



引用格式:胡永金,任淑娣,王知荣,等. 毛霉 40899 和毛霉 M/T 混合发酵腐乳的研究[J]. 轻工学报,2019,34(1):1-10.

中图分类号:TS214.2 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2019.01.001

文章编号:2096-1553(2019)01-0001-10

毛霉 40899 和毛霉 M/T 混合发酵腐乳的研究

Study on Sufu fermented by *Mucor* 40899 and *Mucor* M/T

胡永金¹,任淑娣¹,王知荣²,柴建国²,许佳威¹,李世俊¹,
薛桥丽³

HU Yongjin¹, REN Shudi¹, WANG Zhirong², CHAI Jianguo², XU Jiawei¹,
LI Shijun¹, XUE Qiaoli³

1. 云南农业大学 食品科学技术学院,云南 昆明 650201;

2. 云南羊泉生物科技股份有限公司,云南 牟定 675500;

3. 云南农业大学 学报编辑部,云南 昆明 650201

1. College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. Yunnan Yangquan Biotechnology Co., Ltd., Mouding 675500, China;

3. Journal Editorial Department, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

关键词:

腐乳;毛霉;混合菌种
发酵;蛋白酶活力

Key words:

Sufu; *Mucor*; mixed
fermentation; protease
activity

摘要:从腐乳毛坯中分离得到毛霉 M/T,以毛霉 40899 和毛霉 M/T 为混合发酵剂,采用单因素法和响应面法研究混合菌种发酵腐乳的前发酵工艺,并在最优前发酵条件下考察混合菌种发酵过程中腐乳的氨基酸态氮、质构特性和色度的变化,得出如下结果:经鉴定,毛霉 M/T 为放射毛霉属;腐乳前发酵最优条件为发酵时间 60 h,毛霉 40899 与毛霉 M/T 质量比 1:1,乳酸 pH 值 3.5. 在此条件下,腐乳的蛋白酶活力达到最大值 48.015 U/mL. 腐乳后发酵至 30 d 时,腐乳中氨基酸态氮含量为 0.53 g/(100 g),达到腐乳行业标准中的成熟标准. 腐乳成熟时的硬度、黏附性、弹性等质构特性良好,色差值与市售成熟腐乳接近.

收稿日期:2018-07-12

基金项目:云南省科技创新强省专项项目(2016AB016)

作者简介:胡永金(1971—),男,云南省永胜县人,云南农业大学教授,博士,主要研究方向为食品微生物、功能性食品与生物技术.

通信作者:李世俊(1971—),男,云南省永胜县人,云南农业大学教授,博士,主要研究方向为食品科学与工程.

Abstract: *Mucor* M/T was isolated from sufu pehtze. Using *Mucor* 40899 and *Mucor* M/T as mixed starters, the pre-fermentation process of Sufu was studied through single factors and response surface optimization method. Then, the changes of amino acid nitrogen, texture and chromaticity of Sufu fermented by mixed strains were studied under the optimal pre-fermentation conditions. The results showed that *Mucor* M/T was identified as the *Actinomucor*. The optimal pre-fermentation conditions were as follows: fermentation time was 60 h, strain quality ratio of *Mucor* 40899 and *Mucor* M/T was 1 : 1, pH value was 3.5. Under the optimal conditions, the protease activity reached 48.015 U/mL. After post-fermentation of 30 d, the content of amino acid nitrogen in Sufu was 0.53 g/(100 g), which met the mature standard in the industry standard of Sufu. The texture, adhesion and elasticity of Sufu were good. The color difference value was close to that of commercially mature fermented Sufu.

0 引言

腐乳是我国传统的大豆发酵制品,它以大豆为基本原料,利用多种微生物对其进行协同发酵而制成,风味独特,质地鲜美,营养丰富^[1-3],因而受到全球消费者的喜爱. 目前我国的腐乳生产仍以传统工艺为主,由于不同的菌种在发酵过程中所分泌的酶系不同,现腐乳的发酵生产存在周期长、受季节限制、效率低、产品品质和风味稳定性难以控制等问题.

腐乳的发酵是微生物及其所产生的酶系不断作用的过程,核心工艺是蛋白酶系将蛋白质分解成多肽、氨基酸等小分子化合物,以及风味物质的形成^[4-8]. 为了缩短生产周期,提高产品质量,筛选出高产且蛋白酶系齐全的发酶菌株是腐乳生产工艺的关键. 赵玉莲等^[9]从各地腐乳样品中分离出一些微生物,并对产酶情况进行相关研究发现,不同厂家所选用的菌种不同,产酶类别和含量不同,所需培养周期也不同. M. Frans 等^[10]研究了食盐对腐乳中蛋白质和脂肪水解的影响发现,低盐条件(质量分数 8%)下腐乳成熟时间缩短至 40 d. B. Z. Han 等^[11]利用少孢根霉发酵腐乳,显著改善了产品风味. 目前我国工业生产多采用纯菌种发酵腐乳,然而单一菌种发酵存在酶系不全,风味单调等问题^[12, 13]. 鉴于此,本研究拟对毛霉 40899 和毛霉 M/T 混合发酵腐乳的前发酵工艺进行优化,

并对后发酵过程中氨基酸态氮、质构特性及色度进行测定,以期品质优良的腐乳发酵剂的开发提供一定的理论依据.

