

大豆高压短时蒸煮显著提高酱油二次沉淀蛋白降解率

胡锋, 区晓鸣, 周华林

(广东美味鲜调味食品有限公司, 广东中山 528401)

摘要: 酱油二次沉淀严重影响其外观质量和商品价值。本研究以大豆低压长时(0.24 MPa/18 min)蒸煮工艺为对照, 采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和基质辅助激光解吸电离串联飞行时间质谱(MALDI-TOF/TOF MS)等方法研究了大豆高压短时(0.54 MPa/14 min)蒸煮工艺对酱油二次沉淀蛋白和二次沉淀生成量的影响。实验结果表明大豆球蛋白G4中的B₃亚基(20 ku)和G1中的A_{1a}亚基(35 ku)是酱油二次沉淀蛋白的主要成分, 采用大豆高压短时蒸煮工艺制备的酱油(样品)比其对照酱油中B₃亚基减少65.38%, 样品中A_{1a}亚基被完全降解; 样品中二次沉淀含量比其对照减少72.69%。同时, 采用大豆高压短时蒸煮工艺可提高酱油原料蛋白质利用率9.37%、氨基酸态氮14.14%、总氮10.74%、总糖22.36%、还原糖27.87%和无盐固形物12.38% ($p < 0.05$)。因此, 采用大豆高压短时蒸煮工艺可显著提高酱油二次沉淀蛋白降解率, 减少酱油二次沉淀生成量和提高酱油滋味物质含量, 同时改善酱油外观质量和滋味。

关键词: 酱油; 二次沉淀; 高压短时蒸煮; 大豆; 蛋白质

文章编号: 1673-9078(2020)08-220-224

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.8.0625

High-pressure Short-duration Steaming of Soybean Significantly Enhances the Degradation Rate and Reduces the Content of Secondary Precipitates of Soy Sauce

HU Feng, OU Xiao-ming, ZHOU Hua-lin

(Guangdong Meiweixian Flavoring Foods Co., Ltd., Zhongshan 528401, China)

Abstract: Secondary precipitates affect the appearance and commercial value of soy sauce adversely. Therefore, to investigate ways to minimize secondary precipitates in soy sauce, the content of secondary precipitate protein and the amount of secondary precipitates in soy sauce made from soybean prepared using high-pressure and short-duration steaming (0.54 MPa/14 min) were compared with the same parameters in soy sauce made from soybean prepared using low-pressure and long-duration steaming (0.24 MPa/18 min) as a control. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight tandem mass spectrometry were used to analyze the secondary precipitate proteins and secondary precipitates in the soy sauces. The B₃ subunit of glycinin G4 (20 ku) and the A_{1a} subunit of glycinin G1 (35 ku) were the main protein components of the secondary precipitates. The B₃ subunit content in soy sauce prepared using the soybean steamed at high pressure for a short time (hereinafter, the sample) was 65.38% lower than that of the control, whereas the A_{1a} subunit in the sample was completely degraded. The secondary precipitate content in the sample was also reduced, by 72.69% relative to the control level. Additionally, the application of high pressure and a short time to steam the soybean enhanced the rate of utilization of proteins in the raw materials by 9.37% and led to the following increases in the soy sauce: amino acid nitrogen: 14.14%; total

引文格式:

胡锋, 区晓鸣, 周华林. 大豆高压短时蒸煮显著提高酱油二次沉淀蛋白降解率[J]. 现代食品科技, 2020, 36(8): 220-224

HU Feng, OU Xiao-ming, ZHOU Hua-lin. High-pressure short-duration steaming of soybean significantly enhances the degradation rate and reduces the content of secondary precipitates of soy sauce [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(8): 220-224

收稿日期: 2020-06-25

基金项目: 中山市重大科技专项项目(2018A1007)

通讯作者: 胡锋(1979-), 男, 高级工程师, 研究方向: 酱油、酱等传统调味品的研发

nitrogen: 10.74%; total sugars: 22.36%; reducing sugars: 27.87%; and salt-free solids: 12.38% ($p < 0.05$). Therefore, the adoption of high pressure and a short duration for the soybean steaming process can significantly enhance the rate of secondary precipitate protein degradation, reduce the content of secondary precipitates, and increase the content of taste compounds in soy sauce, leading to simultaneous improvements in the appearance and taste of the product.

