

米渣蛋白酱油发酵中氮素演变规律与过程 调控相关性

林灿, 袁江兰, 邓冲, 康旭, 徐宁

(湖北工业大学轻工学部食品与制药工程学院, 湖北武汉 430068)

摘要: 本文以米渣蛋白(RDP)为主要原料酿制酱油, 探讨发酵过程中氮素变化规律与过程调控的相关性。通过动态监测 RDP 酱油 30 d 的发酵过程中氨基态氮、总氮、可溶蛋白质、氮转化率的变化规律, 优化酱醪的发酵温度、盐水浓度、盐水添加量等控制条件。对相同试验条件下所得 RDP 酱油和大豆酱油的氨基酸态氮和总氮含量进行了比较, 并初步评价了 RDP 酱油的抗氧化活性。结果表明, 50 °C 发酵 2 d 氮素转化即可达到最高值, 35 °C 发酵持续时间长且有利于氮素转化, 产品品质好; 酱醪盐浓度为 11% 时有利于 RDP 的氮素转化; 在盐水倍数为 2.2、2.5、2.8 时, 对总氮和氨基态氮含量没有明显影响, 但较高的盐水量可以促进 RDP 蛋白质的降解, 有利于提高 RDP 酱油的总氮转化率。综合分析, 确定 RDP 酱油发酵的优化控制条件为不超过 35 °C 条件下添加 2.8 倍曲料质量的盐水, 使酱醪盐浓度达到 11%, 可获得 RDP 总氮转化率 70% 以上的酱油产品。RDP 酱油的总氮和氨基态氮含量均明显高于大豆酱油, RDP 酱油具有显著的抗氧化活性。

关键词: 米渣蛋白; 酱油; 氮素转化; 过程调控; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2015)6-116-121

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.6.019

Correlation between Pattern of Nitrogen Transformation and Process

Control during Fermentation of Rice Dreg Protein for Sauce Production

LIN Can, YUAN Jiang-lan, DENG Chong, KANG Xu, XU Ning

(Academy of Food and Pharmaceutical Engineering, College of Light Industry, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China)

Abstract: Rice dreg protein (RDP) was used as the main material for fermentation to produce sauce, and the correlation between the process control and nitrogen transformation pattern during the fermentation was investigated. The fermentation temperature, salt concentration, amount of added brine, and other control conditions were optimized via dynamic monitoring of the changing patterns of total nitrogen content, amino nitrogen content, soluble protein, and total nitrogen conversion rate in RDP sauce during a 30-d fermentation. The amino nitrogen and total nitrogen contents of RDP sauce and soy sauce obtained under the same conditions were compared, and the antioxidant activity of RDP sauce was evaluated preliminarily. The results showed that the conversion of nitrogen in RDP sauce peaked on the second day of fermentation at 50 °C; fermentation at 35 °C required a longer duration, favored the conversion of nitrogen, and yielded a high-quality product. Moromi with a salt concentration of 11% was conducive to conversion of nitrogen. When the amount of brine was 2.2, 2.5, and 2.8 times as much as the koji weight, no significant effects on the total nitrogen and amino nitrogen contents were observed, while a higher amount of brine promoted the degradation of RDP protein and increased the total nitrogen conversion rate in RDP sauce. Based on this comprehensive analysis, the optimized processing conditions were as follows: the amount of added brine was 2.8 times the koji weight; the fermentation temperature was below 35 °C; and the salt concentration of the moromi was 11%. Under these conditions, an RDP sauce with a total nitrogen conversion rate of over 70% was obtained. The amino nitrogen and total nitrogen contents of RDP sauce were significantly higher than those of soy sauce, and RDP sauce possessed significant antioxidant activity.

