

# 毛霉发酵对豆制品的质构和微观结构的影响

郑晓婷, 赵新淮

(乳品科学教育部重点实验室, 东北农业大学, 黑龙江 哈尔滨, 150030)

**摘 要** 利用质构仪和扫描电子显微镜研究毛霉发酵豆腐的质构和微观结构, 通过电泳分析豆腐的蛋白质水解情况, 并与未发酵豆腐进行对比。结果表明, 与未发酵豆腐相比, 发酵豆腐的硬度和黏性增大, 内聚性和弹性减小。其微观结构较均匀致密。电泳分析和微结构分析均显示出大分子量的蛋白质在豆腐发酵过程中的降解。

**关键词** 毛霉, 豆腐, 质地, 微观结构

毛豆腐是我国徽州的著名小吃, 它是利用豆浆的凝乳状物, 通过微生物发酵所制成的一种干酪型产品, 可以有效地提高大豆的消化率和生物价<sup>[1]</sup>。毛霉是生产发酵豆制品——毛豆腐的主要菌种, 这主要是因为毛霉能分泌蛋白酶, 将蛋白质分解生成氨基酸和多肽等, 使食品具有独特的风味、丰富的营养和质地的细腻, 受到消费者的喜爱。

食物的物性与食品的品质密切相关, 是食品品质评价的一个重要方面。消费者对食品的接受度, 很大程度上取决于食物的物性, 如硬度、黏性等。毛霉发酵, 不仅为毛豆腐的成型提供了包裹作用, 而且它所分泌的蛋白酶对毛豆腐的质地必定有着重要的影响。因此, 研究毛豆腐在发酵期间的质地等方面的变化具有重要意义。本研究从自然发酵生产的毛豆腐中分离得到 1 株毛霉, 模拟毛豆腐的发酵过程, 利用此菌株发酵豆腐, 然后利用仪器分析方法等观察、分析毛豆腐的微观结构和质地的变化, 及蛋白质降解情况。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 试验菌种及试剂

毛霉(*Mucor*), 从自然发酵生产的豆制品中分离获得; 斜面培养基: 查氏培养基和沙保劳氏培养基; 豆腐, 购自市场; 标准蛋白(Mark), 中国科学院; 十二烷基磺酸钠(SDS), Sigma 公司; 四甲基乙二胺(TEMED), Sigma 公司; 丙烯酰胺, N,N-甲叉双丙烯酰胺, 三羟甲基氨基甲烷(Tris), 甘氨酸, Solarbio 公司。

#### 1.1.2 仪器设备

DHP-9272 型电热恒温培养箱, 哈尔滨东联电子技术开发有限公司; pH S-3C 型精密 pH 计, 上海雷磁仪器厂; 手提式压力蒸汽灭菌器, 镇海金鑫医疗器械有限公司; ES-2030 型冷冻干燥仪, 日本 HITA-CHI; S-3400N 扫描电镜, 日本 HITACHI; E-1010 型离子溅射镀膜仪, Giko; TA.XT PLUS 质构仪, 美国; 凝胶成像分析系统, 美国。

## 1.2 方 法

### 1.2.1 发酵豆腐制备工艺<sup>[2]</sup>

豆腐→灭菌→切块→接种→培养(又称发花)→凉花

毛霉菌悬液—↑

豆腐经 100℃ 湿热灭菌 20 min 后, 切成 3 cm×3 cm×2 cm 的豆腐坯, 用无菌水冲洗已培养好的毛霉斜面培养基, 过滤即得菌悬液, 用软刷均匀地将悬液涂布在豆腐坯上, 保持培养温度为 20℃, 分别取发酵 2~6 d 的样品和豆腐原样进行试验。

### 1.2.2 质构仪测试条件<sup>[3]</sup>

采用 TPA 二次下压法, 具体参数如下: 探头: P 0.5; 下降速度: 1.0 mm/s; 测试速度: 1.0 mm/s; 提升速度: 1.5 mm/s; 下压距离为 8 mm; PPS: 200.0; 时间: 5.00 s; 触发力: 2.5 g。每个样品重复测定 5 次。

