

牡丹籽粕酱油发酵工艺优化及抗氧化活性研究

Optimization of fermentation process and antioxidant activity of peony seed meal soy sauce

胡 伊 于泓鹏 吴克刚 刘晓丽

HU Yi YU Hong-peng WU Ke-gang LIU Xiao-li

(广东工业大学轻工化工学院, 广东 广州 510000)

(College of Light Industry and Chemical Engineering, Guangdong University of Technology,
Guangzhou, Guangdong 510000, China)

摘要:采用响应面分析法对牡丹籽粕酱油发酵工艺进行优化,并对其抗氧化活性进行研究。结果表明:最佳发酵工艺条件为发酵温度 45.5 ℃、发酵时间 18 d、盐水浓度 12%,此时籽粕酱油氨基态氮含量为 0.616 g/100 mL。体外抗氧化性试验表明,高温高压灭菌下的牡丹籽粕酱油对 DPPH· 具有较好的清除能力,清除率可达 94.19%。

关键词:牡丹籽粕;酱油;固态发酵;氨基态氮;抗氧化活性

Abstract: This paper used single factor and response surface analysis to optimize the fermentation process of peony seed meal soy sauce, and the antioxidant activity of peony seed meal soy sauce was studied. The result showed that the establishment of regression model reflects the relationship between the content of amino nitrogen and fermentation temperature, fermentation time and salinity of peony seed meal soy sauce. The optimum fermentation conditions of peony seed meal soy sauce were fermentation temperature of 45.5 ℃, fermentation time of 18 days, and salinity of 12%. Under the conditions, the content of amino nitrogen in peony seed meal soy sauce was 0.616 g/100 mL. According to the oxidation experiments in vitro, peony seed meal soy sauce under high temperature and high-pressure sterilization had better scavenging ability to DPPH free radicals, and the scavenging rate can reach 94.19%.

Keywords: peony seed meal; soy-sauce; solid-state fermentation;

nitrogen; antioxidant activity

牡丹籽中含有 7%~8% 的油脂、9.9% 的淀粉、20.35% 的蛋白质和多种生物活性物质,尤其是不饱和脂肪酸含量较高^[1]。2011 年,国家卫生和计划生育委员会发布《关于批准元宝枫籽油和牡丹籽油作为新资源食品的公告》,将牡丹籽列为新资源食品^[2]。牡丹籽粕是牡丹籽经压榨取油后的一种副产品,年产量达 2.25 万 t^[3],但大部分都被废弃。牡丹籽粕不仅含有丰富的蛋白质、8 种必需氨基酸、不饱和脂肪酸和亚麻酸^[4],还含有多糖、多酚、V_E、植物甾醇、黄酮等抗氧化活性成分^[5],可开发成食品、药品等。牡丹籽粕中富有微生物生长代谢的碳源,可作为微生物培养基物的来源,生产相关发酵产品。宋王婷等^[6]利用牡丹籽粕和白酒曲研制开发出一种具有特殊风味的牡丹籽酒。李杰^[7]采用牡丹籽粕或辣木籽粕为主要原料制成一种具有抗氧化、降血压等功能的牡丹辣木酱油。利用牡丹籽粕酿造酱油,即以牡丹籽粕全替代大豆或豆粕,并辅以面粉和麸皮经制曲和发酵而成的一种新型液态调味品,不仅营养丰富,还具有典型的酱油风味和独特的香气及滋味。目前,相关的研究主要集中在酿造工艺条件的优化上,对其品质分析和功能性的研究尚未见报道。

试验拟以提取油脂后的牡丹籽粕为原料,优化其酱油发酵工艺,并研究牡丹籽粕酱油的抗氧化活性,旨在为提高牡丹籽粕的资源利用和精深化发展提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

牡丹籽粕大曲:牡丹籽粕与麦麸以 8:2 的比例制得,自制;

酱油品牌 S1、酱油品牌 S2:市售;

基金项目:广东省农村科技特派员重点项目(编号:19ZK0364);
广东省林业科技创新重点项目(编号:202KJXCX003);
广东省科技计划项目(编号:2015A020209157,
2015B020204002);国家自然科学基金(编号:
81703811)

作者简介:胡伊,女,广东工业大学在读硕士研究生。

通信作者:于泓鹏(1979—),男,广东工业大学副教授,博士。

E-mail: yuhpeng@163.com

收稿日期:2019-12-20

氢氧化钠、甲醛、无水乙醇、浓硫酸、盐酸、冰乙酸、六水三氯化铁、硫酸亚铁、无水醋酸钠:分析纯,天津市致远化学试剂有限公司;