1 材料与amp;方法

1.1 材料与设备

1.1.1 实验材料 食品原料:新鲜豆腐、润丰油腐乳、食盐、白酒、辣椒粉、花椒粉、胡椒粉、植物油,均购自昆明沃尔玛超市.

实验试剂:乳酸酚棉兰染液、福林酚,索莱宝生物科技有限公司产;干酪素、酚酞、碳酸钠、氢氧化钠、磷酸氢二钠、氯化钠、磷酸二氢钠,天津市风船化学试剂科技有限公司产;乳酸、三氯乙酸,广东光华科技股份有限公司产;甲醛溶液,成都市科隆化学品有限公司产. 以上试剂均为分析纯. 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(生化试剂 BR),青岛高科园海博生物科技有限公司产.

菌种:毛霉 40899,购于中国工业微生物菌种保藏管理中心;菌株 M/T,分离自天和腐乳毛坯,云南农业大学食品科技学院实验室保存.

1.1.2 实验设备 HWS24 型恒温水浴锅,上海一恒科学仪器有限公司产;T6 新世纪紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司产;BSC-250 恒温培养箱,上海博迅实业有限公司医疗设备厂产;PHS-3CpH 计,仪电科学仪器有限公司产;LDZX-50KBS 立式压力蒸

汽灭菌器,上海申安有限公司产;TA. XT Plus 质构仪,超技仪器有限公司产;EX30 光学显微镜,宁波舜宇仪器有限公司产;H2-16KR 台式高速冷冻离心机,湖南可成仪器设备有限公司产;CR-400 型色差计,日本柯尼卡美能达公司产;SHA-BA 恒温振荡器,常州澳华仪器有限公司产;热板 IT-09A5 磁搅拌器,上海一恒科技有限公司产;SW-CJ-2D 双人单面净化工作台,苏州净化设备有限公司产.

1.2 实验方法

1.2.1 菌株 M/T 的鉴定 采用选择性培养基(察氏培养基)从天和腐乳毛坯分离得到优势菌株 M/T,并将该菌株点种于 PDA 培养基上,于 28 ℃ 下培养 2 d 后进行形态学和生理生化鉴定.

1.2.2 发酵工艺流程 前期发酵:新鲜豆腐→切块(3 cm × 3 cm × 1.5 cm)→紫外灯杀菌 30 min→蘸浸菌悬液→喷洒乳酸→温度 28 ℃,湿度 96% 条件下发酵→毛坯.

后期发酵:毛坯→搓毛→腌坯→配料→装瓶→灌油→后酵→成熟.

1.2.3 混合菌种发酵腐乳前发酵条件的单因素试验 1) 发酵时间对混合菌种发酵腐乳的影响试验. 基于预实验结果,设置发酵温度 28 ℃,湿度 96%,菌悬液浓度 1.0×10^7 CFU/mL,毛霉 40899 与菌株 M/T 质量比 1:1,乳酸 pH 值 3.5,测定不同时间段(24 h,36 h,48 h,60 h,72 h)混合菌种发酵腐乳毛坯的蛋白酶活力.

2) 毛霉 40899 与菌株 M/T 质量比对混合菌种发酵腐乳的影响试验. 设置发酵温度 28 ℃,湿度 96%,菌悬液浓度 1.0×10^7 CFU/mL,乳酸 pH 值 3.5,发酵时间 60 h,测定毛霉 40899 与菌株 M/T 不同质量比(1:3,1:2,1:1,2:1,3:1)的混合菌种发酵腐乳毛坯的蛋白酶活力.

3) 乳酸 pH 值对混合菌种发酵腐乳的影响试验. 设置发酵温度 28 ℃,湿度 96%,菌悬液浓度 1.0×10^7 CFU/mL,发酵时间 60 h,毛霉 40899 与菌株 M/T 质量比 1:1,测定不同乳酸 pH 值(2.0,2.5,3.0,3.5,4.0)混合菌种发酵腐乳毛坯的蛋白酶活力.

1.2.4 响应面法优化混合菌种发酵腐乳的前发酵条件 利用响应曲面 Box-Behnken 试验设计,以蛋白酶活力为反映指标,选取发酵时间、毛霉 40899 与菌株 M/T 质量比、乳酸 pH 值 3 个影响显著的因素,进行 3 因素 3 水平的试验设计^[14-15].

1.2.5 测定方法 菌悬液浓度的测定采用血球计数板法^[16];蛋白酶活力测定采用福林酚法^[17];氨基酸态氮含量按照腐乳行业标准 SB/T 10170—2007 进行测定^[18];采用质构仪位移模式,用两种探头对腐乳的质地剖面进行质构特性分析与测定^[19];以市售的润丰油腐乳为对照样,采用 CR-400 型色差计的 $L^* a^* b^*$ 测量系统对色度进行测定^[20].

1.3 数据处理

采用 Excel, Design Expert 8.0, Origin 9.0 分析处理.

2 结果与分析

2.1 菌株 M/T 的鉴定结果

通过乳酸石碳酸棉蓝染色实验,显微镜下菌株 M/T 的形态如图 1 所示.