Key words: rice dreg protein; sauce; conversion of nitrogen; process control; antioxidation

收稿日期: 2014-09-11

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31371741)

作者简介: 林灿 (1990-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品工程

通讯作者: 袁江兰, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 蛋白质化学与工艺

酱油是中国、日本等亚洲国家广为流传的一种调味品, 具有风味浓郁、营养丰富等特点, 能增加食物的风味, 是不可或缺的一种日常家用酱汁。传统酱油均以大豆、豆粕或脱脂大豆为蛋白质基原料, 辅以小

麦粉、麸皮等,经过蒸煮、曲霉制曲后与盐水混合成稀醪,然后利用微生物及其酶系的较长期作用,将原料中的大分子物质不断分解、利用和转化,形成具有典型色、香、味的产品。

近年来,有研究者尝试利用其他蛋白质丰富的原料替代或部分替代大豆酿制酱油^[1,2,3],取得了一定进展。米渣蛋白(RDP)是生产大米淀粉糖的副产品。大米经过高温淀粉酶液化,再经过滤获得糖类产品,同时产生RDP。每吨大米通过糖化后约有0.5 t湿RDP^[4],因其溶解性较差,国内大部分RDP被用作饲料。RDP含蛋白质60%左右^[5],明显高于大豆蛋白质含量,是一种浓缩的大米蛋白。大米蛋白氨基酸组成合理,与WHO/FAO推荐的理想模式非常接近,且具有低过敏性,是已知谷物中过敏性最低的蛋白质^[6]。利用RDP酿造试制酱油新品,是RDP在食品中应用的新尝试,可以通过微生物降解和转化有效提高RDP的利用率,而且所得酱油风味独特、鲜味典型,产品质量较好。

蛋白质转化率一直是酱油酿造领域中重点关注的问题。与大豆酱油相比,RDP酱油蛋白质转化率相对较低。酱油制曲过程中,米曲霉分泌出丰富的酶系,其中与蛋白质降解相关的主要是蛋白酶,酿造过程中蛋白酶系不断将大分子蛋白质降解成肽类、氨基酸等可溶性含氮物,使蛋白质转化率逐渐提高,但由于RDP原料颗粒较细小,以及其蛋白质本身的结构特点,导致其转化所需工艺条件异于大豆蛋白质。本文主要通过工艺优化,动态监测发酵过程中氮素相关指标的变化规律,探究RDP酱油的过程控制与氮素转化的相关性,并初步评价了其抗氧化活性,为提高成品RDP酱油品质和原料蛋白利用率奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

RDP由湖南省万福生科股份有限公司提供;米曲霉(*Aspergillus oryzae*)沪酿3.042购于上海佳民有限公司酿造一厂;面粉、麸皮均为市售;其他化学试剂均为分析纯。

1.2 仪器和设备

K9860凯氏定氮仪,济南海能仪器股份有限公司;WFJ2000型可见光分光光度计,上海尤尼柯仪器有限公司;800电动离心机,上海浦东物理光学仪器厂;78-1数显pH计,梅特勒-托利多仪器上海有限公司。

1.3 实验内容和方法

1.3.1 指标测定方法

1.3.1.1 氨基酸态氮(AAN)含量的测定:采用甲醛滴定法^[7]。

1.3.1.2 总氮(TN)含量的测定:采用凯氏定氮法^[7]。

1.3.1.3 可溶性蛋白质含量的测定:采用Bradford法^[8]。

1.3.1.4 总氮转化率(CRT)

$$\text{CRT}/\% = \frac{V_A \times \text{TN}_1}{M_R \times \text{TN}_2} \times 100\%$$

注: V_A -盐水体积; TN_1 -RDP生酱油总氮; TN_2 -曲料总氮; M_R -曲料质量。

1.3.1.5 还原力的测定:采用铁氰化钾还原法^[9]。

1.3.2 发酵工艺流程

原料→润水→蒸料→冷却→加面粉和麸皮混合→接种→制曲→制酱醪→发酵→滤油→生酱油

1.3.3 发酵温度控制

在酱油的发酵过程中,温度会影响发酵过程中各种酶活力、微生物生长及美拉德反应等,从而影响酱油品质^[10]。设计20、35、50℃三个温度水平,将曲料和盐水混合,分别进行恒温发酵。

