

文章编号:1673-1689(2011)06-0905-06

低盐固态酿造酱油生产过程中黄曲霉毒素 B₁ 和微生物的动态变化

徐丹¹, 王洪新¹, 张银志², 刘璐¹, 孙秀兰^{*1}, 王淼¹, 赵建新¹
(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122)

摘要: 以低盐固态酿造酱油为研究对象, 跟踪监测了酱油酿造过程中水分含量、水分活度、氨基态氮、总酸、微生物(菌落总数、霉菌、酵母菌、产黄曲霉毒素 B₁ 的霉菌)、黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁) 的动态变化, 结果发现成品酱油中的 AFB₁ 50% 来源于原料, 50% 源于制曲过程中污染的产毒菌在发酵前期产毒; 蒸煮、制曲、发酵、淋油四阶段均对 AFB₁ 有一定的去除作用, 但生产结束后, 仍有 52.04% 的 AFB₁ 会从酱醅中迁移到成品酱油中, 所以需针对污染源采取相应措施控制酿造酱油中 AFB₁ 的污染。

关键词: 酿造酱油; 黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁); 产毒菌

中图分类号: Q 815

文献标识码: A

Dynamic Changes of Aflatoxin B₁ and Microbes during the Fermentation of Low-Salt Solid Soy Sauce

XU Dan¹, WANG Hong-xin¹, ZHANG Yin-zhi², LIU Lu¹,
SUN Xiu-lan^{*1}, WANG Miao¹, ZHAO Jian-xin¹

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The aim of this study was to analyze the source of AFB₁ and degradation of AFB₁ by various stages during the production process of fermented soy sauce. The water content, water activity, amino nitrogen, total acid, microbes (the number of total colony, fungi, yeast and toxigenic fungi) and AFB₁ were detected at different stages. Results reveal that 50% of AFB₁ was caused by raw materials and another 50% was produced by toxigenic fungi at early fermentation stage. Steaming, making koji, fermentation and leaching can reduce some AFB₁, however, 52.04% of AFB₁ can be migrated to soy sauce from pastes after soaking. Therefore, we need to take appropriate measures to control the AFB₁ contamination in soy sauce.

Key words: fermented soy sauce, aflatoxin B₁, toxigenic fungi

收稿日期: 2010-10-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(20806033); 国家“十一五”科技支撑计划项目(2009BADB91305)(2007BAK36B06)。

作者简介: 徐丹(1981-), 女, 贵州铜仁人, 博士研究生, 主要从事食品安全研究。Email: xudan0325@163.com

* 通信作者: 孙秀兰(1976-), 女, 山东聊城人, 工学博士, 教授, 主要从事食品安全研究。

Email: sxlzz@yahoo.com.cn

AFB₁是一类由黄曲霉、寄生曲霉、集峰曲霉、烟曲霉、裸壳属产生的次级代谢产物,它具有致突变、致癌、免疫抑制等毒性作用^[1-4],并且已经被IARC列为I类致癌物质。作为一种传统的发酵调味品,酿造酱油富含氨基酸、抗氧化物质和芳香酯等多种营养成分,是人们餐桌上必不可少的一类调味料,但因为传统的酿造工艺是在一个完全开放的环境中进行的,且在原料的种植、收获、贮藏、加工各个环节中都极易污染 AFB₁,所以酿造酱油的生物安全性引起了人们的极大关注。

通过调查研究发现,AFB₁在大豆、酿造酱油及各种酱制品中均存在不同程度的污染^[5-10]。酿造酱油从原料到终产品的整个生产过程中,各个环节都有可能污染 AFB₁,但目前对酿造酱油中 AFB₁来源的研究未见报道。所以本研究拟以无锡调味食品有限公司生产的低盐固态发酵酱油为研究对象,跟踪调查了一个生产周期中 AFB₁、微生物及酱油相关理化指标的动态变化规律,旨在确定出在实际生产中,引起酿造酱油 AFB₁污染的生产环节,分析污染原因,为发酵调味品中 AFB₁污染的控制研究提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

1.1.1 样品 无锡市调味食品有限公司提供。

1.1.2 培养基 营养琼脂培养基(g/L):蛋白胨 10,牛肉膏 3,NaCl 5,琼脂 15,pH值 7.2~7.4。

高盐察氏培养基(g/L):NaNO₃ 2,KH₂PO₄ 1,MgSO₄·7H₂O 0.5,KCl 0.5,FeSO₄ 0.01,NaCl 60,蔗糖 30,琼脂 20。

