

# 利用米曲霉制作腊八豆的研究

周传云, 谭周进, 蒋立文

(湖南农业大学食品科技学院, 湖南 长沙 410128)

**摘 要:** 以酿造酱油用的米曲霉经紫外线诱变选育后, 人工接种于煮熟的黄豆制作腊八豆。结果表明, 接种量为熟豆重量的 0.5% (孢子含量  $10^{10}$  个 /g 菌剂), 经 32~35℃、48h 前发酵便可得优质霉豆胚, 加适量食盐、食用白酒及生姜等拌匀入坛进行 10~15d 的后发酵, 便可获得品质极鲜美, 食后余味甘甜的腊八豆, 优于毛霉型腊八豆, 更优于传统方法制作的腊八豆。比传统腊八豆的制作周期缩短近 1 个月, 便于工业化生产。

**关键词:** 米曲霉; 毛霉菌; 发酵; 腊八豆

## Study on Preparing of Labadou Fermented by *Aspergillus oryzae*

ZHOU Chuan-yun, TAN Zhou-jin, JIANG Li-wen

(College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

**Abstract:** The study on the breeding of *Aspergillus oryzae* and the possibility of industrial processing for Labadou preparation was conducted. The results showed that: The bred *Aspergillus oryzae* Mq1 could be used for the preparation of Labadou. The high-quality-fermented soybean could be obtained when the prepared soybean was inoculated with 0.5% *Aspergillus oryzae* Mq1 preparation (about  $10^{10}$  spores per gram) and cultured 48hrs at 32~35℃. If the pre-fermented soybean was added with salt, liquor and other flavors, delicious quality Labadou would be prepared after 10~15d post-fermentation. Compared with mucor-fermented Labadou and traditional Labadou, the Labadou fermented by *Aspergillus oryzae* Mq1 was more delicious and nutritional, and the processing cycle was shortened by one month or so.

**Key words:** *Aspergillus oryzae*; *Mucor* sp.; fermentation; Labadou

中国分类号 TS214

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2005)01-0134-04

腊八豆是中国南方民间冬春两季较为盛行的传统美食。人们在家里将煮熟过的大豆摊放在簸箕内, 让其自然发霉 7~15 d, 再拌入适量的食盐、白酒、生姜等辅料, 入坛, 经 30 d 左右腌制而成。由于其味鲜美、独特, 且具有多种保健功能, 虽从历史流传至今, 民间仍很盛行, 然而其产品品质、卫生质量很难保证。故而笔者已于 4 年前采用现代微生物发酵工程, 利用从腐乳中筛选出来的毛霉 M2 进行人工接种、人工调控发酵, 在国际上领先获得了工业化生产成功, 使民间传统腊八豆进入了工业化、规模化、商品化<sup>[1]</sup>。

然而, 为了更加丰富现有商品腊八豆的风味、保健功能及品种种类, 本研究利用酱油生产用的米曲霉进行紫外线诱变所取得的纯种米曲霉发酵制作腊八豆, 获得了可喜的成功。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

菌种 毛霉 M2 及米曲霉等试管菌种均由湖南农业

大学食科院微生物教研室提供 菌种扩大用培养基 PDA 固体培养基; 生产用菌剂培养基 麸皮固体培养基; 初筛蛋白酶活力用培养基 干酪素平板 其它 大豆及主要辅料均为市售食用级。

### 1.2 仪器设备

恒温培养箱; 烘箱; 高压蒸汽灭菌器; 发酵器 自制; CHA-123 OLYMPUS 显微镜 日本; 血球计数板; 723 型分光光度计 上海 NC-4A 氨基酸自动分析仪 日本岛田公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 米曲霉菌种诱变、筛选

诱变筛选程序

出发菌株→制备孢子悬液→制备含菌平板诱变处理→初筛→复筛→发酵性能测定→生产用菌株。

诱变剂 紫外线, 由从市场新购置的 15W 紫外灯产生。

孢子悬液制备 在 PDA 斜面上取 2 环经活化好的米曲霉出发菌株的孢子, 在盛有 100ml 并含有玻璃珠的无

收稿日期: 2003-12-23

作者简介: 周传云(1947-), 男, 副教授, 研究方向为食品微生物、食品发酵工程、大豆深加工及奶制品加工。

菌生理盐水的三角瓶中振荡20min,得单孢子悬液。用血球计数板计数其孢子含量,并用无菌生理盐水逐步稀释至含孢子数约为 $10^4$ 个/ml的孢子悬浮液,且置32℃恒温箱中培养6h备用。