1.3.4 发酵酱醪盐浓度的控制

酱醪盐浓度可能通过影响酶活而影响RDP蛋白质转化^[11]。将不同浓度的盐水和曲料按体积质量比2.5:1进行混合,使发酵酱醪盐浓度分别达到11%、13%、15%。在35℃下恒温发酵。

1.3.5 发酵盐水量的控制

将不同体积的盐水和曲料进行混合,盐水体积分别是曲料质量的2.2、2.5、2.8倍,在35℃下恒温发酵。

1.3.6 RDP酱油和传统大豆酱油的比较

在相同条件下,分别以大豆和RDP作为蛋白质原料发酵酱油。测定发酵180 d的样品中总氮和氨基态氮含量,对两种酱油的氮素转化进行初步分析比较。

1.3.7 RDP酱油的抗氧化性

采用铁氰化钾还原法评价以上三种试验条件所得RDP酱油的抗氧化活性,发酵时间均为30 d。

1.3.8 数据处理

采用Origin 8.0处理和分析数据。试验中各项指标测定重复3次,结果取平均值。

2 结果与讨论

2.1 发酵温度与RDP酱油氮素演变相关性

温度影响酱油发酵过程中酶活性和各种生化反应速率,因此对氮素的转化有显著影响。合适的发酵温

度有利于缩短发酵周期、提高氮转化率和促进良好风味的形成。温度对 RDP 酱油发酵过程中氮素指标的影响如图 1 所示。

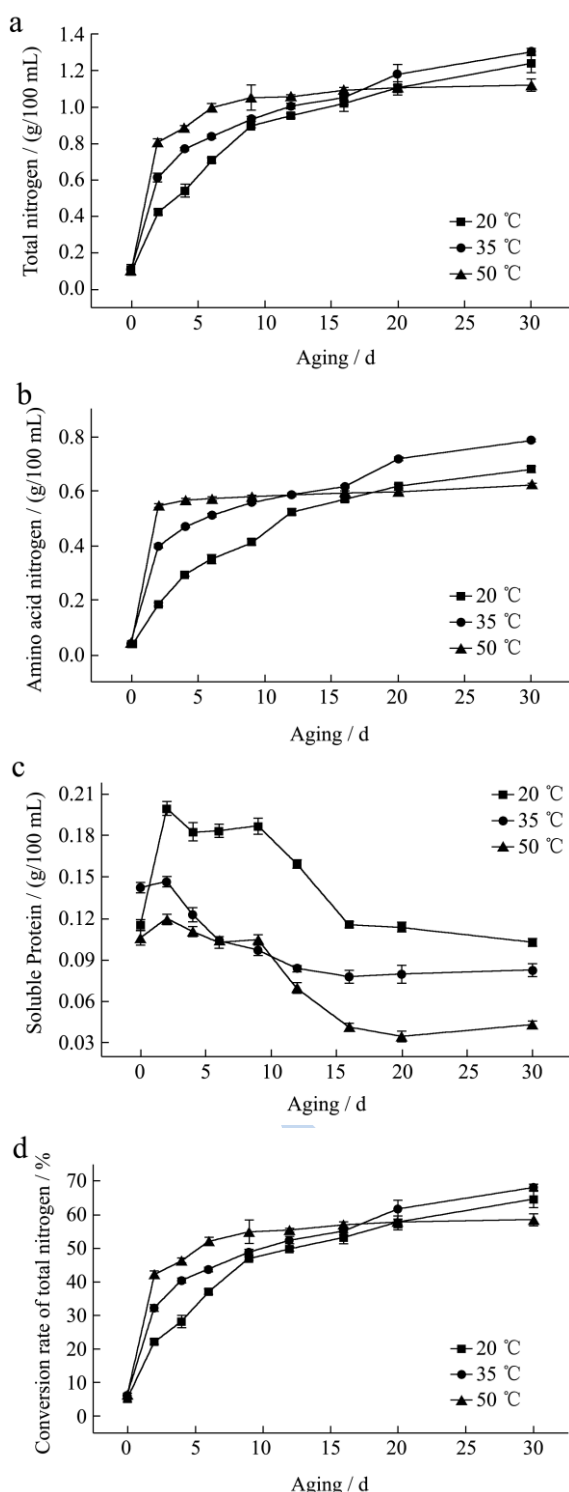


图 1 温度对 RDP 酱油发酵过程中氮素指标的影响

Fig.1 Effects of temperature on the nitrogen indexes during fermentation of RDP sauce

