

自然发酵黄豆酱生产过程中理化及微生物指标的动态分析

晏 丽¹, 张银志², 王 淼¹, 赵建新¹, 孙秀兰^{*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: 以马鞍山市黄池食品(集团)有限公司酱类产品为调查对象,以自然发酵黄豆酱生产工艺流程与 HACCP 关键控制点为依据取样,跟踪了 2010 年 3~9 月生产周期中各环节的水分质量分数、水分活度、总酸、氨基酸态氮含量、AFB1 质量分数、细菌总数、霉菌总数、致病菌的检测。确定了 AFB1 的变化动态以及与水分活度、水分质量分数的相关关系,进而分析了自然发酵黄豆酱中 AFB1 的污染源;确定了豆酱质量重要指标氨基酸态氮的变化动态以及与酸度、pH 的相关关系;确定了黄豆酱自然发酵过程中微生物的变化动态以及致病菌污染状况。

关键词: 自然发酵黄豆酱; AFB1 含量; 氨基酸态氮; 细菌总数; 霉菌总数

中图分类号: TQ 920.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2012)03-0271-05

Dynamic Analysis of Physiochemical and Microbiology Indexs in the Process of Producing Natural Fermented Yellow Bean Sauce

YAN Li¹, ZHANG Yin-zhi², WANG Miao¹, ZHAO Jian-xin¹, SUN Xiu-lan^{*1}

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

Abstract: Using the sauce products of maanshan Huangchi food Co. LTD as research model, based on the production process of natural fermented yellow bean sauce and HACCP critical points, the moisture content, water activity, total acid content, amino acids nitrogen content, AFB1 content, bacteria count, mould count, pathogenic bacteria in production cycle of March-September, 2010 were detected. A serial of result were acquired: (1) The time-course of AFB1 content was determined, furthermore, the relationship of AFB1 content and water activity, moisture content was established. Based on the relationship, the pollution source of natural fermented yellow bean sauce was identified. (2) the relationship of nitrogen amino acid content and acidity was established; (3) The relationship of the dynamics of microbes and pathogenic bacteria pollution condition was developed.

Key words: natural fermented yellow bean sauce, AFB1 content, nitrogen amino acid, bacterial count, mould count

收稿日期: 2011-02-22

基金项目: 国家 973 计划项目(2012CB720804); 科技部“十一五”科技支撑计划项目(2009BADB9B05)。

* 通信作者: 孙秀兰(1976-), 女, 山东聊城人, 工学博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事食品安全检测方面的研究。

E-mail: sxlzz@yahoo. com. cn

豆酱是我国的最为古老传统调味品,起源于3 000多年前的周朝,深受消费者喜爱,在国内有着广阔的市场前景和生产价值。豆酱等大豆发酵食品有很多生理功能^[1]:豆酱原料中所含大豆皂角苷,具有抑制血清胆固醇上升的效果;大豆所含胰蛋白酶抑制物质具有抑制肝脂肪积蓄的作用;有预防肝癌作用;具有降血压作用;具有除却放射性物质的功能、防止胃溃疡效果、强大的抗氧化作用。孔子曰:“不得其酱不食”可见豆酱在人们日常生活中具有的重要地位。

但是长期以来,我国豆酱自然发酵占据主导地位。由于在制曲和发酵过程主要采用手工操作,同时又是日晒夜露式的开放生产,并且发酵周期比较长,这样就增加了微生物、灰尘、蚊蝇以及其他污染物入侵的机会,使豆酱受产毒真菌、细菌、致病菌、真菌毒素黄曲霉毒素 B1 等污染严重,产品的安全卫生状况较差^[2-3]。因食用不卫生豆酱而中毒的事件时有发生,如2006年3月,澄城县冯原镇10多名村民因食用被肉毒杆菌污染的自制豆瓣酱而中毒,自然发酵豆酱的安全性受到广泛关注。

