

豆粕热处理对酱曲中蛋白酶活性和酱油中氨基态氮含量的影响

陈 杰,徐婧婷,郭顺堂

(中国农业大学 食品科学与营养工程学院,北京 100083)

摘 要:原料质量直接影响酱油的品质。以高温干热处理低温脱脂豆粕为原料,低盐固态法酿造酱油,分析热处理过程对曲料中性蛋白酶活力和酱油中氨基态氮含量的影响。低温脱脂豆粕经 150 ℃热风循环处理 30 min 后酿造酱油,其中性蛋白酶活力和氨基态氮含量显著增加,分别为 1478 U · g⁻¹干基和 1.235 g · 100 mL⁻¹,是对照的 1.57 倍和 1.72 倍。此外,20 ~ 40 目的酱油粕粒度较适宜,能获得较高的蛋白酶活力,提高酱油中氨基态氮含量。说明适度的粒度和物料的均匀受热处理,可改善酿造酱油的质量。

关键词:热处理;酱油;中性蛋白酶活力

中图分类号:TS214 文献标识码:A 文章编号:1000-9841(2009)05-0889-05

Effect of Thermal Treatment of Defatted Soy Flakes on the Neutral Protease Activity in Koji and Contents of Amino Nitrogen in Fermented Soy Sauce

CHEN Jie, XU Jing-ting, GUO Shun-tang

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: Defatted soy flakes have critical influence on the quality of soy sauce. To study the effect of dry-heating substrates on the neutral protease activity in Koji and contents of amino nitrogen in the soy sauce, we investigated the thermal treatments of defatted soy flakes appropriate to solid – state and low-salt fermented soy sauce. The results demonstrated that thermal-treatment process was effective to increase the contents of neutral protease (1478 U · g⁻¹ dry weight) in Koji and free amino acid (1.235 g · 100 mL⁻¹) in the soy sauce, using 150 degree centigrade thermo-wave treatment on the defatted soy flakes for 30 minutes. Furthermore, the grain size of defatted soy flakes from 20 to 40 mesh was more suitable than other sizes of substrates. All the results definitely prove that proper thermal treatment on the defatted soy flakes significantly improves the quality of soy sauce.

Key words: Thermal-treatment; Soy sauce; Neutral protease activity

酱油是中国的传统调味品,它是以脱脂豆粕和小麦麸皮为主要原料,经蒸料处理和米曲霉发酵后,用盐水淋油而得^[1-2]。脱脂豆粕根据榨油后大豆脱溶工艺处理温度的差异分为低温豆粕和高温豆粕。低温豆粕经历了 60 ~ 70℃脱溶过程,蛋白质变性程度低,具有很高的蛋白质分散指数(PDI)和氮溶解指数(NSI);与此相反,高温豆粕热处理温度高,经历 100 ~ 120℃ 30 min 的变性过程^[3],蛋白变性过度,但价格便宜,是目前酱油酿造中最常用的原料。

原料质量直接影响酿造酱油的品质。相关研究发现^[4-8],豆粕经过烘烤、高温蒸煮处理、膨化处理后,对改善酱油的 pH 值、总氮、氨基酸、总糖以及风味等酿造性质有显著的效果。但是,目前酱油生产中采用

的高温豆粕除有杂质、蛋白含量存在差异等问题外,还由于豆粕的热处理温度存在差异或不均匀,导致酱油专用豆粕原料蛋白利用率低,酱油产品烘烤味过重等问题,一定程度上影响了酱油行业质量的提高。

采用低盐固态法酿造酱油,结合制曲过程中曲料的外观,以中性蛋白酶活力和酱油氨基态氮含量为指标,研究高温预处理过程对酿造酱油蛋白利用情况的影响,其目的是为酱油专用豆粕的生产提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

