

传统发酵霉豆渣中微生物的分离 及其作为豆渣发酵剂的应用

毛欣欣^{1,2}, 雷茜¹, 陈伟哲¹, Kashif Hussain¹, 王洁¹, 方祥¹, 廖振林^{1*}

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 广东茂名农林科技职业学院, 广东茂名 525027)

摘要: 豆渣是大豆加工的副产品, 具有产量大但应用不足的特点。为提高豆渣的利用率, 开发新型豆渣产品。该实验对湖南邵阳霉豆渣进行微生物分离, 旨在得到能利用豆渣营养物质的菌株。共分离 33 株菌, 分别为乳酸菌 13 株, 戊糖乳杆菌 (*Lactobacillus pentosus*)、乳酸片球菌 (*Pediococcus lolii*)、短乳酸杆菌 (*Lactobacillus brevis*)、发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*)、融合魏斯氏 (*Weissella confusa*); 芽孢杆菌 7 株, 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*); 葡萄球菌 9 株, 松鼠葡萄球菌 (*Staphylococcus sciuri*)、克氏葡萄球菌 (*Staphylococcus kloosii*)、鸡葡萄球菌 (*Staphylococcus gallinarum*)、缓慢葡萄球菌 (*Staphylococcus lentus*); 2 株酵母菌, 库德毕赤酵母 (*Pichia kudriavzevii*)、白地霉 (*Geotrichum candidum*); 2 株霉菌, 总状横梗霉 (*Lichtheimia ramosa*) 和伞房横梗霉 (*Lichtheimia corymbifera*)。用白地霉、总状横梗霉和伞房横梗霉固态发酵豆渣, 结果表明, 发酵豆渣总酚和抗氧化活性明显高于未发酵的豆渣 ($p < 0.05$), 发酵 6 d, ABTS 清除率和总酚含量达到最高, 为 92.67% 和 134.35 mg GAE/10 g, DPPH 清除率为 79.98%。证实发酵豆渣可提高豆渣营养价值, 有助于豆渣在食品及其副产品中的应用。

关键词: 霉豆渣; 分离; 豆渣; 发酵; 抗氧化活性

文章编号: 1673-9078(2022)06-74-83

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.6.0745

Isolation of Microorganisms from Traditional Fermented Meitauza and Its Use as the Starter for Fermented Okara

MAO Xinxin^{1,2}, LEI Xi¹, CHEN Weizhe¹, Kashif Hussain¹, WANG Jie¹, FANG Xiang¹, LIAO Zhenlin^{1*}

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(2. Guangdong Maoming Agriculture & Forestry Technical College, Maoming 525027, China)

Abstract: Okara are a by-product of soybean processing, which has the characteristics of large output but insufficient application. In order to improve the utilization rate of okara and develop new okara products, microorganisms were isolated from the fermented meitauza of Shaoyang in Hunan province, with the aim to obtain strains that could utilize the nutrients in okara. A total of 33 strains were isolated, including 13 strains of lactic acid bacteria (*Lactobacillus pentosus*, *Pediococcus lolii*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum* and *Weissella confusa*), 7 strains of *Bacillus* (*Bacillus subtilis* and *Bacillus velezensis*), 9 strains of *Staphylococcus* (*Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus kloosii*, *Staphylococcus gallinarum* and *Staphylococcus lentus*), 2 strains of yeasts (*Pichia kudriavzevii* and *Geotrichum candidum*), and 2 strains of fungi (*Lichtheimia corymbifera* and *Lichtheimia ramosa*). Solid-state fermentation of okara was conducted using *Geotrichum candidum*, *Lichtheimia corymbifera* and *Lichtheimia ramosa*. The results showed that the content of total phenolics and antioxidant activity of fermented okara were significantly higher than those of unfermented okara ($p < 0.05$). After fermentation of okara for 6 d, the ABTS scavenging rate and total phenolic content reached the highest (92.67% and 34.35 mg GAE/10g, respectively), with the DPPH scavenging rate being 79.98%. It was

引文格式:

毛欣欣,雷茜,陈伟哲,等.传统发酵霉豆渣中微生物的分离及其作为豆渣发酵剂的应用[J].现代食品科技,2022,38(6):74-83

MAO Xinxin, LEI Xi, CHEN Weizhe, et al. Isolation of microorganisms from traditional fermented meitauza and its use as the starter for fermented okara [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(6): 74-83

收稿日期: 2021-07-15

基金项目: 广东省重点领域研发计划项目 (2020B020226008; 2018B020206001); 国家自然科学基金项目 (31171673)

作者简介: 毛欣欣 (1993-), 女, 硕士研究生, 助教, 研究方向: 发酵食品与健康, E-mail: 739498652@qq.com

通讯作者: 廖振林 (1968-), 男, 博士研究生, 教授, 研究方向: 发酵食品、菌群与健康, E-mail: larryliao@scau.edu.cn

confirmed that fermentation of okara can improve the nutritional value of okara, which contributes to the application of okara and its by-products in foods.

Key words: meitauza; isolation; okara; fermentation; antioxidant activity

豆渣是大豆在制作豆浆、豆腐等大豆加工产品的过程中产生的废渣,通常是白色或淡黄色^[1,2]。豆渣与大豆的营养成分类似,在豆渣干物质中膳食纤维占40%~60%,蛋白质占15%~25%,脂质占10%,是一种典型的低热量高蛋白质的食品资源,在加工食品的应用上极具潜力^[3-6]。豆渣的产量巨大,尤其是我国作为大豆及其制品的高消费国家,每年仅豆腐生产制造业,就要产生约280万t豆渣^[7,8]。然而,新鲜豆渣具有水分含量高(70%~80%)、口感粗糙、豆腥味浓烈等特点,使其在食品工业的应用上受到巨大的束缚,除了少部分被加工成食品或饲料,绝大部分豆渣作为农业废弃物进行填埋或焚烧^[9,10]。

霉豆渣是湖南、湖北、安徽、广西、江西等地区较为常见的传统发酵豆渣制品^[11]。豆渣经清浆、压榨除水、蒸煮、摊开晾凉、压制成型、霉制等步骤制成霉豆渣,其中霉制是霉豆渣制作的关键步骤,经覆盖稻草自然霉制发酵后,豆渣表面被白色霉菌菌丝包裹,故此得名霉豆渣^[11,12]。霉豆渣改善豆渣粗糙的口感,消除豆渣的腥味,形成一种富含多种氨基酸和多肽的豆渣发酵制品^[13]。研究发现,豆渣在发酵过程中,粗纤维含量降低,改善豆渣粗糙口感;大豆蛋白水解产生肽和游离氨基酸,去除豆渣不良风味,提高豆渣的溶解性和抗氧化活性;豆渣中脂肪和多糖也进一步分解成脂肪酸和小分子糖类,提高豆渣的消化率,丰富豆渣的营养价值^[14-17]。此外,微生物发酵可降低或消除豆渣中胰蛋白酶抑制剂、皂甙和植酸等抗营养物质,改善豆渣应用价值^[18-20]。

