

霉菌型黑豆豆豉的主要成分及其抗氧化活性研究

吴兰芳, 蒋爱民, 曲直, 任俊锋, 曾宪浩
(华南农业大学食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 以黑豆为原料, 研究自然发酵豆豉与纯种发酵豆豉的主要成分及抗氧化活性。黑豆经过发酵成豆豉后, 主要成分的含量发生了变化, 其蛋白质含量减少 1.9%~4.2%、还原糖含量减少 1.5%~2.1%, 酸度增加 1.0%~1.3%、多肽含量增加 1.5%~1.6%、脂肪增加 6.2%~7.5%、类黑精含量增加 1.7%~2.0%。以维生素 C 为阳性对照, 二苯代苦味基肼自由基 (DPPH·) 法、水杨酸法和 Fe^{3+} 还原能力三种方法评价抗氧化活性, 结果显示, 黑豆经过发酵后, 抗氧化活性增强, 自然发酵豆豉的抗氧化效果优于黑豆, 而纯种发酵豆豉抗氧化效果较差。

关键词: 黑豆; 纯种发酵; 豆豉; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2013)1-51-54

Study on the main components and Antioxidant Activity of Aspergillus-type Fermented Soybean

WU Lan-fang, JIANG Ai-min, QU Zhi, REN Jun-feng, ZENG Xian-hao

(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The black bean was used as raw materials to study the main components and antioxidant activity of traditional fermented soybean and pure fermentation. The results showed that, after fermentation, its protein and reducing sugars had 1.9%~4.2% and 1.5%~2.1% decreased respectively. The contents of acidity, peptide, fat and melanoidin increased 1.0%~1.3%, 1.5%~1.6%, 6.2%~7.5% and 1.7%~2.0%, respectively. The antioxidant activity were investigated by DPPH· (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method, salicylic acid method and deoxidization Fe^{3+} method and compared with that of Vitamin C. The results showed that the antioxidant activity of the traditional fermented soybean was better than black beans. The pure fermented soybean showed the lowest antioxidant effect.

Key words: black beans; pure fermentation; soybean; antioxidant activity

豆豉作为一种传统大豆发酵制品, 已有上千年的历史。其品种繁多, 按制曲时参与的微生物不同, 豆豉可分为毛霉型、曲霉型、根霉型和细菌型等^[1]。国外的丹贝 Tempe (印度尼西亚根霉型豆豉) 和纳豆 Natto (日本细菌型豆豉) 都是与豆豉同类的食品^[2~3]。豆豉以其豉香诱人、营养丰富、风味独特而深受消费者欢迎。据文献报道, 大豆在发酵过程中, 在微生物及酶的作用下, 对大豆中的大分子有机物分解和重组, 同时经过复杂的生化作用, 形成代谢产物和变性物质^[4], 例如其中的蛋白质会分解为多肽和氨基酸, 异黄酮糖苷会转化成为生理活性较高的苷元, 类黑精的生成^[5], 这些成分都能增强豆豉的抗氧化活性。食物中的抗氧化成分可以防止与自由基损伤有关的一些疾

收稿日期: 2012-08-17

基金项目: 广东省重大科技专项专项(2011A020102001)

作者简介: 吴兰芳 (1985-), 女, 博士研究生, 研究方向: 食品加工与贮藏

通讯作者: 蒋爱民 (1957-), 男, 教授, 博士, 研究方向: 畜禽产品加工与

质量安全控制

病, 如心血管疾病、癌症等, 还可以延缓机体衰老^[6]。

20 世纪 30 年代以来我国开始用纯种发酵技术改革传统工艺, 该技术可提高产品产量和劳动生产率, 缩短生产周期^[7,8]。因此本文利用纯种技术及自然发酵技术制作豆豉, 并对黑豆、纯种发酵豆豉、自然发酵豆豉的营养品质及其抗氧化活性进行测定, 从而为豆豉保健食品的进一步开发提供理论依据和科学指导。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

黑豆, 采自阳江; 二苯代苦味基肼自由基 (DPPH·), 百灵威公司; 维生素 C, 国药集团化学试剂有限公司; 无水乙醇, 广州化学试剂厂; 过氧化氢, 西药集团化学试剂有限公司; 水杨酸, 西陇华工有限公司; 硫酸亚铁, 广州化学试剂厂; 磷酸氢二钠, 广州化学试剂厂; 磷酸二氢钠, 广州化学试剂厂; 三氯乙酸, 天津化学试剂厂。