注: (a) 总氮; (b) 氨基酸氮; (c) 可溶性蛋白质; (d) 总氮转化率。

结果表明, 发酵过程中, 氨基酸氮和总氮含量

受温度影响的规律较为一致。在发酵初期, 适度高温有利于蛋白质降解和酱油中总氮的积累, 但持续性差。Takeharu N 等研究发现低温下肽酶的作用时间长于高温, 因此长时间高温发酵反而不利于总氮和氨基态氮的积累, 而且高温促进了褐变反应, 影响酱油的品质^[12]。

在发酵初始的 2 d 内, 酱醪可溶性蛋白质含量均有不同程度的增加, 2 d 后开始下降并于 16 d 后趋于平缓。说明在发酵开始的 2 d 内是曲料中大分子或不溶性蛋白质降解的主要阶段。可溶性蛋白质含量与蛋白质降解相关, 发酵过程中, 50 °C 下发酵酱醪可溶性蛋白质含量下降速度高于 20 °C 和 35 °C 的酱醪, 说明适度高温更有利于 RDP 在短期内快速水解。

RDP 酱油总氮转化率的变化趋势与总氮一致。35 °C 下发酵酱油的总氮转化率最高。

2.2 酱醪盐浓度与 RDP 酱油氮素演变相关性

酱油发酵时添加适量食盐能有效抑制杂菌生长, 从而防止腐败, 同时调节有益菌群和酶活性, 有利于氮素转化和产品风味形成, 因此适宜的盐浓度对酱油发酵至关重要。酱醪盐浓度对 RDP 酱油发酵过程中氮素指标的影响如图 2 所示, 发酵过程中, 样品氨基态氮含量均在发酵初始 2 d 内迅速增加后增幅趋于平缓, 在发酵全程中, 11% 盐浓度酱醪的氨基态氮含量均高于 13% 和 15% 盐浓度酱醪。总氮变化规律与氨基态氮相似, 但在发酵 20 d 后, 11% 和 13% 总氮含量区别不显著, 但总体均高于 15% 盐浓度酱醪, 可能是高浓度的盐水抑制蛋白酶活力, 导致蛋白质的利用率下降^[13]。11% 盐浓度酱醪的可溶性蛋白质含量下降速率高于 13% 和 15% 盐浓度酱醪, 说明较低的酱醪盐浓度对蛋白质降解有利, 但需考虑盐浓度对杂菌的抑制效果。RDP 酱油总氮转化率的变化趋势与总氮一致。

2.3 盐水加量与 RDP 酱油氮素演变相关性

盐水为酱醪中所有物质提供了分散和溶解介质, 包括微生物、酶、不溶性成分和可溶性成分, 因此酱醪中盐水加量影响物料分散和溶解、各种生化反应的底物浓度和生成物浓度, 从而影响氮素转化。盐水加量对 RDP 酱油发酵过程中氮素指标的影响如图 3 所示。

盐水倍数对 RDP 酱油发酵过程中氨基态氮含量变化影响不明显, 均在发酵初始的 2 d 内迅速增加后增幅趋于平缓。总氮含量变化总趋势与氨基态氮一致, 说明发酵初始 2 d 内是酱醪蛋白质快速降解阶段, 这与制曲过程产生的高活力蛋白酶系有关。增加盐水量

有利于 RDP 蛋白质的水解, 2.8 倍盐水加量酱醪可溶性蛋白质含量下降速度高于 2.2 倍和 2.5 倍的酱醪。RDP 酱油总氮转化率与盐水加量有关, 随盐水加量的增加而逐渐升高, 说明增加盐水量可以促进蛋白质的降解, 有利于提高酱油的总氮转化率。