**诱变方法** 取上述制备好的孢子悬液0.1ml,均匀涂布于9cm直径的PDA平板表面。将涂菌平板垂直放置在15W紫外灯下20cm处,打开皿盖进行照射处理,共设3个不同的照射时间(即3个不同的诱变剂量):10、15、20min。

每个剂量设6次重复。照射后立即用黑牛皮纸包扎好(避光),倒置于32℃恒温箱中培养3d,取平板上单个独立的米曲霉菌落,移植到PDA斜面培养基上,5支/每个菌落,培养到长满黄绿色孢子后,置4℃冰箱保存备用。

**诱变菌株的筛选:**分别从上述照射处理后培养好的PDA斜面上取孢子,用无菌生理盐水稀释成含孢子 $10^2$ 个/ml的孢子悬浮液,取0.1ml均匀地涂布于干酪素平板表面,置32℃恒温箱中培养2d,分别测定每皿中透明圈直径和菌落直径,计算其HE值。 $HE值 = 透明圈直径 / 菌落直径$ ,选择HE值最大的菌株为本研究用,代号为Mq1。该试验设诱变前米曲霉为CK1(对照1)以毛霉M2为CK2(下文同);但因毛霉在32℃几乎不生长,故取其最适生长温度(25℃,2d)进行培养测定。

**蛋白酶活力测定(Folin-酚法<sup>[2]</sup>):**将所选菌取少许孢子接种于无菌三角瓶麸皮培养基内,于相应温度恒温箱中培养72h,测定其蛋白酶活力。准确称取鲜曲2.00g于内置玻璃珠若干粒的干净三角瓶内,加蒸馏水50ml并振摇20min以便充分将曲打散,于40℃水浴中恒温浸提1h,用定性滤纸过滤去渣得酶液。酶液用pH7.2的0.2mol/L磷酸缓冲液进行适当稀释。40℃测酶活力,723型分光光度计680nm比色。同时测定鲜曲水分含量。

**蛋白酶活力单位:**在40℃,pH7.2条件下,每min水解酪蛋白产生1μg酪氨酸的酶量为一个酶活力单位(U)。

### 1.3.2 菌种制备

**一级菌种** 用PDA斜面培养。

**二级菌种** 按麸皮与水的质量比1:1.2混合均匀,装入500ml的三角瓶内,每瓶装麸皮15g,塞上棉塞并包扎防潮纸,于0.1MPa灭菌40min,取出摇动,冷却到室温,在无菌条件下接种少许一级菌种置入麸皮内并充分摇匀,平置于相应恒温箱中培养,中途扣瓶2~3次,直至麸皮上长满孢子后备用。

注:M2用25℃恒温培养,Mq1及CK1用32℃恒温培养。二级菌种即为本研究用的“生产菌剂”,又称“麸曲”。

### 1.3.3 腊八豆制作工艺

大豆精选去杂→浸泡→水洗→蒸煮→接种→前发酵→后发酵→后期处理→质检

### 1.3.4 工艺操作

**大豆精选去杂** 将市购大豆精选,去除病粒、杂

色粒及砂石等杂质异物,用清水洗净。

**浸泡** 用20~25℃水浸泡10h,让豆粒充分吸饱水份。

**蒸煮** 本研究根据笔者毛霉型腊八豆生产的经验,采用常压湿热蒸煮60min,至豆粒均匀熟化,软而不烂、色泽变化不明显为度。

**接种** 将蒸煮好的大豆,置入无菌室让其自然冷却至室温。按湿豆重量的0.5%称取制备好的麸曲种(均按含孢子量 $10^{10}$ 个/g计算)于灭菌不锈钢盆内,加适量的无菌水。在无菌操作下,充分搅拌使菌剂中的孢子充分均匀分散在无菌水中,过滤去渣制得孢子悬液,再用手持无菌喷雾器将孢子悬浮液喷洒到蒸煮冷却好的大豆上,置发酵器上培养“发霉”。

