

# 单菌剂固态发酵改善紫苏饼粕工艺优化及理化特性分析

杨欣<sup>1,2</sup>, 杨孟<sup>1</sup>, 胡萍<sup>1\*</sup>, 张玉龙<sup>3</sup>

(1. 贵州大学酿酒与食品工程学院, 贵阳 550025; 2. 安顺职业技术学院, 安顺 561000;  
3. 凯里学院大健康学院, 凯里 556011)

**摘要:** **目的** 通过单菌剂固态发酵工艺优化改善紫苏饼粕品质。**方法** 以紫苏饼粕为原料, 研究枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* JP2)接种量、发酵时间、发酵温度、面粉添加比例对发酵紫苏饼粕的品质影响, 并通过正交实验优化发酵工艺, 并对最佳发酵工艺条件下发酵的紫苏饼粕的主要成分、pH及游离氨基酸含量进行测定。**结果** 正交实验极差分析和验证实验显示, 最佳发酵条件为: 发酵时间 60 h、发酵温度 34°C、接种量 2.5%和面粉添加比例 1:20 (g/g)。在最佳发酵条件下, 发酵紫苏饼粕中蛋白酶活力为 1152 U/g, 氨基酸态氮含量为 0.49 g/100 g; 水分含量和 pH 分别由 58.11%、6.27 增加至 60.20%、8.09, 蛋白质、脂肪、还原糖含量分别由 32.14%、11.10%、0.47%降低至 24.92%、2.66%、0.05%, 游离氨基酸种类增加至 13 种, 总氨基酸含量、必需氨基酸含量分别增加至 1.1455%、0.8031%。**结论** 经优化获得了单菌剂固态发酵紫苏饼粕工艺的最佳工艺条件, 该工艺条件有效改善了紫苏饼粕的品质。

**关键词:** 紫苏饼粕; 枯草芽孢杆菌; 优化发酵; 品质改善

## Process optimization of the solid-state fermentation of *Perilla frutescens* seed meal with single microorganism and its physicochemical properties

YANG Xin<sup>1,2</sup>, YANG Meng<sup>1</sup>, HU Ping<sup>1\*</sup>, ZHANG Yu-Long<sup>3</sup>

(1. School of Liquor and Food Engineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. Anshun Technical College, Anshun 561000, China; 3. School of Life and Health Science, Kaili University, Kaili 556011, China)

**ABSTRACT:** **Objective** To improve the quality of fermented *Perilla frutescens* seed meal by optimizing the process of solid-state fermentation with single microorganism. **Methods** The experiment was performed to evaluate the effects of inoculation amount of *Bacillus subtilis* JP2, fermentation time, fermentation temperature, and flour addition ratio on the quality of fermented *Perilla frutescens* seed meal with a raw material of *Perilla frutescens* seed meal. **Results** The range analysis of the orthogonal test and verification experiment showed that the optimal technical conditions were obtained as follows: Fermentation time was 60 h, fermentation temperature was 34°C, inoculation amount was 2.5%, and flour addition ratio was 1:20 (g/g). Under the optimal conditions, fermented *Perilla frutescens* seed meal showed the protease activity of 1152 U/g and 0.49 g/100 g amino acid nitrogen, moisture

基金项目: 国家自然科学基金项目(31460444)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31460444)

\*通信作者: 胡萍, 博士, 教授, 主要研究方向为食品微生物。E-mail: phu1@gzu.edu.cn

\*Corresponding author: HU Ping, Ph.D, Professor, School of Liquor and Food Engineering, Guizhou University, Huaxi District, Guiyang 550025, China. E-mail: phu1@gzu.edu.cn

and pH increased from 58.11% and 6.27 to 60.20% and 8.09, respectively, the content of protein, fat and reducing sugar decreased from 32.14%, 11.10% and 0.47% to 24.92%, 2.66% and 0.05%, respectively, the number of free amino acids increased to 13, the total content of free amino acids and content of essential amino acids increased to 1.1455% and 0.8031%, respectively. **Conclusion** The optimum conditions of solid-state fermentation of *Perilla frutescens* seed meal with single microorganism has been obtained, which can effectively improve the quality of fermented *Perilla frutescens* seed meal.

**KEY WORDS:** *Perilla frutescens* seed meal; *Bacillus subtilis*; optimizing fermentation; quality improvement

## 0 引言

紫苏[*Perilla frutescens* (L.) britt], 又名红苏、赤苏、苏麻、香苏等, 属唇形科一年生草本植物<sup>[1-2]</sup>, 富含酚酸类、类黄酮类、木酚素类、脂肪酸、氨基酸、矿物质等<sup>[3-5]</sup>。紫苏具有平喘祛痰、治疗感冒、解鱼蟹中毒和消炎等功效<sup>[6-7]</sup>, 被国家卫生部首批列为 60 种药食兼用的植物之一<sup>[8]</sup>。紫苏籽的油脂含量为 30%~50%, 不饱和脂肪酸占比高达 90%, 油脂中的  $\alpha$ -亚麻酸含量达 55%~65%<sup>[2-5]</sup>。紫苏籽经过物理压榨脱油后的副产物即为紫苏饼粕。紫苏饼粕富含蛋白质(28%~45%)、全面的必需氨基酸、膳食纤维<sup>[9-13]</sup>, 还含有  $\alpha$ -亚麻酸、亚油酸、油酸、谷维素、维生素 E、维生素 B<sub>1</sub>、甾醇、磷脂、多糖等营养成分<sup>[14-16]</sup>。紫苏饼粕杂质少, 芳香味和色泽良好, 适口性好, 营养丰富, 既不像棉籽粕含有棉酚, 也不像菜籽粕含有硫甙及其降解物等有毒有害物质<sup>[17]</sup>, 净蛋白比值、真消化率和功效比值很高<sup>[12]</sup>。然而, 紫苏经压榨脱油后形成的饼粕被丢弃或者转化为动物饲料, 不再作为食物进入餐桌, 降低了紫苏资源的利用率。现有研究重点关注紫苏饼粕的营养成分和功能活性物质<sup>[18-22]</sup>, 鲜有文章报道如何提高紫苏饼粕的可食用部分的利用率。因此, 本研究着重从发酵角度提高紫苏饼粕的可食用性, 进而提高紫苏饼粕作为食品的利用率。本研究拟利用枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* JP2)发酵紫苏饼粕, 筛选出枯草芽孢杆菌发酵紫苏饼粕的最佳发酵工艺, 并对紫苏饼粕发酵产品的品质进行分析, 以期为进一步开发紫苏饼粕深加工产品提供理论依据和实践基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