UV-1800 紫外可见分光光度计, 岛津仪器有限公

司; 冷冻高速离心机 5804R, 德国艾本德仪器公司; PL203 型电子天平, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; 冷冻高速离心机 5804R, 德国艾本德仪器公司; HH-4 数显恒温水浴锅, 常州澳华仪器有限公司; KjeltacTM 8100 凯式定氮仪。

1.2 实验方法

1.2.1 样品的制备

1.2.1.1 黑豆样品的制备

黑豆采自阳江, 粉碎过 60 目筛备用。

1.2.1.2 自然发酵豆豉的制备

自然发酵豆豉采自阳江, 制作工艺为:

黑豆→浸泡→蒸煮→冷却→接种→制曲→拌盐水→发酵→干燥→豆豉。豆豉成品粉碎后, 过 60 目筛备用

1.2.1.3 纯种发酵豆豉的制备

发酵菌种选自阳江豆豉发酵的优势菌株, 制曲选用米曲霉(*Aspergillus oryzae* RIB40)、米根霉(*Rhizopus oryzae* strain FSU 6156), 后发酵选用伯顿毕赤酵母(*Pichia burtonii* LM076)。制作工艺为:

黑豆→浸泡→蒸煮→冷却→接种(米曲霉、米根霉)→制曲→拌盐水→发酵(接种伯顿毕赤酵母)→干燥→豆豉。对豆豉成品进行粉碎后, 过 60 目筛备用

1.2.2 黑豆、自然发酵豆豉、纯种发酵豆豉主要成分的测定

1.2.2.1 酸度的测定

滴定法^[9]测定样品的总酸含量。

1.2.2.2 还原糖含量的测定

参考 GB 5009.7-2008, 约取 4 g 样品, 除去蛋白质后, 分别加入 5 mL 酒石酸铜甲液和 5 mL 酒石酸铜乙液, 置于 150 mL 锥形瓶中, 加入样品液 10 mL, 加入玻璃珠 2 粒, 控制在 2 min 内加热至沸, 以 1 滴/2s 的速度滴定, 直至颜色褪去, 根据样品液消耗体积计算还原糖含量。

1.2.2.3 蛋白质含量的测定

参考 GB 5009.5-2010, 差量法取样约 2 g, 精确至 0.1 mg, 消化 50 min 后冷却, 用凯式定氮仪蒸馏装置蒸馏, 以甲基红溴甲酚绿指示剂, 用 0.1 mol/L 标准盐酸滴定至棕红色, 记录消耗体积, 按公式进行计算: 蛋白质%=氮%×5.17

1.2.2.4 多肽含量的测定^[10]

取脱脂样品 10 g, 65 °C 水浴 30 min, 过滤后沉淀大豆蛋白质; 收集大豆蛋白采用旋转式离心, 3000 r/min, 8 min; 用中性蛋白酶、木瓜蛋白酶双酶水解, pH 7.2、温度 45 °C、酶解 3 h; 水解产物进行超滤处理, 对滤液进行冷冻干燥并称重。

1.2.2.5 类黑精含量的测定^[11]

取 5 g 样品, 用 10% 的乙醇定容至 200 mL, 充分振荡, 室温静置 24 h, 滤纸过滤, 4 °C, 8000 r/min, 离心 10 min, 取上清液 470 nm 比色。结果按如下公式计算:

$$C = \frac{A_s \times V}{0.269 \times M \times 1000 \times 10} \times 100\%$$

其中: C-类黑精含量(%), A_s -样液吸光度值, V-定容体积(mL), M-样品量(g), 0.269-1mL 水溶液含 0.1 mg 酱油类黑精的吸光度值。

1.2.3 抗氧化活性测定

1.2.3.1 清除 DPPH 自由基^[12]