1,1-二苯基-2-苦肟基(DPPH)、6-羟基-2,5,7,8-四甲基色烷-2-羧酸(Trolox)、2,2'-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐(ABTS)、2,4,6-三吡啶基三嗪(TPTZ):分析纯,上海麦克林生化科技有限公司。

1.1.2 仪器与设备

生化培养箱:LRH 型,上海恒科学仪器有限公司;

pH 计:PHS-3C 型,上海仪电科学仪器股份有限公司;

集热式恒温加热磁力搅拌器:DF-101S 型,巩义市予华仪器有限责任公司;

恒温振荡器:SHA-BA 型,常州澳华仪器有限公司;

酶标仪:FC 型,美国赛默飞世尔科技公司。

1.2 试验方法

1.2.1 单因素试验设计

(1) 发酵温度:准确称取 300 g 成曲分装于 3 个锥形瓶中,按料液比 1:1.5 (g/mL) 加入 11% 盐水,恒温发酵 20 d,考察发酵温度(30,35,40,45,50 °C)对牡丹籽粕酱油氨基酸氮和可溶性无盐固形物的影响。

(2) 发酵时间:称取 300 g 成曲分装于 3 个锥形瓶中,按料液比 1:1.5 (g/mL) 加入 11% 盐水,45 °C 培养箱中恒温发酵,考察发酵时间(15,20,25,30,35 d)对牡丹籽粕酱油氨基酸氮和可溶性无盐固形物的影响。

(3) 盐水浓度:称取 300 g 成曲分装于 3 个锥形瓶中,按料液比 1:1.5 (g/mL) 加入盐水,45 °C 恒温发酵 20 d,考察盐水浓度(7%,9%,11%,13%,15%)对牡丹籽粕酱油氨基酸氮和可溶性无盐固形物的影响。

1.3.2 响应面试验设计 在单因素试验基础上,以发酵温度、发酵时间、盐水浓度为自变量,以氨基酸氮含量为评价指标,根据 Box-Benheken 中心组合设计原理,设计三因素三水平响应面试验优化酱油发酵工艺条件。

1.3.3 灭菌工艺对牡丹籽粕酱油抗氧化能力的影响 取 10 mL 牡丹籽粕生酱油按表 1 进行灭菌,测定灭菌后酱油的 DPPH·清除能力、ABTS⁺·清除能力及铁离子还原力,并与两种市售酱油进行比较。以生酱油为对照。

1.3 指标测定

1.3.1 氨基酸氮 按 GB 18186—2000 执行。

表 1 灭菌工艺

Table 1 Sterilization process

灭菌工艺	操作方法
巴氏杀菌	68 °C, 30 min, 迅速冷却
煮沸杀菌	100 °C, 5 min
高温高压蒸汽灭菌	121 °C, 0.1 MPa, 5 min
恒温水浴	70 °C, 30 min

1.3.2 可溶性无盐固形物 按 GB 18186—2000 执行。

1.3.3 DPPH·清除能力 参照 Brand-Williams 等^[8]的方法。用无水乙醇配制浓度为 0.20 mmol/L 的 DPPH 醇溶液和 6.25 g/L 的 Trolox 溶液。将酱油稀释 10 倍,取 2 mL 待测液加至 2 mL 0.2 mmol/L 的 DPPH 溶液中,混匀,室温避光反应 60 min,测定 517 nm 处吸光度值。取 2 mL 一系列梯度的 Trolox 标准溶液,加至 2 mL 0.2 mmol/L 的 DPPH 溶液中,混匀,室温避光反应 60 min,测定 517 nm 处吸光度值。按式(1)计算 DPPH·清除率。

$$SCR = \left(1 - \frac{A_s - A_c}{A_b}\right) \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

SCR——DPPH·清除率,%;

A_c ——对照溶液吸光度值;

A_s ——样品溶液吸光度值;