**前发酵(发霉)** 将接种毛霉(M2)菌剂的大豆发酵器置25℃恒温培养,接种米曲霉(Mq1与CK1)菌剂的置32~35℃恒温培养,观察记录其生长情况。

**后发酵** 将前发酵好的尚未产生孢子的霉豆坯取出,放入灭菌不锈钢盆中,加入6%的食盐及适量的生姜米和优质食用白酒,拌匀后入坛密封进行发酵,每隔一定时间抽样检查其发酵风味,并进行最终发酵成品的氨基酸分析。

**后期处理** 后发酵好的大豆已具有腊八豆的特有风味,称之为原味腊八豆,可直接作汤料或作配菜等食用,亦可添加香辛调味料加工调制成香、辣、软、鲜等不同系列产品。

### 1.3.5 产品检验方法

**感官检验** 外观粒形完整程度,有无散瓣及其程度,色泽,是否有腊八豆的特殊发酵香味和滋味。

**氨基酸分析** 取分别用毛霉(M2)、诱变前的米曲霉(CK1)及诱变后的米曲霉(Mq1)等3种生产菌剂接种且发霉期均为48h并接着入坛经15d后发酵的腊八豆及煮熟而未发酵的黄豆经酸水解后,用氨基酸自动分析仪测定其氨基酸的含量,由中国农科院饲料研究所进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 Mq1个体形态及菌落特征

经紫外线诱变筛选获得的米曲霉Mq1菌株,用PDA平板插片法<sup>[3,4]</sup>培养,镜检个体形态为:菌丝无色呈分枝状,体内有横隔膜,多细胞,基内菌丝有明显的足细胞,其气生菌丝顶端产生膨大成卵形的顶囊,顶囊外面四周有两层辐射状小梗,小梗顶端着生成串的球形分生孢子,孢子较大,黄绿色。Mq1在PDA平板上菌落特征为:菌落初期为浅白色,后转为浅褐色,最终长满致密黄绿色孢子,菌落呈圆形,边缘较整齐。该菌未检出黄曲霉毒素。

### 2.2 米曲霉菌种诱变筛选结果

以25℃培养好的毛霉M2菌株为对照2(CK2),以32℃培养好的诱变前米曲霉菌株为对照1(CK1)与经32℃培养好的诱变后米曲霉菌株Mq1进行试验,结果如表

1。从表1可以看出,经诱变后的米曲霉菌株的生长速度、产孢量、蛋白质分解能力均明显优于其诱变前,也优于毛霉M2菌株。

表1 米曲霉菌种诱变筛选结果  
Table 1 Induced breeding of *Asp. Oryzae*

HE 值	蛋白酶活力 (U/g干曲)	麸曲内长满孢子 所需时间(h)	麸曲孢子数 (个/g)
Mq1	2.31	6271.5	30
CK1	1.35	4682.6	50
CK2	1.42	4791.3	74

### 2.3 米曲霉制作腊八豆的发霉特性

用等孢子含量的麸曲接种到等重量的蒸煮好并冷却到室温的黄豆中,用同样大小的发霉器用相应的温度进行前期发霉的结果见表2。从表2可看出,米曲霉与毛霉均能发酵大豆呈现腊八豆的风味,而尤以诱变后Mq1菌株发酵性能更佳,发霉快速,便于缩短生产周期,豆粒完整疏松便于后期处理,豆味甘甜舒爽便于扩大消费群体。另外,由于米曲霉能够在32℃生长良好,比毛霉的最适生长温度高得多,所以更利于夏天制作腊八豆。

### 2.4 米曲霉对腊八豆后发酵品质的影响

将发霉正常而未长孢子的霉豆胚拌入同种、同比例的辅料(食盐、食用白酒、生姜等)后,入同样结构、大小的坛子进行后发酵,均于不同时期取样进行感官评定,结果见表3。从表3结果可看出,在腊八豆的后发酵阶段,米曲霉发酵有着与毛霉发酵的同等风味,但其食后的余味和粒形的完整性前者胜过后者,然而其豆粒的色泽随着发酵时间的延长,前者不如后者,其原