目前,霉豆渣主要以家庭作坊式生产,一般采用自然发酵。自然发酵制作的霉豆渣具有发酵周期长、易受杂菌污染、成品质量受自然环境影响较大等缺点,导致霉豆渣的产品稳定性和安全性较低,无法实现高效、安全、工业化的生产^[21,22]。近年来,为了提高豆渣的综合利用率,减少资源浪费,已经有学者从广西、湖北等地区的霉豆渣中分离出雅致放射毛霉、运动发酵单胞菌、粗糙脉孢菌等能够利用豆渣的微生物^[14,23,24]。本研究对湖南邵阳霉豆渣中微生物进行分离纯化与鉴定,旨在从湖南邵阳地区的霉豆渣中分离能够利用豆渣中营养物质的菌株发酵豆渣,开拓豆渣发酵新途径,提高豆渣综合利用率,减少豆渣的废弃。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

霉豆渣:由湖南省邵阳市某家庭小作坊提供,将样品放于无菌采样袋密封,并存储于-20℃备用。

豆渣:由博罗罗浮山润心食品有限公司提供,并存储于-20℃备用。

DPPH、ABTS、没食子酸为色谱纯;福林酚、氯化钠等试剂为分析纯。

1.2 主要仪器设备

LIOO S600T型显微镜,深圳市海量光电有限公司;Mastercycler nexus型PCR仪,德国Eppendorf公司;TFX-20.MC型紫外看胶仪,法国Milber Lourmat公司;SPH-2102C型立式双层恒温培养箱,上海世平实验设备有限公司;LX-B50L型高压灭菌锅,广州深化生物技术有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 霉豆渣中微生物的分离纯化

在225 mL灭菌生理盐水中加入25.00 g捣碎霉豆渣,震荡15 min,将混合液制成 10^{-1} ~ 10^{-7} 稀释梯度,取 10^{-3} ~ 10^{-7} 稀释液200 μ L,分别倾注在PDA和YDP琼脂培养基上30℃培养3 d、MRS和LB琼脂培养基上37℃培养2 d。挑取不同类型菌落,用平板划线对菌株进行纯化,获取菌株纯培养物。使用少许无菌生理盐水冲洗霉菌纯培养物,获得混合液,用无菌棉花过滤混合液,得到的滤液为霉菌孢子悬浮液;在含600 μ L 60%无菌甘油(V/V)的甘油管中分别加入300 μ L细菌、酵母菌、霉菌孢子悬浮液,并分别储藏在-80℃冰箱中。

1.3.2 细菌的分子生物学鉴定

细菌DNA采用Goldenberger等^[25]所述的SDS法提取。PCR扩增反应中,引物为:27f和1492r:5'-AGAGTT TGA TCC TGG CTC AG-3'和5'-CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA-3';体系为:2 \times Taq Master Mix 12.5 μ L, 10 μ mol/L引物各0.25 μ L,模板0.5 μ L, dd H₂O补足至25 μ L;条件为:94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 54℃ 30 s, 72℃ 40 s,共运行30个循环;72℃ 5 min。

1.3.3 真菌的形态学鉴定

观察并记载真菌纯培养物的菌落形态、表面状况、气味、颜色、菌丝长度及生长状况等;并分别用美蓝

和乳酸石碳酸棉兰染液对酵母菌和霉菌染色, 镜检查看酵母菌和霉菌的细胞形态。依照《真菌鉴定手册》^[26]和《酵母菌的特征与鉴定手册》^[27]对真菌进行形态学鉴定。

1.3.4 真菌的分子生物学鉴定

Ezuc 柱式酵母基因组 DNA 试剂盒 (Sangon Biotech) 提取酵母菌 DNA; 霉菌在获得纯培养物后, 直接送至 Sangon Biotech 进行霉菌基因提取及测序。引物为 ITS1 和 ITS4: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGC GC-3' 和 5-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3, PCR 反应体系及条件与细菌 16S rRNA 一致。

1.3.5 微生物分支系统发育分析

扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后, 将含有目标条带的产物送至 Sangon Biotech 测序。将细菌和真菌测序结果分别在 <https://www.ezbiocloud.net/identify> 和 <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 上对比, 获得近似序列, 并通过 MEGA 5.2 软件构建 Neighbor-Joining 系统发育树。

1.3.6 发酵豆渣制备

新鲜豆渣 121 °C 灭菌 15 min, 在无菌条件下, 接种白地霉 J1 和霉菌孢子 (总状横梗霉 Z1 和伞房横梗霉 Z2), 孢子数量采用血球计数板测定, 以 1:1:1 比例接种到灭菌豆渣中, 接种量为 1×10^7 cfu/g, 接种混菌的豆渣置于 30 °C 恒温培养 0、1、2、3、4、5、6、7 d。待发酵终止后, 将发酵豆渣样品放置于 -60 °C 冰箱中, 预冻 24 h, 再用真空冷冻干燥机干燥 48 h, 将冻干豆渣粉碎, 置于干燥器内备用。

1.3.7 豆渣固态发酵过程中总酚与抗氧化活性测定

1.3.7.1 干豆渣总酚提取液的制备

称取粉碎干豆渣 1.00 g, 按料液比 1:100 加入 80% 甲醇, 50 °C 水浴 15 min, 8000 r/min 离心 5 min, 上清液为干豆渣总酚提取液。

1.3.7.2 总酚测定

参照福林酚法^[28]测定豆渣总酚含量。取 500 μL 干豆渣提取液或一系列浓度的没食子酸 (GAE) 工作液 (0、20、40、60、80、100 μg/mL), 依次加入 2.5 mL 10%福林酚溶液 (V/V)、2.0 mL 质量分数 7.5% 的 Na₂CO₃ 溶液, 常温保持 1 h, 在 765 nm 处测定吸光度, 对照 GAE 标准曲线 ($y=0.0092x+0.051$, $R^2=0.9997$), 换算出干豆渣总酚的含量, 单位为 mg GAE/10 g。

1.3.7.3 ABTS 自由基清除率测定

参照 Re 等^[29]的方法并略加修改。在 50 μL 干豆渣总酚提取液中, 再加 2.5 mL ABTS 工作液, 暗室反

应 5 min, 于 734 nm 处测定吸光度, 公式如下:

$$\text{ABTS自由基清除率}/\% = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}) \times 100\%$$

式中:

A_0 ——将干豆渣总酚提取液换成蒸馏水的吸光值;

A_1 ——干豆渣总酚提取液和 ABTS 工作液的吸光值;

A_2 ——将 ABTS 工作液换成蒸馏水的吸光值。

1.3.7.4 DPPH 自由基清除率测定

参照 Akowuah 等^[30]的方法并略加修改。在 500 μL 干豆渣提取液中加入 500 μL DPPH 溶液 (0.08 mg/mL, 用无水乙醇溶解), 暗室静置 30 min, 在 517 nm 处测定吸光值, 公式如下:

$$\text{DPPH自由基清除率}/\% = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}) \times 100\%$$

式中:

A_0 ——将干豆渣总酚提取液换成无水乙醇的吸光值;

A_1 ——干豆渣总酚提取液与 DPPH 溶液的吸光值;