产 AFB₁霉菌计数培养基(g/L):马铃薯 300,葡萄糖 20,β-环糊精 12,琼脂 20。

1.2 实验仪器与amp;设备

HD-A 水分活度测定仪:无锡市绿洲电子电器厂生产;DGG-9123AD 电热恒温鼓风干燥箱:上海森信实验仪器有限公司生产;LS-B50L 立式圆形压力蒸汽灭菌器:上海医用核子仪器厂生产;SW-CJ-1D 洁净工作台:苏州净化设备厂生产;MJ-180B 霉菌培养箱:上海跃进医疗器械厂生产;PYX-DHS-40×50 隔水式电热恒温培养箱:上海跃进医疗器械厂生产;Delta320pH 计:梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司生产;WFH-203B 三用紫外分析仪:上海精科实业有限公司生产;MK3 酶标仪:赛默飞世尔(上海)有限公司;AFB₁酶联免疫定量测试盒:江

苏省苏微微生物研究有限责任公司生产。

1.3 试验方法

1.3.1 取样 按无菌操作方法分别于原料、蒸煮、制曲、发酵 4d、发酵 8d、发酵 12d、发酵 16d、发酵 24d、发酵 28d、淋油 10 个阶段取样。

1.3.2 水分含量和水分活度测定 称取一定量的样品,用直接干燥法测定水分含量;在 25℃下,用水分活度测定仪法测定样品的水分活度^[11]。

1.3.3 氨基态氮和总酸测定 氨基态氮和总酸分别采用甲醛值法和酸碱滴定法测定^[12-13]。

1.3.4 微生物分析方法

1) 菌落总数、霉菌、酵母菌计数 采用稀释涂布平板法进行计数^[14-15]。

2) 产 AFB₁霉菌的计数 在霉菌计数国家标准基础上进行改进,样品处理好后选择 3 个合适的稀释度,用产毒(AFB₁)霉菌计数培养基培养,28℃避光培养 5 d 后,将平皿放于紫外分析仪中,并在 365 nm 下计数产生蓝色荧光的菌落^[16]。

1.3.5 AFB₁分析

1) AFB₁测定 AFB₁分析采用 GB/T5009.22-2003 中酶联免疫分析方法(ELISA)进行测定^[17],测得数据用 Ridasoft Win 软件处理。

2) 各生产阶段对 AFB₁的去除率 分别测定每一生产阶段中 AFB₁的质量分数,计算出每一阶段的去除率。

$$\text{去除率}(\%) = \frac{C_{\text{阶段}x} - C_{\text{阶段}(x+1)}}{C_{\text{阶段}x}} \times 100$$

其中 C 为 AFB₁的质量分数(以干基计,ng/g),x 为本实验的取样阶段数。

3) 成品酱油 AFB₁迁移率 本实验中淋油阶段采用的是浸出法,分别测定酱醅和成品酱油中 AFB₁的总质量,计算迁移率。

$$\text{迁移率}(\%) = \frac{m_{\text{成品酱油}}}{m_{\text{酱醅}}} \times 100$$

其中 m 为 AFB₁的质量(g)。

1.3.6 数据分析 所有数据均采用 Origin 8.0 分析处理。

2 结果与amp;讨论

2.1 酿造酱油生产过程中微生物的变化

从不同生产环节中取样,分析低盐固态酿造酱油自然酿造过程中微生物的动态变化,结果如表 1 所示。

表 1 酿造过程中各阶段的微生物

Tab. 1 Changes of microbe in the production process

生产阶段	菌落数 (lg cfu/g)			
	细菌	酵母菌	霉菌	产毒菌
原料	4.77±0.29	3.74±0.12	4.12±0.14	3.86±0.05
蒸煮	未检出	未检出	未检出	未检出
制曲	7.47±0.09	6.19±0.04	6.72±0.07	5.29±0.25
发酵 4d	6.42±0.02	4.18±0.12	4.18±0.12	3.32±0.27
发酵 8d	7.03±0.01	3.71±0.12	3.78±0.23	1.25±0.18
发酵 12d	6.01±0.04	未检出	未检出	未检出
发酵 16d	6.59±0.07	未检出	未检出	未检出
发酵 24d	6.71±0.03	未检出	未检出	未检出
发酵 28d	6.95±1.16	未检出	未检出	未检出