由图 1 可知,菌株 M/T 的菌丝无横隔,孢子囊顶生,球形,孢囊梗直立分支多集中于顶端,无假根. 包囊孢子大多数呈圆形,少数呈椭圆形. 此外,该菌株的最适生长温度为 28 ℃,对数生长期为 6~36 h,对葡萄糖的利用率高于对果糖、乳糖、蔗糖、半乳糖的利用率,对淀粉利用率最差. 根据以上实验结果可初步判断菌株 M/T 为毛霉科 (*Mucoraceae*),放射毛霉属 (*Actino-*

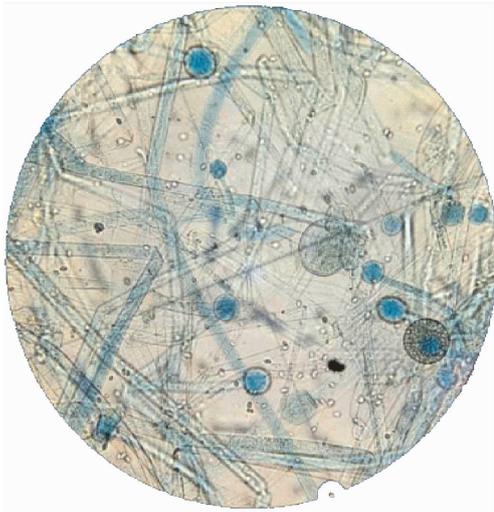


图1 菌株 M/T 光学显微镜下的形态
Fig.1 Morphology of strain M/T under the optical microscope

mucor)^[21].

2.2 腐乳前发酵条件的单因素试验结果

2.2.1 发酵时间对混合菌种发酵腐乳蛋白酶活力的影响

在毛霉 40899 与菌株 M/T 质量比 1 : 1, 乳酸 pH 值 3.5 条件下, 不同发酵时间对混合菌种发酵腐乳蛋白酶活力的影响如图 2 所示. 由图 2 可知, 随着发酵时间的延长, 蛋白酶活力呈现先增加后减少的趋势. 在发酵的第 60 h, 蛋白酶活力达到最大值 34. 371 U/mL. 这是由于从发酵初期到发酵 60 h 这一阶段, 腐乳毛坯上的霉菌不断生长代谢繁殖, 霉菌菌丝也不断生长, 菌丝群的代谢率处于旺盛期, 因而蛋白酶活力不断增长; 随着发酵时间的进一步延长, 腐乳毛坯表面的菌丝开始变黑变黄, 出现孢子, 霉菌菌丝开始老化. 因此, 选择 60 h 为适宜的发酵时间.

2.2.2 毛霉 40899 与毛霉 M/T 质量比对混合菌种发酵腐乳蛋白酶活力的影响

在发酵时间 60 h, 乳酸 pH 值 3.5 条件下, 毛霉 40899 与毛霉 M/T 不同质量比对混合菌种发酵腐乳蛋白酶活力的影响如图 3 所示. 由图 3 可知, 随着毛霉 40899 在混合菌种中的占比不断增加, 蛋白

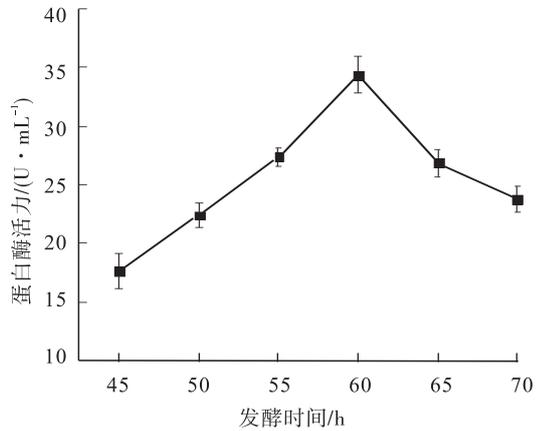


图2 发酵时间对混合菌种发酵腐乳蛋白酶活力的影响

Fig.2 Effects of fermentation time on pretease activity during the fermentation of Sufu by mixed strains

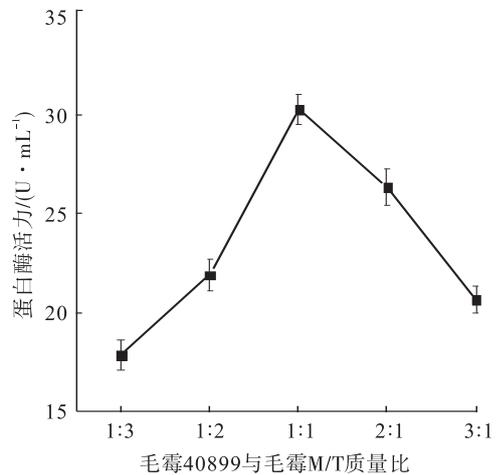


图3 毛霉 40899 与毛霉 M/T 质量比对混合菌种发酵腐乳蛋白酶活力的影响

Fig.3 Effects of *Mucor* 40899 and *Mucor* M/T quality ratio on protease activity during the fermentation of Sufu by mixed strains

酶活力也越来越高, 在菌种配比为 1 : 1 时达到最大值, 接近 30 U/mL. 两者的混合可能使菌种之间取长补短, 促进蛋白酶活力的增加. 而当毛霉 40899 在混合菌种中的占比继续增大时, 蛋白酶活力则开始下降. 因此, 毛霉 40899 与毛霉 M/T 质量比选择 1 : 1 较适宜.