Key words: soy sauce; secondary precipitate; high-pressure short-duration steaming; soybean; protein

酱油是以大豆/豆粕、小麦、淀粉、食盐和水等为原料经制曲、发酵、过滤、杀菌和包装等工艺制作而成的一种传统调味品^[1]。酱油起源于我国,有超过 2500 年的历史,目前已成为中国、日本、韩国和东南亚等国日常烹饪、餐饮行业和食品工业必不可少的调味品。由于酱油鲜味突出、风味独特及其显著的抗氧化、抑制炎症、去除毒素和免疫调节等功能^[2-4],酱油也越来越受到西方消费者的喜爱。但酱油在储存和销售过程中在瓶底形成的一层泥土状二次沉淀严重影响其外观质量和商业价值^[5],因此酱油二次沉淀去除技术已成为酱油行业发展的技术瓶颈。

前期研究证明大豆球蛋白 G4 中的 B₃ 亚基(20 ku)和 G1 中的 A_{1a} 亚基(35 ku)是酱油二次沉淀蛋白的主要成分和导致酱油二次沉淀形成的诱导性因素^[6]。杨明泉等^[7]在酱油制醪阶段添加嗜盐片球菌延长了酱油二次沉淀出现时间 15 天,所制备酱油储存至 60 天时比其对照二次沉淀减少 89.12%。嗜盐片球菌减少酱油二次沉淀的可能机制为嗜盐片球菌能够在醪液中大量繁殖并成片状存在,在醪液加热杀菌过程中二次沉淀蛋白和微小颗粒被絮凝状的嗜盐片球菌吸附并形成更大的絮凝物而沉淀。此外,硅藻土过滤法和膜过滤法也被证实是有效减少酱油沉淀的方法^[8]。上述方法虽然可有效减少二次沉淀,但存在浪费蛋白资源(二次沉淀蛋白)、设备及其运行费用高等缺陷。因此,开发能够同时减少酱油二次沉淀和充分利用原料蛋白资源的酱油二次沉淀去除工艺(或技术)具有重要意义。

文献报道大豆蒸煮压力和时间对大豆蛋白适度变性和可降解性具有显著影响^[9],课题组在前期大量预实验的基础上证实大豆高压短时(0.54 MPa/14 min)蒸煮工艺能够显著减少酱油二次沉淀的形成并提高原料蛋白利用率。在此基础上本研究以常规的大豆低压长时(0.24 MPa/18 min)蒸煮工艺为对照,详细研究了大豆高压短时(0.54 MPa/14 min)蒸煮工艺对酱油二次沉淀蛋白、二次沉淀形成量及大曲和酱油理化指标的影响。

1 材料与方法

1.1 菌种和原料

米曲霉 3.042 由广东美味鲜调味食品有限公司技术中心提供。黄豆、面粉、麸皮、食盐分别购于光辉农产品有限公司(黑龙江省林口县)、广州市南方面粉股份有限公司(广东省广州市)和中山市盐业总公司。福林酚、酪蛋白、三氯乙酸、碘化钾、碘、甲醛、盐酸、硫酸、硼酸、硫酸铜、葡萄糖、氢氧化钠、硝酸银、磷酸氢二钠等均为分析纯,购自中国医药集团上海化学试剂公司。蛋白质标准品 IV 和蛋白质电泳预制胶均购于生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 主要仪器和设备

ULTS1368 超低温冰箱:赛默飞世尔科技(中国)有限公司;Kjeitec2300 凯氏定氮仪:瑞典 FOSS 分析仪器有限公司;5415D 高速离心机:德国艾本德股份公司;WFZ UV-2100 紫外分光光度计:尤尼柯(上海)仪器有限公司;FE 20 pH 计:梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;MJ-70-I 培养箱:上海恒一科学仪器有限公司;NK 式旋转蒸煮锅:温州市商泰轻工机械有限公司;DZF-6020 真空干燥箱:绍兴市苏珀仪器有限公司;60 m³ 玻璃钢发酵罐:温州市伯泰机械科技有限公司;Mini-PROTEAN[®] Tetra System 垂直电泳, BIO-RAD 美国;JEDA 电泳扫描仪(JD-801),中国;高效液相色谱仪及 PICO.TAG 色谱柱, Waters 美国;基质辅助激光解吸电离串联飞行时间质谱(MALDI-TOF/TOF MS), Bruker-Daltonics 德国。