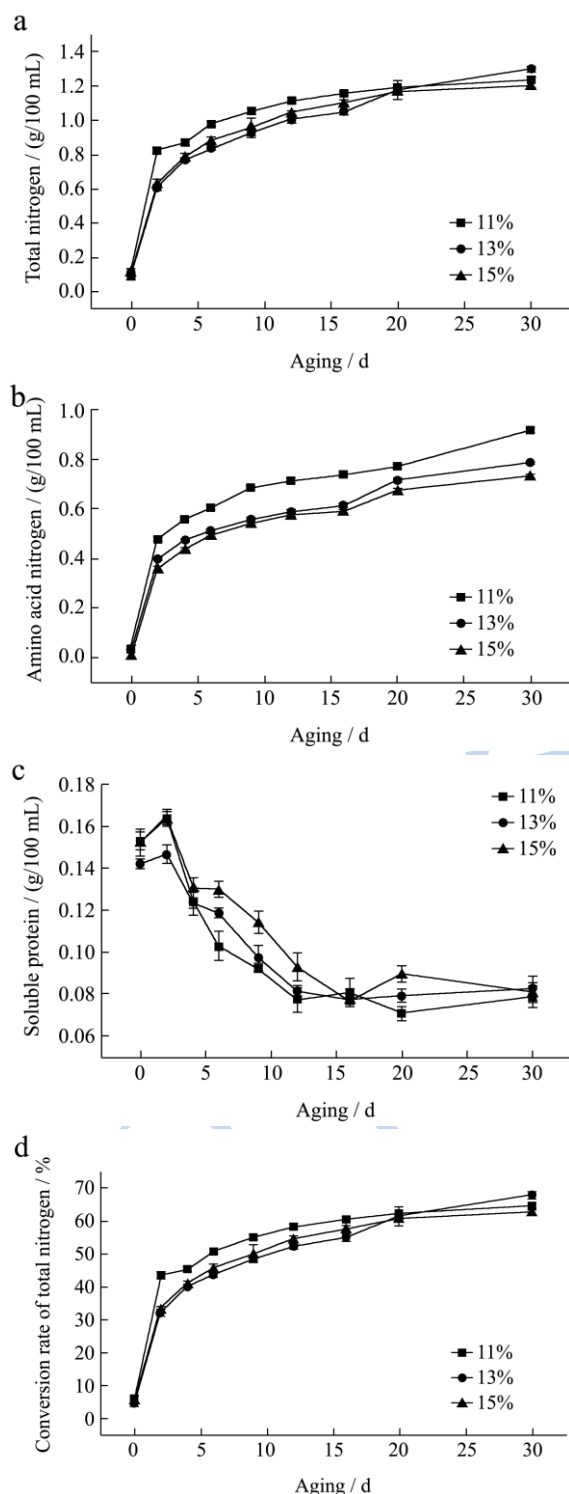


图2 酱醪盐浓度对 RDP 酱油发酵过程中氮素指标的影响
Fig.2 Effects of salt concentration on the nitrogen indexes during fermentation of RDP sauce:

注: (a) 总氮; (b) 氨基酸氮; (c) 可溶性蛋白质; (d)