### 1.2.3 电镀样品的制备过程<sup>[4]</sup>

取样及固定→冷冻割断→冲洗→脱水→置换→干燥→粘样→镀膜

将样品切成小块, 放在 2.5% 的戊二醛溶液中, 4℃ 固定 12 h 后, 用液氮迅速冷却样品, 用锤子轻击, 使之自然断裂, 在 pH 6.8 的磷酸缓冲液中清洗 3 次, 每次 10 min, 然后用乙醇(50%、70%、90%、100%)分别脱水 10 min, V(100%乙醇): V(叔丁醇)=1:1; 叔丁醇各一次, 每次 15 min, 之后样品干燥 4 h, 最后粘样和镀金膜。

第一作者: 硕士(赵新淮为通讯作者)。

收稿日期: 2008-02-22

通过扫描电子显微镜对制备好的样品进行分析、观察,得到相应的扫描电镜照片。

#### 1.2.4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳<sup>[5]</sup>

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

B液(4×分离胶缓冲液):75 mL 2mol/L Tris-HCl (pH 8.8),4 mL 10% SDS,21 mL 蒸馏水,混匀,4℃ 冰箱保存。

C液(4×浓缩胶缓冲液):50 mL 1mol/L Tris-HCl (pH 6.8),4 mL 10% SDS,46 mL 蒸馏水,混匀,4℃ 冰箱保存。

电泳缓冲液:3 g Tris 碱,14.4 g 甘氨酸,1 g SDS,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,H<sub>2</sub>O 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,H<sub>2</sub>O 4.6 mL,混匀,现用现配。

电泳: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。

## 2 结果与讨论

### 2.1 质构分析结果

将豆腐和不同发酵时间的毛豆腐样品进行物性测定,测定指标包括硬度、黏性、内聚力、弹性与咀嚼性,分析结果如图 1 所示。

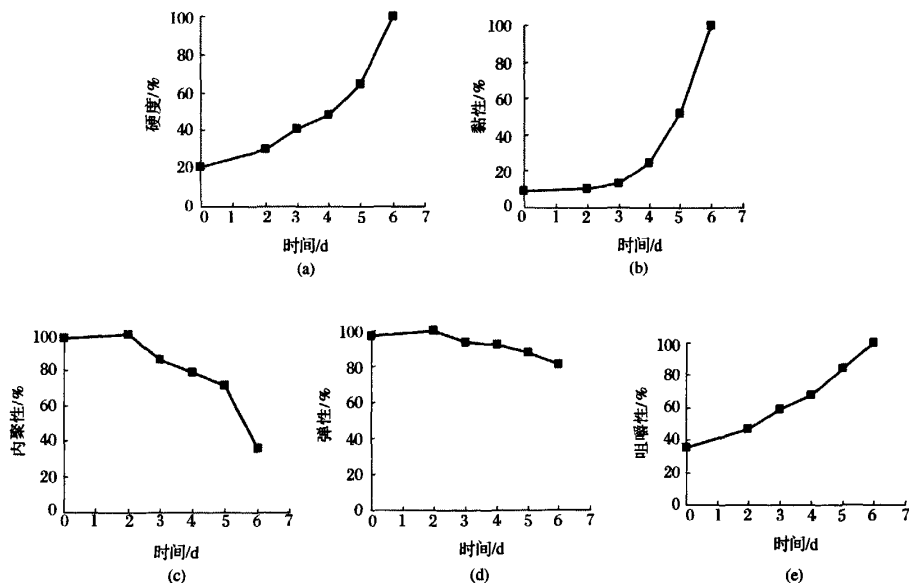


图 1 毛霉发酵过程中豆腐坯的物性随发酵时间的变化

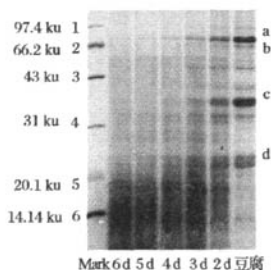
豆腐经发酵后,其水分含量由原来的 78%~80%,下降为 69%~71%,毛坯块变小、坯身变硬。由于其内部的空间结构在蛋白酶的作用下被破坏(蛋白质被降解,电泳分析和微观结构分析可证明这一点),毛豆腐的质地变均匀细腻。从图 1-a 和图 1-b 可看出,豆腐的硬度和黏性都随着发酵时间的延长而呈增加趋势,而内聚力和弹性如图 1-c 和图 1-d 所示,它们随着发酵时间的延长而呈减小趋势,总体体现为咀嚼性的增加(如图 1-e)。整体上看,毛霉发酵对豆腐质地产生的有利影响,改善了豆腐原有的组织状