A_b ——空白吸光度值。

1.3.4 ABTS⁺·清除能力 参照 Siddhuraju^[9]的方法。配置 0.625 g/L 的 Trolox 母液、ABTS 储备液、ABTS 工作液(用 20 mmol/L、pH 4.5 醋酸缓冲溶液按适当比例稀释 ABTS 储备液,使 $A_{734\text{ nm}}$ 为 (0.7 ± 0.02)),以此得到 ABTS⁺工作液)。将酱油稀释 10 倍,取样品提取液 500 μL 加至 5 mL ABTS⁺·工作液中,混匀,避光反应 6 min,测定 734 nm 处吸光值。将 500 μL 50% 的乙醇代替样品做空白对照。取 500 μL 一系列梯度的 Trolox 标准溶液,加至 5 mL ABTS⁺·工作液中,混匀,避光反应 6 min,测定 734 nm 处吸光值。按式(2)计算 ABTS⁺·清除率。

$$C = \left(1 - \frac{A_1}{A_0}\right) \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

C——ABTS⁺·清除率,%;

A_1 ——样品溶液吸光度值;

A_0 ——空白对照溶液吸光度值。

1.3.5 铁离子还原力 参照 Benzie 等^[10]的方法。将 0.3 mol/L 醋酸—醋酸钠缓冲液(pH 3.6)、0.01 mol/L TPTZ 溶液、0.02 mol/L FeCl₃溶液按体积比 10:1:1 混匀,配制 6.25 g/L FeSO₄标准溶液。将酱油稀释 10 倍,取样品提取液 200 μL 加至 2.8 mL Fe³⁺-TPTZ 试剂中,混匀,37 °C 水浴 60 min,测定 593 nm 处吸光值,用去离子水代替样品提取液作空白对照。以 FeSO₄·7H₂O 为标准品绘制曲线。

1.4 数据处理

所有试验重复 3 次取平均值,采用 Origin 2017 软件绘图,采用 Design-expert 8.0.6 软件进行响应面设计,标准曲线采用 Excel 作图。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

由图1可知,牡丹籽粕酱油中氨基态氮含量随发酵温度的升高先增加后降低,当发酵温度为45℃时达最大值。研究表明低温下肽酶的作用时间大于高温,说明低温有利于酶活的保存^[11],高温下蛋白酶活力会降低甚至失活^[12],同时高温促进了氨基酸和戊糖之间的美拉德反应,消耗了氨基酸^[13]。氨基态氮含量随发酵时间的增加而减少,是由于发酵后期酶活力下降,基本不生成氨基态氮,同时酵母菌与耐盐乳酸菌繁殖以及美拉德反应会消耗部分氨基态氮^[14];当发酵15d时,可溶性无盐固形物含量为9.34g/100mL,达不到低盐固态发酵酱油的标准(≥ 10 g/100mL),故选择最佳发酵时间为20d。氨基态氮含量随盐水浓度的增加先上升后下降,当盐水浓度为11%时达最大值,氨基态氮含量下降是因为食盐含量增加,酶活力受抑制,降低了对蛋白质的分解能力^[15]。综上,牡丹籽粕低盐固态发酵酱油的最适温度为45℃、发酵时间为20d、最适盐水浓度为11%。

2.2 响应面优化设计

2.2.1 试验设计与结果分析 根据单因素试验结果,以氨基态氮含量为响应值,根据Box-Behnken中心组合原理进行响应面设计,试验因素水平见表2,试验设计与结果见表3。

利用Design-Expert 8.0.6软件对响应面试验结果进行多元回归拟合,得到以牡丹籽粕酱油氨基态氮含量(Y)为响应值的二次多项回归方程:

$$Y=0.60+0.030A+0.018B-0.030C-0.015AB+0.010AC+0.000BC-0.024A^2-0.059B^2-0.029C^2$$
。(3)

为检验回归方程中各因素对牡丹籽粕酱油氨基态氮含量的影响程度及有效性,对回归方程进行方差分析,结果见表4。

由表4可知,回归模型 $P<0.0001$ 表明该模型线性

关系极显著,失拟项 $P=0.4193>0.05$,不显著,说明该模型拟合性好^[16]。相关系数 $R^2=0.9871$,校正决定系数

表2 试验因素水平表

水平	A 发酵温度/℃	B 发酵时间/d	C 盐水浓度/%
−1	40	15	9
0	45	20	11
1	50	25	13

表3 响应面试验设计与结果

试验号	A	B	C	氨基态氮含量/(10 ^{−2} g·mL ^{−1})
1	0	1	−1	0.57
2	0	−1	1	0.47
3	0	0	0	0.61
4	1	0	−1	0.60
5	1	−1	0	0.56
6	0	0	0	0.60
7	−1	1	0	0.52
8	0	0	0	0.61
9	−1	0	1	0.49
10	1	1	0	0.56
11	0	−1	−1	0.53
12	1	0	1	0.56
13	0	0	0	0.62
14	−1	−1	0	0.46
15	−1	0	−1	0.57
16	0	1	1	0.51
17	0	0	0	0.60