总氮转化率。

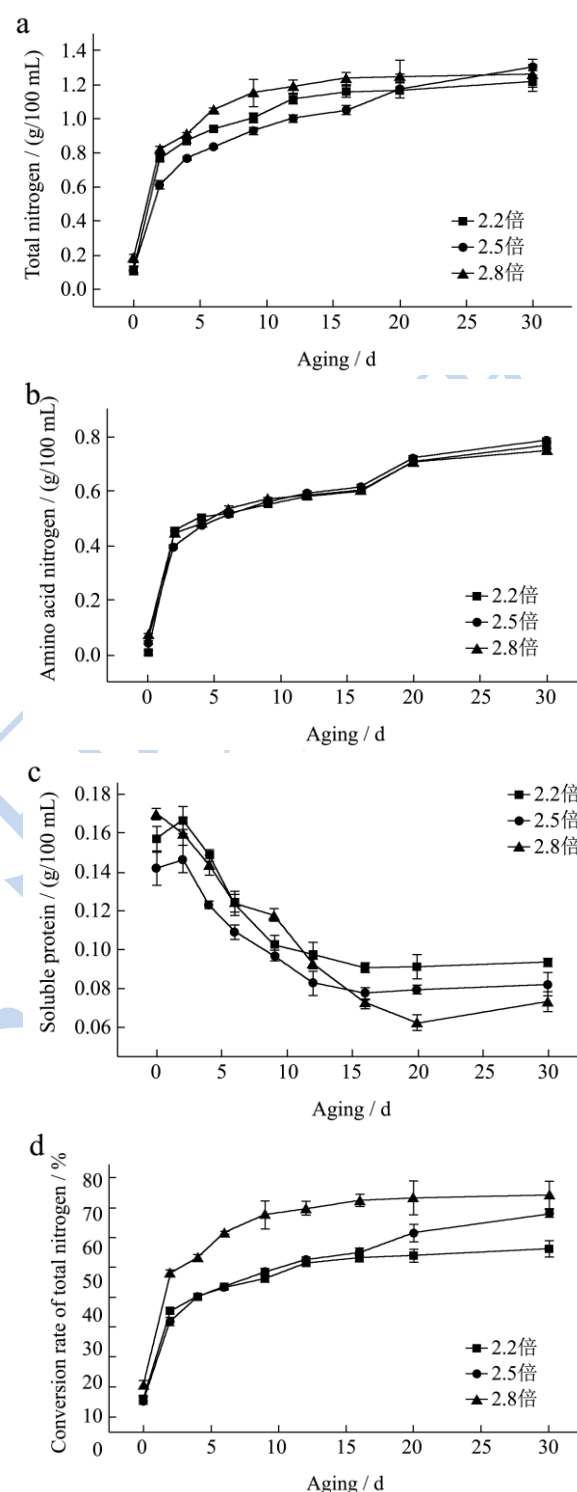


图3 盐水加量对 RDP 酱油发酵过程中氮素指标的影响
Fig.3 Effects of brine content on the nitrogen indexes during fermentation of RDP sauce:

注: (a) 总氮; (b) 氨基酸氮; (c) 可溶性蛋白质; (d) 总氮转化率。

RDP 酱油酱醪与大豆酱油酱醪明显不同, 其具有较高的粘稠度, 醪渣体态较为细腻, 因此液态部分的扩散性相对较差, 较高的盐水加量可能主要是通过降

低醪液粘度、增加扩散性达到促进氮素转化反应的效果。但由于醪液体积不同，图中总氮、氨基态氮和可溶性蛋白质含量的数据未做归一化处理，因此这种差别未得到体现，而在总氮转化率中可以看到盐水加量多所产生的效果。

2.4 RDP 酱油和传统大豆酱油氮素转化比较

总氮和氨基酸态氮是酿造酱油的重要质量指标，也是蛋白质原料中氮素转化和利用的重要评价指标。RDP酱油是一种研制中的新型酱油，其氮素转化效率和产品质量是必须关注的问题。与传统大豆酱油相比，RDP酱油总氮和氨基酸态氮的影响如图4所示。