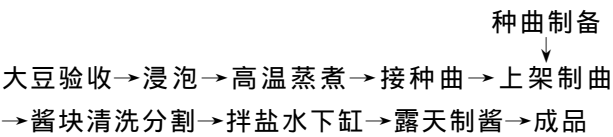
现阶段对我国对自然发酵豆酱的研究多集中在工艺条件的改进、HACCP 体系的研究、制曲菌种的选择及制曲工艺的优化^[4-5]、发酵过程中微生物多样性及菌相组成的研究^[6-7]上。作者就豆酱自然发酵生产周期中各环节的理化及微生物指标各指标进行动态分析,初步总结各指标之间的影响关系,评估豆酱安全性,为企业提高自然发酵豆酱的安全性提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

1.1.1 样品采集点 以马鞍山市黄池食品(集团)有限公司豆酱产品为调查对象,对该公司自然发酵黄豆酱生产工艺过程的每一环节可能存在的生物性、化学性、物理性危害以及产生的原因进行全面的分析,结合该企业的 HACCP 体系的参考关键控制点确定2010年3~9月生产周期中的采集点。

1)自然发酵黄豆酱生产工艺^[8]



2)HACCP 关键控制点:确定采集点为2010年3~9月生产周期中的原料大豆、制曲后的样品、发酵前期(一个月)样品、发酵中期(3个月后)样品、发酵后期(5个月)样品、成品,见表1。

表1 关键控制点危害分析
Tab.1 Hazard analysis and critical control points

加工步骤	确定在这一步中引入的、控制的或增加的潜在的危害
大豆验收	物理危害:石子、铁钉、沙粒等杂质
	化学危害:农药残留、黄曲霉毒素、重金属
	生物危害:霉菌污染、致病菌、杂菌
接种曲	生物危害:致病菌、杂菌污染
上架制曲	物理危害:石子、铁钉、使用工器具及零部件等的脱落
	生物危害:制曲室杂菌污染
发酵制酱	物理危害:环境沙尘
	生物危害:环境杂菌污染

1.1.2 样品采集方法与原则 分6个点定时采集,从表层、中层、和底层、中间和四周等不同部位采样混合,发酵缸取样时应尽量搅拌混合。采样时必须符合无菌操作要求,采样工具勺子、盛装烧杯、包装袋、手套等均需灭菌,防止采样过程中的污染。采样完毕应置于4℃冰箱保存,尽快完成指标的检测。

1.2 理化指标检测

1.2.1 水分质量分数 采用常压干燥法测定。

1.2.2 水分活度 采用 HD-A II 型水分活度测定仪(无锡市绿洲电子电器厂)直接测定。

1.2.3 总酸含量 采用 GB/T 5009. 40-2003 的方法。

1.2.4 pH 值 采用 pH 计直接测定。

1.2.5 氨基酸态氮 采用 GB/T 5009. 40-2003 的方法。

1.3 微生物指标检测

1.3.1 菌落总数 采用 GB 4789. 2-2010 的方法。

1.3.2 霉菌总数 采用 GB 4789. 15-2010 的方法。

1.3.3 致病菌 金黄色葡萄球菌:采用 GB 4789. 10-2010 的方法;沙门氏菌:采用 GB 4789. 4-2010 的方法;志贺氏菌:采用 GB 4789. 5-2010 的方法。

1.4 真菌毒素检测

黄曲霉毒素 B₁:采用 AFB₁ ELISA 试剂盒测定^[9]。

2 结果与分析

2.1 AFB₁ 质量分数、水分活度、水分质量分数分析及其相关关系

对自然发酵黄豆酱整个生产过程中 AFB₁ 质量分数动态监测分析,发酵前期黄曲霉产毒菌生长迅速,黄曲霉毒素 B₁ 的含量逐渐增加,在发酵中期达到最大值,随后含量减少。发酵后期 AFB₁ 质量分数大幅度被降解,减少了 57.9%。成品中黄曲霉毒素 B₁ 质量分数为 1.45 $\mu\text{g}/\text{kg}$,符合 GB 2718-2003《酱卫生标准》中规定的 $\leq 5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 的要求。

分析发现自然发酵黄豆酱中 AFB₁ 污染主要来源于两个途径,其中 53.85% 的污染源于原料黄豆本身,46.15% 的污染源于生产过程中受到产毒菌污染所产生的。

