

酶促速熟过程中腐乳成分及微观结构的分析

张媛媛, 李立英, 汪建明

(食品营养与安全教育国家重点实验室, 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 通过研究酶促腐乳在成熟过程中的色度、蛋白质水解程度、微观结构的变化, 分析添加酶制剂促熟对腐乳品质及微观结构的影响. 利用扫描电子显微镜研究酶促速熟过程中腐乳的微观结构变化, 通过电泳分析腐乳的蛋白质水解情况, 采用中红外扫描研究酶促腐乳的成分, 并与利民红方腐乳(对照样)进行对比. 结果表明, 酶促速熟腐乳的颜色、微观结构、蛋白水解度以及组成成分均与传统工艺生产的利民红方腐乳(对照样)基本相同, 证明腐乳的加酶促进其成熟方法的可行性.

关键词: 腐乳; 酶促; 微观结构

中图分类号: TS264.2

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2012)01-0009-05

Micro-Character and Composition Analysis of Sufu Being Fermented by Enzyme

ZHANG Yuanyuan, LI Liying, WANG Jianming

(Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Chroma values of the sufu inner, proteolysis degree and microstructure of the sufu during maturation were studied so as to evaluate the quality and microstructure of sufu being fermented by enzyme. Microstructures of the sufu inner part were studied with scanning electronmicroscopy (SEM). Proteolysis and constituents were analyzed with SDS-PAGE electrophoresis and FTIR compared with the market sufu as the control. The results indicated that there was no significant difference between the accelerated maturation sufu and the traditional ones, which proved the feasibility of enzyme acceleration during sufu maturation.

Key words: sufu; enzyme acceleration; microstructure

腐乳作为一种发酵型大豆食品, 其营养价值丰富, 质构细腻柔滑, 滋味鲜美, 保健功能可与西方奶酪和日本纳豆并提. 但目前我国腐乳生产制作发酵周期长, 一般需要三个月以上, 占用了生产的场地和周转资金, 因此有必要借鉴干酪酶促成熟工艺进行研究, 从而缩短生产周期. 在前期的研究中, 课题组对常规腐乳风味品质进行测定比较, 并对酶促速熟腐乳的工艺进行了优化^[1-3]; 最终确定依据酶促腐乳^[4]的生产工艺进行后期微观结构的研究.

文献报道^[5], 决定食品性质和品质的主要成分的颗粒大小在 100 μm 以下, 食品的功能性和对消费者

的吸引力都取决于其微观结构(颗粒大小 0.1 ~ 100 μm). 腐乳有着悠久的酿造发酵历史, 研究其微观结构以及发酵过程品质的变化, 尤其是酶促腐乳的微观结构, 对于这种新型酶促腐乳的进一步推广应用有重大意义.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料

干酪乳杆菌, 雅致放射毛霉 (*Actinomucor ele-*

收稿日期: 2011-09-06; 修回日期: 2011-11-15

基金项目: 天津市科技计划支撑项目(11ZCKFNC01800); 天津科技大学科学研究基金资助项目(20100214)

作者简介: 张媛媛(1987—), 女, 天津人, 硕士研究生; 通信作者: 汪建明, 副教授, wjm-1115@126.com.

gans), 微生物实验室保藏菌种; LL-50(乳酸乳球菌乳亚种/乳酸乳球菌乳脂亚种)、酶制剂 I (Accelerzyme CPG)、酶制剂 II (Piccantase R800), 荷兰 DSM 公司上海代表处; 利民红方腐乳(对照样), 天津市利民调料有限公司。

1.1.2 试剂

N,N-亚甲基双丙稀酰胺(分析纯)、三羟甲基氨基甲烷(Tris, 生物试剂), 北京化工厂; 十二烷基磺酸钠(SDS, 分析纯)、四甲基乙二胺(TEMED, 分析纯), 加拿大 BBI 公司; 盐酸(分析纯), 天津市化学试剂三厂; 丙烯酰胺(分析纯), 天津科密欧化学试剂中心; 过硫酸铵(分析纯), 天津东方化工厂; 磷酸二氢钠(分析纯)、甘氨酸(分析纯)、柠檬酸钠(分析纯), 天津市化学试剂一厂; 磷酸氢二钠(分析纯), 天津市北方天医化学试剂厂; 戊二醛(分析纯), 北京化学试剂公司。