材料:普通酱油粕(高温变性脱脂豆粕)(水分

收稿日期:2009-04-09

作者简介:陈杰(1985-),女,硕士,研究方向为酱油的原料和风味。E-mail:jennychen67@yahoo.com.cn。

通讯作者:郭顺堂,教授。E-mail:shuntang@cau.edu.cn。

11.8 % ,蛋白 49.6 % ,脂肪 0.67 % ,纤维 2.27 % ,灰分 5.7 %) ,低温脱脂豆粕 (水分 8.4 % ,蛋白 55.2 % ,脂肪 0.8 % ,纤维 2.4 % ,灰分 6.0 %) ,小麦麸皮 ,冬小麦 ,酱油曲精 (米曲霉 3.042 ,孢子数 $> 5 \times 10^8$ cfu \cdot g⁻¹干基) ,福林酚试剂 ,其它试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 低盐固态法酿造酱油工艺 工艺流程:原料 (豆粕:麸皮:小麦 =5.5:3.5:1)→润水→蒸料→冷却→制曲→发酵→成熟酱醅→高温榨油→成品

具体过程:在 1 000 mL 广口盒中,按 1:1.1 比例在 200 g 混合原料中添加蒸馏水,润水 1 h;121℃ 蒸料灭菌 30 min,冷却至室温后接入物料质量 3%~5%的米曲 3.042,33~35℃ 培养 28 h 以上,至曲料孢子颜色大部分由白变为黄绿色,并散发浓郁的酒曲味为止,制曲时适当翻曲以防止曲料温度过高^[9-10]。制曲结束,在室温下按原料总量 70 % ~ 80 % 添加 13°Bé 盐水,搅拌均匀后,45℃ 密封发酵 28 d,即得固体熟酱醅。再以 1.1 倍原物料质量加入 18°Bé 盐水,保温 6 h 后 4 000 r \cdot min⁻¹ 离心 20 min,除去酱渣即得酱油。

1.2.2 处理方式 以普通酱油粕为对照,将 200 g 低温豆粕分别在烘箱和烤箱中 150℃ 处理 30 min,以模拟循环热风加热和静态加热过程。按 1.2.1 过程酿造酱油,观察曲料的生长情况,测定曲料中中性蛋白酶活力值和酱油中氨基态氮含量。

1.2.3 热处理温度 以未经任何处理的普通酱油粕和低温豆粕为对照,将 200 g 低温豆粕分别在 100℃、150℃、180℃ 鼓风烘箱高温处理 30 min 后,按 1.2.1 酿造酱油,观察曲料的生长情况,并测定曲料中中性蛋白酶活力值和酱油中氨基态氮含量。

1.2.4 不同组成原料的热处理 以普通酱油粕为对照,分别将 200 g 低温豆粕和 20 g 混合样 (35% 麸皮、10% 小麦、55 % 低温豆粕) ,经 150℃ 循环鼓风处理 30 min,按 1.2.1 酿造酱油,观察曲料的生长情况,并测定曲料中中性蛋白酶活力值和酱油中氨基态氮含量。

1.2.5 不同豆粕颗粒度原料的热处理 以未经粉碎处理样品为对照,150℃ 循环热风处理低温豆粕 30 min,再粉碎筛分为 20、40、60 和 80 目,按 1.2.1 酿造酱油,观察曲料的生长情况,并测定曲料中中性蛋白酶活力值和酱油中氨基态氮含量。

1.2.6 中性蛋白酶活力测定 曲料酶活力测定:称取研磨成曲 5 g,稀释至 100 mL;40℃ 水浴 2 min,分别加入酪蛋白 1 mL 保温 20 min,再加入 2 mL 0.4 mol \cdot L⁻¹三氯乙酸终止反应,保温 20 min,过滤除去蛋白沉淀。另取 1 mL 滤液,加 5 mL 0.4 mol \cdot L⁻¹碳酸钠和已稀释的福林酚试剂 1 mL,摇匀后,20 min 后测定 680 nm 下的吸光值。对照为先加入 0.4 mol \cdot L⁻¹三氯乙酸 2 mL 灭酶,再加入酪蛋白,其它同上^[10]。标准曲线绘制参考国标^[11]。