取黑豆、自然发酵豆豉、纯种发酵豆豉粉末, 配制成一定的质量浓度, 向 3 mL 样品溶液加入 3 mL 0.16 mmol/L DPPH 溶液, 于 25 °C 水浴中放置 15 min 后, 在 517 nm 测得试样吸光度 (A_i), 取 3 mL 蒸馏水代替样品测得空白吸光度 (A_0), 以 3 mL 样品中加入 3 mL 蒸馏水测得样品本底吸光度 (A_j), 其中 (A_i) 每个样品质量浓度做三个平行, 取平均值。以维生素 C 作阳性对照, 按下列公式计算清除率。

$$\text{清除率}(\%) = [A_0 - (A_i - A_j)] / A_0 \times 100\%$$

1.2.3.2 清除羟基自由基

采用 Fenton 反应, 利用 H_2O_2 与 Fe^{2+} 混合产生羟基自由基, 在该体系中加入水杨酸捕捉羟基自由基并产生有色物质, 该物质在 510 nm 处有最大吸收^[13,14]。将样品配制成一定的质量浓度, 加入一定浓度样品 4 mL, 9 mmol/L $FeSO_4$ 0.5 mL, 9 mmol/L 水杨酸 0.5 mL, 8.8 mmol/L H_2O_2 0.5 mL, 混匀, 37 °C 水浴中加热 30 min, 于 510 nm 处测定样品吸光度 (A_i), 将体系中的样品改为加入 4 mL 蒸馏水, 测定得空白对照吸光度 (A_0), 向体系中加入 0.5 mL 蒸馏水代替 8.8 mmol/L H_2O_2 时, 测定得样品本底吸光度 (A_j), 其中每个质量样品浓度做 3 个平行, 以维生素 C 作阳性对照, 计算清除率。

$$\text{清除率}(\%) = [A_0 - (A_i - A_j)] / A_0 \times 100\%$$

1.2.3.3 Fe^{3+} 还原力测定^[15]

取黑豆、自然发酵豆豉、纯种发酵豆豉粉末, 配制成一定的质量浓度, 以维生素 C 作为阳性对照, 向 2 mL 样品加入到 2 mL 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.6) 和 2 mL 1% 的铁氰化钾溶液, 50 °C 保温 20 min 后再加入 2 mL 10% 的三氯乙酸溶液, 混合后以 3000 r/min 离心 10 min, 取上清液 2 mL, 加入 2 mL 蒸馏水以及 0.4 mL 0.1% 三氯化铁溶液, 室温反应 10 min 后, 测定其在 700 nm 处的吸光值。

1.3 数据的处理

SPSS 11.5、Excel 分析数据。

2 结果与讨论

2.1 黑豆、自然发酵豆豉、纯种发酵豆豉理化性质

表 1 样品主要成分的研究

Table 1 Study on the main components of the sample

样品	总酸/%	蛋白质/%	多肽/%	还原糖/%	脂肪/%	类黑精/%
黑豆	0.76±0.07	32.28±0.14	0.91±0.21	4.10±0.02	5.61±0.56	0.56±0.03
自然发酵豆豉	2.03±0.05	28.12±0.06	2.43±0.09	2.60±0.01	13.13±0.48	2.58±0.01
纯种发酵豆豉	1.75±0.12	30.38±0.03	2.55±0.12	2.00±0.02	11.80±0.37	2.26±0.03

由表 1 可以看出,黑豆经过发酵成豆豉后,其总酸含量、脂肪含量、多肽含量、类黑精含量有所增高;蛋白质、还原糖含量降低。黑豆经过微生物发酵,微生物分泌了大量的淀粉酶和脂肪酶,使黑豆中的碳水化合物和脂肪分解成有机酸和脂肪酸,从而使总酸含量、脂肪含量增加;在黑豆发酵过程中,蛋白质被微生物所分泌的蛋白酶分解,并转化成氨基酸等小分子物质,因而蛋白质的含量下降,多肽含量增加;在豆豉后发酵阶段,微生物的生长需要能量,分解部分碳水化合物,使淀粉等生物大分子分解产生还原糖,但酵母菌厌氧发酵和乳酸菌发酵需要消耗部分还原糖,使得还原糖含量有所减少。豆豉经过发酵,发生 Maillard 反应,类黑精含量增加,这些成分可能与豆豉的抗氧化活性相关。