1.1.3 仪器设备

数显 pH 计、WSC-S 型色差计, 上海精密科学仪器有限公司; DYCZ-24D 型垂直电泳槽, 北京市六一仪器厂; 离子溅射仪、扫描电子显微镜、WSC-S 测色色差计, 日本电子株式会社(JEOL); Vector 22 型中红外光谱仪, 布鲁克仪器公司。

1.2 实验方法

1.2.1 工艺流程

酶促腐乳工艺流程^[3]如图 1 所示。

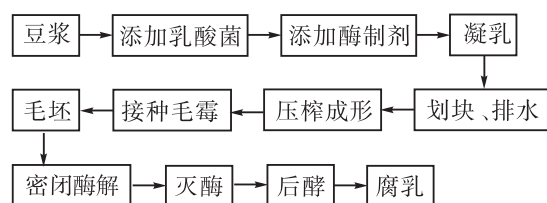


图 1 酶促腐乳的工艺流程

Fig.1 Produced enzymatic sufu from soybean milk

生产工艺条件^[4]为: 酶制剂 I 与酶制剂 II 的比例为 2:1, 总酶量 0.15 g/L, 酶解温度 50 °C, 底物质量分数(以豆浆干物质计)8.0%, pH 6.9, 酶解时间 6.4 h, 酶解完毕后在 75 °C 灭酶 20 min, 灭酶后, 放置于红曲汤料中后酵 10、20、30 d。

腐乳切成 3 cm × 3 cm × 2 cm 的坯体, 分别取白坯、毛坯、酶解 2.0 h、酶解 4.0 h、酶解 6.4 h、后酵 10 d、后酵 20 d、后酵 30 d 的腐乳, 对其进行 100 °C 封罐湿热灭菌处理, 作为后续研究的样品。

1.2.2 色差法测定

采用 WSC-S 型色差计的 $L^*a^*b^*$ 测量系统, 对白

坯、毛坯、酶解 2.0 h、酶解 4.0 h、酶解 6.4 h、后酵 10 d、后酵 20 d、后酵 30 d 的腐乳样品进行测定, 测量前充分搅拌样品, 以便测色均匀。每个样品作 3 个平行样。

按照式(1), 选取利民红方腐乳(对照样), 测定样品色差。

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2} \quad (1)$$

1.2.3 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳

A 液(丙烯酰胺储存液): 称取丙烯酰胺 29.2 g 和双丙烯酰胺 0.8 g, 加蒸馏水至 100 mL, 4 °C 冰箱保存。

B 液(4[#]分离胶缓冲液): 将 75 mL 2 mol/L 的 Tris-HCl(pH 8.8)、4 mL 10% SDS、21 mL 蒸馏水混匀, 4 °C 冰箱保存。

C 液(4[#]浓缩胶缓冲液): 将 50 mL 1 mol/L 的 Tris-HCl(pH 6.8)、4 mL 10% SDS、46 mL 蒸馏水混匀, 4 °C 冰箱保存。

电泳缓冲液: 称量 Tris 3 g、甘氨酸 14.4 g、SDS 1 g, 加蒸馏水至 1 L。

分离胶的配制(15%, 20 mL): A 液 10 mL, B 液 5 mL, 10%过硫酸铵 0.1 mL, TEMED 10 μL, H₂O 0.5 mL, 混匀, 现用现配。

浓缩胶的配制(5%, 8 mL): A 液 1.34 mL, C 液 2 mL, 10%过硫酸铵 60 μL, TEMED 10 μL, H₂O 4.6 mL, 混匀, 现用现配^[6]。

电泳: 取 5 g 腐乳样品, 与 20 mL 0.5 mol/L 的柠檬酸钠(pH 7.0)在 40 °C 混合制成悬浮液, 定容至 100 mL。浓缩胶上所加的电压是 80 V, 当染料进入分离胶后, 将电压提高至 120 V。电泳结束后, 凝胶在固定液中固定 1 h, 然后染色 5 h 后脱色, 直到蛋白质色带清晰为止。然后用凝胶成像系统进行数据采集和分析。