自然发酵黄豆酱的生产过程中,水分质量分数由 10% 的黄豆原料随发酵过程逐渐增加,在发酵前中期达到最大值后稳定在 50% 左右。发酵期间 30%~50% 的水分质量分数适宜霉菌的生长。自然发酵黄豆酱的生产过程中水分活度达到 0.7~0.8,适合霉菌的生长,极易受到产毒霉菌的污染。

利用 SPSS 13.0 软件对 AFB₁ 质量分数和水分质量分数、水分活度的相关性进行分析。AFB₁ 质量分数与水分质量分数的 Spearman 等级相关系数为 0.886, $P=0.019$,相关具有统计学意义,故两者存在正相关关系。AFB₁ 质量分数与水分活度的 Spearman 等级相关系数为 0.829, $P=0.142$,相关具有统计学意义,故两者存在正相关关系。AFB₁ 质量分数除原料中带入的以外,46.15% 的污染源于生产过程中受到产毒菌污染所产生。而水分活度和水分含量是影响产毒曲霉生长与产毒的重要因素,高水分活度和水分质量分数更有利于 AFB₁ 的产生,因此 AFB₁ 质量分数与水分活度、水分质量分数具有正相关性,见图 1。

将三者进行偏相关分析,当有水分质量分数的影响时,水分活度和 AFB₁ 质量分数无显著相关性,当有水分活度影响时,水分质量分数和 AFB₁ 质量分数也无显著相关性。因此水分活度与水分

含量综合作用,影响产毒曲霉的产毒,引起黄曲霉毒素 B₁ 的积累。

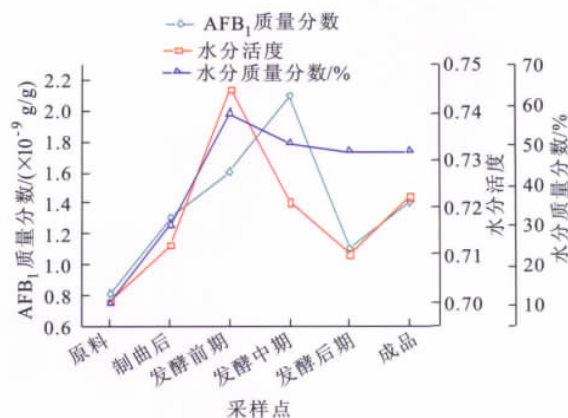


图 1 AFB₁ 质量分数与水分活度、水分质量分数的动态变化图
Fig. 1 Dynamic variational figure of AFB₁ content, water activity and moisture content

2.2 氨基酸态氮、pH 值、酸度分析及其相关关系

豆酱的生产机理是原料中的蛋白质、淀粉经曲霉菌等微生物水解,水解产物再相互进行复杂的反应,最后形成具有色、香、味俱佳的产品。其水解过程:蛋白质—肽—多肽—氨基酸;淀粉—糊精—麦芽糖—葡萄糖。因此氨基酸态氮是衡量豆酱质量的重要指标。

原料黄豆中的氨基酸态氮质量分数较低,仅 0.168%。制曲和发酵是豆酱生产的主要环节,也是蛋白质分解的过程以及分解物再次发生复杂反应的过程,氨基酸态氮质量分数迅速增加。到发酵后期,氨基酸态氮质量分数积累达到峰值,增加趋势平缓。氨基酸态氮是衡量豆酱质量的重要指标,成品中氨基酸态氮质量分数达到 1.116%,符合 GB 2718-2003《酱卫生标准》中规定的 $\geq 0.6\%$ 的要求。

如图 2 所示,在黄豆酱的自然生产过程中总酸含量(或 pH 值)增加(或减少)到一定程度以后,达到峰值。酸度的变化与乳酸菌的作用关系密切,在发酵的初始阶段,乳酸菌大量繁殖,代谢可发酵性糖,产生乙醇、乳酸、醋酸等有机酸,总酸含量上升(或 pH 值下降)明显^[10]。但酸度的积累对乳酸菌的活动起到了一定的抑制作用,在发酵中后期总酸含量增加(或 pH 值下降)的速率明显减缓,总酸含量和 pH 值达到峰值。