A_2 ——将 DPPH 溶液换成无水乙醇的吸光值。

1.3.8 数据分析

干豆渣总酚提取液的总酚含量和抗氧化能力结果以 Mean±S.D.表示, 并利用 GraphPad Prism 5.0 软件绘制图形, SPSS 19.0 软件进行方差分析, 实验数据重复测定 3 次。

2 结果与讨论

2.1 霉豆渣中细菌的鉴定结果和系统发育进化树的构建

2.1.1 霉豆渣中乳酸菌的分子生物学鉴定结果

将测定结果与 EzBiocloud 收录的标准菌株 DNA 序列进行比对, 经核酸同源性分析, 将同源性 97% 以上的细菌 16S rRNA 序列, 进行分支系统发育分析, 由图 1 可知, 从传统霉豆渣中分离了 13 株乳酸菌; 如图 1a 所示, 菌株 R11、R12、R13 与标准菌株戊糖乳杆菌 (*Lactobacillus pentosus*) 聚在一起, 且菌株 R11、R12、R13 与戊糖乳杆菌的序列相似度也大于 99%, 证实菌株 R11、R12、R13 为戊糖乳杆菌; 同理可知, 菌株 R21、R22、R23 为乳酸片球菌 (*Pediococcus lolii*), 菌株 R31、R32、R33 为短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*), 菌株 R41、R42 为发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*), 且均与其相对应标准菌株的序列相似度均大于 99%。如图 1b 所示, 分离得到的菌株 R51、R52 与标准菌株融合魏斯氏菌 (*Weissella confusa*) 在同一支上, 且序列相似度大于 99%, 由此, R51、R52

被鉴定为融合魏斯氏菌。

在食品发酵过程中，乳酸菌起关键作用，既能够改善发酵食品风味，又具有益生菌特性，可以增加发酵食品活性功能，是发酵食品中最常用的微生物^[31]。Ogodo 等^[32]利用乳酸菌联合发酵豆粉，经测定发现淀粉体外消化率增加了 8.75%，体外蛋白质消化率增加了 8.16%，脂肪、糖类和粗纤维的含量均呈现降低趋势；证实豆粉用乳酸菌联合发酵后，可以改善其营养价值和消化率。

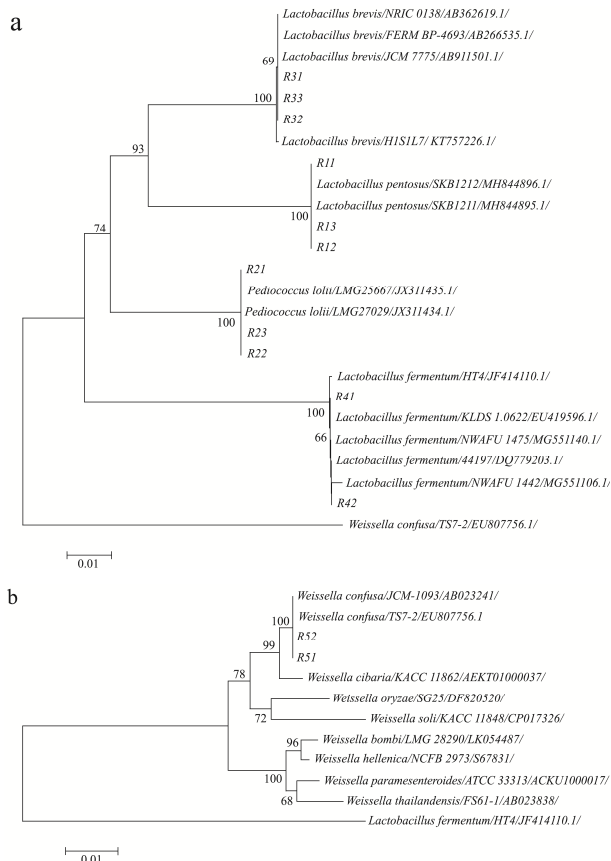


图 1 乳酸菌的系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree of lactic acid bacteria

2.1.2 霉豆渣中芽孢杆菌的分子生物学鉴定结果

由图 2 可知，从传统霉豆渣中分离了 6 株芽孢杆菌，其中 Y11、Y12、Y14、Y15 为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、Y21、Y22 为贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*)。

芽孢杆菌具有潜在的益生功能，将其用于大豆及其制品的发酵有利于提高豆制品的营养价值，如 Ali 等^[33]利用从韩国传统发酵豆制品清糊酱中分离得到一株枯草芽孢杆菌 KCTC 13241，利用其发酵大豆制作清糊酱，结果表明，接种 1% 枯草芽孢杆菌 KCTC 13241 的清糊酱，其总酚含量达到最高为 5.99 mg/g，DPPH 清除率达到 94.24%，ABTS 清除率达到 86.03%；

显著提高了清糊酱的营养价值和抗氧化能力，证实枯草芽孢杆菌 KCTC 13241 具有潜在的益生功能；Kobayash 等^[34]用枯草芽孢杆菌发酵蒸煮大豆制作纳豆，与未发酵的蒸煮大豆相比，发酵过的蒸煮大豆其亚精胺增加了 19.4%，精胺减少了 19.4%，增加了发酵大豆的营养价值。

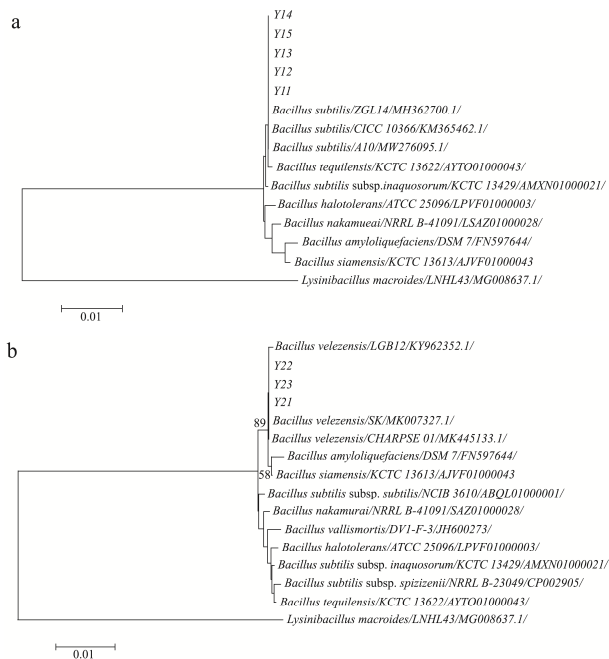


图 2 芽孢杆菌的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of *Bacillus*

2.1.3 霉豆渣中葡萄球菌的分子生物学鉴定结果

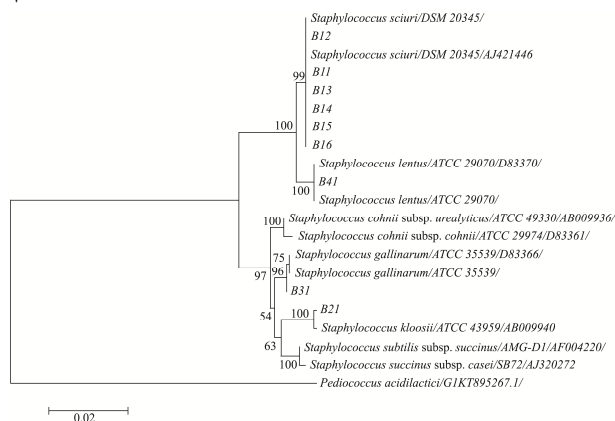


图 3 葡萄球菌的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of *Staphylococcus*