1.2.4 腐乳微观结构的观察

取待测腐乳样品切成薄片, 表面平整。将小片腐乳浸泡于 2.5%的戊二醛溶液中, 于 4 °C 条件下, 固定 3 h 以上。用 pH 为 7.2 的磷酸缓冲液清洗 3 次, 每次 10 min。分别用 30%、50%、70%、90%、100%乙醇梯度脱水 10 min。将样品在冷冻干燥器下迅速冷冻, 然后捶击使之自然断裂, 取小块样品粘台。采用离子溅射方法喷金, 喷金时间 5 min, 然后置于扫描电镜下观察^[7]。

1.2.5 腐乳主要成分的红外光谱分析

采用中红外光谱(FTIR)分析法^[8], 对样品进行分

析, 选取波数范围为 $650 \sim 4\,000\text{ cm}^{-1}$, 分辨率 4 cm^{-1} ; 将样品放在水平的 ATR 检测器上进行测定。

2 结果与讨论

2.1 色差法分析

色差计可以用于测量板状、粉状、粒状等物体的反射色, 从而反映物质微观品质的变化情况。本实验通过色差计测定酶促腐乳与利民红方腐乳(对照样)的颜色差值, 反映工艺改善过程中腐乳的微观品质, 结果见表 1。

表 1 酶促腐乳截面的色度值
Tab.1 Chroma value of sufu cross section

成熟过程	明度 (L^*)	红度 (a^*)	黄度 (b^*)	色差 ΔE
对照样	52.70	10.01	21.74	0.00
白坯	70.69	2.21	14.59	20.87
毛坯	67.54	1.72	18.34	17.34
酶解 2.0 h	71.03	2.21	19.52	20.04
酶解 4.0 h	71.84	1.86	20.05	20.87
酶解 6.4 h	72.71	1.34	20.03	21.87
后酵 10 d	67.28	5.84	21.03	16.98
后酵 20 d	61.39	6.99	23.80	9.87
后酵 30 d	58.53	10.02	25.54	6.96

以利民红方腐乳(对照样)的色值作为对照, 由表 1 显示, 产品的黄度随着成熟时间延长而不断升高, 原因在于白坯中的异黄酮、黄酮类物质被氧化成羟基化合物, 所以毛坯与酶解的豆腐较白坯而言略显黄; 明度不断增高, 主要原因是由于坯体中蛋白质脂肪等大分子部分降解成为稍小的仍具有反光性的分子, 且随着酶解时间增加, 这种分子增多, 反光性增强, 明度增加。在后酵成熟过程中, 明度降低, 红度升高, 这主要是随着坯体成熟时间延长, 蛋白质脂肪的酶解, 微观结构粒度变小, 对于光的反射变小, 导致产品明度降低; 而由于坯体加入到红曲腌料中, 随着浸泡时间的延长, 红度逐渐升高; 最终酶解 6.4 h 后酵 30 d 的腐乳的色差与利民红方腐乳(对照样)较为接近, 达到了预期效果。

2.2 电泳分析

分别取白坯、毛坯、酶解 2.0 h、酶解 4.0 h、酶解 6.4 h、后酵 10 d、后酵 20 d、后酵 30 d、利民红方腐乳(对照样)的样品进行处理, 结果如图 2。

由图 2 可以看出, 白坯中大豆蛋白主要由 7 S 和 11 S 球蛋白构成, 7 S 主要由 α' 、 α 、 β 这 3 个亚基构成, 相对分子质量分别为 7.6×10^4 、 7.2×10^4 、 5×10^4 , 而 11 S 由酸性亚基(相对分子质量 $3.0 \times 10^4 \sim$

4.0×10^4)和碱性亚基(相对分子质量 2.5×10^4 以下)构成。7 S 和 11 S 蛋白在经巯基乙醇处理后变性, 亚基之间的二硫键解开。由此可见, 腐乳随着成熟时间的延长, 球蛋白的水解程度增加, 7 S 和 11 S 球蛋白亚基被水解, 表现为条带变窄, 出现了大量的小分子质量物质。且随着发酵时间延长, 腐乳 11 S 碱性亚基以下的小分子质量的快速迁移肽逐渐增多。后酵 30 d 的酶促腐乳与利民红方腐乳(对照样)电泳条带, 在相对分子质量为 7.1×10^4 处有所不同, 利民红方腐乳(对照样)在此处无明显条带, 而酶促腐乳仍存在明显条带, 这说明酶促成熟腐乳中还有未分解的较大分子物质存在, 但这并不影响腐乳整体品质。这说明经过酶促后酵 30 d 的腐乳与传统利民红方腐乳(对照样)蛋白水解程度已经几乎一致。