2.2.3 乳酸 pH 值对混合菌种发酵腐乳蛋白酶活力的影响

在发酵时间 60 h, 毛霉 40899

与毛霉 M/T 质量比 1 : 1 条件下,不同的乳酸 pH 值对混合菌种发酵腐乳蛋白酶活力的影响如图 4 所示. 由图 4 可知,当 pH 值不断升高时,分泌蛋白酶的活力呈现先递增后减少的趋势. 当 pH 为 3.5 时,蛋白酶活力达到最大,接近 28 U/mL. 原因可能是随着乳酸 pH 值的增大,酸度逐渐下降,霉菌的生长繁殖速度不断加快,且适当的 pH 值能够有效抑制杂菌生长,蛋白酶活力也不断增强. 而当 pH 值继续增加时,蛋白酶活力不断减少,这可能是由于酸度不断降低,乳酸对杂菌的抑制力也相应降低. 因此,乳酸 pH 值选择 3.5 为宜.

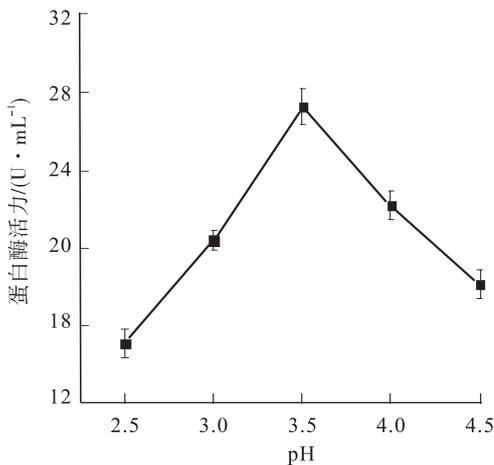


图 4 乳酸 pH 值对混合菌种发酵腐乳蛋白酶活力的影响

Fig. 4 Effects of lactic acid pH value on protease activity during the fermentation of Sufu by mixed strains

2.3 响应面法优化混合菌种发酵腐乳前发酵条件试验结果

2.3.1 响应面试验设计与结果

以单因素试验结果为基础,以蛋白酶活力为指标,选取发酵时间(A)、毛霉 40899 与毛霉 M/T 质量比(B)和乳酸 pH 值(C)3 个因素,使用 Design-Expert 8.0 软件进行响应面试验设计. 因素与水平表和试验结果分别见表 1 和表 2.

利用 Design-Expert 8.0 软件对数据进行拟

表 1 因素与水平表

Table 1 Factor and level table

水平	因素		
	A/h	B	C
-1	48	1 : 2	3.0
0	60	1 : 1	3.5
1	72	2 : 1	4.0

表 2 混合菌种发酵腐乳前发酵条件响应面试验结果

Table 2 Experiment results for response surface methodology of per-fermentation conditions of Sufu by mixed strains

试验号	因素			蛋白酶活力(Y) /(U · mL ⁻¹)
	A	B	C	
1	-1	0	1	34.13
2	-1	0	-1	33.74
3	0	-1	1	40.52
4	1	1	0	35.37
5	0	0	0	48.06
6	0	-1	-1	40.53
7	1	0	1	35.25
8	-1	1	0	32.18
9	1	0	-1	33.43
10	0	1	1	40.08
11	0	1	-1	38.47
12	0	0	0	48.57
13	1	-1	0	35.66
14	0	0	0	48.87
15	0	0	0	48.23
16	0	0	0	47.93
17	-1	-1	0	35.57

合分析,以蛋白酶活力为因变量(Y),以发酵时间(A)、毛霉 40899 与毛霉 M/T 质量比(B)和乳酸 pH 值(C)为自变量,得到的回归方程为

$$Y = 48.34 + 0.51A - 0.77B + 0.48C + 0.78AB + 0.36AC + 0.41BC - 9.70A^2 - 3.94B^2 - 4.49C^2$$

偏回归系数方差分析结果见表 3.

由表 3 可知,所选择的模型其不同处理间差异具有高度显著性($P < 0.0001$),即用回归方程来体现各个变量因子与响应值之间的关系,其自变量与因变量之间的线性关系显著,说

表3 混合菌种发酵腐乳前发酵条件
偏回归模型方差分析结果

Table 3 Variance analysis of partial regression
model of pre-fermentation conditions of
Sufu by mixed strains

方差来源	SS	df	MS	F值	P值	显著性
模型	608.65	9	67.63	301.38	<0.000 1	**
A	2.09	1	2.09	9.31	0.018 5	*
B	4.78	1	4.78	21.30	0.002 4	*
C	1.82	1	1.82	8.12	0.024 7	*
AB	2.42	1	2.42	10.79	0.013 4	*
AC	0.51	1	0.51	2.28	0.174 7	
BC	0.66	1	0.66	2.93	0.013 4	*
A ²	396.06	1	396.061	765.03	<0.000 1	**
B ²	65.25	1	65.25	290.80	<0.000 1	**
C ²	85.03	1	85.03	378.95	<0.000 1	**
残差	1.57	7	0.22			
失拟项	0.98	3	0.33	2.23	0.226 5	不显著
纯误差	0.59	4	0.15			
总差	610.22	16				
相关系数 R ²			0.997 4			
校正决定系数			0.994 1			
变异系数			1.19%			