由图 3 可知，从霉豆渣分离出葡萄球菌属 9 株，其中有 6 株松鼠葡萄球菌 (*Staphylococcus sciuri*)，分别为 B11、B12、B13、B14、B15、B16；1 株克氏葡萄球菌 (*Staphylococcus kloosii*) B21；1 株鸡葡萄球菌 (*Staphylococcus gallinarum*) B31；1 株缓慢葡萄球菌 (*Staphylococcus lentus*) B41。

葡萄球菌广泛存在于临床、食品制造、土壤等环

境中, 包含致病性、腐生性和食品工业发酵剂的菌株^[35]。松鼠葡萄球菌和克氏葡萄球菌是机会致病菌, 有感染人或动物的风险^[36,37]。因此, 食用自然发酵的霉豆渣, 可能存在潜在的安全风险。研究表明, 葡萄球菌不仅在肉制品的发酵过程中发挥着重要作用, 而且影响发酵大豆及其制品的风味, 大多数发酵豆制品中含量丰富的葡萄球菌^[35]。Wu 等^[38]研究发现, 在黄豆

酱发酵过程中, 葡萄球菌的含量最丰富。Jia 等^[39]研究发现, 在豆瓣酱发酵过程中, 葡萄球菌是引起豆瓣发酵和风味形成的优势菌群之一。霉豆渣中葡萄球菌是否会影响霉豆渣的风味及安全性有待进一步研究。

2.2 霉豆渣中真菌形态学与分子学鉴定结果

2.2.1 霉豆渣中霉菌的鉴定结果

表 1 真菌菌体及菌落形态表

Table 1 Mycelial and colony morphology of fungi

菌体形态	菌落形态
J1 有真菌丝, 菌丝有较多横隔; 有单个或链状的孢子, 形状为长筒型, 末端圆钝	菌落中心有米白色凸起, 四周为浅白色, 短绒状近于粉状, 果酒清香浓郁, 不透明
J2 细胞呈椭圆形, 两端芽殖	光滑蜡质, 呈圆形, 略有酱油香味, 乳白色, 不透明, 边缘整齐
Z1 有分支丝状菌丝组成的菌丝体, 末端近椭圆型的孢子囊	菌丝灰白, 呈絮状
Z2 菌丝分枝, 末端近圆型或梨型的孢子囊	菌丝灰色, 呈絮状

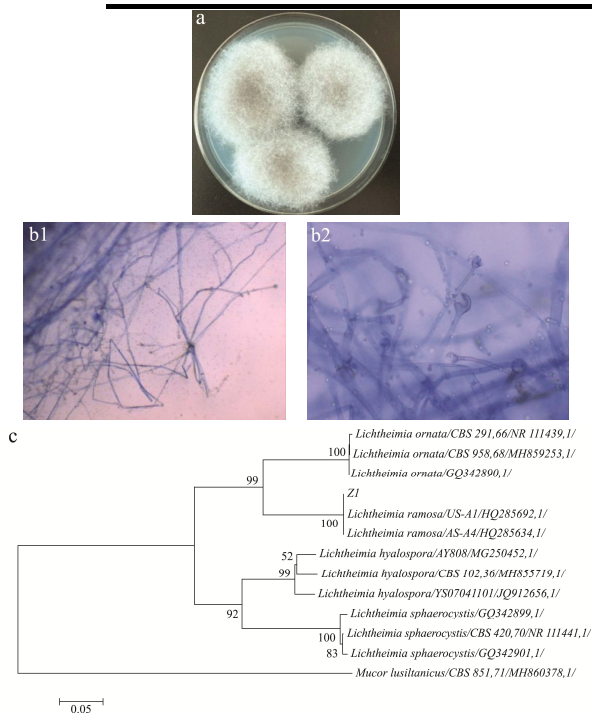


图 4 霉菌 Z1 的鉴定结果

Fig.4 Identification of mold Z1

注: 图 a 为 PDA 培养基菌落形态; 图 b 为菌体形态, b1 为 100×, b2 为 400×; 图 c 为系统发育树。图 5 同。

菌株 Z1 菌丝体呈灰白色, 质地丝绒状 (图 4a 和表 1); 镜检发现有大量分支丝状菌丝组成的菌丝体以及分生孢子梗末端形成近椭圆型的孢子囊, 囊轴呈扁圆形 (图 4b)。根据形态学观察, 初步将菌株 Z1 归为毛霉科真菌 (*Mucoraceae*)。

将菌株 Z1 基因序列进行同源性序列搜索匹配 (BLAST), 菌株 Z1 与总状横梗霉 (*Lichtheimia ramosa*) 遗传距离最近, 同源性达到 100% (图 4c)。

结合 Z1 的生长及形态特征、序列相似性和构建的系统发育树, 鉴定菌株 Z1 为总状横梗霉。有研究发现, 总状横梗霉可以发酵水果渣、棕榈仁粉, 可作为发酵食品和饲料的潜在菌^[40,41]。

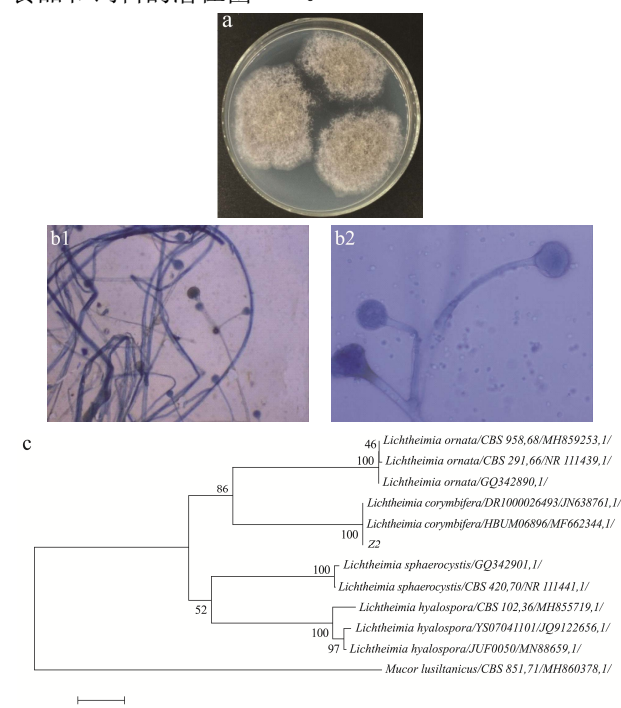


图 5 霉菌 Z2 的鉴定结果

Fig.5 Identification of mold Z2

菌株 Z2 菌丝呈灰色, 绒毛状 (图 5a 和表 1); 镜检下可清晰观测到分支丝状菌丝组成的菌丝体以及分生孢子梗末端形成的分生孢子, 孢囊梗分支, 末端形成近梨型或圆型的孢子囊, 孢囊孢子多以球形呈现 (图 5b); 由细胞形态和菌落特征, 初步将菌株 Z2 归为毛霉科真菌 (*Mucoraceae*)。