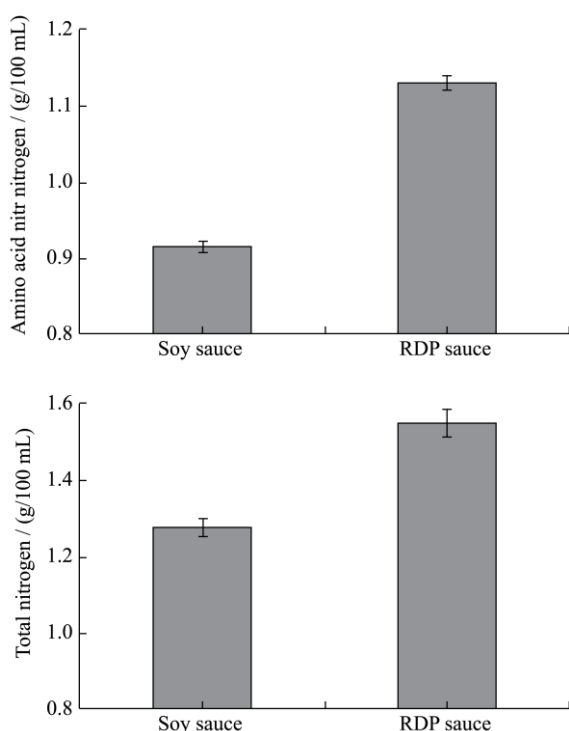


图4 RDP 酱油和传统大豆酱油总氮和氨基酸态氮比较

Fig.4 Total nitrogen and amino acid nitrogen content of RDP sauce and soy sauce

2.5 RDP 酱油的抗氧化活性

据分析测定，酱油的化学成分有 300 多种，很多物质具有生理活性，而最引人注目的是抗氧化作用^[14]。在一般情况下，化合物的还原能力与抗氧化能力呈正相关，因为供电子还原剂可以通过向自由基提供一个电子，从而中和自由基的反应活性而呈现出抗氧化活性。还原能力的测定作为一种简单、快速的方法，可用于以上试验条件所得 RDP 酱油抗氧化活性的初步评价。每毫升 RDP 酱油的还原力与抗坏血酸浓度的等同量，即 μg 抗坏血酸值/mL ($\mu\text{g AAE/mL}$)。RDP 酱油还原力如图 5 所示。S1、S2、S3 分别为 20 °C、35 °C、

50 °C 发酵所得的酱油样品；S4、S2、S5 分别为酱醪盐浓度 11%、13%、15% 发酵所得样品；S6、S2、S7 分别为盐水倍数 2.2、2.5、2.8 倍发酵所得样品。

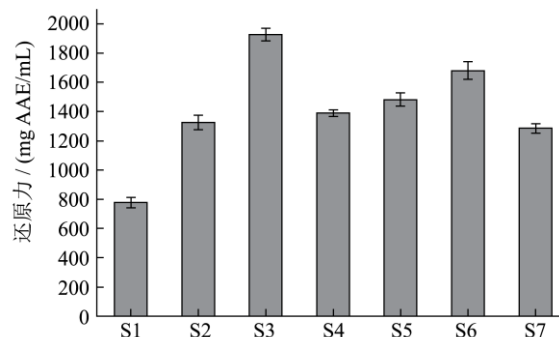


图 5 RDP 酱油的抗氧化活性

Fig.5 Antioxidant activity of RDP sauce

结果表明，各RDP酱油样品均具有一定的抗氧化活性，其中发酵温度影响最大，酱醪盐浓度影响不明显，而盐水加入量增多样品抗氧化活性下降。RDP酱油的抗氧化活性可能与其中蛋白质降解产物存在相关性，这方面有待进一步研究。

3 结论

3.1 RDP 酱油发酵工艺的最佳工艺参数：不超过 35 °C 条件下添加 2.8 倍曲料质量的盐水，使酱醪盐浓度达到 11%，以保证较高的酱油原料利用率和酱油品质。

3.2 RDP 酱油具有明显的抗氧化活性，且受发酵温度的影响较为显著。利用微生物发酵 RDP 生产具有抗氧化活性酱油值得进一步深入研究。

3.3 RDP 代替大豆作为蛋白质原料酿造酱油可行，RDP 酱油的品质较好。

参考文献

[1] 靳艳,袁江兰,康旭,徐宁,林灿.米渣蛋白酿造酱油的原料配比优化[J].中国调味品,2013,38(9):45-47
JIN Yan, YUAN Jiang-lan, KANG Xu, XU Ning, LIN Can. Optimization of raw material ratio of fermented soy sauce from rice residue protein [J]. China Condiment, 2013, 38(9): 45-47