从表 1 可知原料中微生物的种类丰富,同时检测到一定数量的产毒菌。酿造原料浸泡后在 0.2 MPa, 130 °C 条件下蒸煮 25~35 min, 所有微生物被杀灭, 说明蒸煮阶段可以起到灭菌的效果。现大多数工厂都是开放式制曲, 原料极易被其他杂菌和各种产毒菌污染, 且此阶段的温度和含水量适合各种微生物生长, 因此, 此时微生物的种类和数量最多, 这一阶段的优势霉菌主要有米曲霉、酱油曲霉和黑曲霉^[18], 并且还发现大量能产 AFB₁ 的霉菌。

发酵阶段以细菌为主, 此阶段温度较高达到 50~55 °C, 高盐分含量导致水分活度和含氧量下降, 再加上酸性代谢产物的逐渐增加, 使霉菌和酵母菌的生长受到抑制, 数量逐渐下降, 直至发酵 12 d 未检测到活菌; 发酵中后期, 在高渗透压、低水分活度、低 pH 条件下, 酱醅中的微生物主要是细菌, 并以嗜盐片球菌、酱油四联球菌、植物乳杆菌乳酸菌为优势菌株^[19], 并保持在一个平稳的数量级水平上。

2.2 酿造酱油生产过程中 AFB₁ 浓度与酱油相关理化指标变化的关系

跟踪监测了酿造酱油各生产环节中 AFB₁ 的浓度, 以确定出酱油中 AFB₁ 的污染原因, 为了对整个过程中 AFB₁ 的动态变化进行分析比较, 通过测定水分含量后, 将 AFB₁、氨基态氮、总酸的浓度转换成干基计算, 结果如图 1 所示。在酿造过程中 AFB₁ 的变化分为 3 个阶段: 第一阶段是从原料到发酵 4 d, AFB₁ 含量呈下降趋势; 第二阶段是从发酵 4 d 到发酵 12 d, AFB₁ 含量呈上升趋势; 第三阶段是从发酵 12 d 到发酵 28 d, AFB₁ 含量呈下降趋势。结合酿造过程中微生物、水分质量分数、水分活度、氨基态氮和总酸的动态变化, 分析 AFB₁ 含量发生

变化的原因。

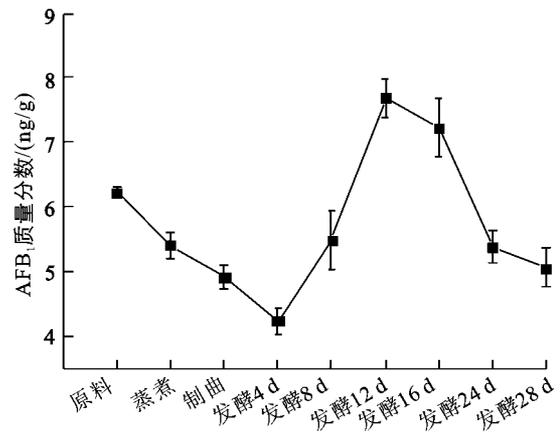
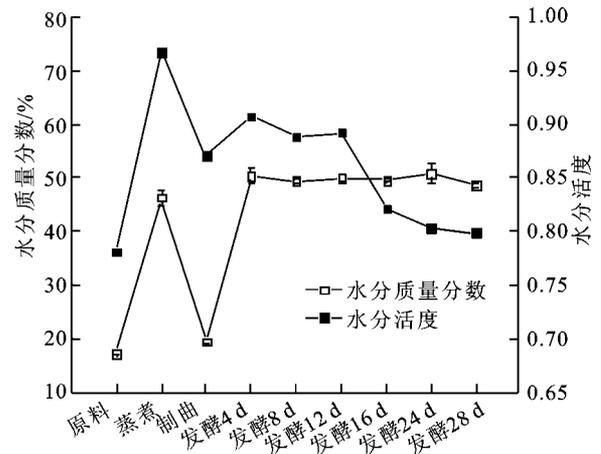
图 1 酿造酱油生产过程中 AFB₁ 的变化Fig. 1 Changes of the concentration of AFB₁ in the production process

图 2 酿造酱油生产过程中水分质量分数和水分活度的变化

Fig. 2 Changes of water content and water activity in the production process

酱油酿造原料在种植、收获、贮藏阶段极易被

产毒菌污染,因此酿造前原料就含有一定量的 AFB₁^[5](见图1)。由图2可知原料浸泡后水分含量和水分活度迅速增加,AFB₁在高温高压高湿的蒸煮阶段有少量降解。蒸煮后豆粕等原料的高水分利于霉菌在制曲阶段生长,分泌各种酶系,同时由于米曲霉的作用,AFB₁也有少量降解。