紫苏饼粕, 贵州省农科院油料所提供, 其水分含量约 8.90%, 粗蛋白含量约 32.31%, 粗脂肪含量约 7.45%, 灰分含量约 8.55%, 粗纤维含量约 35.50%; 面粉, 购于花溪合力超市; 枯草芽孢杆菌, 实验室保藏菌种。

氯化钠、氢氧化钠、邻苯二甲酸氢钾、硫酸钾、硫酸铜、亚硫酸钠、酚酞、溴甲酚绿(分析纯, 成都金山化学试剂有限公司); 无水乙醇、石油醚(分析纯, 天津市富宇精细化工有限公司); 无水碳酸钠(分析纯, 天津市永大化学试

剂有限公司); 磷酸氢二钾、磷酸二氢钾(分析纯, 成都市科龙化工试剂厂); 碘(分析纯, 贵州科技发展有限公司); 三氯乙酸、3,5-二硝基水杨酸(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 盐酸[分析纯, 重庆市川东化工(集团)有限公司]; 硼酸(分析纯, 天津市优谱化学试剂有限公司); 甲醛溶液(分析纯, 西陇科学股份有限公司); 福林酚(分析纯, 北京索莱宝科技有限公司); 甲基红、亚甲基蓝(分析纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司); 平板计数琼脂(plate count agar, PCA)培养基(生物试剂, 上海博微生物科技有限公司); 牛肉膏蛋白胨液体培养基(配制试剂, 牛肉浸膏 3 g/L、蛋白胨 10 g/L、氯化钠 5 g/L)。

### 1.2 仪器与设备

JJ-CJ-1FD 洁净工作台(苏州金净净化工程有限公司); HH-S6A 电热恒温水浴锅(北京科伟永兴仪器有限公司); JY11002 电子天平(上海蒲春计量仪器有限公司); FA2004 电子天平(精度 0.0001 g, 上海菁海仪器有限公司); HPX-9082MBE 数显电热培养箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂); LS-B75L-I 立式压力蒸汽灭菌器(江阴滨江医疗设备有限公司); SER148 脂肪测定仪[嘉盛(香港)科技有限公司]; L5S 紫外可见分光光度计(上海仪电分析仪器有限公司); JK9830 自动凯氏定氮仪(济南精密科学仪器仪表有限公司); TD5MD 台式低速离心机、TGL20M 台式高速离心机(长沙迈佳森仪器设备有限公司); HZQ-X100 恒温双层振荡培养箱(苏州培英实验设备有限公司); 101-2A 电热鼓风干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 紫苏饼粕发酵单因素实验

紫苏饼粕经粉碎机粉碎, 60 目筛子过滤, 得到颗粒度较小的紫苏饼粕粉。称取 20 g 紫苏饼粕粉, 装于 150 mL 三角瓶中, 加入 1.4 倍水, 浸泡 10~14 h。浸泡后的紫苏饼粕粉在 121°C、0.1 MPa 条件下处理 8 min。高温高压处理后的紫苏饼粕粉被置于超净工作台, 待温度降至 40°C, 加入经 75°C 干蒸 20 min 的面粉, 然后接入一定量孢子数为 10<sup>8</sup> CFU/mL 的枯草芽孢杆菌, 混匀密封后放置于培养箱中恒温发酵。

紫苏饼粕发酵固定条件为: 按紫苏饼粕(湿基, 水分

含量被控制在 8.80%~9.00%)重量的十分之一添加干蒸的面粉、饼粕重量的 2%接种枯草芽孢杆菌种子液,充分混匀,并于 37°C 下发酵 72 h。考查发酵时间(12、24、48、72、96 h)、发酵温度(32、37、42°C)、接种量(1%、2%、3%)和面粉添加比例[按紫苏饼粕(湿基)重量的十分之一(1:10)、十分之三(3:10)、十分之五(5:10)添加, g/g]、对紫苏饼粕发酵产物感官评分、氨基酸态氮和蛋白酶活力的影响。

### 1.3.2 正交实验

根据单因素实验结果,按  $L_9(4^3)$ 设计 4 因素 3 水平实验,进行正交实验优化(表 1)。

### 1.3.3 感官评定

感官评估标准参考孟舒雨等<sup>[23]</sup>和姚嘉莉等<sup>[24]</sup>的评估方法略作修改。组织经过感官培训的 10 名感官评定人员对紫苏饼粕产品的色泽、香气、滋味和组织形态进行综合评

价。在感官评定期间,感官评定人员着装符合感官评定要求,不得携带、喷洒干扰感官评定的物品、香水等化妆品,不得相互之间交谈,避免相互影响。感官评分标准(百分制)见表 2。

表 1 发酵条件优化正交实验因素和水平  
Table 1 Optimization of orthogonal experiment factors and levels of fermentation conditions

水平	因素			
	A: 发酵时间/h	B: 发酵温度/°C	C: 接种量/%	D: 面粉添加比例(g/g)
1	60	30	1.5	1:10
2	72	32	2.0	3:10
3	84	34	2.5	5:10

表 2 发酵紫苏饼粕的感官评分标准  
Table 2 Sensory evaluation standard of fermented *Perilla frutescens* meal

项目	评分标准		
色泽(20)	黄褐色或棕褐色,鲜艳,有光泽(20~15)	黄褐色或浅黄色,光泽度欠缺(14~10)	黄褐色或浅黄色,黯淡无光(9~0)
香气(25)	酱香浓郁,豉香,紫苏香(25~20)	酱香、豉香味中等,无不良气味(19~9)	酱香、豉香味淡,有酸味等异味(8~0)
滋味(30)	味鲜醇厚,无苦味、酸味及其他不良气味(30~20)	味较鲜,但不醇厚,无苦味、酸味及其他不良气味(19~10)	有苦味、酸味及其他不良气味(9~0)
组织形态(25)	粘稠适度,质地均匀,无异物(25~20)	偏稀或偏稠(19~10)	不黏稠或过于粘稠(9~0)