因有待探讨。以其风味的完美性及生产效益综合指标看,均以10~15d的后发酵期为宜。

### 2.5 米曲霉发酵对腊八豆中氨基酸含量的影响

取发霉期为48h并接着入坛经15d后发酵的腊八豆,测定其氨基酸含量,结果见表4。从表4可看出,米曲霉及毛霉发酵的腊八豆中氨基酸的总含量均比未发酵的熟黄豆中氨基酸总含量有较大幅度增加,尤以诱变后的米曲霉Mq1增幅最大,增加了51.7%。其中呈鲜味的氨基酸总量增幅大小依次为:诱变后的米曲霉(53.25)>诱变前的米曲霉(51.51)>毛霉(50.06)>未发酵的煮熟黄豆(36.97);呈现甜味的氨基酸总量增幅大小依次为:诱变后米曲霉(36.41)>诱变前米曲霉(33.73)>毛霉M2(30.31)>未发酵的煮熟豆(21.73)。这均与表2和表3的结果相对应。8种必需氨基酸总含量增加率依次为:诱变后米曲霉制作的腊八豆(37.7%)>诱变前米曲霉制作的腊八豆(31.35%)>毛霉制作的腊八豆(22.45%)>煮熟未发酵黄豆(0)。

## 3 结 论

3.1 研究表明:利用经过诱变的纯种米曲霉人工接种煮熟的黄豆,接种量为料重的0.5%(菌剂含孢子量 $10^{10}$ 个/g),前发酵期(发霉阶段)为48h(32~35℃),后发酵期为10~15d(常温)。即可获得:粒形完整,豆粒软硬适度,色泽豆黄或微褐,具有优质自然发酵腊八豆特殊的发酵香味,味道极鲜美,食后余味甘甜的腊八豆。但后发酵期达30d以上时,豆粒将变深褐色乃至变浅黑色,味仍极鲜。

3.2 分析表明,利用经过诱变育种后的纯种米曲霉发酵制作腊八豆时,对大豆中蛋白质的分解转化率较高。

表2 不同菌种在熟黄豆上发霉状况比较  
Table 2 Growth situation of different strains on bean

发霉时间 (h)	Mq1	M2	CK1
24	豆粒表面幼眼可见菌丝初现,豆香味浓	部分豆粒表面有白色菌丝生长,豆香味浓	豆粒表面无菌丝生长,豆香味浓
36	表层豆粒已长满浅白色菌丝,中层豆粒也开始生长,有霉香味	表层豆粒已长满白色菌丝,中、下层豆粒稍见菌丝生长,微有霉香味	表层豆粒表面均已有菌丝生长
48	中、下层豆粒均已长满菌丝,且菌丝已由白开始转浅褐色,霉香味浓,已有腊八豆香	中、下层豆粒均已长有菌丝,表层豆粒上菌丝开始转灰白色,有霉香味,微有腊八豆香	中、下层豆粒已开始有菌丝生长,微有霉香味
60	所有豆粒均已长满菌丝,豆粒之间疏松而不粘结,大部分豆粒表面已有黄绿色孢子,霉香味浓,腊八豆特有香浓厚,豆粒甘甜,舒爽	豆粒表面已长满灰白色絮状菌丝(约1cm长),豆粒之间大部分结块,霉香味浓,腊八豆香浓	所有豆粒均已长有菌丝,并转为浅褐色,豆粒之间疏松不粘结,霉香味浓,同时有腊八豆特有香味,豆粒微甜
72	稍动发酵器便可见黄绿色孢子飞扬,豆粒较干,完整而不皱缩,豆粒甘甜稍带微苦	表层豆粒已长有稀疏黑色孢子,豆粒之间结板块,豆粒味涩带苦,色泽较暗	豆粒已长有黄绿色孢子,豆粒完整疏松稍干,味甘甜