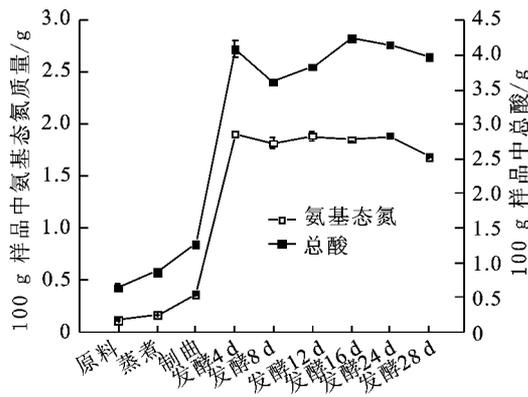


图3 酿造酱油生产过程中氨基态氮和总酸的变化
Fig.3 Changes of amino nitrogen and total acid in the production process

图3显示,发酵初期氨基态氮和总酸含量迅速升高,发酵4d后氨基态氮略有下降,而 AFB₁ 含量在发酵4~12d呈升高趋势,这可能是由于酱醅中的脯氨酸和胱氨酸等氨基酸刺激产毒菌产毒^[20],同时低pH条件利于 AFB₁ 的产生^[21-22]。发酵12d后,总酸有所上升,同时水分活度逐渐降低到0.8,此时产毒菌的生长被抑制,AFB₁ 不再增加,相反,AFB₁ 被乳酸菌等细菌吸附或降解,浓度逐渐减少^[23]。

2.3 头油中 AFB₁ 的迁移率

低盐固态发酵的酱醅成熟后,一般采用浸出法将成品酱油和残渣分离,在浸出过程中,AFB₁ 会迁移到成品酱油中。如表2所示,有52.04%的 AFB₁ 从酱醅中浸出,使得酱油中 AFB₁ 的浓度为(0.22±0.18)×10⁻⁹ ng/mL。

表2 头油中 AFB₁ 的迁移率

Tab.2 The mobility of AFB₁ from pastes to soy sauce

	酱醅 (以干基计)	头油	AFB ₁ 迁移率 (%)
浓度 (×10 ⁻⁹ ng/mL)	5.05±0.30	0.22±0.18	52.04
质量(g)	4.65±0.28	2.42±1.98	

2.4 酿造酱油生产过程中各阶段对 AFB₁ 的降解作用

由图1可知,酿造酱油生产过程中 AFB₁ 一直在动态变化,说明酿造过程中各阶段都会对 AFB₁ 有一定的降解作用,图4显示了对 AFB₁ 有去除作用的生产环节,但由图可知降解率都比较低。

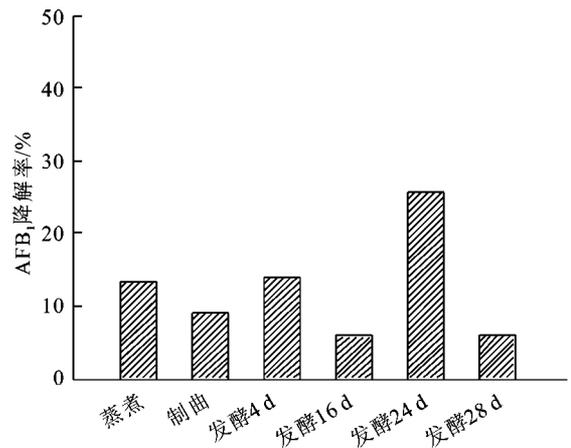


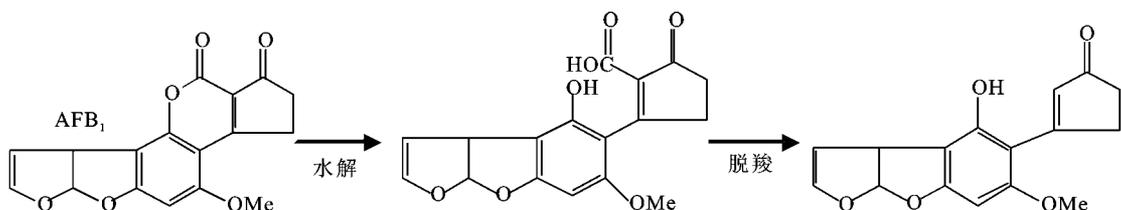
图4 酿造酱油生产过程中各阶段对 AFB₁ 的降解作用
Fig.4 Degradation of AFB₁ by various stages in the production process