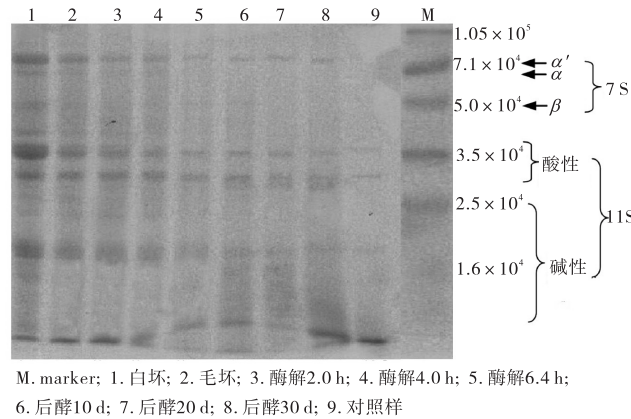


图 2 腐乳成熟过程中 SDS 凝胶电泳图
Fig.2 SDS-PAGE of sufu in maturation processing

2.3 电镜分析结果

分别取白坯、毛坯、酶解 4.0 h、酶解 6.4 h、后酵 30 d、利民红方腐乳(对照样)的样品进行处理, 通过扫描电子显微镜(SEM)对其微观结构进行观察, 结果如图 3 所示。

大豆经过浸泡、打浆后, 大部分蛋白质均匀地分散在水中, 过滤后形成稳定的蛋白质溶胶, 即生豆浆。生豆浆中的蛋白质处于天然的状态, 表面有很多亲水性的基团, 把极性的水分子吸附到蛋白质粒子周围, 形成一层厚厚的水化膜。豆浆中的蛋白质带有负电荷, 与电性相反的离子构成稳定的双电层而结成胶团, 蛋白质粒子之间便相互隔离开来。水化膜和双电层的存在, 使蛋白质粒子均匀稳定的溶解在水里, 形成以水为分散介质, 以大豆蛋白质为主要分散相的乳状液。其中, 蛋白质分子呈卷曲的紧密结构, 具有相对的稳定性。加热时, 大豆蛋白质的肽链受过热的热振荡, 保持其空间结构的次级键(主要是氢键)受到破

坏,蛋白质分子内部的有序排列被解除,从卷曲状态舒展开来,暴露出内部的疏水基团,使卷曲结构外的亲水基团相对减少。同时,蛋白质分子吸收热能,运动加剧,分子间的接触、交联机会增加,通过疏水键、二硫键的结合,形成了中间留有空隙的立体网络结构,即凝胶态豆乳。盐类凝固剂的加入产生了静电作用,破坏了蛋白质表面的双电层,促使蛋白质胶粒进一步聚焦,凝固剂的镁离子或钙离子结合,发生胶凝作用^[9-10]。借助乳酸菌产酸和钙桥,大豆蛋白相互联结,形成致密稳定的网络结构,即豆腐白坯,如图3(a)所示。