注: $P < 0.000 1$, 差异高度显著 (**); $P < 0.05$, 差异显著 (*); $P > 0.05$, 差异不显著

明该试验方法可信. 失拟项 $0.226 5 > 0.05$, 表明回归方程的试验拟合较好, 试验过程中出现的误差较小. 校正系数 $R_{Adj}^2 = 0.994 1$, 即该模型能解释 99% 的响应值变化. 通过 F 值可以看出各个因素在试验中对协同发酵腐乳前发酵产蛋白酶效果的影响大小顺序为: 毛霉 40899 与毛霉 M/T 质量比 > 发酵时间 > 乳酸 pH 值.

2.3.2 双因子效应分析结果 基于回归方程和回归模型方差分析表得到的各因素交互作用的响应面变化三维曲面图和等高线如图 5 所示. 由图 5 可知, 前发酵过程中, 当乳酸 pH 值固定时, 随着发酵时间和毛霉 40899 与毛霉 M/T 质量比的递增, 蛋白酶活力呈现先上升后下降的趋势. 由两因素交互作用的 3D 图是凸型且等高线呈椭圆形可知, 两因素之间交互作用

较强. 当毛霉 40899 与毛霉 M/T 质量比固定时, 随着发酵时间和乳酸 pH 值的递增, 蛋白酶活力呈现先上升后下降的趋势; 当发酵时间固定时, 随着乳酸 pH 值和毛霉 40899 与毛霉 M/T 质量比的递增, 蛋白酶活力呈现先上升后下降的趋势. 图 5b) 和 c) 的等高线为圆形, 说明发酵时间与乳酸 pH 值、毛霉 40899 与毛霉 M/T 质量比和乳酸 pH 值之间的交互作用不显著, 与回归模型方差分析表反映的结果一致. 综上, 由此回归模型得出前发酵较优条件为发酵时间 60.28 h, 毛霉 40899 与毛霉 M/T 质量比 1 : 1.18, 乳酸 pH 值 3.53, 该条件下腐乳的蛋白酶活力响应曲面出现最高点, 其预测值为 48.38 U/mL.

2.3.3 最佳前发酵条件的确定与验证 为了验证模型的有效性, 考虑到实际情况, 将较优条件修改为发酵时间 60 h, 毛霉 40899 与毛霉 M/T 质量比 1 : 1, 乳酸 pH 值 3.5, 与单因素试验结果大致吻合. 利用此发酵条件进行 3 次腐乳前发酵实验, 测得蛋白酶活力的平均值为 48.015 U/mL, 与预测值接近, 说明此模型能较好地预测腐乳的蛋白酶活力.

2.4 腐乳发酵过程中游离氨基酸态氮的变化规律

图 6 为腐乳发酵过程中氨基酸态氮含量的变化情况. 由图 6 可知, 腐乳在发酵过程中氨基酸态氮含量呈上升趋势. 前发酵过程中由于霉菌生长繁殖分泌蛋白酶, 氨基酸氮含量出现小幅上升; 腌制阶段由于高浓度食盐有抑制酶活力的作用, 游离氨基酸态氮上升不明显; 进入后发酵后, 腐乳中游离氨基酸氮含量快速上升然后趋于平缓. 腐乳中的游离氨基酸是蛋白质降解的最终产物, 腐乳的滋味与其含量密切相关, 行业标准规定每 100 g 腐乳中氨基酸态氮含量不低于 0.42 g, 即达到基本成熟. 由图 6 可知, 腐乳在后发酵 30 d 时达到基本成熟标准, 此时

