物添加组样品,除亚精胺未检出外,其他7种生物胺均被检出。然而,0.3%苦荞蛋白水解物添加组中的色胺、尸胺、组胺、精胺含量显著低于对照组;对照组中的苯乙胺、腐胺、酪胺含量均低于0.3%苦荞蛋白水解物添加组,但并不显著。0.3%苦荞蛋白水解物添加组的总生物胺含量为317.50 mg/kg,较对照组含量降低了22.92%。以上结果表明,0.3%苦荞蛋白水解物的添加,可以有效阻止腐乳中生物胺的生成。这可能是由于苦荞蛋白水解物促进了微生物代谢,一方面使微生物产生更少的生物胺,另一方面,据报道,某些微生物(如酵母、乳酸菌等)可以降解生物胺^[16],这也可能是添加苦荞蛋白水解物促进微生物代谢而加速这些微生物降解生物胺。

3 结论

通过研究添加苦荞蛋白水解物对腐乳发酵的影响,结果表明,添加0.3%苦荞蛋白水解物可有效促进腐乳在不到90 d



注:不同小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$)。

Note: Different lowercase letter indicate significant difference between treatments ($P < 0.05$).

图4 苦荞蛋白水解物添加对腐乳生物胺生成的影响

Fig.4 Effect of tartary buckwheat protein hydrolysate addition on the production of biogenic amine in fermented bean curd

的发酵时间使氨基酸态氮超过行业标准的要求,缩短了发酵时间,且通过分析腐乳水分含量及生物胺含量,发现添加苦荞蛋白水解物对腐乳的水分含量没有显著影响,并显著降低了生物胺的生成,提高了产品的品质 and 安全性。因此,在腐乳发酵后熟过程中添加3%苦荞蛋白水解物,既能加快腐乳发酵时间,又能提高腐乳产品质量安全。

参考文献

- [1] HAN B Z, ROMBOUTS F M, NOUT M J R. Sufu-A Chinese fermented soybean food[J]. International journal of food microbiology, 2001, 65(1/2): 1-10.
- [2] WAN H F, LIU T, SU C W, et al. Evaluation of bacterial and fungal communities during the fermentation of Baixi sufu, a traditional spicy fermented bean curd[J]. Journal of the science of food and agriculture, 2020, 100(4): 1448-1457.
- [3] 张蒙冉, 李淑英, 高雅鑫, 等. 传统发酵豆制品研究进展[J]. 食品科技, 2021, 46(1): 98-104.
- [4] 张岭, 刘景春. 浅谈腐乳的营养价值[J]. 中国调味品, 2002(5): 9-10.
- [5] 穆德伦, 乌日娜, 崔亮, 等. 大豆品种对毛霉菌发酵腐乳营养品质的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(23): 159-165.
- [6] 马艳利, 梁静静, 李大伟, 等. 储藏条件对开盖红方腐乳生物胺和理化性质的影响[J]. 中国调味品, 2020, 45(7): 59-62, 75.
- [7] LI Y C, DU W, MENG F B, et al. Tartary buckwheat protein hydrolysates enhance the salt tolerance of the soy sauce fermentation yeast *Zygosaccharomyces rouxii*[J]. Food chemistry, 2021, 342: 1-9.
- [8] YANG H R, ZONG X Y, XU Y C, et al. Improvement of multiple-stress tolerance and ethanol production in yeast during very-high-gravity fermentation by supplementation of wheat-gluten hydrolysates and their ultrafiltration fractions[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2018, 66(39): 10233-10241.
- [9] 中华人民共和国商务部. 腐乳: SB/T 10170—2007[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007: 1-3.
- [10] 李大伟, 李丹丹, 梁静静, 等. 高效液相色谱法测定市售腐乳中生物胺的含量[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(16): 120-124, 129.
- [11] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品中生物胺的测定: GB/T 5009.208—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 1-5.
- [12] 魏冠棉, 张军伟, 周鹏. 油腐乳发酵过程中的品质分析[J]. 食品科学, 2019, 40(14): 138-143.
- [13] 李娟娟, 玫瑰考克氏菌(*Kocuria rosea*) KDF3及其胞外蛋白酶KRP3在腐乳中的应用研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2014.
- [14] 王新南. 发酵豆制品中生物胺含量研究进展[J]. 中国酿造, 2019, 44(9): 188-190.
- [15] 杨熙, 颜婷婷, 殷丽君, 等. 腐乳中生物胺的产生及其控制研究进展[J]. 中国酿造, 2021, 40(10): 1-6.
- [16] 梁静静, 李大伟, 史瑞琴, 等. 腐乳中产生生物胺菌株的筛选鉴定及产生生物胺能力评价[J]. 河北农业大学学报, 2019, 42(3): 88-93.