### 1.3.4 主要理化指标

水分含量测定参照 GB 5009.3—2016《食品安全国家标准 食品中水分的测定》中规定的直接干燥法;粗蛋白含量测定参照 GB 5009.5—2016《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》中规定的凯氏定氮法;粗脂肪含量测定参照 GB 5009.6—2016《食品安全国家标准 食品中脂肪的测定》中规定的索氏抽提法;氨基酸态氮含量测定参照 GB 5009.235—2016《食品安全国家标准 食品中氨基酸态氮的测定》中规定的酸度计法;游离氨基酸的测定参照 GB/T 30987—2020《植物中游离氨基酸的测定》中规定的全自动氨基酸分析仪法。

pH 测定参考 ZHANG 等<sup>[25]</sup>的方法。称取 10 g 混匀试样,加入新煮沸冷却蒸馏水定容至 100 mL,摇匀,30°C 条件下浸渍 30 min 后过滤,取 50 mL 滤液于 100 mL 烧杯中。用 pH 计测定。

参考王宗敏等<sup>[26]</sup>的方法测定样品的蛋白酶活力。称取 1.00 g 样品,加蒸馏水 10 mL,于 40°C 水浴 1 h,且每 15 min 摇匀一次,6000 r/min 离心 3 min,上清液备用。样品稀释液 1 mL 在 40°C 水浴中孵育 5 min,加入 1 mL 酪蛋白,精确保温 10 min,再加入 2 mL 三氯乙酸(0.4 mol/L)终止反应,于 6000 r/min 离心 3 min,残余蛋白质沉淀。取上

清液 1 mL,加入 5 mL 碳酸钠(0.4 mol/L)和 1 mL 福林试剂。混匀后,混合体系于 40°C 水浴 20 min,在 660 nm 波长下测定吸光度 OD 值。空白组为三氯乙酸(0.4 mol/L)灭活的酪蛋白,并以 L-酪氨酸标准品绘制标准曲线。蛋白酶活力按照公式(1)计算:

$$\text{蛋白酶活力}/(\text{U/g}) = K \times A \times 4 \times 100 \times \frac{1}{10} \times \frac{1}{m} \quad (1)$$

式中: A, 由样品平行实验测得的平均 OD 值; K, 吸光常数; 4, 反应总体积, 4 mL; 100, 样品稀释倍数; 10, 反应时间, 10 min; m, 样品的质量, g。

参考郑东影等<sup>[27]</sup>报道的 DNS 法测定还原糖含量。称取 3.00 g 样品用 50 mL 蒸馏水稀释,50°C 恒温水浴 20 min,是还原糖浸出,再将浸出液于 4000 r/min 离心 20 min,沉淀用 20 mL 蒸馏水洗一次后再离心,将两次上清液收集在 100 mL 容量瓶中,用蒸馏水定容至刻度,混匀作为待测液。取 2 支试管,各加入 0.5 mL 待测液、1.5 mL 蒸馏水和 1.5 mL DNS 溶液,沸水浴 5 min,取出加蒸馏水补足至 10 mL,在波长 540 nm 处测定吸光值。同时用蒸馏水做空白、葡萄糖标准品做标准曲线,按照公式(2)计算还原糖含量:

$$\text{还原糖}/\% = \frac{m_1 \times V_1 / V_2}{m_2} \times 100\% \quad (2)$$

式中:  $m_1$ , 查曲线所得葡萄糖毫克数(mg);  $m_2$ , 样品毫克数(mg);  $V_1$ , 提取液总体积(mL);  $V_2$ , 测定时取用体积(mL)。

#### 1.4 数据处理

实验至少重复3次, 每次重复做4个水平, 采用WPS软件(WPS Office v 11.1.0.7989)和正交设计助手IIv3.1进行实验数据分析和处理, 各因素水平间的差异显著性( $P < 0.05$ )以方差分析中的最小显著性差异法(least-significant difference, LSD)计算, 图中不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