表3 米曲霉对腊八豆后发酵品质的影响结果  
Table 3 The effect of *Asp.oryzae* on quality of Labadou

发酵时间 (d)	Mq1	M2	CK1
3~5	有鲜味, 盐、酒、姜味浓厚, 豆粒黄色	微有鲜味, 盐、酒、姜味浓厚, 豆粒黄色	微有鲜味, 盐、酒、姜味浓厚, 豆粒黄色
7~10	滋味鲜美, 有甘甜味, 有腊八豆香味, 无酒及生姜味, 粒形完整, 豆黄色	滋味较鲜美, 有腊八豆香味, 无甜味、无酒味, 微有散瓣, 豆黄色	滋味鲜美, 有腊八豆味, 有甘甜味, 无酒味, 豆黄色
15~20	味道极鲜美, 咸淡适中, 余味甘甜、风味浓厚, 粒形完整	味道极鲜美, 咸淡适中, 风味浓厚, 但余味无甘甜, 粒形欠完整	味道很鲜, 咸淡适中, 余味微甘甜, 粒形完整
20~30	味道极鲜美, 咸淡适中, 余味甘甜、风味浓厚, 豆粒虽完整但色泽开始变暗	味道极鲜美, 咸淡适中, 风味浓厚, 但余味无甘甜, 豆粒黄色, 但豆粒已软糜	味道很鲜, 咸淡适中, 余味微甘甜, 粒形完整, 但色泽已变暗

表4 米曲霉发酵的腊八豆中氨基酸含量测定结果  
Table 4 The amino acid content of Labadou fermented by *Asp. oryzae*

氨基酸种类	经 Mq1 发酵的腊八豆中 (mg/100g)	经 CK1 发酵的腊八豆中 (mg/100g)	经 M2 发酵的腊八豆中 (mg/100g)	煮熟而未发酵的黄豆 (mg/100g)
天门冬氨酸(Asp)	18.04	17.34	16.82	12.03
*苏氨酸(Thr)	4.25	3.81	3.29	3.99
丝氨酸(Ser)	8.65	8.13	7.65	4.07
谷氨酸(Glu)	35.21	34.17	33.26	24.94
甘氨酸(Gly)	7.63	7.21	6.70	5.04
丙氨酸(Ala)	7.91	7.43	6.47	5.07
*缬氨酸(Val)	7.36	7.15	6.95	5.60
*蛋氨酸(Met)	1.85	1.47	1.35	1.00
*异亮氨酸(Ile)	8.61	8.10	7.50	5.75
酪氨酸(Tyr)	5.07	4.95	4.58	2.39
*苯丙氨酸(Phe)	8.92	8.87	8.35	6.44
*组氨酸(His)	3.87	3.72	3.27	3.03
*赖氨酸(Lys)	5.02	4.69	4.25	2.33
精氨酸(Arg)	10.04	9.92	9.85	4.49
*亮氨酸(Leu)	11.15	10.87	10.42	8.92
脯氨酸(Pro)	2.95	2.46	1.95	1.23
合 计	146.53	140.29	132.64	96.59
氨基酸总量增加率(%)	51.70	45.24	37.32	0
8种必需氨基酸总含量	53.03	48.68	45.38	37.06
8种必需氨基酸增加率(%)	37.70	31.35	22.45	0

经测定后发酵完成后的原味腊八豆, 其 16 种氨基酸总含量的多少依次为: 诱变后米曲霉发酵的 > 诱变前米曲霉发酵的 > 毛霉 M2 发酵的。其中呈鲜味氨基酸的总含量, 诱变后米曲霉发酵的为毛霉 M2 发酵的 1.06 倍; 呈甜味氨基酸的总含量, 诱变后米曲霉发酵的比毛霉 M2 发酵的增加了 20.13%, 8 种必需氨基酸的总量以诱变后米曲霉发酵的腊八豆中含量最大。

3.3 结果分析表明: 利用米曲霉工业化生产腊八豆技术上是可行的, 经过工艺放大, 利用米曲霉发酵生产的新型腊八豆产品将会成为传统而又新型的保健型发酵大豆制品。

#### 参考文献:

- [1] 蒋立文, 周传云, 邬玉香. 传统美食腊八豆工业化生产的研究[J]. 食品科学, 2003, (3): 59-64.
- [2] 孟颢华. 沪酿3.042米曲霉的纯化复壮[J]. 中国调味品, 2001, (7): 7-9.
- [3] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994. 48-393.
- [4] 范秀容, 李广武, 沈萍. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1992. 82-188.
- [5] 石彦国. 大豆制品工艺学[M]. 北京: 轻工业出版社, 1994.