2.2 对 DPPH 自由基的清除作用

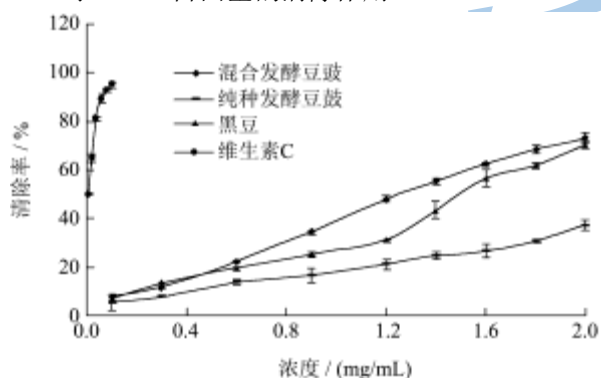


图 1 清除 DPPH 自由基作用

Fig.1 The capability of scavenging DPPH radical

DPPH 自由基是一种稳定的自由基,在有机溶剂中呈紫色,在 517 nm 波长有较大吸收,当加入抗氧化剂一部分自由基被清除,使得在该波长下吸收减弱,可借此来评价物质的抗氧化活性。本实验以天然抗氧化剂维生素 C 作为对照,由图 1 可以看出,各样品对 DPPH 自由基表现出清除作用,并在实验浓度范围内呈一定的量效关系,但各样品的清除作用均弱于维生素 C,其中自然发酵相对于其它两个样品,对 DPPH 自由基能力较强,清除能力大小依次为维生素 C>自然发酵豆豉>黑豆>纯种发酵豆豉。

对 DPPH 自由基清除作用的半清除率浓度 (IC₅₀

mg/mL) 大小依次为: 维生素 C(0.010)<自然发酵豆豉(1.069)<黑豆(1.347)<纯种发酵(9.668)。自然发酵豆豉的抗氧化效果相对于黑豆、纯种发酵强,可能原因是经过微生物发酵,生物活性成分有一定程度的变化,其中的蛋白质会降解为多肽和氨基酸,而异黄酮会由糖苷的形式转化为生理活性较高的甙元形式以及类黑精生成都有可能使豆豉出现抗氧化活性,而且自然发酵利用的是多种菌,使活性成分向高活性方向转化,纯种则发酵菌株较为单一。

2.3 对羟基自由基的清除作用

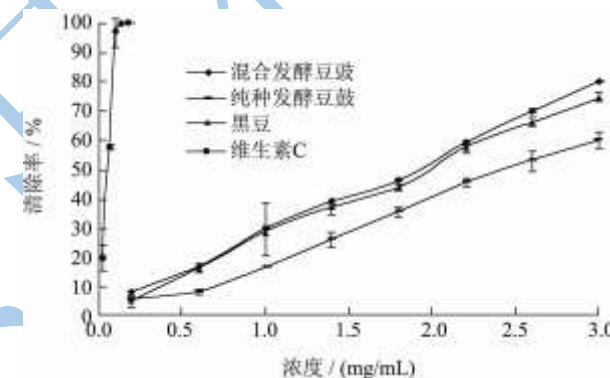


图 2 清除羟基自由基作用

Fig.2 The capability of scavenging hydroxyl radical

由图 2 可以看出,以维生素 C 作为对照,各样品对羟基自由基表现出一定的清除能力,并在实验浓度范围内呈一定的量效关系,其中自然发酵相对于其它两个样品,对羟基自由基能力较强,清除能力大小依次为: 维生素 C>自然发酵豆豉>黑豆>纯种发酵豆豉。对羟基自由基清除作用的半清除率浓度 (IC₅₀ mg/mL) 大小依次为: 维生素 C(0.044)<自然发酵(1.516)<黑豆(1.669)<纯种发酵(2.568)。半清除率浓度与清除能力大小成负相关,即半清除率浓度越小则清除能力越强,除维生素 C 外,清除能力最好的为自然发酵豆豉。

2.4 对 Fe³⁺还原力的测定

抗氧化剂的抗氧化能力与其还原力有关,还原力越大,抗氧化能力越强。抗氧化剂能够在一定的条件下将 Fe³⁺还原为 Fe²⁺,因此,根据 Fe³⁺还原为 Fe²⁺的多少来间接评价各种提取物的抗氧化能力。由图 3 可

以看出,样品的还原能力与其浓度呈一定的量效关系,随着浓度的增加,样品的吸光值呈上升趋势,样品的吸光值越大,表明还原能力愈强,抗氧化效果愈佳。各样品还原能力大小依次为:维生素 C>自然发酵豆豉>黑豆>纯种发酵豆豉。