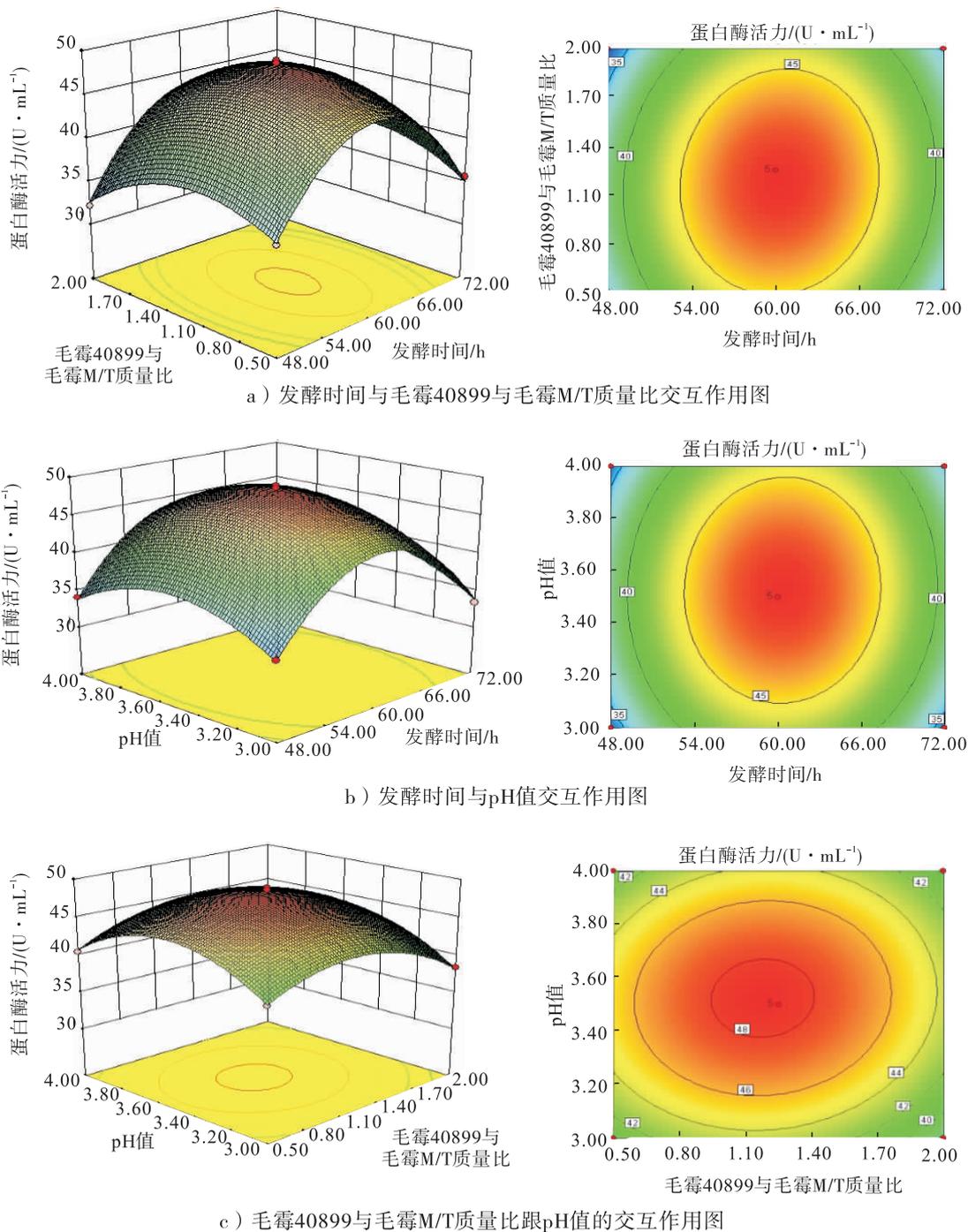


图5 3因素交互作用对蛋白酶活力影响的响应面和等高线

Fig. 5 The response surface and contour lines of the interaction of three factors on protease activity

每 100 g 腐乳中氨基酸态氮含量为 0.53 g,与多数报道中单菌发酵 40 ~ 50 d 腐乳才基本成熟相比,周期大大缩短,说明混合菌种发酵有利于缩短腐乳的发酵周期。

2.5 腐乳发酵过程中质构特性的变化规律

2.5.1 腐乳发酵过程中硬度的变化 图 7 为

腐乳发酵过程中硬度的变化情况. 由图 7 可知,腐乳后发酵 30 d 腐乳坯的硬度比白坯下降了 31.97%. 在发酵的过程中,前酵阶段由于霉菌菌丝的包裹,腐乳毛坯的硬度增大;腌制过程中,由于食盐的加入导致水分析出,腐乳的硬度直线上升;进入后发酵时段,腐乳的硬度与腐乳

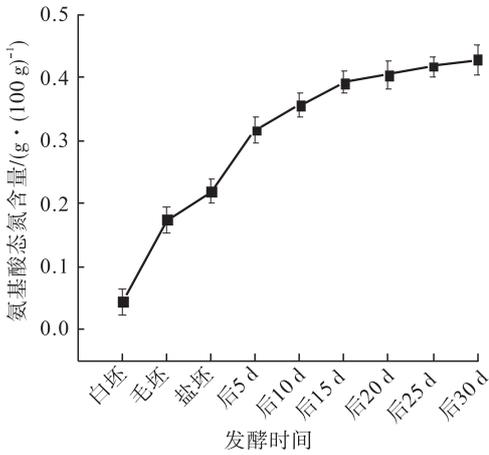


图6 腐乳发酵过程中氨基酸态氮含量的变化
Fig. 6 Changes of amino acid nitrogen during the fermentation of Sufu

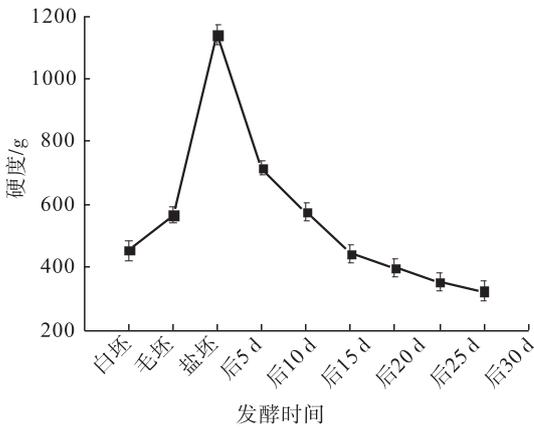


图7 腐乳发酵过程中硬度的变化
Fig. 7 Changes of hardness during the fermentation of Sufu

各成分含量存在一定的相关性,与腐乳降解程度相关,蛋白质降解造成腐乳坯体变柔软,并且后发酵过程中植物油的浸泡与渗透也促使坯体硬度迅速减小.