态,赋予毛豆腐更好的口感。

### 2.2 蛋白质水解

对未发酵的豆腐和发酵 2~6 d 的毛豆腐样品中的蛋白质进行电泳,以未发酵的豆腐为对照,通过对蛋白质电泳条带分布和各条带的分子量的对比,分析毛霉发酵过程对毛豆腐样品中蛋白质的水解情况。在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析结果见图 2。

在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳过程中,蛋白质的分子量的大小,决定了蛋白质在凝胶中的迁移率。采用凝胶成像系统软件 Labwork 4.5 分析可知,未发



1-兔磷酸化酶 B(MW 97.4 ku);2-牛血清白蛋白 (MW 66.2 ku);3-兔肌动蛋白(MW 43 ku);4-牛碳酸酐酶(MW 31 ku);5-胰蛋白酶抑制剂(MW 20.1 ku);6-鸡蛋清溶菌酶(MW 14.4 ku)。

图2 毛霉发酵豆腐的蛋白质水解电泳图

酵的豆腐中,蛋白质的分子量范围约为 97~25 ku,即蛋白质分子相对较大。在豆腐的毛霉发酵过程中,毛霉分泌的蛋白酶对豆腐中的蛋白质进行了水解。并且,随着发酵时间的延长,大分子量的蛋白质被水解成小分子量的肽、肽和氨基酸。通过豆腐和不同发酵时间的毛豆腐样品的电泳蛋白质条带对比,可以看出,在发酵第 3 天的样品中,已经几乎不含有分子量约为 97 ku 的蛋白质;在发酵的第 6 天,样品中的大部分大分子量蛋白质已基本降解为分子量小于 20 ku 的蛋白质。

### 2.3 微观结构观察

食品品质的改进经常与其微观结构上的改变有关系。对豆腐和不同发酵时间的样品进行扫描电子

显微镜观察,确定微观结构的变化,结果如图 3 所示(放大倍数为 5 000 倍)。

由图 3-a 可以看出,豆腐白坯含有大孔径的空间网状组织结构,这些微孔的直径一般为 1~4 μm,呈不规则蜂窝型结构。网状组织结构是由大豆蛋白所形成的,是豆腐质地产生的物质基础。正是由于这种微观的大孔径网状结构,赋予了豆腐在宏观上所表现出的物理性质(持水力和内聚性等)。

在发酵阶段,毛霉生长的变化大致可分为孢子发芽生长、菌丝生长旺盛和菌丝产酶 3 个阶段。试验发现,在 20℃ 的温度条件下,发酵 48 h 时菌丝已长满在豆腐坯表面,并且开始分泌出蛋白酶。毛霉发酵作用,不仅使豆腐表面被菌膜包住,形成一定的外观形状,更为重要的是所分泌的蛋白酶来水解蛋白质,破坏了豆腐原有的空间结构。从图 3-b 至图 3-f 中可观察到发酵(更确切地说是蛋白质水解)对微结构的影响,扫描电子显微镜图片清楚的显示出微观结构的变化情况。随着发酵时间的延长,蛋白质的水解程度加大,蛋白质网状结构的破坏作用加大,大孔径的网状结构逐渐减少,小孔径的网状结构增加,质地逐渐变得非常紧密;发酵到 4~6 d 后,蛋白质的空间网状结构已经基本消失,已经形成均匀、紧密微观结构特征。与质构分析结果相联系,看出随着蛋白质分子被降解为较小的肽分子片断,毛豆腐的质地改善应该直接取决于蛋白质的水解。