样品吸光值 = 样品的平均吸光值 - 空白吸光值,样品中性蛋白酶活力值单位为 U \cdot g⁻¹干基。

1.2.7 氨基态氮含量测定 参考酿造酱油标准 GB18186—2000,甲醛法测定氨基态氮含量^[10]。

1.2.8 曲料质量外观特征 参考低盐固态发酵酱油酿造工艺规程 SB/T10311—1999,观察菌丝生长和孢子成熟情况,具体标准参考文献^[11]。

1.2.9 数据处理和分析方法 每批样品设立 3 个平行,3 次重复。所有数据采用 (AVONA) 方差分析 ($P < 0.05$ 水平)。

2 结果与讨论

2.1 热处理对曲料中性蛋白酶活力和酱油氨基态氮含量的影响

酱油原料经热处理后蛋白质会产生变性,物料的组织状态也发生改变。为考察热处理方式对酿造酱油品质的影响,在配料和蒸料前对豆粕进行热处理,发现在制曲过程中,相对于普通酱油粕 (对照),加热处理会使曲香味增强。但是,静止高温处理样品则出现强烈的烤豆味,而循环热风处理样品曲料蓬松有弹性,曲香味较浓。

进一步分析曲料中米曲霉蛋白酶活力值和酱油中氨基态氮含量的差异,结果如图 1、2 所示。循环热风处理样品的中性蛋白酶活力和氨基态氮含量均高于静态加热处理样品。循环热风处理样品的中性蛋白酶活力和氨基态氮含量最高,分别为 1 362.4 U \cdot g⁻¹干基和 1.108 g \cdot 100 mL⁻¹,是烤箱样品的 1.23 倍和 1.53 倍,与其它样品之间存在显著性差异 ($P < 0.05$ 水平)。表明干热处理方式产生不同的影响,循环热风处理更有利于产生更多的中性蛋白酶和游离氨基酸。Sarah 等^[4]也曾报道通过烘烤过程,促进了米曲霉的生长,进一步促进了豆粕用于豆酱的酿造。由于在处理物料过程中,鼓风循

环热风处理有利于加热过程中物料均匀受热,可以防止局部加热过度引起蛋白过度变性,从而促进米曲霉中性蛋白酶活力增加,酱油中的游离氨基酸含量增加。

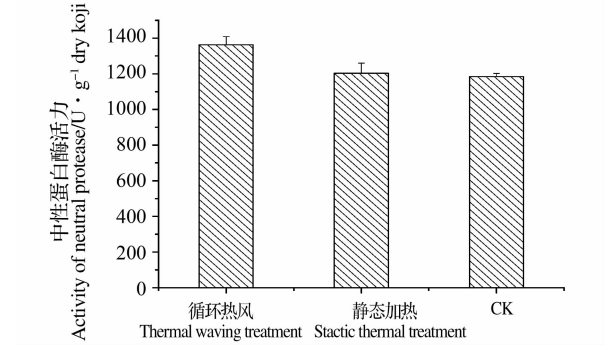
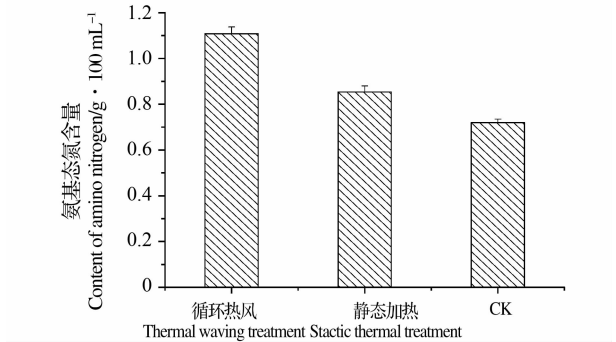