2.5.2 腐乳发酵过程中弹性的变化 图8为腐乳发酵过程中弹性的变化情况.由图8可知,在腐乳发酵过程中,弹性变化呈现逐渐减小趋势.前发酵阶段,毛坯外部被菌丝紧密包裹,硬度有所增加,弹性减小但幅度不大;腌坯阶段,弹性减小是由于高盐浓度使盐坯硬度增加,导

致弹性降低;后发酵阶段,由于大分子物质在各种酶系的催化作用下逐渐降解为小分子物质,使得腐乳坯逐渐变得松软,弹性逐渐减小,后发酵30 d时,腐乳坯的弹性较白坯下降了72.11%.

2.5.3 腐乳发酵过程中黏附性的变化 图9为腐乳发酵过程中黏附性的变化情况.腐乳的黏附性与大豆蛋白的凝胶结构密切相关,腐乳发酵过程中,随着蛋白质的降解,凝胶结构被破坏,使得腐乳越来越软,从而黏附性越来越大.

由图9可知,腐乳后发酵30 d腐乳坯的胶黏性比白坯增加了74.07%.前发酵和腌制阶

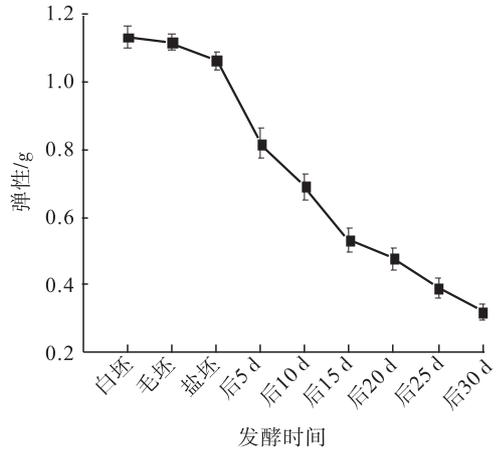


图8 腐乳发酵过程中弹性的变化
Fig. 8 Changes of flexibility during the fermentation of Sufu

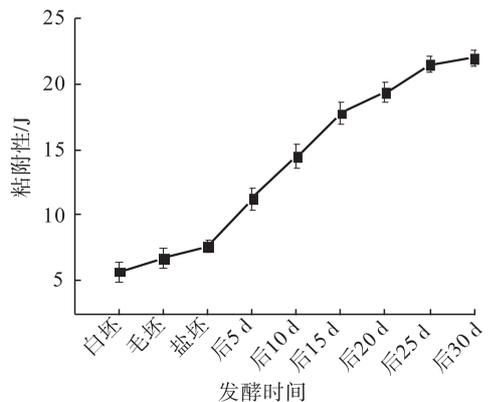


图9 腐乳发酵过程中黏附性的变化
Fig. 9 Changes of adhesion during the fermentation of Sufu

段由于酶系的作用不明显,黏附性的变化不显著;进入后发酵阶段,酶系作用增强,使得腐乳的黏附性显著增大,随着后发酵的进行,蛋白质降解速率减缓,腐乳黏附性的变化也逐渐趋于平缓.

2.6 腐乳发酵过程中的色度变化

表 4 为腐乳发酵过程中的色度变化情况.由表 4 可以看出,腐乳的明度随着发酵时间延长而不断降低,在前发酵过程中,由于毛坯外裹一层带有少许孢子的菌丝,因而明度降低;在后发酵过程中,明度进一步降低,这是因为随着发酵时间的延长和蛋白质脂肪的酶解,微观结构粒度变弱,对于光的反射变弱,导致腐乳明度降低^[20].此外,明度的降低还与加入调味料有关.腐乳的黄度随着发酵时间延长而不断升高,在前发酵中,黄度升高的主要原因在于大豆异黄酮类物质在微生物分泌的氧化酶作用下生成羟

基化合物,该化合物呈黄色,所以毛坯变黄.腐乳的红度随着发酵时间延长逐渐升高,在前发酵阶段小幅升高,后发酵阶段大幅升高,这是因为后发酵时盐坯裹上了辣椒粉调料,随着浸泡时间的延长,红度逐渐升高.后发酵 30 d 的腐乳其色差值较为接近市售润丰油腐乳,表明腐乳外观品质良好.

3 结论

本文从腐乳毛坯中分离得到毛霉 M/T,以蛋白酶活力为指标,通过单因素试验和响应面试验优化毛霉 40899 和毛霉 M/T 混合发酵腐乳的前发酵工艺,并在最优前发酵条件下考察混合菌种发酵腐乳过程中氨基酸态氮、质构特性和色度的变化规律.混合菌种发酵腐乳的最佳前发酵条件为:发酵时间 60 h,毛霉 40899 与毛霉 M/T 质量比 1:1,乳酸 pH 值 3.5.在此条件下前发酵的腐乳经后发酵 30 d 后,每 100 g 腐乳中氨基酸态氮含量为 0.53 g,达到腐乳行业标准中基本成熟的规定,且腐乳硬度、黏附性、弹性和色度指标良好.因此,毛霉 40899 和毛霉 M/T 混合发酵不仅能提高腐乳发酵优势菌株的丰富度,且在不影响腐乳品质指标的前提下缩短发酵周期.