由图 5c 可知, 菌株 Z2、*Lichtheimia corymbifera* strain IDR1000026493 (GenBank NO.JN638761.1) 和 *Lichtheimia corymbifera* strain HBUM06896 (GenBank NO.MF662344.1) 三者处于同一分支, 相似度为 100%, 鉴定 Z2 为伞房横梗霉。目前对于伞房横梗霉用于发酵食品的报道较为罕见。

2.2.2 霉豆渣中酵母菌的鉴定结果

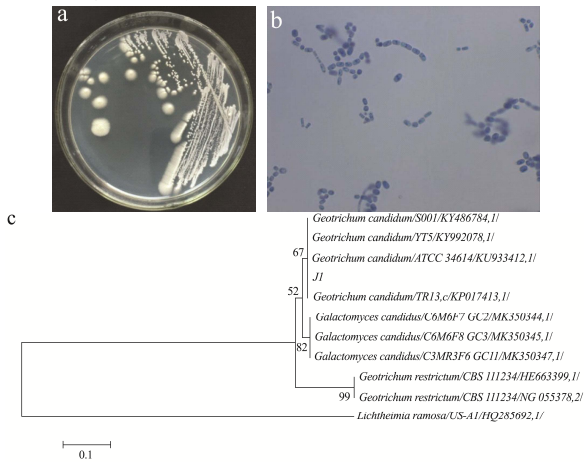


图 6 酵母菌 J1 的鉴定结果

Fig.6 Identification of yeast J1

注: 图 a 为 PDA 培养基菌落形态; 图 b 为菌体形态 (400×); 图 c 为系统发育树。表 7 同。

结合菌株 J1 的菌落形态 (图 6a 和表 1) 和镜检 (图 6b) 可知, 菌株 J1 有菌丝, 且菌丝为横隔的真菌丝; 有单个或链状的节孢子, 形状为长筒型、末端钝圆; 菌落四周近粉状, 呈现乳白色, 菌落中心有圆形凸起; 初步将 J1 认定为地霉属 (*Geotrichum*)。

将菌株 J1 基因序列进行 BLAST, 该片段与白地霉 (*Geotrichum candidum*) 的同源性达到 100%。如图 6b 所示, 菌株 J1 与 *Geotrichum candidum* strain S001 (GenBank NO.KY486784.1)、*Geotrichum candidum* strain YT5 (GenBank NO.KY992078.1)、*Geotrichum candidum* strain ATCC34614 (GenBank NO.KU933412.1)、*Geotrichum candidum* strain TR13.c (GenBank NO.KP017413.1) 聚在同一分支上, 鉴定菌株 J1 为白地霉 (*Geotrichum candidum*)。白地霉能够将蛋白质和脂类转化成具有香气的化合物, 因此在食品工业上白地霉不仅被泛用于辅助干酪成熟, 更是食品和饲料发酵中常用的菌种之一^[42,43]。如: 刘天明等^[44]利用白地霉发酵麦芽汁, 制得的啤酒未检出乙醇、甲醇和甲醛, 为无醇啤酒饮料。Noor-UI 等^[45]在日粮中添加白地霉饲喂异育银鲫, 饲喂 10^6 CFU/kg 和 10^8 CFU/kg 白地霉实验组与对照相比, 异育银鲫体重、饲料利用率和存活率显著提高 ($p < 0.05$), 证实白地霉是一种潜在的益生菌。

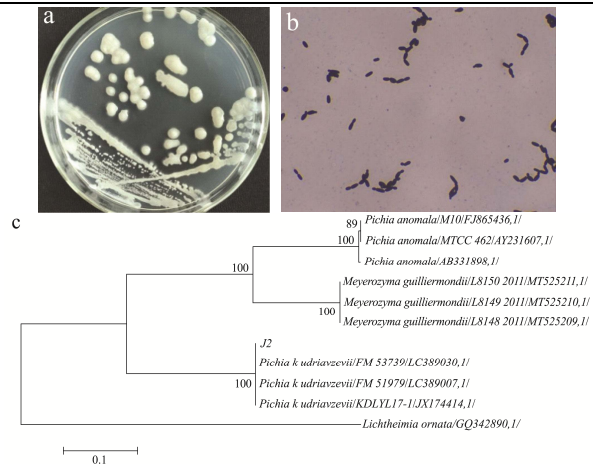


图 7 酵母菌 J2 的鉴定结果

Fig.7 Identification of yeast J2

如图 7a、图 7b 与表 1 可知, J2 以两端出芽的方式繁殖, 具有椭圆形态, 菌落光滑蜡纸、呈现乳白色; 初步鉴定为毕赤酵母属 (*Pichia*)。图 7c 表明, 菌株 J2 与库德毕赤酵母 *Pichia kudriavzevii* strain IFM53739 (GenBank NO.LC389030.1)、*Pichia kudriavzevii* strain IFM51979 (GenBank NO.LC389007.1)、*Pichia kudriavzevii* strain KDLYL17-1 (GenBank NO.JX174414.1) 在同一分支上, 鉴定菌株 J2 为库德毕赤酵母 (*Pichia kudriavzevii*)。Junior 等^[46]以库德毕赤酵母和酿酒酵母复配发酵可可豆, 与未发酵可可豆相比, 总酚含量和甲基黄嘌呤显著增加 ($p < 0.05$), 提高了可可豆的抗氧化能力, 增强了巧克力粉的品质和功能特性; 证实了库德毕赤酵母可作为食品发酵剂。

结合霉豆渣中细菌和霉菌分子学鉴定结果可知, 霉豆渣中微生物种类非常复杂, 存在具有益生作用的乳酸菌和芽孢杆菌; 以及可用于发酵食品或饲料的总状横梗霉、白地霉和库德毕赤酵母, 但也存在条件致病菌: 松鼠葡萄球菌和克氏葡萄球菌。在自然发酵的霉豆渣中, 由于制作环境的开放性, 可能会定植一定数量的致病菌, 直接食用存在一定的风险性; 且不同地区的霉豆渣受自然环境、制作方法、季节等影响, 导致不同地区的霉豆渣中定植的微生物种类有所不同、菌群具有特异性; 如徐书泽等^[21]梧州霉豆渣中分离出 1 株粗糙脉孢菌; 石威^[47]从自制霉豆渣中分离酵母菌 4 株, 分别为胶红酵母菌、圆形丝孢酵母菌、普鲁兰酵母菌、阿氏丝孢酵母菌, 乳酸菌 2 株, 分别为屎肠球菌和肠膜明串珠菌以及 1 株米根霉菌, 以分离的 7 株菌混合发酵豆渣, 制得色泽一致、游离氨基酸含量为 11.64 mg/g, 膳食纤维降低 6.70 mg/g 的发酵豆渣制品, 改善了豆渣的食用特性。因此, 从湖南邵阳霉豆渣中分离微生物是非常有必要的, 为使用霉豆渣中分离的安全菌株发酵豆渣, 生产规范化、工业化的