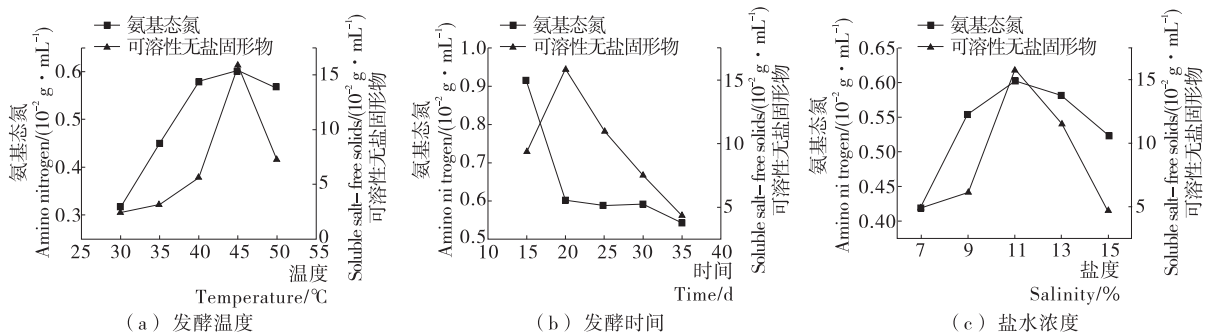


图1 各因素对牡丹籽粕酱油氨基态氮和可溶性无盐固形物含量的影响

Figure 1 Effects of fermentation temperature, fermentation time and salinity on amino nitrogen and soluble unsalted solid content of peony seed meal soy sauce

表 4 回归模型方差分析[†]

Table 4 Analysis of variance of regression models

系数	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.041	9	4.522E-003	59.72	<0.000 1	* *
A	7.200E-003	1	7.200E-003	95.09	<0.000 1	* *
B	2.450E-003	1	2.450E-003	32.36	0.000 7	* *
C	7.200E-003	1	7.200E-003	95.09	<0.000 1	* *
AB	9.000E-004	1	9.000E-004	11.89	0.010 7	*
AC	4.000E-004	1	4.000E-004	5.28	0.055 1	
BC	0.000	1	0.000	0.00	1.000 0	
A ²	2.425E-003	1	2.425E-003	32.03	0.000 8	* *
B ²	0.015	1	0.015	193.58	<0.000 1	* *
C ²	3.541E-003	1	3.541E-003	46.77	0.000 2	* *
残差项	5.300E-004	7	7.571E-003			
失拟项	2.500E-004	3	8.333E-003			
纯误差	2.800E-004	4	1.448E-003	1.19	0.419 3	
总和	0.041	16	7.000E-003			

[†] * * 表示影响极显著 ($P<0.01$), * 表示影响显著 ($P<0.05$); $R^2=0.987\ 1$, $R^2_{\text{Adj}}=0.986\ 4$ 。

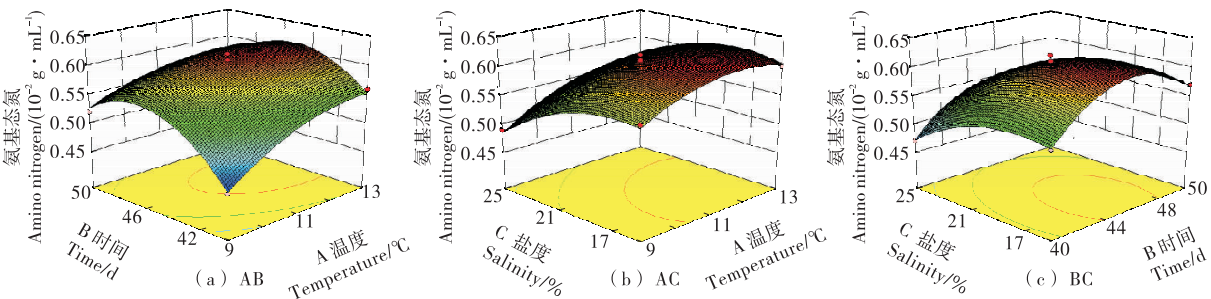


图 2 各因素交互作用对牡丹籽粕酱油氨基态氮含量的影响

Figure 2 Effects of interaction of factors on amino nitrogen content in peony seed meal soy sauce