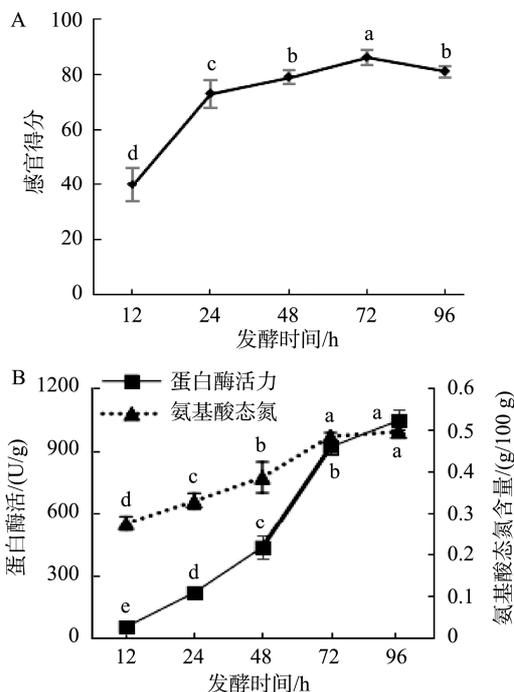
## 2 结果与分析

### 2.1 发酵时间

随着发酵时间延长, 发酵紫苏饼粕的色泽逐渐变深, 香气逐渐浓郁直至出现“氨味”, 滋味呈香醇直至出现酸、苦等味道, 紫苏饼粕组织松软, 无明显结块。色泽的变化与吴晖等<sup>[28]</sup>报道的发酵豆粕的色泽变化一致。发酵紫苏饼粕色泽变深可能是其成熟的标志之一, 与美拉德反应的发生相关。“氨味”的产生主要是因为发酵过程中枯草芽孢杆菌及其他微生物对氨基酸发生脱氨反应而产生了氨气, 或者枯草芽孢杆菌的氨基酸代谢中发生脱羧作用而产生了有机氮。总体上, 感官得分呈先增加后降低的趋势( $P < 0.05$ ), 并在发酵72 h达最高评分(图1A)。在发酵12~72 h阶段, 蛋白酶活力和氨基酸态氮含量快速升高( $P < 0.05$ , 图1B), 风味变得更加浓郁, 发酵72 h产物色泽明亮, 香气浓郁, 回味悠长。这一阶段的蛋白酶活力上升最快, 酶活力较高, 代谢产生的有机酸对酶的活力影响较小, 发酵饼粕中氨基酸态氮的含量快速上升。在发酵72 h之后, 蛋白酶活力缓慢上升, 这是微生物在发酵过程中产生的大量有机酸抑制了微生物生长<sup>[28]</sup>, 导致蛋白酶产生速率降低; 氨基酸态氮亦呈现缓慢上升趋势, 但发酵紫苏饼粕的苦味开始增加。有研究显示, 氨基酸态氮含量与发酵过程中蛋白质的降解密切相关, 发酵产品的色泽与氨基酸态氮含量存在一定的相关性<sup>[29]</sup>。基于发酵紫苏饼粕的感官评分、蛋白酶活力和氨基酸态氮含量变化, 紫苏饼粕的最佳发酵时间为72 h。

### 2.2 发酵温度

随着发酵温度升高, 发酵紫苏饼粕的颜色逐渐变深; 醇香味由淡变浓郁, 最后出现“氨味”, 更高的温度使得发酵紫苏饼粕略干, 这些指标的变化导致发酵紫苏饼粕的感官得分呈先增加后迅速降低的趋势( $P < 0.05$ , 图2A)。发酵温度升高会降低蛋白酶活力和氨基酸态氮含量。发酵温度为32°C时, 蛋白酶活和氨基酸态氮含量最高(图2B); 发酵温度37°C时, 发酵产物综合感官评分最高。温度到达42°C时, 水分蒸发导致色泽、风味变差, 此时的发酵紫苏饼粕感官评分最低。温度影响微生物的生长, 高于枯草芽孢杆菌生长的适宜温度会导致菌株过早老化, 进而影响其活性和活性物质的分泌<sup>[30]</sup>, 产生不良的“氨味”。鉴于32°C和



注: 不同小写字母表示组间差异显著,  $P < 0.05$ , 下同。

图1 发酵时间对紫苏饼粕的感官品质、蛋白酶活性和氨基酸态氮含量的影响

Fig.1 Effects of fermentation time on sensory quality, protease activity and amino nitrogen of *Perilla frutescens* meal

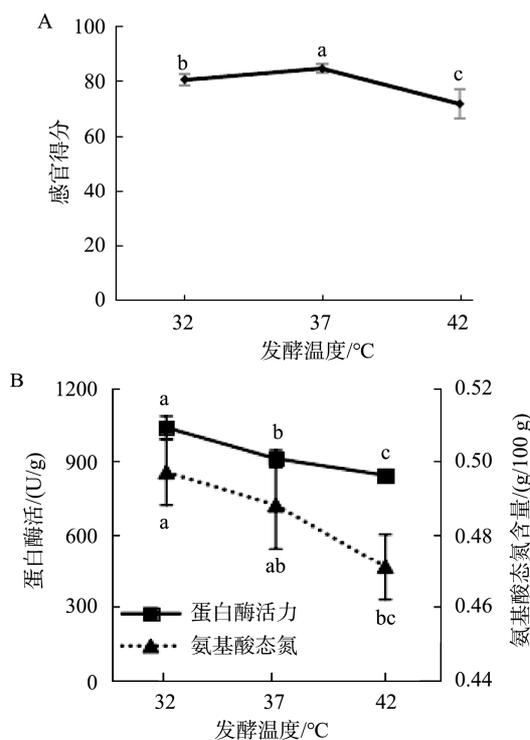


图2 发酵温度对紫苏饼粕的感官品质、蛋白酶活性和氨基酸态氮含量的影响

Fig.2 Effects of fermentation temperature on sensory quality, protease activity and amino nitrogen of *Perilla frutescens* meal

37°C条件下发酵的紫苏饼粕的感官评分相近,而32°C时氨基酸态氮含量和蛋白酶活力最高,故本研究选择紫苏饼粕的最佳发酵温度为32°C。

### 2.3 接种量

随着菌剂接种量的增加,发酵紫苏饼粕的感官得分、蛋白酶活力、氨基酸态氮含量均呈先增加后降低的趋势( $P<0.05$ ,图3)。接种量为1%时,菌种数量较少,菌群繁殖较慢,不利于特殊风味形成,微生物产生蛋白酶速率较慢,蛋白质降解也缓慢,这更利于腐败微生物等的快速生长和繁殖,使得发酵物容易产生腐败<sup>[31]</sup>;接种量为2%时,发酵产物色泽、香气纯正浓郁,口感最佳,这主要归因于大量的微生物分泌大量的蛋白酶类物质,蛋白酶活力升高,伴随着氨基酸态氮含量的上升。当接种量为3%时,菌种数量过多,反而抑制了枯草芽孢杆菌的生长和繁殖,菌种过快消耗营养物质,营养物质不足以维持枯草芽孢杆菌产蛋白酶,且容易产生大量苦味物质,最终导致蛋白酶活力降低,氨基酸态氮含量也随之降低。已有研究也表明,菌剂接种量太低,菌群繁殖困难,而接种量过高会抑制菌体的生长和繁殖,不利于代谢物的产生与分泌<sup>[28]</sup>。经综合评价,紫苏饼粕的最佳发酵接种量为2%。