霉豆渣及研制其他发酵豆渣制品打下基础。

2.3 豆渣固态发酵过程中总酚与体外抗氧化活性变化

本研究在前期试验分别以霉豆渣中分离得到的单一细菌或真菌菌株发酵豆渣, 结果发现, 经单菌发酵后的豆渣与未发酵豆渣相比, 总酚含量和抗氧化能力均无明显变化 ($p>0.05$), 单一菌株不能利用豆渣中营养物质。经多次试验, 最终将白地霉 J1、总状横梗霉 Z1 和伞房横梗霉 Z2 以 1:1:1 接种到灭菌豆渣中, 接种量为 1×10^7 CFU/g, 置于 30 °C 培养箱中固态混菌发酵豆渣; 结果表明, 在未发酵豆渣 (0 d) 中总酚含量为 17.57 mg GAE/10 g, 发酵 6 d 达到最高, 为 134.35 mg GAE/10 g, 总酚含量增长了 116.78 mg GAE/10 g (见图 8)。据 Adetuyi 等^[48]报道, 酚类化合物一般存在游离态或与糖苷结合两种形式, 在发酵过程中, 微生物分泌酶把酚类化合物转化成可溶性的游离酚。发酵 7 d, 豆渣总酚降至 119.86 mg GAE/10 g, 可能是由于随着发酵时间增加, 豆渣中糖类物质减少, 微生物开始利用酚类物质作为碳源, 从而导致在发酵 7 d 时, 豆渣酚类物质含量降低。酚类化合物具有抗氧化、抗炎症等生理活性, 适当摄入富含多酚的食品, 对保持和促进身体健康有利^[49]。本研究结果表明, 白地霉、总状横梗霉和伞房横梗霉混菌固态发酵豆渣有助于提高豆渣中酚类物质的含量。

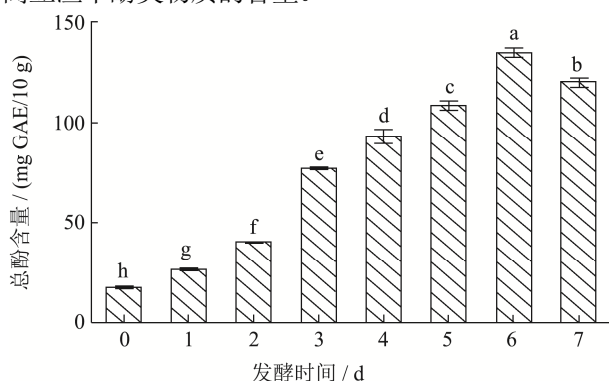


图 8 豆渣固态发酵期间的总酚含量 (以没食子酸当量表示)

Fig.8 Total phenolic content (expressed as gallic acid equivalents) during solid-state fermentation of okara

注: 不同小写字母表示组间差异显著 ($p<0.05$); 相同小写字母表示组间差异不显著 ($p>0.05$), 下同。

如图 9 可知, 在豆渣发酵过程中, ABTS 清除率与总酚含量变化趋势大致相同, 呈现先增后减。未发酵豆渣 (0 d) ABTS 自由基清除率为 11.11%, 在发酵 6 d 时达到最高为 92.67%。ABTS 自由基清除率结果表明, 豆渣发酵有助于提高豆渣的抗氧化能力。

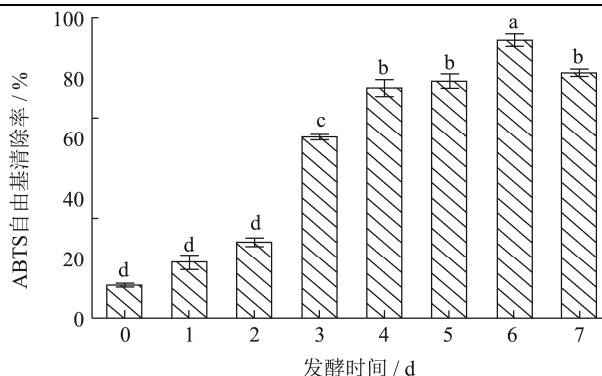


图 9 豆渣固态发酵期间的 ABTS 清除率

Fig.9 ABTS radical scavenging activity during solid-state fermentation of okara

如图 10 可知, 随着发酵时间的增长, DPPH 清除率变化也呈现先增后减。未发酵豆渣 (0 d) DPPH 自由基清除率为 23.47%, 在发酵 5 d 时达到最高为 79.98%, 其中发酵 3~7 d 变化不明显 ($p>0.05$), 与总酚及 ABTS 清除率变化趋势略有不同。研究表明, 除了酚类物质会引起豆渣抗氧化能力提高之外, 某些氨基酸的增加也可以增强抗氧化性活性, 如组氨酸、色氨酸和苯丙氨酸都具有抗氧化活性^[49]。因此, DPPH 清除率在发酵 3~7 d 变化不显著, 其原因可能是微生物发酵豆渣导致蛋白质分解, 产生某些具有抗氧化能力的氨基酸有关。实验结果表明, 利用微生物发酵豆渣后, 其总酚含量和抗氧化能力显著提升, 有利于豆渣营养价值的提高。

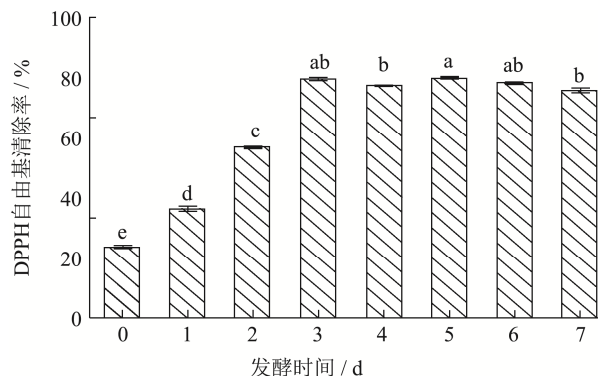


图 10 豆渣固态发酵期间的 DPPH 清除率

Fig.10 DPPH radical scavenging activity during solid-state fermentation of okara

3 结论

湖南邵阳地区霉豆渣中分离纯化并鉴定出 33 株细菌, 其中乳酸菌有 13 株分别为戊糖乳杆菌、乳酸片球菌、短乳酸杆菌、发酵乳杆菌和融合魏斯氏菌; 芽孢杆菌有 7 株分别为枯草芽孢杆菌和贝莱斯芽孢杆菌; 葡萄球菌 9 株, 分别为松鼠葡萄球菌、克氏葡萄球菌、鸡葡萄球菌、缓慢葡萄球菌; 真菌有 4 株, 分别为总