[2] 韩秋霞,邹玉红.三种蛋白质原料对酱油发酵品质的影响[J].中国酿造,2009,7:142-144
HAN Qiu-xia, ZOU Yu-hong. Influence of three kinds of protein raw materials on quality of soy sauce [J]. China Brewing, 2009, 7: 142-144

[3] 李凤林,吴雪晶.玉米蛋白粉酿造酱油生产工艺的探讨[J].中国调味品,2009,34(7):82-83

- LI Feng-lin, WU Xue-jing. Study on the technology of soy sauce with product from corn gluten meal [J]. China Condiment, 2009, 34(7): 82-83
- [4] 李绮丽,吴卫国.米渣和米糠蛋白的开发利用[J].粮食加工,2009,34(6):39-42
- LI Qi-li, WU Wei-guo. Extraction and exploitation of rice dregs and rice bran protein [J]. Grain Processing, 2009, 34(6): 39-42
- [5] 王章存,申瑞玲,姚惠源.大米蛋白开发利用[J].粮食与油脂,2004,1:12-14
- WANG Zhang-cun, SHEN Rui-ling, YAO Hui-yuan. Extraction and exploitation of rice protein [J]. Cereals & Oils, 2004, 1: 12-14
- [6] 席文博,赵思明,刘友明.大米蛋白分离提取的研究进展[J].粮食与饲料工业,2003,10:45-47
- XI Wen-bo, ZHAO Si-ming, LIU You-ming. Progress of research on rice protein separation and purification [J]. Cereal & Feed Industry, 2003, 10: 45-47
- [7] 国家标准:GB 18186-2000,中华人民共和国国家标准-酿造酱油[S]
- Government Standard: GB 18186-2000, National Standards of the People's Republic of China - Brewing Soy Sauce [S]
- [8] 罗群.考马斯亮蓝法快速测定菜籽粕中可溶性蛋白质的含量[J].成都大学学报(自然科学版),2014,33(2):125-126
- LUO Qun. Rapid determination of soluble protein content in rapeseed meal by coomassie brilliant blue method [J]. Journal of Chengdu University (Natural Science Edition), 2014, 33(2): 125-126
- [9] WU HC, CHEN HM, Shiau CY. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*) [J]. Food Res Int, 2003, 36(9-10): 949-957
- [10] 尹文颖,崔春,陈玲,等.发酵温度对高盐稀态酱油原油品质的影响[J].食品工业科技,2014,2:154-157
- YIN Wen-ying, CUI Chun, CHEN Ling, et al. Effects of fermentation temperature on the quality of soy sauce [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 2: 154-157
- [11] 李丹,王娅琴,赵海锋,等.盐水浓度及 pH 对高盐稀态酱油酿造初期酱醪理化性质影响的研究[J].现代食品科技,2011,27(4):380-383
- LI Dan, WANG Ya-qin, ZHAO Hai-feng, et al. Effects of brine salt concentration and pH on physicochemical properties during the early fermentation of high-salt diluted soy sauce [J]. Modern Food Science and Technology, 2011, 27(4): 380-383
- [12] Takeharu N, Hitomi Y, Riichiro U. Effect of temperature on the stability of various peptidases during peptide-enriched soy sauce 1 fermentation [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2012, 113(3): 355-359
- [13] Nakadai T, Nasuno S. Hyperproduction of peptidase and proteinase by mutants of *Aspergillus oryzae* [enzymes for digestion of soybean 1 proteins to produce good quality soy sauce] [J]. Ferment, Technol, 1977, 55: 273-276
- [14] 曾小波,宋小焱,朱新贵,等.高盐稀态法酿制酱油的抗氧化研究[J].中国酿造,2009,1:131-133
- ZENG Xiao-bo, SONG Xiao-yan, ZHU Xin-gui, et al. Anti-oxidation activity of soy sauce brewed by high-salt-suspension fermentation [J]. China Brewing, 2009, 1: 131-133