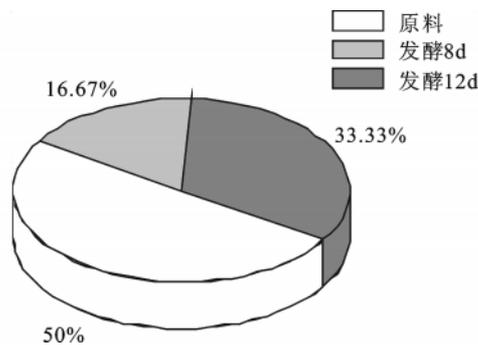
通过分析发现蒸煮阶段 AFB₁ 浓度降低了13.32%,当样品含水量高时,AFB₁ 经高压高温处理后含量会减少^[24],因为此时 AFB₁ 的内酯环会打开,并且进一步发生脱羧反应^[25],其反应如下:

制曲时 AFB₁ 浓度降低了9.1%,大曲中的米曲霉、黑曲霉对 AFB₁ 有一定的降解作用,其中黑曲霉能将 AFB₁ 转化为毒性较弱的 AFR₀^[26];在发酵中后期,AFB₁ 浓度降低了34.24%,这主要是由于酱醅中的短杆菌及真菌分泌的漆酶、过氧化物酶降解 AFB₁^[27-29],同时植物乳杆菌等乳酸菌的活菌体、原生质体和细胞壁对 AFB₁ 有较强的吸附作用,从而达到去除 AFB₁ 的作用^[30]。

2.5 酿造酱油中 AFB₁ 的来源

通过监测酿造过程中 AFB₁ 和微生物的动态变化,分析了酱油中 AFB₁ 的污染来源,如图5所示,50%的 AFB₁ 是由于原料污染该毒素带入的,16.67%的 AFB₁ 是由于制曲时污染了产 AFB₁ 的霉菌而在发酵前期代谢产生的,33.33%的 AFB₁ 是由产毒菌在发酵中期代谢产生的。



图5 酿造酱油 AFB₁ 的来源Fig. 5 The source of AFB₁ in fermented soy sauce

AFB₁、微生物及酿造酱油相关理化指标的变化,发现酿造酱油中 AFB₁ 有 50% 是由生产原料带来的,剩下 50% 由于制曲阶段污染了产毒菌,而产毒菌在发酵中前期产毒产生的;还发现蒸煮、制曲、发酵中后期、淋油四阶段均会对 AFB₁ 有一定的去除作用,但去除率都比较低,淋油结束后仍会有 52.04% 的 AFB₁ 浸入成品酱油中。因此,需要生产企业及相关监管部门加大力度控制酿造酱油中 AFB₁ 的污染,以降低 AFB₁ 的暴露量,并将制曲和发酵中前期作为重点的控制环节。

3 结 语

测定了低盐固态酿造酱油一个生产周期中

参考文献(References):