状横梗霉、伞房横梗霉、白地霉和库德毕赤酵母。本研究结果反映了霉豆渣中微生物的多样性,但由于自然发酵的霉豆渣因发酵环境的开放性和发酵条件的不确定性,使得霉豆渣产品质量受外界影响较大,产品安全性较低,定植了一定数量的条件致病菌:松鼠葡萄球菌和克氏葡萄球菌,直接食用霉豆渣可能存在安全风险。此外,以总状横梗霉、伞房横梗霉和白地霉混菌固态发酵豆渣后,其总酚含量和抗氧化能力大幅度提升,有助于将低成本的豆渣开发成食品或者动物饲料,增加豆渣的利用价值,减缓因豆渣废弃而引起的资源浪费。

参考文献

- [1] Choi In Seong, Kim Young Gyu, Jung Ja kyun, et al. Soybean waste (okara) as a valorization biomass for the bioethanol production [J]. Energy, 2015, 93: 1742-1747
- [2] Vong Weng Chan, Yang K A, Liu Shao-Suan. Okara (soybean residue) biotransformation by yeast *Yarrowia lipolytica* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 235: 1-9
- [3] Kamble Dinkar B, Rani Savita. Bioactive components, *in vitro* digestibility, microstructure and application of soybean residue (okara): a review [J]. Legume Science, 2020, 2(1): 1-9
- [4] Pérez-López E, Cela D, Costabile A, et al. *In vitro* fermentability and prebiotic potential of soyabean okara by human faecal microbiota [J]. British Journal of Nutrition, 2016, 116(6): 1116-1124
- [5] Kim Hyun-Suk, Yu Ok-Kyeong, Byun Moon-Sun, et al. Okara, a soybean by-product, prevents high fat diet-induced obesity and improves serum lipid profiles in C57BL/6J mice [J]. Food Science and Biotechnology, 2016, 25(2): 607-613
- [6] Redondo-Cuenca Araceli, Villanueva-Suárez M Jose, Mateos-Aparicio Inmaculada. Soybean seeds and its by-product okara as sources of dietary fibre. Measurement by AOAC and Englyst methods [J]. Food Chemistry, 2008, 108(3): 1099-1105
- [7] Vong Weng Chan, Liu Shao-Suan. Changes in volatile profile of soybean residue (okara) upon solid-state fermentation by yeasts [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2017, 97(1): 135-143
- [8] Vong Weng Chan, Xin Hua-Yi, Liu Shao-Quan. Solid-state fermentation with *Rhizopus oligosporus* and *Yarrowia lipolytica* improved nutritional and flavour properties of okara [J]. LWT, 2018, 90: 316-322
- [9] Xia Xiudong, Wang Ying, Liu Xiaoli et al. Soymilk residue (okara) as a natural immobilization carrier for *Lactobacillus plantarum* cells enhances soymilk fermentation, glucosidic isoflavone bioconversion, and cell survival under simulated gastric and intestinal conditions [J]. Peer J, 2016, 4: e2701
- [10] LI Guanghui, GUO Weiyun, GAO Xueli, et al. Effect of superfine grinding on physicochemical and antioxidant properties of soybean residue powder [J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(2): 1-7
- [11] 林苍.不同菌种发酵豆渣的营养及抗氧化特性分析[J].现代食品,2016,10:114-115
LIN Cang. Nutrition and antioxidant properties of different strains fermented soybean residue analysis [J]. Modern Food, 2016, 10: 114-115
- [12] 朱运平,程永强,汪丽君,等.发酵豆渣的功能性及应用研究现状[J].食品科学,2008,5:475-478
ZHU Yunping, CHENG Yongqiang, WANG Lijun, et al. Overview on functionality and application researching situation of fermented soybean dregs [J]. Food Science, 2008, 5: 475-478
- [13] 张明.发酵豆渣辣椒酱的研制[D].长沙:湖南农业大学,2016
ZHANG Ming. Development of fermented okara chili sauce [D]. Changsha: Hunan University, 2016
- [14] ZHOU Ruolin, REN Zhiqing, YE Jun, et al. Fermented soybean dregs by *Neurospora crassa*: a traditional prebiotic food [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2019, 189(3): 608-625
- [15] LI Shuhong, CHEN Ye, LI Kejuan, et al. Characterization of physicochemical properties of fermented soybean curd residue by *Morchella esculenta* [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2016, 109: 113-118
- [16] Vong Weng Chan, Liu Shaoquan. Biovalorisation of okara (soybean residue) for food and nutrition [J]. Trends in Food Science & Technology, 2016, 52: 139-147
- [17] Lee Delia P S, Gan Alicia X, Kim Jung E. Incorporation of biovalorised okara in biscuits: improvements of nutritional, antioxidant, physical, and sensory properties [J]. LWT, 2020, 134: 109902
- [18] LI Bo, QIAO Meiyang, LU Fei. Composition, nutrition, and utilization of okara (soybean residue) [J]. Food Reviews International, 2012, 28(3): 231-252
- [19] JIANG Kang, TANG Bao, WANG Qian, et al. The bio-processing of soybean dregs by solid state fermentation using a poly γ -glutamic acid producing strain and its effect as feed additive [J]. Bioresource Technology, 2019, 291: 121841
- [20] O'Toole D K. Soybean: soymilk, tofu, and okara [J].