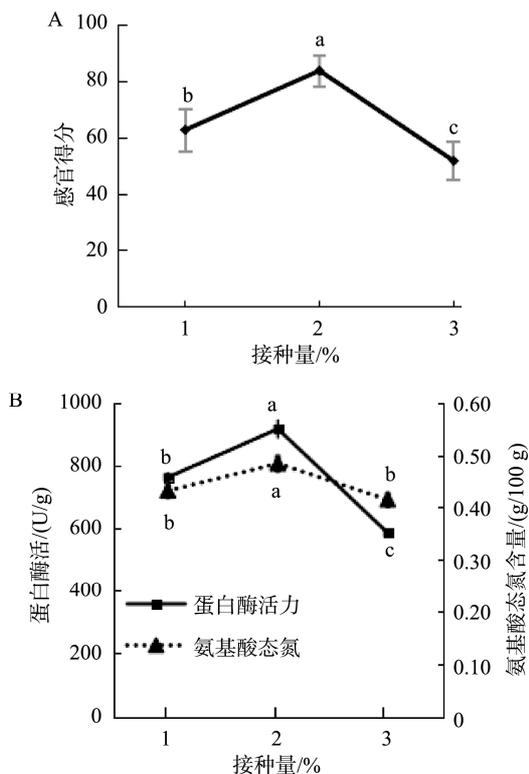


图3 接种量对紫苏饼粕的感官品质、蛋白酶活性和氨基酸态氮含量的影响

Fig.3 Effects of inoculation on sensory quality, protease activity and amino nitrogen of *Perilla frutescens* meal

### 2.4 面粉添加比例

随着面粉添加比例的增加,发酵紫苏饼粕色泽明亮度、香气减弱,滋味变淡,发酵紫苏饼粕出现结块、干硬现象,感官评分、蛋白酶活力和氨基酸态氮含量逐渐降低( $P<0.05$ ,图4)。当面粉添加比例为1:10时,发酵后的饼粕产品黏稠度适中,香气浓郁,色泽明亮,蛋白酶活力和氨基酸态氮含量最高。当面粉添加比例为5:10时,发酵紫苏饼粕的感官品质、蛋白酶活力和氨基酸态氮含量最低。这提示面粉的过多添加不利于枯草芽孢杆菌的增殖,事实上,添加比例较高的干蒸面粉会降低水分含量,使得发酵产物表面较干,风味不明显。李文立等<sup>[32]</sup>报道显示,基质的水分含量既影响微生物的生长,又影响发酵体系中气体交换和氧气供应等活动,最终关系到发酵的成功与否,吴晖等<sup>[28]</sup>报道,适当的水分含量有利于发酵豆粕的醇香气味和蛋白酶活力增加,因此本研究中发酵豆粕混合物体系需要适当控制紫苏饼粕的添加比例。综合感官评分、蛋白酶活力和氨基酸态氮含量变化规律,发酵的最佳面粉添加比例为1:10。

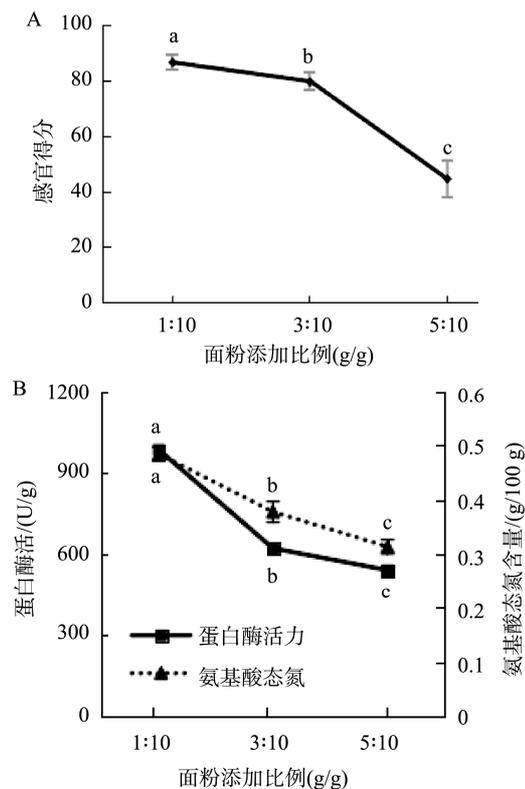


图4 添加面粉对紫苏饼粕的感官品质、蛋白酶活性和氨基酸态氮含量的影响

Fig.4 Effects of flour addition on sensory quality, protease activity and amino nitrogen of *Perilla frutescens* meal

### 2.5 正交实验结果分析

在单因素的基础上,以氨基酸态氮含量和蛋白酶活

力作为指标进行  $L_9(3^4)$  正交实验, 结果见表 3。通过对数据进行极差分析得出, 以氨基酸态氮含量为考察指标, 4 个因素主次关系是接种量>发酵温度>发酵时间>面粉添加比例, 最佳发酵条件为  $A_1B_3C_3D_1$ , 即发酵时间 60 h、发酵温度 34℃、接种量 2%和面粉添加比例 1:20 (g/g); 以蛋白酶活力为考察指标, 4 个因素主次关系为接种量>发酵温度=发酵时间>面粉添加比例, 最佳发酵条件为  $A_1B_3C_3D_2$ , 即发酵时间 60 h、发酵温度 34℃、接种量 2%和面粉添加比例 1:10 (g/g)。  $A_1B_3C_3D_1$  条件下, 蛋白酶活力为 1152 U/g, 氨基酸态氮含量为 0.49 g/100 mL;  $A_1B_3C_3D_2$  条件下, 蛋白酶活力为 1108 U/g, 氨基酸态氮含量为 0.48 g/100 mL, 低于  $A_1B_3C_3D_1$  条件下的指标水平。本研究最终确定紫苏饼粕的最佳发酵条件为  $A_1B_3C_3D_1$ , 即发酵时间 60 h、发酵温度 34℃、接种量 2.5%和面粉添加比例 1:20 (g/g)。

表 3 正交实验结果与分析  
Table 3 Results and analysis of orthogonal tests

序号	因素和水平				蛋白酶活力/(U/g)	氨基酸态氮/(g/100 mL)
	A/h	B/°C	C/%	D (g/g)		
1	1	1	1	1	512	0.363
2	2	1	2	2	595	0.257
3	3	1	3	3	574	0.388
4	3	2	1	2	426	0.308
5	1	2	2	3	689	0.418
6	2	2	3	1	920	0.452
7	2	3	1	3	652	0.391
8	3	3	2	1	613	0.361
9	1	3	3	2	1108	0.481
$K_1$	1.262	1.008	1.062	1.176		
	2309	1681	1590	2045		
$K_2$	1.100	1.178	1.036	1.046		
	2167	2035	1897	2129		
$K_3$	1.057	1.233	1.321	1.167		
	1613	2373	2602	1915		
$k_1$	0.421	0.336	0.354	0.392		
	769	560	530	682		
$k_2$	0.367	0.393	0.345	0.349		
	722	678	632	710		
$k_3$	0.352	0.411	0.440	0.389		
	538	791	867	638		
R	0.069	0.075	0.095	0.043		
	231	231	337	72		