- [1] Ehrlich K C, Kobbeman K, Montalbano B G, et al. Aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Thailand[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2007, 114(2): 153-159.
 - [2] Frisvad J C, Samson R A, Smedsgaard J. *Emericella astellata*, a new producer of aflatoxin B₁, B₂ and sterigmatocystin [J]. **Letters in Applied Microbiology**, 2004, 38(5): 440-445.
 - [3] Maren A K. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin[J]. **Molecular Plant Pathology**, 2007, 8(6): 713-722.
 - [4] Do J, Choi D K. Aflatoxins: Detection, toxicity, and biosynthesis[J]. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 2007, 12(6): 585-593.
 - [5] Bean G A, Schillinger J A, Klarman W L. Occurrence of aflatoxins and aflatoxin-producing strains of *Aspergillus* spp. in soybeans[J]. **Applied Microbiology**, 1972, 24(3): 437-439.
 - [6] IA e-K, MS Y. Survey of mycoflora and mycotoxins in Egyptian soybean seeds[J]. **Journal of basic microbiology**, 1993, 33(6): 371-378.
 - [7] KA S, MT H, HK C, et al. Occurrence of mycotoxins in raw ingredients used for animal feeding stuffs in the United Kingdom in 1992 [J]. **Food Additives and Contaminants**, 1997, 14(2): 157-173.
 - [8] Sripathomswat N, Thasnakorn P. Survey of aflatoxin-producing fungi in certain fermented foods and beverages in Thailand[J]. **Mycopathologia**, 1981, 73(2): 83-88.
 - [9] E. K. Kim, D. H. Shon, J. Y. Yoo, et al. Natural occurrence of aflatoxins in Korean meju[J]. **Food Additives and Contaminants**, 2001, 18(2): 151-156.
 - [10] Chun H S, Ok H E, Kim H J, et al. Risk assessment of aflatoxins in food products consumed in South Korea. 13th World Congress of Food Science & Technology. Nantes. 2006
 - [11] 谢音. 食品分析 [M]. 北京:科学技术文献出版社,2006,14-26.
 - [12] 北京市卫生防疫站. GB/T 5009.40-2003 酱卫生标准的分析方法 [S]. 北京:中国标准出版社,2003
 - [13] 北京市卫生防疫站. GB/T 5009.39-2003 酱油卫生标准的分析方法 [S]. 北京:中国标准出版社,2003
 - [14] 卫生部食品卫生监督检验所. GB4789-2010 食品微生物学检验 菌落总数测定 [S]. 北京:中国标准出版社,2010
 - [15] 卫生部食品卫生监督检验所. GB4789-2010 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数 [S]. 北京:中国标准出版社,2010
 - [16] Maragos C M, Appell M, Lippolis V, et al. Use of cyclodextrins as modifiers of fluorescence in the detection of mycotoxins[J]. **Food Additives & Contaminants, Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment**, 2008, 25(2): 164-171.
 - [17] 计融,路戈,罗雪云,等. GB/T5009.22-2003 食品中黄曲霉毒素 B₁ 的测定方法 [S]. 北京:中国标准出版社,2003
 - [18] 苏东林,张志刚,陈亮,等. 永丰辣酱自然发酵过程中主要优势菌及化学成分的动态变化 [J]. **食品科学**, 2009, 30(17): 212-216.
- SU Dong-lin, ZHANG Zhong-gang, CHEN Liang, et al. Dominant microbes and dynamic analysis of chemical components during spontaneous fermentation of Yongfeng Hot Pepper Sauce[J]. **Food Science**, 2009, 30(17): 212-216. (in

Chinese)

- [19] 冯德一. 发酵调味品工艺学 [M]. 北京:中国商业出版社,1993.7-41.
- [20] Maing I Y, Ayres J C, Koehler P E. Persistence of aflatoxin during the fermentation of soy sauce [J]. **Applied Microbiology**, 1973, 25(6): 1015-1017.
- [21] Senyuva H Z, Gilbert J, Ozturkoglu S, et al. Changes in free amino acid and sugar levels of dried figs during aflatoxin B₁ production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2008, 56(20): 9661-9666.
- [22] Lie J L, Marth E H. Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in a casein substrate at different pH values[J]. **Journal of Dairy Science**, 1968, 51(11): 1743-1747.
- [23] G R, EH M. Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in a medium at different pH values and with or without pimaricin[J]. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A**, 1988, 187(5): 436-439.
- [24] Gratz S, Wu Q K, El-Nezami H, et al. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG reduces aflatoxin B₁ transport, metabolism, and toxicity in Caco-2 cells [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2007, 73(12): 3958-3964.
- [25] Karaca H, Nas S. Combined effect of pH and heat treatment on degradation of aflatoxins in dried figs[J]. **Journal of Food Processing and Preservation**, 2009, 33(s1): 329-339.
- [26] Coomes T J, Crowther P C, Feuill A J, et al. Experimental detoxification of groundnut meals containing aflatoxin[J]. **Nature**, 1966, 209(5021): 406-407.
- [27] Mann R, Rehm H J. Degradation products from aflatoxin B₁ by *Corynebacterium rubrum*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride* and *Mucor ambiguus*[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 1976, 2(4): 297-306.
- [28] Doyle M P, Marth E H. Degradation of aflatoxin by lactoperoxidase[J]. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A**, 1978, 166(5): 271-273.
- [29] Alberts J F, Gelderblom W C A, Botha A, et al. Degradation of aflatoxin B₁ by fungal laccase enzymes[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2009, 135(1): 47-52.
- [30] Petchkongkaew A, Taillandier P, Gasaluck P, et al. Isolation of *Bacillus* spp. from Thai fermented soybean (Thuanao): screening for aflatoxin B₁ and ochratoxin A detoxication [J]. **Journal of Applied Microbiology**, 2008, 104(1495-1502).
- [31] Hernandez-Mendoza A, Guzman-de-Pena D, Garcia H S. Key role of teichoic acids on aflatoxin B₁ binding by probiotic bacteria [J]. **Journal of Applied Microbiology**, 2009, 107(2): 395-403.