1.3 大曲和酱油制备

大豆用自来水清洗三次后浸泡 8 h,浸泡后的大豆转入 NK 蒸煮锅。在前期预实验基础上,以酱油二次沉淀生成量为指标,选择最优蒸煮条件为(高压短时蒸煮):进汽阀压力 0.54 MPa,开排气阀排除锅内冷蒸汽,待排气阀有可见的蒸汽排出时关闭排气阀,同时旋转蒸煮锅,待蒸煮锅内压力升到 0.15 MPa 时(11 min)关闭进汽阀,保压 3 min。打开蒸煮锅排气阀和排水阀,直至锅内的压力降至 0 MPa 即可出锅。其他条件不变的情况下,进汽阀压力改为 0.24 MPa 对大豆进行升温,锅内压力升到 0.15 MPa 约需 15 min,保压 3 min,此过程即为大豆低压长时蒸煮工艺(对照)。蒸煮大豆降温至 40 °C 时与接种了米曲霉孢子的面粉

充分混合:大豆(干):面粉=1:0.4,大豆面粉混合物接种孢子数约 1×10^6 孢子/g混合物。大曲培养条件为:温度 $30 \sim 35^\circ\text{C}$ 、相对湿度 $85\% \sim 90\%$ 、培养44 h,培养至10 h和30 h进行翻曲。至大曲表面覆盖一层浅黄绿色孢子时即为大曲成熟。

两种成熟大曲分别与盐水(22%, m/V ; 大曲:盐水=1:2.15, m/V)混合后泵入玻璃钢发酵罐(60 m^3),按照传统“日晒夜露”工艺进行发酵。发酵结束后取样品(大豆高压短时蒸煮)和对照发酵液(大豆低压长时蒸煮)过定性滤纸后置于 4°C 冰箱保存。

1.4 大曲蛋白酶酶活分析

采用酪蛋白-福林酚法测定两种成熟大曲的中性和酸性蛋白酶酶活,具体方法参照Gao等方法^[10]。

1.5 酱油中二次沉淀制备及二次沉淀蛋白的分离和鉴定

采用低温-超声法快速制备两种酱油发酵液中的“潜在二次沉淀”^[11]。收集两种酱油二次沉淀,冷冻干燥后溶解于含有8 M尿素、60 mM DTT、50 mM Tris和1% SDS的水溶液中,并调整溶液蛋白质含量至1 mg/mL。采用SDS-PAGE法分离酱油二次沉淀蛋白,采用MALDI-TOF/TOF MS法对所分离的蛋白质进行鉴定,具体方法参照Gao等方法^[6]。

1.6 大豆高温短时蒸煮对酱油理化指标的影响

氨基酸态氮和总氮的测定分别参照GB/T 5009.40-2003和微量凯氏定氮法GB 5009.5-85法。蛋白质利用率为:酱油中总氮含量/原料中总氮含量 $\times 100\%$ 。NaCl含量的测定参照GB/T 5009.39-2003法。无盐固形物含量为总固形物含量减去NaCl含量,具体测定参照GB 18186-2000法。还原糖的测定参照GB/T 5009.7-2003法。总糖的测定方法如下:吸取样品2~10 mL(控制样品总糖含量 $1 \sim 2\text{ g/L}$)于500 mL容量瓶中,加水50 mL和6 M盐酸5 mL, $68 \sim 70^\circ\text{C}$ 水浴加热15 min。冷却后加入甲基红指示液2滴,用200 g/L的NaOH溶液滴定至红色消失(近中性)。加水定容、摇匀、冷却后备用。其他步骤参照还原糖测定方法GB/T 5009.7-2003。