图1 不同热处理低温豆粕曲料中性蛋白酶活力变化

Fig.1 Neutral protease activities with thermal-treatments



对照为未经过任何处理的高温酱油粕

CK:general high thermal treatment defatted soy flake

图2 不同热处理低温豆粕中酿造酱油中氨基态氮含量变化

Fig.2 Contents of amino nitrogen with thermal treatments

2.2 热处理温度对曲料中性蛋白酶活力和酱油中氨基态氮含量的影响

热处理过程有利于蛋白变性,为研究加热温度引起的差异大小,对低温豆粕不同温度条件下热风循环处理。在制曲过程中,加热处理使曲料整体呈现疏松有弹性,曲香味浓郁的良好状态;相对100℃、180℃而言,150℃处理样品的菌丝生长速度更快,成熟期孢子的颜色、浓密度和曲香味更好。

进一步研究热处理温度变化与曲料中性蛋白酶活力和酱油中氨基态氮含量变化之间的关系,分析其中性蛋白酶活力和氨基态氮含量。图3、4反映了循环热风温度变化引起中性蛋白酶活力值和氨基态氮含量之间存在显著性差异($P < 0.05$)。150℃样品的中性蛋白酶活力和氨基态氮含量为

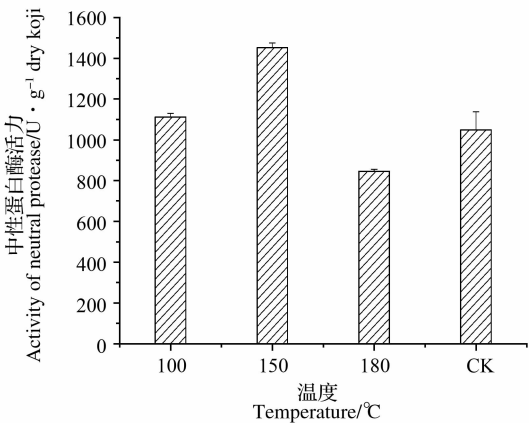


图3 不同热处理温度豆粕用于制曲时中性蛋白酶活力变化

Fig.3 Neutral protease activities with different temperature

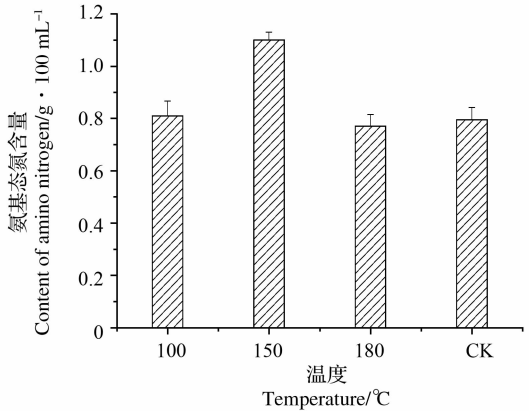


图4 不同热处理温度豆粕酿造酱油的氨基态氮含量变化

Fig.4 Contents of amino nitrogen with different temperature

1 451.8 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ 干基、1.1 $\text{g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$,分别是180℃样品的1.72和1.37倍。这说明高温干热处理的温度对酱油品质有明显的影 响,150℃高温处理30 min更适宜于改善原料的酿造性能。变性程度增加,有利于促进米曲霉产生更多的中性蛋白酶,提高酱油中游离氨基酸含量;但过度的干热处理反而不利于米曲霉的生长和酱油的风味。Sarah等^[4]、Motoi等^[5]也曾报道通过高压蒸煮和烤箱处理大豆酿造豆酱,游离氨基酸含量和中性蛋白酶活力随温度升高增强,温度过高引起酶活力下降的趋势。