## 2.6 发酵前后紫苏饼粕品质比较

在最佳发酵工艺条件下发酵紫苏饼粕并对其主要成分、还原糖和 pH 进行测定。从发酵起始至发酵结束, 发酵紫苏饼粕的水分含量和 pH 显著上升( $P<0.05$ ), 其中水分含量由 58.11%增加至 60.20%, pH 由 6.27 上升至 8.09。微生物在发酵过程中分解营养物质时会产生水分等二级产物, 同时产生碱性类代谢物质, 这可能是发酵紫苏饼粕的水分含量和 pH 升高的关键, 进而可能赋予发酵饼粕一定的苦味和碱味。与未发酵紫苏饼粕相比, 发酵 60 h 的紫苏饼粕的蛋白质、脂肪和还原糖含量分别由 32.14%、11.10%、0.47%显著降低至 24.92%、2.66%和 0.05% ( $P<0.05$ )。这是因为在发酵过程中, 微生物以蛋白质、碳水化合物和脂肪等大分子物质作为能量来源, 这提示发酵能够降低紫苏饼粕的蛋白质、脂肪和糖类物质, 同时这些大分子物质的在发酵过程中降解产生诸多风味物质, 赋予发酵饼粕独特的发酵风味。

发酵前后紫苏饼粕中游离氨基酸的含量变化见表 4。未发酵的紫苏饼粕中游离氨基酸种类为 10 种, 总含量为 0.1469%; 经发酵 60 h 后, 紫苏饼粕中游离氨基酸增加至 13 种, 总含量显著升高至 1.15% ( $P<0.05$ )。与发酵前紫苏饼粕相比, 发酵使总氨基酸和必需氨基酸的含量由 0.2136%、0.0238%增加至 1.1455%、0.8031%。发酵后, 发酵紫苏饼粕中呈酸味的谷氨酸含量降低, 使得发酵饼粕的酸味在一定程度减弱; 呈苦味的缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、蛋氨酸的含量显著增加 ( $P<0.05$ ), 精氨酸含量显著降低( $P<0.05$ ), 但呈苦味的氨基酸的总含量显著增加( $P<0.05$ ), 这可能导致发酵饼粕呈现苦味; 呈甜味的甘氨酸、丙氨酸、赖氨酸、丝氨酸的含量显著增加( $P<0.05$ ), 这些氨基酸能够赋予发酵饼粕甜味; 呈鲜味的谷氨酸含量降低, 半胱氨酸含量增加, 但呈鲜味的氨基酸总量降低, 这也使得发酵饼粕的鲜味程度降低。与发酵前的紫苏饼粕相比, 发酵 60 h 的紫苏饼粕的蛋白酶

表 4 紫苏饼粕游离氨基酸分析结果  
Table 4 Free amino acids of *Perilla frutescens* meal

氨基酸名称	含量/% DW		氨基酸名称	含量/% DW	
	0 h	60 h		0 h	60 h
谷氨酸	0.0740	-	组氨酸	0.0044 <sup>b</sup>	0.0616 <sup>a</sup>
甘氨酸	0.0053 <sup>b</sup>	0.0292 <sup>a</sup>	赖氨酸	0.0113 <sup>b</sup>	0.0586 <sup>a</sup>
丙氨酸	0.0193 <sup>b</sup>	0.0745 <sup>a</sup>	精氨酸	0.0805 <sup>a</sup>	0.0258 <sup>b</sup>
缬氨酸	0.0038 <sup>b</sup>	0.1753 <sup>a</sup>	丝氨酸	-	0.0029
亮氨酸	0.0034 <sup>b</sup>	0.1970 <sup>a</sup>	半胱氨酸	-	0.0049
酪氨酸	0.0063 <sup>b</sup>	0.1435 <sup>a</sup>	蛋氨酸	-	0.0914
苯丙氨酸	0.0053 <sup>b</sup>	0.1913 <sup>a</sup>	异亮氨酸	-	0.0895
总氨基酸	0.2136	1.1455			
必需氨基酸	0.0238	0.8031			

注: DW, dry weight 的缩写, 表示干重; -表示未检出。

活力增强,原料中的蛋白质被蛋白酶分解为氨基酸,致使终产物中的游离氨基酸,尤其是必需氨基酸含量升高。不同氨基酸呈现不同的味道,氨基酸含量的变化可能会影响发酵饼粕的风味。经过枯草芽孢杆菌发酵,紫苏饼粕的缬氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、赖氨酸、异亮氨酸含量显著增加( $P<0.05$ ),这些呈苦味氨基酸总量由 0.0345%增加至 0.9168%,使得发酵紫苏饼粕的苦味轻微增加;谷氨酸呈酸味,其含量由 0.0740%降低至无法检出,但对发酵紫苏饼粕的酸味几乎无影响;甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸和蛋氨酸含量显著增加( $P<0.05$ ),这些甜味氨基酸总含量由 0.0246%增加至 0.1980%,但对发酵紫苏饼粕的甜味影响甚微。

### 3 结 论

本研究以紫苏饼粕为原料,利用枯草芽孢杆菌发酵,对发酵后的紫苏饼粕的感官品质和理化指标进行分析。通过单因素实验和正交实验得出最佳发酵工艺参数:发酵时间为 60 h,发酵温度为 34℃,接种量为 2%,面粉添加量为 1:10 (g/g)。验证实验结果显示,最佳发酵条件下,蛋白酶活力为 1152 U/g,氨基酸态氮含量为 0.49 g/100 mL;发酵紫苏饼粕的水分含量和 pH 上升,蛋白质、脂肪和还原糖含量明显降低,氨基酸种类、总氨基酸含量和必需氨基酸含量明显增加。作为紫苏压榨后的产物,紫苏饼粕的研究报道尚且很少,鲜有研究其可食用产品的开发。尽管本研究利用枯草芽孢杆菌对紫苏饼粕进行了发酵,但对发酵紫苏饼粕的品质分析尚不够充分,发酵后紫苏饼粕的安全性尚未得到证实。为进一步加大紫苏上游加工副产物的开发利用,作为油料副产物之一,紫苏饼粕的可食用产品开发和活性物质分离将是未来的重要研究趋势。