1.7 统计分析

所有实验数据均测定3次,运用SPSS 15软件(SPSS Inc., 美国)计算其平均值、标准偏差和并行数据之间的显著性差异($p < 0.05$)。

2 结果与讨论

2.1 大豆高压短时蒸煮对大曲理化性质的影响



图1 高压短时蒸煮对大豆及大曲的影响

Fig.1 Effects of high pressure and short time steaming on soybean and koji

由图1可知,高压短时法蒸煮的大豆色泽光亮,大豆颗粒完整,捏压时有弹性,有典型的豆香味,黄豆蒸煮适度。低压长时法蒸煮的大豆色泽较浅,部分大豆出现烂、碎现象,颗粒不完整,捏压时有粘手感,豆香味较高压短时法蒸煮大豆香气弱。与采用低压长时法蒸煮大豆制备的大曲相比(7~44 h),采用高压短时法蒸煮大豆制备的大曲,曲霉萌发速度快,菌丝茂密、旺盛,成熟大曲色泽呈现典型的浅黄绿色,且翻曲过程中不易造成碎曲。成曲中性和酸性蛋白酶酶活分析结果显示,采用高压短时法蒸煮大豆所制备的大曲其中性和酸性蛋白酶酶活分别为1596 U/g干曲和357 U/g干曲,而采用低压长时法蒸煮大豆所制备的大曲其中性和酸性蛋白酶酶活分别为1098 U/g干曲和293 U/g干曲,前者中性和酸性蛋白酶分别比后者提高45.36%和21.84%。上述结果说明采用高压短时法蒸煮大豆可以显著提高大曲质量和酶活。高献礼^[12]研究结果表明大豆蒸煮时间和温度对米曲霉大曲酸性和中性

蛋白酶有显著影响。大豆蒸煮时间过短大豆易形成“N性蛋白(非变性蛋白)”,不利于微生物生长产酶;大豆蒸煮时间过长可使大豆蛋白过度变性,同时使大豆中的植酸钙镁变成植酸钙镁酸,后者能够抑制曲霉的生长。同时,过度变性的大豆造成大曲变粘,易污染杂菌,杂菌的生长会进一步抑制米曲霉的生长和产酶。此外, Kusumah 等^[13]指出采用高压蒸煮大豆制备 Tempe (发酵豆制品),可提高大曲抗菌能力和产品抗氧化能力。与传统水煮大豆法制曲相比,高压蒸煮大豆可使更多大豆蛋白适度变性和降解,有利于曲霉更好的利用其中的蛋白质、还原糖等营养物质,有利于曲霉快速繁殖从而抑制杂菌生长和分泌更多的水解酶类(如蛋白酶和淀粉酶),进而提高 Tempe 终产品中抗氧化物质(氨基酸、Maillard 反应产物、异黄酮等)的含量和抗氧化能力^[4]。结合前期和本实验研究结果可知,大豆蒸煮方式对大豆和大曲品质具有重要影响,高压(温)短时蒸煮可提高蒸煮大豆和大曲品质。

2.2 大豆高压短时蒸煮对酱油二次沉淀及二次沉淀蛋白的影响

由图 2a 可知,样品和对照蛋白质图谱具有明显的差异,样品仅有一条分子量约为 20 ku 的条带,而对照有两条分子量约为 20 ku 和 35 ku 的条带,经 MALDI-TOF/TOF MS 鉴定,两条条带分别为大豆 11 S 球蛋白 B₃ 亚基和 A_{1a} 亚基。前期研究结果证实上述两种亚基是酱油二次沉淀蛋白的主要成分(>95%)^[6],这与本研究结果基本一致。上述两种亚基的平均疏水值($H\Phi_{avg}$)显著高于酱油上清中可溶性蛋白的平均疏水值,而这两种亚基二级结构中的 β -折叠和无规则卷曲含量显著低于酱油上清中可溶性蛋白质中两种二级结构含量,大豆蛋白质中的 β -折叠和无规则卷曲含量与其水溶性高度正相关。上述两种亚基较高的平均疏水值及较低的 β -折叠和无规则卷曲含量是其难溶于水而导致产生酱油二次沉淀的关键原因^[6]。

由图 2a 及电泳扫描仪分析可知,样品中大豆 11 S 球蛋白 B₃ 亚基含量比其对照减少 65.38%,而样品中的 A_{1a} 亚基则完全降解。由图 2b 及二次沉淀含量分析可知,样品和对照中二次沉淀形成量分别为 0.59 g/L 和 2.16 g/L,样品中二次沉淀含量减少 72.69%。由此可知,酱油中二次沉淀蛋白的降解可显著减少酱油二次沉淀蛋白的形成,这与本课题组前期研究结果一致^[5,6]。Ling 等^[14]研究了大豆挤压预处理对酱油大曲和酱油理化性质的影响,结果表明原料挤压处理可使米曲霉生长速度加快,大曲中蛋白酶、淀粉酶、淀粉酶、