2.3 原料颗粒度对曲料中性蛋白酶活力和酱油中氨基态氮含量的影响

相关研究表明^[4-6],物料的单位质量表面积越大,越有利于米曲霉菌丝的生长和深入。观察制曲发现,菌丝的生长速度和紧密程度都随着颗粒度的减小而提高。同时,测定曲料中性蛋白酶活力和酱油中氨基态氮含量,结果如图5、6所示。热风处

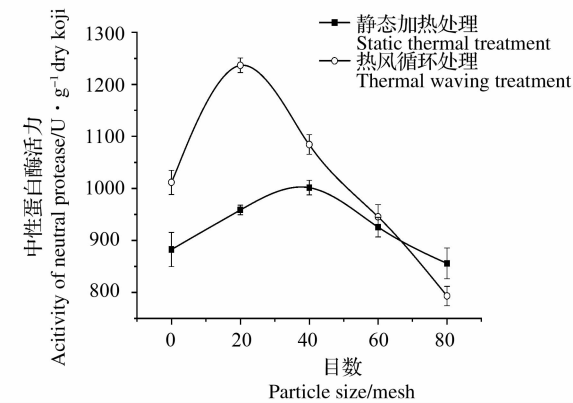


图5 不同原料颗粒度曲料中中性蛋白酶活力变化

Fig. 5 Neutral protease activities with different substrates particles

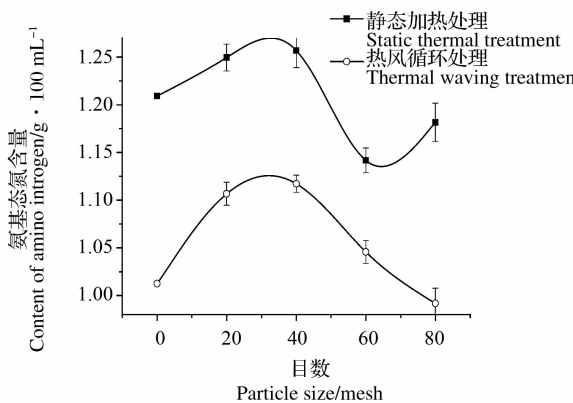


图6 不同原料颗粒度酿造酱油中氨基态氮含量变化

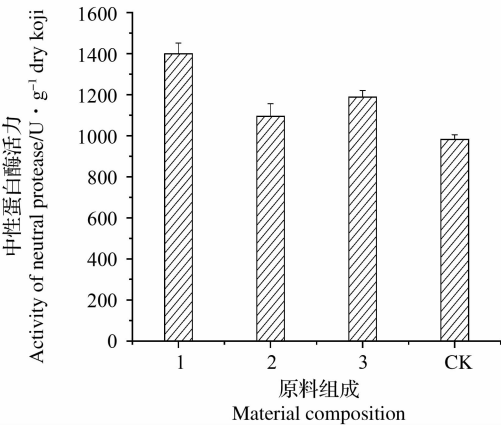
Fig. 6 Content of amino nitrogen with different substrates particles

理和静态处理呈现相同的变化趋势,即豆粕颗粒度的减小,中性蛋白酶活力和氨基态氮含量呈先升高后下降的趋势。当处于20~40目时,中性蛋白酶活力和氨基态氮含量值均达最高,其中20目时蛋白酶活力可达 $1\,246\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ 干基,氨基态氮含量达 $1.26\text{ g}\cdot 100\text{ mL}^{-1}$ 。但颗粒度超过40目后,各指标呈现明显的下降趋势。

尽管20世纪80年代初期福崎幸藏^[12]研究发现原料的颗粒度大小对酱油的酿造影响并不明显,但大量研究表明,颗粒度减小、破碎程度增高,有利于中性蛋白酶活力的提高^[7,13-17]。颗粒度适当减小,可促进初期菌丝生长,但颗粒不宜过细。这可能由于在培养初期消耗营养成分过多,而后期孢子成熟期所需养分减少,导致分泌的中性蛋白酶活力降低,游离氨基酸含量不高。