利用 SPSS 13.0 软件对氨基酸态氮质量分数和总酸质量分数(或 pH 值)的相关性进行分析。氨

氨基酸态氮含量与总酸含量的 Spearman 等级相关系数为 1.0, $P=0.0$, 相关具有统计学意义, 故两者存在强的正相关关系。氨基酸态氮含量与 pH 值的 Spearman 等级相关系数为 -0.829 , $P=0.042$, 相关性具有统计学意义, 故两者存在负相关关系。中性、碱性蛋白酶的活力是蛋白质分解、氨基酸态氮积累的一个重要因素, 而其活力大小又与酸度、pH 值的大小存在密切的关系。发酵初期体系 pH 值有利于蛋白酶的作用, 氨基酸态氮质量分数增加明显, 到发酵中后期酱醅中的酸度不断积累, 过酸的环境超出蛋白酶最适 pH 值, 抑制了蛋白酶的活力, 氨基酸态氮含量增加速率减缓, 见图 2。

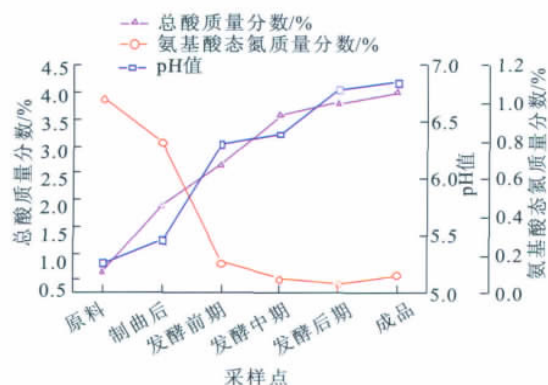


图 2 氨基酸态氮与总酸质量分数、pH 值的动态变化图

Fig. 2 Dynamic variational figure of nitrogen amino acid, total acid content and pH value

2.3 微生物指标分析

制曲阶段, 30 °C 制曲 32 h 的过程中, 这个阶段容易受到制曲室的微生物菌系及温度的影响, 温度过高或过低都会引起杂菌的污染, 是决定豆酱产品质量的关键阶段。在这一阶段中, 霉菌以及细菌污染均达到峰值, 菌落数分别为 1.55×10^7 cfu/g, 和 1.7×10^5 cfu/g。

发酵初期阶段, 添加盐水进行发酵, 由于较高的食盐浓度和缺乏氧气, 霉菌的生长已经基本停止并逐渐消亡, 霉菌菌落数迅速下降, 由于较高的食盐质量浓度以及酸度的不断积累, 细菌难以生长, 菌落也部分消亡, 菌落数明显减少。

发酵中后期, 由于酸性等代谢产物和酒精的积累, 霉菌和细菌生长基停止, 仅还存在着微弱的代谢活性, 微生物总数基本上维持在一个较稳定的低数量水平上。

在发酵前期样品, 可以观察到毛霉分布整个培养皿中, 可见毛霉是酱醅发酵前期的优势类群。由图 3 的分析可知, 发酵前期水分活度、水分质量分数最大的阶段, 在这一阶段, 毛霉之所以成为优势菌种, 是由于它为湿性真菌, 水活度大的基质有利于毛霉生长。随着酱醅湿度下降, 毛霉逐渐被别的曲霉所代替, 在发酵中期能观察到少量的毛霉生长, 到发酵后期已观察不到毛霉的生长。

各阶段样品均未检测到沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、志贺氏菌等致病菌, 豆酱成品的质量、安全状况良好。