谷氨酰胺酶、 α -半乳糖苷酶和脂肪酶活性显著提高,由于上述酶活的提高进而使酱油中蛋白质和淀粉得到更充分的降解,终产品酱油中的总氮、氨基酸态氮、总糖和还原糖含量均显著提高。Wani 等^[15]研究了高温短时挤压对鹰嘴豆淀粉理化性质和流变特性的影响,结果表明高温短时挤压可显著减少鹰嘴豆淀粉中的直连淀粉含量、降低原料粘度,而显著提高淀粉膨化度和可溶性。综合上述实验结果和文献报道可知,大豆高压短时蒸煮工艺提高酱油二次沉淀蛋白降解率和减少酱油二次沉淀的可能原因为:(1)高压短时蒸煮显著减少了大豆中的“N性蛋白”和过度变性蛋白,即提高了大豆中适度变性蛋白的含量,这为其高效降解奠定了基础^[9]。(2)高压短时蒸煮可使大豆中的淀粉适度糊化和降解,同时减少植酸钙镁酸的生成,这有利于米曲霉的生长繁殖和分泌各种水解酶,为大豆蛋白(包括酱油二次沉淀蛋白)降解提供“驱动力”。

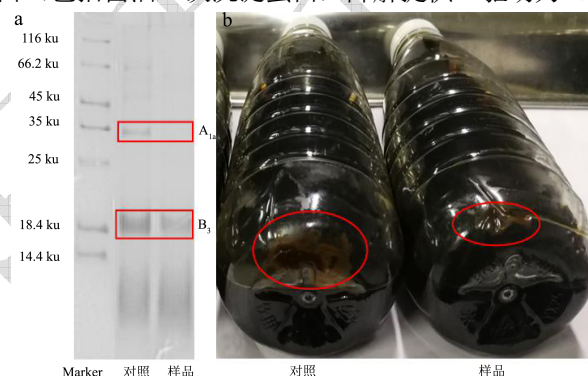


图2 大豆高压短时蒸煮对酱油二次沉淀蛋白及二次沉淀的影响

Fig.2 Effects of high pressure and short time steaming of soybean on the secondary precipitate proteins and the secondary precipitate of soy sauce

2.3 大豆高压短时蒸煮对酱油理化指标的影响

由表 1 可知,大豆高压短时蒸煮显著提高了酱油氨基酸态氮(14.14%)、总氮(10.74%)、蛋白质利用率(9.37%)、总糖(22.36%)、还原糖(27.87%)和无盐固形物(12.38%)含量($p<0.05$),但其对酱油 NaCl 和总酸含量无显著影响($p>0.05$)。酱油是咸、鲜突出,咸、鲜、甜、酸等诸味协调的一种调味品^[16]。咸味主要来源于发酵过程中添加的 NaCl;其鲜味主要来源于蛋白质降解产物谷氨酸、天门冬氨酸及鲜味肽和微生物降解产生的核苷酸^[17];其甜味主要来源于淀粉降解产生的葡萄糖和果糖及蛋白质降解产生的甜味氨基酸;酸味主要来源于酱油发酵过程中耐盐乳酸菌产生的乳酸、醋酸等有机酸和呈酸味的氨基酸等^[18]。大豆高压短时蒸煮工艺不但可显著提高酱油二次沉淀蛋

白降解率和减少酱油二次沉淀的形成，改善酱油外观品质；同时也可显著提高酱油呈味物质含量，进而可

改善酱油滋味。因此，大豆高压短时蒸煮工艺在酱油生产中具有重要的应用价值。

表 1 大豆高压短时蒸煮对酱油理化指标的影响

Table 1 Effects of high pressure and short time steaming of soybean on the physiochemical indices of soy sauce