2.4 原料的组成对曲料中性蛋白酶活力和酱油氨基态氮含量的影响

原料组成的差异,直接影响米曲霉的产酶种类和能力。为考察热处理原料组成对米曲霉生长和中性蛋白酶活力的影响,对比纯低温豆粕和按比例配料后混合物料经加热处理后,制曲过程中生长情况的变化。从感观上分析,纯豆粕样品(原料1)的菌丝生长速度比其他样品快,初期菌丝分布均匀而浓密,成熟孢子黄绿色遍布整个曲料内层。



1为低温豆粕(40目)热风150℃处理30 min;2为混合豆粕、麸皮和小麦三种配料(40目)热风150℃处理30 min;3为低温豆粕;CK是普通酱油粕。下同。

1:around 40 mesh, which was thermal-treated by 150 degree centigrade for 30 min;2:mixed substrates with the same size of defatted soy flake, wheat bran and wheat (5.5:3.5:1.0 w/w) treated by 150 thermal-wave for 30 min;3:general defatted soy flake for soy protein extracting;CK sample: common soy sauce flake. Same as the below.

图7 热处理原料的组成对曲料中性蛋白酶活力变化
Fig. 7 Neutral protease activities with different substrates

进一步分析豆粕在制曲过程中曲料中性蛋白酶活力和酱油中氨基态氮含量,结果如图7、8所示。图7中纯豆粕样品(原料1)中性蛋白酶活力为 $1\,435.7\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ 干基,是普通酱油粕样品的1.57倍,与其他样品间存在显著性差异($P<0.05$);但混合麸皮、面粉样品(原料2)酱油中氨基态氮含量为 $1.215\text{ g}\cdot 100\text{ mL}^{-1}$,明显高于其它样品(图8)。表明热处理原料组成差异引起酿造酱油品质的变化,纯豆粕样品的曲料生长较好,但酱油中氨基态氮含量却低于混合麸皮和小麦样品混合原料。

江洁等^[18]也曾报道了热处理纯豆粕的豆酱中中性蛋白酶活力值和氨基态氮含量明显高于添加其他配料的混合样品。这可能由于在发酵过程中,其

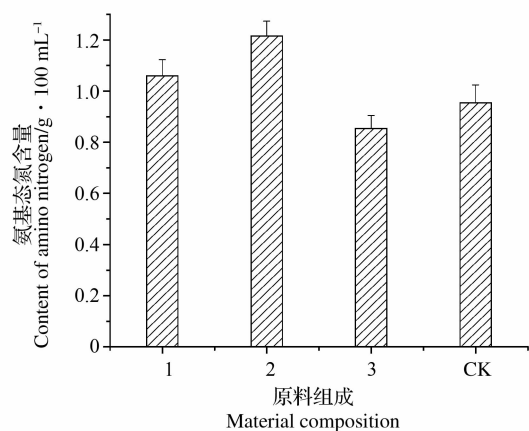


图8 热处理原料的组成对酱油氨基态氮含量变化

Fig.8 Contents of amino nitrogen with different substrates

它辅料即小麦和麸皮的存在,虽未促进米曲霉产酶分解蛋白,但小麦蛋白经高温处理后更容易自身降解,氨基态氮含量增高。其具体作用原理还有待进一步研究。

3 结论

高温处理酱油原料影响曲料的蛋白酶活性和酱油中氨基态氮含量,颗粒度为 20 ~40 目低温豆粕经循环热风 150 ℃处理 30 min 后,采用低盐固态法发酵酿造酱油,其曲料中中性蛋白酶活力值和酱油氨基态氮含量分别为 1 478 U · g⁻¹干基和 1.235 g · 100 mL⁻¹,是普通酱油粕的 1.57 倍和 1.72 倍。

参考文献

[1] 陶文欣,许赣荣.固稀发酵及多菌种混合发酵法生产酱油技术的研究[D].无锡:江南大学,2001;8-20. (Tao W X. A study on soy sauce production technology characterized by solid state and semi-solid fermentation and multi-microorganism fermentation[D]. Wuxi:Southern Yangtze University,2001;8-20.)