参考文献:

- [1] 李幼筠,周邈.中国独具特色的发酵豆制品[J].中国酿造,2010,217(4):12.
- [2] 王瑞芝.中国腐乳酿造[M].2版.北京:中国轻工业出版社,2009:100.
- [3] 刘亚,杨光影,吴悦,等.腐乳进展研究[J].农产品加工(学刊),2013,337(12):64.
- [4] LI Y Y, YU R C, CHOU C C. Some biochemical and physical changes during the preparation of the enzyme-ripening Sufu: a fermented product of soybean curd[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(8):4888.

表 4 腐乳发酵过程中的色度变化

Table 4 Colorimetric changes during the fermentation of Sufu

时间	明度 L^*	红度 a^*
对照样	54.15 ± 0.89	12.94 ± 0.67
白坯	75.70 ± 1.04	3.51 ± 0.28
毛坯	72.78 ± 0.95	3.41 ± 0.32
后发酵 5 d	60.89 ± 0.79	9.88 ± 0.41
后发酵 10 d	60.68 ± 0.74	10.68 ± 0.37
后发酵 15 d	59.31 ± 0.77	10.71 ± 0.32
后发酵 20 d	57.63 ± 0.71	11.19 ± 0.38
后发酵 25 d	56.50 ± 0.72	11.64 ± 0.36
后发酵 30 d	52.35 ± 0.83	12.02 ± 0.53
时间	黄度 b^*	色差 ΔE
对照样	30.40 ± 0.75	0
白坯	8.02 ± 0.55	32.47
毛坯	9.07 ± 0.63	29.88
后发酵 5 d	22.46 ± 0.76	10.86
后发酵 10 d	23.56 ± 0.69	9.73
后发酵 15 d	23.71 ± 0.67	8.74
后发酵 20 d	25.54 ± 0.82	6.23
后发酵 25 d	27.40 ± 0.77	4.03
后发酵 30 d	28.06 ± 0.64	3.09

- [5] HANB Z, Rombouts F M, Nout M J R. A Chinese fermented soybean food [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 65:1.
- [6] ANDUIC S, GENCCELEP H, KOSE S. Determination of biogenic amines in herby cheese [J]. *International Journal of Food Properties*, 2010, 13(6):1300.
- [7] GUAN R F, LIU Z F, ZHANG J J, et al. Investigation of biogenic amines in sufu (furu): a Chinese traditional fermented soybean food product [J]. *Food Control*, 2013, 31:345.
- [8] 冉春霞, 陈光静, 阚建全. 响应面法优化全豆腐乳前发酵条件的研究 [J]. *食品工业科技*, 2012, 33(18):227.
- [9] 赵玉莲, 郑学翔. 豆腐乳生产用微生物(二) [J]. *中国酿造*, 1999(2):9.
- [10] FRANS M, ROMBOUITS M J, ROBERT N, et al. Effect of NaCl on textural changes and protein and lipid degradation during the ripening stage of Sufu: a Chinese fermented soybean food [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2003, 83(9):899.
- [11] HAN B Z, ROBERT M J N. Effects of temperature, water activity and gas atmosphere on mycelial growth of tempe fungi *Rhizopus microsporus* var *microsporus* and *R. microsporus* var *Oligosporus* [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2000, 16(8):853.
- [12] 冉春霞, 阚建全. 全腐乳发酵菌种选择的实验研究 [J]. *中国调味品*, 2015, 18(40):1.
- [13] 陈治霖, 和七一, 陈斌. 腐乳毛坯双菌制曲工艺的研究 [J]. *中国调味品*, 2015, 2(40):91.
- [14] 李爱华, 岳思君, 马海滨, 等. 真菌孢子三种计数方法相关性的探讨 [J]. *微生物学杂志*, 2006, 26(2):107.
- [15] 国家标准化管理委员会. 蛋白酶制剂: GB/T 23527—2009 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [16] 刘威, 曹蕾蕾, 陈春雨, 等. 少孢根霉发酵腐乳前酵条件优化及发酵全程质构的研究 [J]. *食品工业科技*, 2014, 35(18):228.
- [17] 樊巧, 陈厚荣, 徐晓萍, 等. 响应面实验优化酪蛋白-魔芋葡甘聚糖共混溶胶制备工艺及其稳定性 [J]. *食品科学*, 2015, 36(24):10.
- [18] 中华人民共和国商务部. 腐乳: SB/T 10170—2007 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [19] 鲍松林. 腐乳生产菌布氏毛霉的鉴定及其生理特征 [J]. *中国调味品*, 1994(9):7.
- [20] 管立军, 程永强, 李里特. 腐乳和豆豉功能性研究进展 [J]. *中国食物与营养*, 2008(11):48.
- [21] 曹蕾蕾. 少孢根霉发酵腐乳过程中主要营养成分变化的研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2014.