	氨基酸态氮 /(g/100 mL)	总氮 /(g/100 mL)	蛋白质利 用率/%	总糖 /(g/L)	还原糖 /(g/L)	NaCl /(g/100 mL)	无盐固形物 /(g/100 mL)	总酸
对照	0.99±0.04 ^b	1.49±0.05 ^b	82.31±3.28 ^b	48.43±2.38 ^b	36.21±1.68 ^b	16.50±0.39 ^a	15.59±0.58 ^b	1.25±0.05 ^a
样品	1.13±0.04 ^a	1.65±0.06 ^a	90.02±3.15 ^a	59.26±2.50 ^a	46.30±2.10 ^a	16.25±0.36 ^a	17.52±0.65 ^a	1.32±0.06 ^a

注：同一列数据标注不同字母表示数值之间存在显著差异（ $p<0.05$ ）。

3 结论

综上，大豆高温短时蒸煮（0.54 MPa/14 min）不但可显著提高酱油二次沉淀蛋白降解率，进而显著减少酱油二次沉淀生成量，改善酱油外观品质；而且可显著提高酱油呈味物质含量，进而改善酱油滋味。大豆高温短时蒸煮显著提高了蒸煮大豆中适度变性蛋白含量，促进了淀粉适度变性和降解，减少了抑制米曲霉生长的植酸钙镁酸生成，进而促进了米曲霉的生长和水解酶的分泌。这是大豆高温短时蒸煮工艺显著提高酱油二次沉淀蛋白降解率、减少酱油二次沉淀生成量及提高其呈味物质含量的原因。课题组下一步将开展大豆高温短时蒸煮工艺对酱油香气物质影响的研究。

参考文献

[1] Gao X L, Liu E M, Zhang J K, et al. Accelerating aroma maturation of raw soy sauce using low intensity sonication [J]. Food Chemistry, 2020, 329: 127118

[2] Li Y, Teng Z, Parkin K L, et al. Identification of bioactive metabolites dihydrocanadensolide, kojic acid, and vanillic acid in soy sauce using GC-MS, NMR spectroscopy, and single-crystal xray diffraction [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62: 8392-8401

[3] Kobayashi M. Immunological functions of soy sauce: hypoallergenicity and antiallergic activity of soy sauce [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2005, 100: 144-151

[4] Gao X L, Liu E M, Zhang J K, et al. Effects of sonication during moromi fermentation on antioxidant activities of compounds in raw soy sauce [J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 116: 108605

[5] 杨明泉,高献礼,刘占,等.国产酱油二次沉淀研究进展和展

望[J].食品与发酵工业,2019,45:250-255

YANG Ming-quan, GAO Xian-li, LIU Zhan, et al. Research prospect of secondary precipitation in Chinese soy sauce [J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45: 250-255

[6] Gao X L, Sun P F, Lu J, et al. Characterization and formation mechanism of proteins in the secondary precipitate of soy sauce [J]. European Food Research and Technology, 2013, 237: 647-654

[7] 杨明泉,滑欢欢,梁亮,等.嗜盐片球菌在减少酱油二次沉淀和生物胺中的应用[J].现代食品科技,2019,35:1-6

YANG Ming-quan, HUA Huan-huan, LIANG Liang, et al. Application of *Pediococcus halophilus* on removing secondary precipitate and biogenic amine of soy sauce [J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35: 1-6

[8] Guo H, Li Z H, Huang J, et al. Microfiltration of soy sauce: efficiency, resistance and fouling mechanism at different operating stages [J]. Separation and Purification Technology, 2020, 240: 116656

[9] 李正邦.关于利用 NK 蒸汽锅的高压短时间蒸煮法的研究 [J].调味品科技,1979,2:47-54

LI Zheng-bang. Study on high pressure short time steaming with NK tank [J]. Condiment Technologies, 1979, 2: 47-54

[10] Gao X L, Zhang J K, Liu E M, et al. Enhancing the taste of raw soy sauce using low intensity ultrasound treatment during moromi fermentation [J]. Food Chemistry, 2019, 298: 124928

[11] 高献礼,孙鹏飞,闫爽,等.酱油二次沉淀制备方法的对比[J].食品与发酵工业,2013,39(1):46-50

GAO Xian-li, SUN Peng-fei, YAN Shuang, et al. A comparative study on the different methods for secondary precipitates preparation of soy sauce [J]. Food and Fermentation Industries, 2013, 39(1): 46-50

（下转第 280 页）