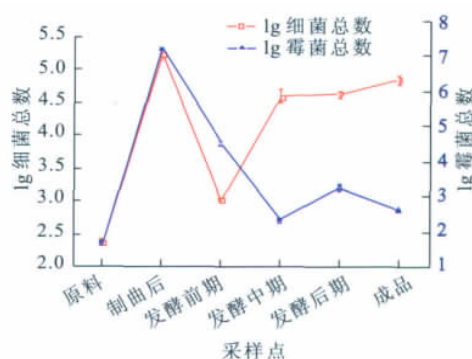


图 3 菌落总数与霉菌总数的动态变化图

Fig. 3 Dynamic variational figure of bacterial count and mould count

3 结 语

水分活度与水分质量分数综合作用, 影响产毒曲霉的产毒, 引起黄曲霉毒素 B1 的积累。自然发酵黄豆酱中 AFB1 污染在发酵中期最为严重, 其主要来源于两个途径, 其中 53.85% 的污染源于原料黄豆本身, 46.15% 的污染源于生产过程中。因此除要精选原料, 加强原料储存条件, 把好原料污染关的同时应加强生产条件的改进、生产环境卫生的控制, 特别是发酵中期的环境条件, 并实时监测水分质量分数与水分活度, 降低体系 AFB1 生产的条件, 将 AFB1 质量分数控制在最低范围。

氨基酸态氮是衡量豆酱质量的重要指标, 其在体系中的积累与酸度、pH 值的大小存在密切的关系, 在豆酱发酵生产中应密切监测体系的酸度和 pH 值, 防止体系酸度过高, 以赋予豆酱良好的风味。

自然发酵豆酱卫生状况良好,发酵阶段微生物含量明显减少,杂菌污染主要来源于制曲过程,因此此阶段杂菌污染的控制十分重要,企业应加强制曲间环境以及制曲操作工人的卫生监督。

该研究还存在一定的局限性,产毒曲霉的存在

是产生 AFB₁ 的主要原因,加强产毒曲霉的动态检测能更好地监测 AFB₁ 的污染,为企业加强产品质量提供重要价值。但传统的产毒曲霉的检测方法落后、精确度低,应建立一种更为精确的快速的检测方法,此项工作正在研究中。

参考文献(References):

- [1] 包启安. 豆酱的功能性[J]. 中国酿造, 2002(3): 1—6.
BAO Qi-an. The functionality of soya sauce [J]. **China Brewing**, 2002(3): 1—6. (in Chinese)
- [2] 贡汉坤. 传统豆酱自然发酵的动态分析及人工接种多菌种发酵研究[D]. 无锡: 江南大学, 2004.
- [3] R J Meldrum, C L Little. Assessment of the microbiological safety of salad vegetables and sauces from kebab take-away restaurants in the United Kingdom[J]. **Food Microbiology**, 2009, 23(3): 573—577.
- [4] 杨进, 乔鑫, 李冬生, 等. 黄豆酱的制曲工艺[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(1): 90—92.
YANG Jin, QIAO Xin, LI Dong-sheng, et al. Research on process of koji making of soy sauce[J]. **Food Research and Development**, 2010, 31(1): 90—92. (in Chinese)
- [5] Veki Tatsuro. Development of a soy sauce brewing method using a mixed koji-making system of two koji molds[J]. **Nippon Shoyu Kenkyushozasshi**, 1997, 23(2): 61—70.
- [6] 陈嵘. 我国部分地区自然发酵豆酱中真菌的多样性和真菌毒素的检测[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2008.
- [7] Ishihara Kazuo. Comparison of volatile components in soy sauce produced using *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* [J]. **Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi**, 1996, 43(9): 1063—1074.
- [8] 李东, 徐桂连, 马莺. 自然发酵黄豆酱工业生产中 HACCP 体系的建立[J]. 中国酿造, 2010, 215(2): 187.
LI Dong, XU Gui-lian, MA Ying. The establishment of HACCP system in the process of natural fermented yellow bean sauce [J]. **China Brewing**, 2010, 215(2): 187. (in Chinese)
- [9] 孙婷婷, 徐丹, 晏丽, 等. 酿造酱油中黄曲霉毒素 B₁ 的含量调查与风险评估[J]. 食品科技, 2010, 230(12): 296—297.
SUN Ting-ting, XU Dan, YAN Li, et al. The content of aflatoxin B₁ investigation in brewed soy sauce and risk assessment [J]. **Food Science and Technology**, 2010, 230(12): 296—297. (in Chinese)
- [10] 孟发宝. 影响酱油中氨基酸态氮含量的因素[J]. 中国调味品, 2008, 6: 29—33.
MENG Fa-bao. The factor that influence the content of nitrogen in amino acid in soy sauce[J]. **China Condiment**, 2008, 6: 29—33. (in Chinese)