### 参考文献

- [1] SINGH S, SINGHS, KUMAR S, *et al.* Biological activities and therapeutic potential of *Perilla frutescens* (purple mint): A review [J]. *Int J Pharm Sci Res*, 2022, 13: 645–653.
- [2] 郭旭, 张东, 孙晓丽, 等. 焙炒对紫苏籽油理化性质及化学组成的影响[J]. *中国油脂*, 2022, 47(8): 71–76.  
GUO X, ZHANG D, SUN XL, *et al.* Effect of roasting on physicochemical properties and chemical composition of *Perilla* seed oil [J]. *China Oils Fats*, 2022, 47(8): 71–76.
- [3] 隋晓东. 紫苏主要营养成分及其功能特性[J]. *农业科学*, 2019, 2(6): 49–50.  
SUI XD. Nutritional components and functional properties of *Perilla* [J]. *Agric Sci*, 2019, 2(6): 49–50.
- [4] 刘思佳, 邢钰彬, 星萍, 等. 紫苏黄酮抗菌活性表征[J]. *食品研究与开发*, 2021, 42(23): 163–168.  
LIU SJ, XING YB, XING P, *et al.* Characterization of the antibacterial activity of *Perilla* flavone [J]. *Food Res Dev*, 2021, 42(23): 163–168.
- [5] FANG H, ZHENG S, LIU J. Progress in chemical constituents and bioactivities of *Perilla frutescens* (L.) britt [J]. *Med Res*, 2021, 5(3): 210008.
- [6] 莫雪婷, 覃逸明, 郭松. 紫苏黄酮的提取及生物活性的研究进展[J]. *山东化工*, 2021, 50(16): 84–87.  
MO XT, QIN YM, GUO S. Research progress in the extraction methods and bio-activity of flavonoid from *Perilla frutescens* britt [J]. *Shandong Chem Ind*, 2021, 50(16): 84–87.
- [7] DHYANI A, CHOPRA R, GARG M. A review on nutritional value, functional properties and pharmacological application of *Perilla* (*Perilla frutescens* L.) [J]. *Biomed Pharmacol J*, 2019, 12(2): 649–660.
- [8] 中华人民共和国药典编写委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1990.  
Chinese Pharmacopoeia Commission. *Chinese pharmacopoeia* [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1990.
- [9] 张志军, 李晓鹏, 李会珍, 等. 紫苏饼粕蛋白酶法提取工艺研究[J]. *中国粮油学报*, 2013, 28(2): 77–79, 109.  
ZHANG ZJ, LI XP, LI HZ, *et al.* Study on protein extraction process from *Perilla* seed meal with cellulase [J]. *J Chin Cereal Oil Ass*, 2013, 28(2): 77–79, 109.
- [10] LONGVAH T, DEOSTHALE YG. Effect of dehulling, cooking and roasting on the protein quality of *Perilla frutescens* seed [J]. *Food Chem*, 1998, 63(4): 519–523.
- [11] 张品, 余顺波, 朱文秀, 等. 紫苏饼粕分离蛋白中蛋白质含量测定方法比较[J]. *粮食与油脂*, 2021, 34(11): 150–154.  
ZHANG P, YU SB, ZHU WX, *et al.* Comparison of methods for determining protein content in *Perilla* meal protein isolate [J]. *Cere Oils*, 2021, 34(11): 150–154.
- [12] 朱国君. 紫苏饼粕蛋白质的分离提取及其功能特性研究[D]. 重庆: 西南大学, 2008.  
ZHU GJ. Study on the extraction of protein from *Perilla* seed meal and its functional properties [D]. Chongqing: Southwest University, 2008.
- [13] 张传智, 田海娟, 张艳, 等. 紫苏油粕改性技术的研究[J]. *食品研究与开发*, 2014, 35(1): 26–29.  
ZHANG CZ, TIAN HJ, ZHANG Y, *et al.* Study on modification technology of *Perilla* oil meal [J]. *Food Res Dev*, 2014, 35(1): 26–29.
- [14] 胡东亚, 张志军, 曹千慧, 等. 紫苏饼粕的残油醇提工艺及品质分析[J]. *现代食品科技*, 2022, 38(2): 218–223, 271.  
HU DY, ZHANG ZJ, CAO QH, *et al.* Alcohol extraction process and quality analysis of residual oil from *Perilla* cake meal [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2022, 38(2): 218–223, 271.
- [15] 李晓君, 韩飞燕, 李会珍, 等. 响应面法优化紫苏饼粕残油的提取条件[J]. *中国粮油学报*, 2015, 30(4): 67–71.  
LI XJ, HAN FY, LI HZ, *et al.* Extraction conditions of residual oil from *Perilla* seed meal by response surface methodology [J]. *J Chin Cereal Oil Ass*, 2015, 30(4): 67–71.
- [16] 刘子坤, 尹贺, 杨安皓, 等. 紫苏籽多糖分离纯化及抗肿瘤活性[J]. *食品科学*, 2022, 43(15): 158–165.  
LIU ZK, YIN H, YANG ANH, *et al.* Separation, purification and anti-tumor activity of polysaccharides from *Perilla frutescens* seeds [J]. *Food Sci*, 2022, 43(15): 158–165.
- [17] 张燕平, 张虹, 沈志扬. 苏子油粕中蛋白质的提取研究[J]. *中国商办工业*, 2000, (7): 46–48.  
ZHANG YP, ZHANG H, SHEN ZY. Study on extraction of protein from