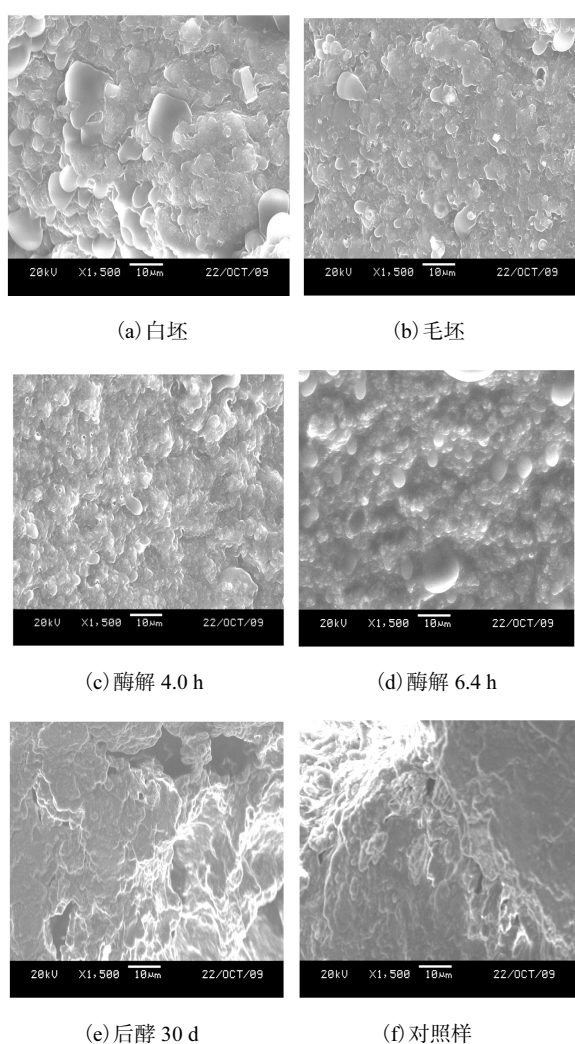


图3 发酵过程中腐乳内部微观结构图

Fig.3 Microstructure of sufu accelerated by enzyme

将白坯接种毛霉,28℃培养、凉花后得到毛坯。在毛霉生长过程中,同时分泌蛋白酶,使部分蛋白质降解为小分子物质,为菌体的继续生长繁殖提供必要的养分。然而,较低活力的毛霉蛋白酶对蛋白质的水解有限,因此比较图3(a)和图3(b),毛坯内部

的微细结构没有造成显著破坏。

对毛坯搓毛后进行水解,由于水解作用,腐乳内部大的胶粒状蛋白质聚集体被降解成小聚集体。酶解4.0h后,虽然蛋白质仍呈胶粒状态聚集在一起,但是,蛋白质凝胶结构的断裂及聚集体的大小都已经发生了显著变化;酶解6.4h后,蛋白质胶粒明显变小,已经出现孔洞,空洞处原来由水分所占据。内部结构如图3(c)和图3(d)所示。

后酵30d的酶促腐乳,由于水解时间的延长,坯体中粒状的胶体蛋白结构几乎完全消失,水解成为平滑均一的形态;利民红方腐乳(对照样)的微观结构,其蛋白质胶束断裂聚集情况与后酵30d的几乎一致,如图3(e)和图3(f)所示,可以断定,酶促成熟腐乳与传统利民红方腐乳(对照样)的微观结构的一致性,证明酶促熟达到了预期实验要求效果。

2.4 总体组分

分别对白坯、毛坯、酶解2.0h、酶解6.4h、后酵30d、利民红方腐乳(对照样)的样品进行分析,采用中红外光谱对腐乳的成熟(酶解)过程进行跟踪检测,通过研究腐乳在成熟过程中的组分变化,检测腐乳成熟度,结果如图4、图5所示。

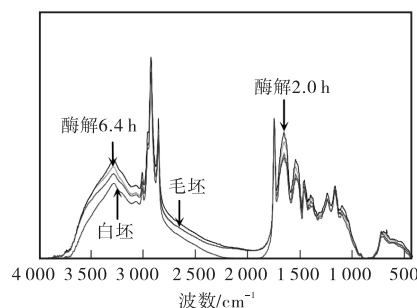


图4 酶促腐乳水解过程中红外光谱图

Fig.4 Normalized mid-infrared spectra evolution during enzyme acceleration maturation

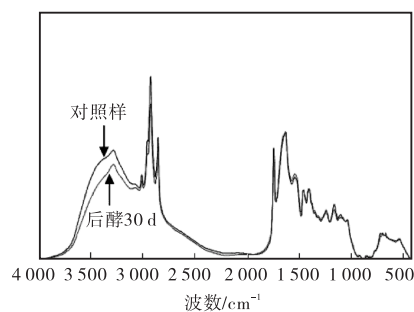


图5 酶促腐乳与利民红方腐乳中红外吸收峰比较

Fig.5 Enzyme modify sufu and traditional sufu of innormalized mid-infrared spectra evolution