- Reference Module in Food Science, 2004: 1-10
- [21] 徐书泽,黄丽,滕建文,等.传统发酵霉豆渣中产酶优势菌的分离鉴定及性质研究[J].食品与发酵工业,2014,40(3):102-106
XU Shuze, HUANG Li, TENG Jianwen, et al. Isolation and identification of dominant microorganism in traditional fermentative meidouzha and characterization of dominant strain [J]. Food and Fermentation Industrie, 2014, 40(3): 102-106
- [22] 朱运平,李秀婷,刘瑞山,等.不同菌种发酵豆渣的营养及抗氧化特性研究[J].中国食品学报,2014,14(9):20-27
ZHU Yunping, LI Xiuting, LIU Ruishan, et al. Antioxidant activity and nutritional characterization of okara fermented by various microorganisms [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2014, 14(9): 20-27
- [23] 管瑛.雅致放射毛霉 DCY-1 固态发酵豆渣的营养及功能性研究[D].南京:南京农业大学,2016
GUAN Ying. Effects on nutrition and bio-fuctionality of okara by solid-state fermentation with *Actinomucor elegans* DCY-1 [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2016
- [24] 薛振环.粗壮脉纹胞菌发酵豆渣的研究及产品开发[D].南昌:南昌大学,2008
XIE Zhenhuan. Study on fermented soybean dregs by *Neurospora crassa* and its products development [D]. Nanchang: Nanchang University, 2008
- [25] Goldenberger D, Perschil I, Ritzler M, et al. A simple “universal” DNA extraction procedure using SDS and proteinase K is compatible with direct PCR amplification [J]. PCR methods and applications, 1995, 4(6): 368-370
- [26] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:科学技术出版社,1979
WEI Jingchao. Manual of Fungi Identification [M]. Shanghai: Science and Technology of China Press, 1979
- [27] Barnett J A, Payne R W, D Yarrow, et al. Yeasts: Characteristics and Identification [M]. Cambridge University Press (CUP) Cambridge, 1990
- [28] Chaovanalikit A, Wrolstad R E. Total anthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties [J]. Journal of Food Science, 2010, 69(1): FCT67-FCT72
- [29] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay [J]. Free Radical Biology and Medicine, 1999, 26(9-10): 1231-1237
- [30] Akowuah G A, Ismail Z, Norhayati I, et al. The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity [J]. Food Chemistry, 2005, 93(2): 311-317
- [31] LIU Shanna, HAN Ye, ZHOU Zhijiang. Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods [J]. Food Research International, 2011, 44: 643-651
- [32] Ogodo A C, Ugbogu O C, Onyeagba R A, et al. *In-vitro* starch and protein digestibility and proximate composition of soybean flour fermented with lactic acid bacteria (LAB) consortia [J]. Agriculture & Natural Resources, 2018, 52(5): 503-509
- [33] Ali Muhammad Waqas, Shahzad Raheem, Bilal Saqib, et al. Comparison of antioxidants potential, metabolites, and nutritional profiles of Korean fermented soybean (cheonggukjang) with *Bacillus subtilis* KCTC13241 [J]. Journal of Food Science and Technology, 2018, 55(8): 2871-2880
- [34] Kobayashi Kazuya, Shimojo Sayaka, Watanabe Satoshi. Contribution of a fermentation process using *Bacillus subtilis* (natto) to high polyamine contents of natto, a traditional Japanese fermented soy food [J]. Food Science and Technology Research, 2016, 22(1): 153-157
- [35] Irlinger Francoise. Safety assessment of dairy microorganisms: coagulase-negative *staphylococci* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 126(3): 302-310
- [36] Beims H, Overmann A, Fulde M, et al. Isolation of *Staphylococcus sciuri* from horse skin infection [J]. Open Veterinary Journal, 2016, 6(3): 242-246
- [37] Acmd Santos, Jie Rulili, Godoy H A, et al. Complete genome sequences of the potential zoonotic pathogens *Staphylococcus felis* and *Staphylococcus kloosii* [J]. Genome Announcements, 2018, 6(20): e00404-18
- [38] WU Junrui, TIAN Tian, LIU Yiming, et al. The dynamic changes of chemical components and microbiota during the natural fermentation process in da-jiang, a Chinese popular traditional fermented condiment [J]. Food Research International, 2018, 112: 457-467
- [39] JIA Yun, NIU Chengtuo, XU Xin, et al. Metabolic potential of microbial community and distribution mechanism of *Staphylococcus* species during broad bean paste fermentation [J]. Food Research International, 2021, 1: 110533
- [40] XIE Jianhua, LI Pan, HE Zhimei, et al. A novel thermophilic β -mannanase with broad-range pH stability from *Lichtheimia ramosa* and its synergistic effect with α -galactosidase on

- hydrolyzing palm kernel meal [J]. Process Biochemistry, 2020, 88: 51-59
- [41] Silva C, Silva P, Silva G, et al. Biotransformation of fruit residues via solid state bioprocess using *Lichtheimia ramosa* [J]. SN Applied Sciences, 2020, 2(5): 861
- [42] Pottier I, Gente S, Vernoux J P, et al. Safety assessment of dairy microorganisms: *Geotrichum candidum* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 126(3): 327-332
- [43] Noelia Sacristán, Leticia González, José M Castro, et al. Technological characterization of *Geotrichum candidum* strains isolated from a traditional Spanish goats' milk cheese [J]. Food Microbiology, 2012, 30(1): 260-266
- [44] 刘天明,王慧,刘庆军,等.产香白地霉发酵无醇绿啤饮料研究[J].酿酒科技,2007,10:78-80
- LIU Tianming, WANG Hui, LIU Qingjun, et al. Research on non-alcoholic beverage with aroma-producing strains of *Geotrichum candidum* [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2007, 10: 78-80
- [45] Noor-Ul Huda, Liu Haokun, Jin Junyan, et al. Dietary supplementation of *Geotrichum candidum* improves growth, gut microbiota, immune-related gene expression and disease resistance in gibel carp CAS III (*Carassius auratus gibelio*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 99: 144-153
- [46] Junior G, Ferreira N R, Gloria M, et al. Chemical implications and time reduction of on-farm cocoa fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia kudriavzevii* [J]. Food Chemistry, 2021, 338: 127834-127872
- [47] 石威.自然发酵豆渣中微生物分离、鉴定及混合发酵豆渣产品的研制[D].南昌:南昌大学,2012
- SHI Wei. Microbes isolation, identification of natural fermented okara and the products development of mixed fermented okara [D]. Nanchang: Nanchang University, 2012
- [48] Adetuyi F O, Ibrahim T A. Effect of fermentation time on the phenolic, flavonoid and vitamin C contents and antioxidant activities of okra (*Abelmoschus esculentus*) seeds [J]. Nigerian Food Journal, 2014, 32(2): 128-137
- [49] Santos V Q, Nascimento C G, Schimidt C, et al. Solid-state fermentation of soybean okara: isoflavones biotransformation, antioxidant activity and enhancement of nutritional quality [J]. LWT, 2018, 92: 509-515

(上接第 45 页)

- [28] 史雅凝.鸡蛋膜蛋白酶解物的制备及其对肠道氧化应激和炎症的影响[D].无锡:江南大学,2015
- SHI Yaning. Preparation of egg membrane proteolysis and its effect on intestinal oxidative stress and inflammation [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2015
- [29] 彭海英,于洪波,左中.氧化和抗氧化指标在大鼠高脂饮食所致脂肪肝中的动态变化[J].临床军医杂志,2007,5:677-679
- PENG Haiying, YU Hongbo, ZUO Zhong. Dynamic changes of oxidation and antioxidant indexes in fatty liver induced by high-fat diet in rats [J]. Clinical Medical Journal, 2007, 5: 677-679
- [30] Rolla R, Vay D, Mottaran E, et al. Detection of circulating antibodies against malondialdehyde-acetaldehyde adducts in patients with alcohol-induced liver disease [J]. Hepatology, 2010, 31(4): 878-884
- [31] 黄静,廖爱美,潘文娟,等.家蚕蛹油对大鼠肝脏脂质代谢及相关酶活性的影响[J].食品科学,2011,32(5):273-276
- HUANG Jing, LIAO Aimei, PAN Wenjuan, et al. Effects of silkworm pupa oil on lipid metabolism and related enzyme activities in rat liver [J]. Food Science, 2011, 32(5): 273-276
- [32] Kapourchali F R, Surendiran G, Goulet A, et al. The role of dietary cholesterol in lipoprotein metabolism and related metabolic abnormalities: a mini-review [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2016, 56(14): 2408-2415
- [33] 王宁.鸡蛋 LDL 结构、脂质组分析及对小鼠血脂代谢的影响研究[D].武汉:华中农业大学,2018
- WANG Ning. Egg LDL structure, lipidome analysis and its effect on blood lipid metabolism in mice [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2018
- [34] Poret J M, Souza-Smith F, Marcell S J, et al. High fat diet consumption differentially affects adipose tissue inflammation and adipocyte size in obesity-prone and obesity-resistant rats [J]. International Journal of Obesity, 2018, 42(3): 535-541