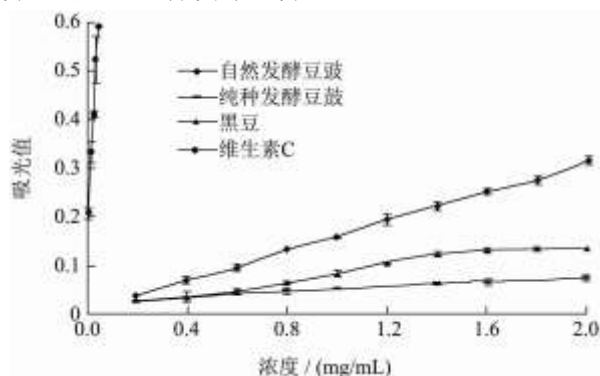


图3 Fe³⁺还原能力曲线

Fig.3 The deoxidizatio capacity of Fe³⁺

3 结论

3.1 黑豆经过发酵后,蛋白质含量减少,样品蛋白质含量依次为:原料>纯种发酵>自然发酵;但蛋白质的水解产物多肽含量增加,多肽含量依次为:纯种发酵>自然发酵>原料;还原糖含量减少,样品的还原糖含量依次为:原料>自然发酵>纯种发酵;类黑精含量增多,样品的类黑精含量为:自然发酵豆豉>纯种发酵>原料;总酸含量和脂肪含量增多:自然发酵豆豉>纯种发酵>原料,自然发酵比纯种发酵中的微生物更丰富,风味物质更丰富。

3.2 对产品的抗氧化特性测定结果表明,抗氧化活性大小依次为:自然发酵>原料>纯种发酵。在本实验中,影响具有抗氧化特性物质的最主要因素可能是“微生物”,在微生物的作用下,大豆经过生化作用,会生成更多的活性物质,而且自然发酵利用的是多种菌,使活性成分向高活性方向转化,纯种发酵菌株则较为单一。目前选出的微生物主要围绕“食用品质”优选,本研究表明所筛选出改良“食用品质”的3株微生物可能与改良“抗氧化活性”的微生物不同,进一步研究时应该各有所侧重。

参考文献

- [1] 庞庆芳,张炳文,孙爱东.中国传统大豆发酵食品-豆豉功能成分的研究进展[J].研究与开发,2006,27(2):185-187
- [2] 孙森,宋俊梅,张长山.豆豉、纳豆及天培的研究进展[J].中国调味品,2008,349(3):29-33
- [3] 宋永生,张炳文.日本纳豆与中国豆豉营养功能成分的研究进展[J].中国调味品,2004,310(12):6-9
- [4] 孙成行,牟光庆.豆豉活性成分研究进展[J].食品研究与开发,2006,27(9):157-159
- [5] 范俊峰,李里特,张艳艳,等.传统大豆发酵食品的生理功能[J].食品科学,2005,26(1):250-254
- [6] 邹磊,甄少波,王静,等.发酵豆制品抗氧化作用的研究进展[J].中国调味品,2008,354(8):20-24
- [7] 赵德安.纯种发酵、混合发酵与传统发酵食品[J].中国调味品,2010,222(9):15-17
- [8] 杨勇,詹永,李征,等.快速发酵豆豉关键技术及问题讨论[J].现代食品科技,2008,24(8):819-821
- [9] 大连轻工业大学等编.食品分析[M].北京:中国轻工业出版社,2007
- [10] 李雄辉,过新胜,徐刚.大豆多肽提取工艺的研究[J].工艺技术,1999,9:28-30
- [11] 秦礼康,丁肖霖.陈窖豆豉耙类黑精提取及骨架肽段氨基酸组成分析[J].食品科学,2006,27(1):125-129
- [12] Smirnoff N, Cumbes Q J, Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes [J]. Phytochemistry, 1989, 28 (4): 1057-1060
- [13] Brand-Williams W, Cuvelier M E, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity [J]. LWT-Food Science and Technology, 1995, 25:25-30
- [14] 张兴茂,吴晖,赖富饶.酱油渣蛋白水解产物抗氧化性研究[J].现代食品科技,2011,27(10):1200-1204
- [15] Oyaizu, M. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine [J]. Japanese Journal of Nutrition, 1986, 44, 307-315