根据文献^[10]报道, 701 cm^{-1} 常用来作为芳香环的吸收峰, 由图 4 可见, 在酶解过程中有缓慢上升的趋势; $1\,163\text{ cm}^{-1}$ 代表腐乳中双糖和单糖总量的变化, 4 条线几乎重合, 表明双糖和单糖含量无显著变化, 这是因为腐乳中碳水化合物含量较少的缘故; $1\,457\text{ cm}^{-1}$ 代表有机酸总量的变化, 有一直升高的趋势; $1\,652\text{ cm}^{-1}$ 代表 Amide I (Amide I 区间主要包含了 C=O 和 C—N 的伸缩振动, 对于蛋白质二级结构的变化非常敏感), $1\,539\text{ cm}^{-1}$ 代表 Amide II, 在这两个波段氨基类化合物含量一直在不断增加, 是由蛋白的不断降解造成的, 可以看到在腐乳被酶解过程中, 蛋白降解程度增大, 这可能是由于随着酶解时间的延长, 在酶制剂的作用下, 越来越多的短肽产生; $2\,851\text{ cm}^{-1}/2\,920\text{ cm}^{-1}$ 代表游离脂肪酸含量的变化, 可见腐乳的脂肪也是在不断降解; $3\,281\text{ cm}^{-1}$ 代表—OH 类物质, 可以看出, —OH 含量不断增多。

由图 5 可以看出, 后酵 30 d 的酶促腐乳与利民红方腐乳(对照样)的特征吸收峰基本重合。这说明, 后酵 30 d 的酶促腐乳与利民红方腐乳(对照样)的总组成基本相同, 腐乳成熟度基本一致。可以确定, 酶促成熟腐乳达到了预期加速成熟的效果。

3 结 论

酶促腐乳在成熟过程中, 色度随着成熟时间的延长而不断降低, 最终接近利民红方腐乳(对照样)颜色; 电泳分析表明, 酶促腐乳在成熟过程中, 7 S 和 11 S 的球蛋白的亚基被水解, 表现在电泳条带变窄, 出现了大量的小分子质量物质; 扫描电镜分析表明, 随着成熟时间延长, 腐乳内部微观结构不断变化, 坯体中胶粒状蛋白质消失, 蛋白质完全被水解, 形成平

滑均一的形态; 经产品的中红外扫描分析, 确定酶促腐乳的总组成与利民红方腐乳(对照样)基本相同。通过以上分析可知, 最终酶促成熟腐乳与利民红方腐乳(对照样)基本相似, 证明通过加酶促进腐乳快速成熟的方法是可行的。

参考文献:

- [1] 尹喆, 汪建明, 贾磊. 腐乳粉中挥发性风味物质分析[J]. 中国食品添加剂, 2010(S1): 107-110.
- [2] Wang Jianming, Wan Shoupeng, Gu Jinying. Application of protease to accelerate sufu ripening[C]// Bioinformatics and Biomedical Engineering (iCBBE), 2010 4th International Conference. Piscataway: IEEE, 2010: 1-4.
- [3] 汪建明, 贾磊, 张媛媛. 基于酶促降解的腐乳酱后熟过程的研究[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(4): 56-61.
- [4] 曹瑞博. 酶促成熟腐乳及其品质的研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2010.
- [5] Aguilera J M. Why Food Microstructure[J]. Journal of Food Engineering, 2005, 67(1/2): 3-11.
- [6] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2008.
- [7] 励建荣, 苏虎. 酸奶凝胶的组织特性与物理特性[J]. 食品工业科技, 2004, 25(4): 157-160.
- [8] Karoui R, Mazerolles G, Bosset J O, et al. Utilization of mid-infrared spectroscopy for determination of the geographic origin of Gruyère PDO and L'Etivaz PDO Swiss cheeses[J]. Food Chemistry, 2007, 105(2): 847-854.
- [9] 程闰达, 张淑茹. 关于豆腐黄膜生成机理的探讨[J]. 中国酿造, 1998(3): 6-9.
- [10] 刘志胜, 李里特, 辰巳英三. 豆腐盐类凝固剂的凝固特性与作用机理的研究[J]. 中国粮油学报, 2000(3): 39-43.

责任编辑: 郎婧