- Perilla* oil meal [J]. *China Shangban Ind*, 2000, (7): 46–48.
- [18] 张品, 朱文秀, 余顺波, 等. 响应面优化紫苏饼粕蛋白提取工艺[J]. *食品工业*, 2022, 43(1): 38–42.  
ZHANG P, ZHU WX, YU SB, *et al.* Response surface optimization of protein extraction from *Perilla* meal [J]. *Food Ind*, 2022, 43(1): 38–42.
- [19] 刘大川, 余华峰. 乙醇浸提紫苏籽压榨饼中油脂的工艺[J]. *农业工程学报*, 2008, 24(11): 242–246.  
LIU DC, YU HF. Technology for extraction of *Perilla* seed oil from pressed *Perilla* seed cake with ethanol [J]. *Trans Chin Soc Agric Eng*, 2008, 24(11): 242–246.
- [20] 朱建飞, 杨喙啦, 陈岗, 等. 碱提紫苏饼粕多糖的工艺优化[J]. *食品研究与开发*, 2011, 32(2): 69–71.  
ZHU JF, YANG SL, CHEN G, *et al.* Optimization of extract technology of polysaccharide for *Perilla* meal by alkali [J]. *Food Res Dev*, 2011, 32(2): 69–71.
- [21] 闫拯, 王乐, 袁施彬. 响应面法优化提取紫苏籽饼粕迷迭香酸及其抗氧化能力研究[J]. *西华师范大学学报(自然科学版)*, 2017, 38(2): 134–140.  
YAN Z, WANG L, YUAN SB. A study on the extraction of rosmarinic acid from *Perilla* seed meal and its antioxidant capacity [J]. *J China West Norm Univ (Nat Sci)*, 2017, 38(2): 134–140.
- [22] 宋继伟, 刘蓓, 尤丽新. 紫苏籽饼粕黄酮类物质的提取[J]. *现代食品*, 2015, (21): 71–73.  
SONG JW, LIU P, YOU LX. The extraction of flavonoids from *Perilla* seed meal [J]. *Mod Food*, 2015, (21): 71–73.
- [23] 孟舒雨, 李苗云, 赵改名, 等. 基于灰色关联度法的狮子头风味电子鼻分析与感官评分相关性[J]. *肉类研究*, 2019, 33(4): 24–28.  
MENG SY, LI MY, ZHAO GM, *et al.* Correlation between electronic nose analysis of and sensory evaluation of flavor in Lion's head meatballs based on grey correlation analysis [J]. *Meat Res*, 2019, 33(4): 24–28.
- [24] 姚嘉莉, 石文娟, 杨万根. 液熏技术对腊肉理化和感官品质的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(17): 220–225.  
YAO JL, SHI WJ, YANG WG. Effects of liquid smoke technology on physicochemical and sensory quality of bacon [J]. *Food Ferment Ind*, 2020, 46(17): 220–225.
- [25] ZHANG Y, HU P, XIE Y, *et al.* Co-fermentation with *Lactobacillus curvatus* LAB26 and *Pediococcus pentosaceus* SWU73571 for improving quality and safety of sour meat [J]. *Meat Sci*, 2020, 170: 108240.
- [26] 王宗敏, 王辛禹, 白桦, 等. 鲢鱼副产物中产蛋白酶微生物的分离与表征[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(1): 51–57.  
WANG ZM, WANG XY, BAI H, *et al.* Isolation and characterization of microorganisms producing proteinase from by-products of *Scomberomorus niphonius* [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(1): 51–57.
- [27] 郑东影, 梅婕, 陈玮, 等. DNS法与非林试剂法测定酿酒大曲糖化酶活力的比较分析[J]. *酿酒*, 2023, 50(5): 134–138.  
ZHENG DY, MEI J, CHEN W, *et al.* Comparison of the DNS method and the film reagent method for determination of Daqu glucoamylase activity [J]. *Liquor Mak*, 2023, 50(5): 134–138.
- [28] 吴晖, 卓林霞, 解检清, 等. 发酵条件对枯草芽孢杆菌发酵豆粕中的蛋白酶活力的影响[J]. *现代食品科技*, 2008, 24(10): 973–976.  
WU H, ZHUO LX, XIE JQ, *et al.* Effect of fermentation conditions on the proteolytic activity of a *Bacillus subtilis* protease on fermented soybean meal [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2008, 24(10): 973–976.
- [29] 梁叶星, 张玲, 李雪, 等. 重庆水豆豉自然发酵过程中色泽质构变化规律[J]. *食品科学*, 2019, 40(18): 137–143.  
LIANG YX, ZHANG L, LI X, *et al.* Changes in color and texture of Shuidouchi, a Chinese traditional fermented soybean product, during fermentation process [J]. *Food Sci*, 2019, 40(18): 137–143.
- [30] 张伟鑫. 多孔菌 Y-30 菌株液体发酵工艺及多糖体外抗肿瘤活性研究[D]. 青岛: 青岛农业大学, 2011.  
ZHANG WX. Production of polysaccharide from *polyporus varius pers* Y-30 with submerged fermentation and its in vitro antitumor activity [D]. Qingdao: Qingdao Agricultural University, 2011.
- [31] 潘子强, 李梅, 李琳, 等. 冷藏脆肉鲩鱼特定腐败菌的噬菌体分离及其抑制腐败的探讨[C]. 第五届全国微生物资源学术暨国家微生物资源平台运行服务研讨会, 2013.  
PAN ZQ, LI M, LI L, *et al.* Isolation of phage from specific spoilage bacteria in refrigerated crispy grass carp and its study on inhibiting spoilage [C]. The 5th National Microbial Resources Academic and National Microbial Resources Platform Operation Service Seminar, 2013.
- [32] 李文立, 孙振钧, 任慧英. 组合微生物发酵提高豆粕品质的方法与优化工艺研究[J]. *中国粮油学报*, 2013, 28(1): 88–92.  
LI WL, SUN ZJ, REN HY. Fermentation method and process of improving soybean meal quality by compound microorganisms [J]. *J Chin Cereal Oil Ass*, 2013, 28(1): 88–92.

(责任编辑: 郑丽 张晓寒)

## 作者简介



杨欣, 副教授, 主要研究方向为农产品贮藏与加工技术。  
E-mail: 390111379@qq.com



胡萍, 博士, 教授, 主要研究方向为食品微生物。  
E-mail: phu1@gzu.edu.cn