2.3 抗氧化活性

2.3.1 DPPH·清除能力 由图 3 可知,不同灭菌工艺的牡丹籽粕酱油的 DPPH·清除能力不同。经灭菌处理后的牡丹籽粕酱油的 DPPH·清除能力高于牡丹籽粕生酱油,可能是灭菌过程中生成了一些抗氧化物质,如多肽、氨基酸、类黑精和醛酮类风味物质^[17]。牡丹籽粕生酱油的 DPPH·清除能力高于市售品牌大豆酱油 S2,与市售品牌大豆酱油 S1 的清除能力一致,且经灭菌后的牡丹籽粕酱油 DPPH·清除能力高于市售的两种大豆酱油。表明牡丹籽粕酱油具有很强的 DPPH·清除能力。

2.3.2 铁离子还原力 由图 4 可知,灭菌工艺对牡丹籽粕酱油还原力有一定影响,高温高压灭菌条件下牡丹籽粕酱油还原力较生酱油的提高了 85.6%。恒温水浴、煮沸灭菌、巴氏灭菌条件下,牡丹籽粕酱油还原力较生酱油分别降低了 10.8%,0.3%,3.0%,且这 3 种灭菌处理前后的还原力差异不明显,说明高温高压灭菌对牡丹籽粕酱

$R^2_{\text{Adj}}=0.986\ 4$,说明该模型可靠。一次项 A、B、C 和二次项 A²、B²、C² 对牡丹籽粕酱油氨基态氮的影响极显著 ($P<0.01$);交互项 AB 对牡丹籽粕酱油氨基态氮的影响显著 ($P<0.05$)。各因素对牡丹籽粕酱油氨基态氮含量影响的大小为发酵温度=盐水浓度>发酵时间。

2.2.2 试验因素间的交互作用 由图 2 可知,发酵温度与盐水浓度之间的交互作用显著,其次依次为发酵温度与发酵时间、盐水浓度与发酵时间之间的相互作用。通过响应面的陡峭程度可以看出,发酵温度影响最大,发酵时间的影响大于盐水浓度,与方差分析结果一致。

2.2.3 验证实验 根据所建立的模型得到最佳发酵工艺参数为发酵温度 45.42 °C、盐水浓度 12.02%、发酵时间 17.86 d,此时酱油的实测氨基态氮含量预测值为 0.623 g/100 mL。为检验响应面结果的可靠性,对最优工艺参数进行验证实验 ($n=3$),根据实际操作情况,将验证条件修正为发酵温度 45.5 °C、盐水浓度 12%、发酵时间 18 d,此时酱油的实测氨基态氮含量为 0.616 g/100 mL,与预测值基本一致,证明用所建模型预测牡丹籽粕酱油氨基态氮含量是准确可行的。

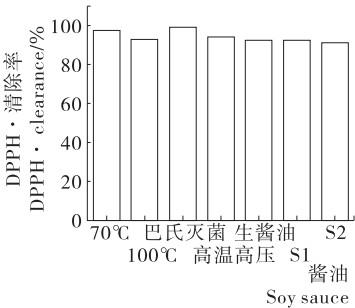


图 3 酱油 DPPH·清除能力

Figure 3 DPPH free radical scavenging ability of soy sauce

油铁离子还原力有提高作用。高温高压灭菌工艺下的牡丹籽粕酱油 (FRAP 值为 1.30 mmol/L) 的抗氧化能力高于市售品牌酱油 S1 的,表明高温高压灭菌条件下的牡丹籽粕酱油抗氧化能力较强。