[2] 董胜利,徐开生.酿造调味品生产技术[M].北京:北京化学工业出版社,2003;65-78. (Dong S,Xu K S. Technology of fermented seasoning products [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2003;65-78.)

[3] 周瑞宝,周兵.脱脂豆粕的加工和利用[J].中国油脂,2001(26):75-78. (Zhou R B,Zhou B. Utilization and production of defatted soy flakes [J]. Chinese Oil,2001;75-78.)

[4] Dakwa S, Sakyi- Dawson E, Diako C, et al. Effect of boiling and roasting on the fermentation of soybeans into soy dawadawa[J]. International Journal of Food Microbiology,2005,69-82.

[5] Motoi H, Watana Y, Kishi K, et al. The studies on the soy sauce fermentation by reducing koji amounts, using co-extruded wheat and soybean flour[J]. Journal of Japan Soy Sauce Research Institute,1982(8):254-259.

[6] Cheng C C, Meei Y L. Biochemical changes in soy sauce prepared with extruded and traditional raw materials[J]. Food Research International,1998(31):487-492.

[7] Kyoko K, Hideyuki S. Improving the umami taste of soy sauce by the addition of bacterial γ -glutamyltranspeptidase as a glutaminase to the fermentation mixture[J]. Enzyme and Microbial Technology,2007(41):80-84.

[8] Mercier C, Feillet P. Modification of carbohydrate components by extrusion cooking of cereal products [J]. Cereal Chemistry, 1975(52):283-297.

[9] 林祖申,陈骥声.酱油及酱类的酿造[M].北京:北京化学工业出版社,2000;58-85. (Lin Z S, Chen B S. Soy sauce and sauce fermentation[M]. Beijing:Beijing Chemistry Press,2000;58-85)

[10] 酿造酱油[S].国家质量技术监督局,GB18186-2000. (Fermented soy sauce[S]. National Bureau of Quality and Technical Supervision,GB18186-2000.)

[11] 酱油制曲过程质量指标[S].国家质量技术监督局,SB/T10311—1999. (Soy sauce quality factors in Koji [S]. SB/T10311—1999.)

[12] 福崎幸藏.宋刚译.小型酱油厂实用技术[M].北京:北京轻工业出版社,1990;24-56. (Fu Q X. Song G, Trans. Operative technologies of soy sauce in small-scale factories[M]. Beijing: Light Industry Press,1990;24-56.)

[13] Ling M Y, Chou C C. Growth and enzyme production by *Aspergillus oryzae* in various extruded fermentation substrate as a function of extrusion variables[J]. Journal of Chinese Agricultural Chemistry Society,1995(33):521-523.

[14] Ling M Y, Chou C C. Biochemical changes during the preparation of soy sauce koji with extruded and traditional raw materials[J]. Journal of Food Science Technology,1996(31):511-517.

[15] Chou C C, Hwan C H. Effect of ethanol on the hydrolysis of protein and lipid during the aging of Chinese fermented soy bean curd-sufu [J]. Journal of Food Science Agriculture,1994(6):393-398.

[16] Nan W S, Mei L W, Kam F K, et al. Effects of temperature and sodium chloride concentration on the activities of proteases and amylases in soy sauce koji[J]. Journal of food chemistry,2005(53):1521-1525.

[17] Hwang G R , Chou C C. Physical and chemical changes during the aging of tou-pan-chiang mash [J]. Journal of Chinese Food Science,1987(43):469-475.

[18] 江洁,吴耕红,王广霞.高温挤压在豆酱生产中的应用[J].中国酿造,2007(8):45-48. (Jiang J, Wu G. H, Wang G. X. Application of extrusion and swelling technique on soybean paste production[J]. China Brewing,2007(8):45-48.)