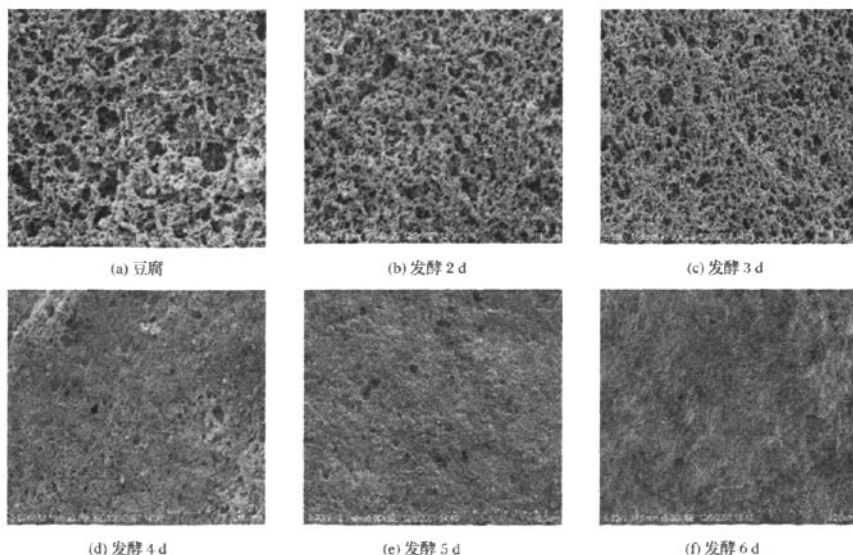


图3 豆腐白坯和不同发酵时间毛豆腐坯的微观结构特征

整体上看,在毛霉对豆腐进行发酵处理时,发酵过程中毛霉分泌蛋白酶,并对蛋白质进行降解作用,导致了蛋白质分解成为较小的肽片断,破坏了蛋白质分子在豆腐中形成的网状结构,改善了毛豆腐的物性指标,赋予了毛豆腐以良好的感官质量。蛋白酶对豆腐中蛋白质的水解作用,是所研究的各种变化产生的根本原因。

### 3 结 论

在毛霉发酵豆腐过程中,豆腐的硬度、黏性等质地性质都随着发酵时间的改变有相应的变化,硬度和黏性呈增加趋势,内聚性和弹性则呈减小趋势,总体体现为咀嚼性的增加。对毛豆腐中的蛋白质的电泳分析显示,豆腐中的蛋白质在发酵过程中被降解,大部分降解为分子量小于 20 ku 的肽片断。通过扫描电镜对其微观结构的观察,证明了微观结构随发酵时

间有明显的变化,并与质地分析结果相对应。发酵过程中蛋白质的降解是产生质构变化、电泳条带变化以及微观结构变化的根本原因。

### 参 考 文 献

- 1 张雪梅,蒲 彪. 腐乳的研究概况与发展前景[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(5): 94~97
- 2 王瑞芝. 中国腐乳酿造[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999
- 3 郑小平,莫蓓红,郭本恒. 质构仪在干酪凝乳终点判定中的应用[J]. 乳品工业与技术, 2007, 3: 122~124
- 4 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
- 5 汪家政,范 明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2008

## Study on the Effect of Tofu Fermentation by *Mucor* on Texture and Microstructure

Zheng Xiaoting, Zhao Xinhui

(Ministry of Education Key Lab of Dairy Science, College of Food, Northeast Agriculture, Haerbin 150030, China)

**ABSTRACT** The texture and microstructure of *Mucor* fermented tofu were studied by texture analyzer and scanning electronmicroscopy (SEM). Proteolysis of tofu was analyzed by SDS-PAGE electrophoresis using unfermented tofu as a control. The TPA profiles showed that hardness and adhesiveness of fermented tofu were increased while the cohesiveness and springiness were reduced. The microstructure of fermented tofu was homogeneous. Results from SDS-PAGE analysis and microstructure analysis both indicated protein degradation during tofu fermentation.

**Key words** mucor, tofu, texture, microstructure

信  
息  
窗

### 微生物源杀菌剂长川霉素面世

由浙江海正化工股份有限公司承担的浙江省技术创新项目——创制微生物源杀菌剂长川霉素产业化关键技术研究已通过省级验收。长川霉素是上海农药研究所创制的我国具有自主知识产权的微生物源杀菌剂。该项目采用孢子悬液接入种子罐培养、罐发酵、放罐、料液经过滤、滤渣用丙酮浸泡,浸泡液树脂层析,洗脱液浓缩,萃取,制成微生物源杀菌剂长川霉素。

产品具有高效、低毒、对环境友好等特点。产品经苏州市蔬菜研究所、浙江金华农科院三禾农业开发有限公司田间药效试验表明,1%长川霉素乳油对番茄、草莓灰霉病等病害防治效果良好。浙江省化工研究院化学品安评中心急性毒性试验结果表明,经口原药为中毒、1%乳油为低毒,经皮均属低毒,对皮肤均无刺激性,对眼睛1%乳油有轻度至中度刺激性。上海农药研究所与浙江海正化工有限公司合作对该项目进行产业化开发并获得成功,长川霉素原药和1%长川霉素乳油均取得了农药临时登记证。该杀菌剂对黄瓜灰霉病、玉米小斑病、菌核病、白粉病等多种真菌病害有较好的防治效果,可广泛用于草莓、番茄、黄瓜等经济作物,可替代多菌灵、甲基托布津、速克灵等抗性严重的农药。