2.3.3 ABTS⁺·清除能力 由图 5 可知,酱油对 ABTS⁺·

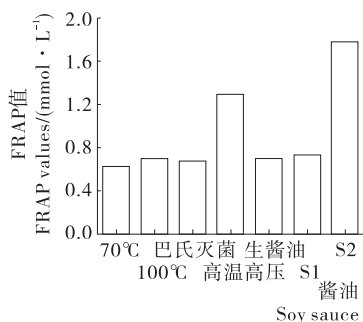


图4 酱油的铁离子还原力

Figure 4 Soy sauce iron ion reducing power

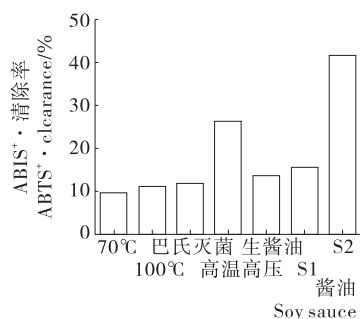
图5 酱油的 ABTS⁺ · 清除能力

Figure 5 ABTS free radical scavenging ability of soy sauce

有一定的清除能力。高温高压灭菌的牡丹籽粕酱油的 ABTS⁺ · 清除率(26.41%)最强,高于牡丹籽粕生酱油和市售品牌酱油 S1。另一方面,高温高压灭菌的牡丹籽粕酱油的 TEAC 值为 79.90 mmol Trolox/mL,抗坏血酸的为 283.48 mmol Trolox/mg,表明 3 μ L 酱油样品的 ABTS⁺ · 清除能力相当于 1 μ g 抗坏血酸的,说明牡丹籽粕酱油具有较强的抗氧化能力。

3 结论

试验表明,牡丹籽粕酱油的最佳发酵工艺条件为发酵温度 45.5 $^{\circ}$ C、发酵时间 18 d、盐水浓度 12%,此时牡丹籽粕酱油氨基态氮含量为 0.616 g/100 mL。体外抗氧化活性表明,经高温高压灭菌的牡丹籽粕酱油的 DPPH · 清除能力、铁离子还原力及 ABTS⁺ · 清除能力都高于牡丹籽粕生酱油,且高温高压灭菌的牡丹籽粕酱油的 DPPH · 清除能力高于两种市售大豆酱油 S1、S2,表明高温高压灭菌下的牡丹籽粕酱油具有较好的抗氧化能力。试验仅涉及牡丹籽粕低盐固态发酵酱油的抗氧化性,并未研究其具体的抗氧化物质。因此,分离鉴别牡丹籽粕酱油具体的以及特有的抗氧化物质是后续研究的重点。

参考文献

[1] 袁琴琴, 刘文营. 牡丹籽中营养和功能性成分研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(17): 333-339.

[2] 周琳, 王雁. 我国油用牡丹开发利用现状及产业化发展对策[J]. 世界林业研究, 2014, 27(1): 68-71.

[3] 卢宗元. 牡丹花及牡丹籽饼粕化学成分研究[D]. 洛阳: 河南科技大学, 2014: 3.

[4] 戴玉, 许腾, 初汉平, 等. 牡丹籽饼营养成分分析[J]. 饲料研究, 2019, 42(7): 54-57.

[5] 金青哲, 王丽蓉, 王兴国, 等. 木本油料油脂和饼粕产品开发[J]. 中国油脂, 2015, 40(2): 1-7.

[6] 宋王婷, 咎丽霞, 索艳敏, 等. 牡丹籽粕发酵酒工艺优化研究[J]. 粮食与饲料工业, 2018(12): 28-31.

[7] 李杰. 一种牡丹辣木酱油及制备方法: 中国, 201510421535.0[P]. 2015-11-25.

[8] BRAND-WILLIAMS W, CUVELIER M E, BERSET C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity[J]. Lebensm. Wiss Technol, 1995, 28: 25-30.

[9] SIDDHURAJU P. The antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of phenolics of raw and heated moth bean (*Vigna aconitifolia* Jacq.) Marechal seed extracts[J]. Food Chemistry, 2006, 50(1): 149-157.

[10] BENZIE I F F, STRAIN J J. The Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay[J]. Anal Biochem, 1996, 239: 70-76.

[11] TAKEHARU N, HITOMI Y, RIICHIRO U. Effect of temperature on the stability of various peptidases during peptide-enriched soysauce fermentation[J]. Journal of Bio-science and Bioengineering, 2012, 113(3): 355-359.

[12] 赵德安. 酱油酿造工艺的本质与误区[J]. 中国调味品, 2005(8): 4-8.

[13] HOFMANN T. Studies on the relationship between molecular weight and the color potency of fractions obtained by thermal treatment of glucose/amino acid and glucose/proteinsolutions by using ultracentrifugation and colordilution techniques[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(10): 3 891-3 895.

[14] 孙言. 基于挤压技术的白汤酱油酿造及其品质分析[D]. 无锡: 江南大学, 2018: 32.

[15] 罗龙娟. 不同制曲和发酵工艺条件对高盐稀态酱油品质的影响[D]. 广州: 华南理工大学, 2011: 42.

[16] 夏季, 郑炯, 陈光静, 等. 响应面法优化超声辅助提取野木瓜多酚工艺[J]. 食品工业科技, 2014, 35(21): 253-258.

[17] 张欢欢. 原料及美拉德后处理对酱油抗氧化活性影响的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2018: 30.