

含盐量和温度对豆酱发酵过程的影响

赵建新, 王 淼, 毛丙永, 张 灏, 陈 卫, 田丰伟, 汤 坚

(江南大学食品学院, 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘 要: 为了寻求最适豆酱发酵的含盐量和温度, 本实验比较不同含盐量的酱醅在发酵过程中总酸和氨态氮含量的变化, 表明含盐量为 10% 时可以有效地抑制腐败菌的生长, 同时缩短发酵周期; 从 pH 值、总酸、鲜味氨基酸、主要风味物质等方面研究阶段控温对发酵的影响, 结果表明在前期采用 40℃ 发酵 20d, 后期 30℃ 发酵 30d 的控温方式所得产品质量较好, 而且周期最短, 仅为 50d。

关键词: 豆酱; 食盐; 温度; 氨态氮

Effects of Salt Content and Temperature on Soybean Paste Fermentation

ZHAO Jian-xin, WANG Miao, MAO Bing-yong, ZHANG Hao, CHEN Wei, TIAN Feng-wei, TANG Jian

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

Abstract: In this study, the contents of total acids and amino nitrogen during the fermentation process of soybean paste at various salt contents and fermentation temperatures were investigated so as to find the optimal salt content and temperature. The results showed that 10% salt could effectively inhibit the growth of spoilage bacteria and shorten the fermentation period. Aside from this, the effect of stepwise temperature settings on soybean paste fermentation was evaluated in terms of changes in pH, total acids, tasty amino acids and key flavor compounds. It was found that fermentation for 20 days at 40 °C at first and then 30 days at 30 °C resulted in excellent product quality and the shortest fermentation period of only 50 days.

Key words: soybean paste; salt; temperature; amino-nitrogen

中图分类号: TS264.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)23-0220-05

豆酱的发酵过程主要是利用酱醅中曲霉、毛霉和根霉等微生物产生的各种酶系共同作用于各类原料的过程, 其中最重要的是曲霉^[1-3]。米曲霉具有较强的蛋白质分解力和淀粉液化力的酶系, 蛋白酶和外肽酶能将蛋白质水解成氨基酸; 液化淀粉酶分解淀粉生成糊精和葡萄糖, 酶活的高低决定着原料利用率、酱醅发酵成熟的时间与产品鲜味、色泽等。目前, 我国酱油、豆酱生产绝大多数采用米曲霉沪酿 3.042, 它生长快, 较粗放, 产中性和碱性蛋白酶活力较高, 在豆酱发酵前期起着重要的作用^[4-6]。

“百味之中盐为最”, 食盐不但使豆酱具有适当的咸味, 还与氨基酸共同呈鲜味, 增加豆酱的风味。食盐一方面能抑制杂菌的繁殖, 防止酱醅腐败; 但另一方面, 食盐浓度过高会抑制蛋白酶的活性, 致使蛋白质的分解速率减慢, 发酵周期延长^[7-8]。因此食盐浓度的控制对豆酱发酵是至关重要的。温度是影响豆酱发酵的

又一关键因素, 蛋白酶的最佳温度是 40~45℃, 而乳酸菌、酵母菌的最适温度是 28~35℃。蛋白酶活力的高低关系着最终产品中氨态氮的含量, 乳酸菌、酵母菌的生长关系着风味物质的多少。因此, 温度的高低与发酵时间的长短及豆酱品质的好坏有着密切的关系。

针对以上问题, 以沪酿 3.042 作为种曲, 结合传统露晒发酵工艺, 研究食盐浓度、温度等因素对发酵过程的影响, 结合前期对发酵过程的分析, 寻找在控制发酵需要的最适食盐浓度和最适温度, 以期生产出品质优良的豆酱。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

成曲由安徽马鞍山黄池食品集团提供。

无水硫酸钠、氢氧化钠、甲醛、无水乙醚、甲醇、3,5-二硝基水杨酸、三氯乙酸、葡萄糖 国药集

收稿日期: 2011-05-03

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划项目(2009BADB9B05)

作者简介: 赵建新(1971—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: jxzhao@jiangnan.edu.cn

团化学试剂有限公司; 对羟基苯甲醛、氨基酸标准样品美国 Sigma 公司; 2,4,6- 三甲基嘧啶(色谱纯) 瑞士 Fluka 公司; 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

Agilent 1100 液相色谱仪 美国安捷伦公司; 气相色谱-质谱联用仪 美国 Finigan 质谱公司; SPME 手动进样手柄 上海安谱科学仪器有限公司; SPME 萃取头(75 μ m CAR-PDMS) 美国 Supelco 公司; 半固体发酵罐镇江达森发酵设备有限公司定制。

1.3 酱醅的制作

每 100kg 成曲加入 90kg 的盐水制得酱醅, 通过调节添加盐水的量来控制酱醅中食盐质量分数分别为 6%、8%、10%、12%、14%, 转至半固体发酵罐进行发酵, 控制温度为 40℃。每隔 5d 取样测定相应指标, 同一样品测定 3 次取平均值。

每 100kg 成曲加入 90kg 的盐水制得含盐量为 10% 的酱醅, 控制发酵温度。每隔 5d 取样测定相应指标, 同一样品测定 3 次取平均值。

1.4 pH 值和总酸的测定

pH 值测定: 称取研磨后样品 10.00g 置于 100mL 小烧杯内, 加入去离子水 20mL, 混匀后用 pH 计测定; 总酸测定: 参照 GB/T 5009.39—2003《酱油卫生标准的分析方法》进行测定。

1.5 氨态氮含量的测定

参照 GB/T 5009.39—2003 进行测定, 同一样品测定 3 次取平均值。

1.6 谷氨酸和天冬氨酸含量的测定

取 10.0g 研磨均匀的样品加 50mL 蒸馏水, 充分混匀并定容至 100mL 容量瓶中, 充分混匀后 10000 \times g 离心 10min, 取上清液 5mL 加入 10mL 体积分数为 5% 三氯乙酸溶液, 混匀静置 60min, 定容到 50mL 容量瓶中, 静置 2min, 用双层滤纸过滤。取滤液至离心管, 放入离心机 10000 \times g 离心 10min。移取 1mL 上清液, 用氨基酸专用高效液相色谱仪柱前衍生法测定谷氨酸和天冬氨酸的含量。

色谱条件: C₁₈ 色谱柱(4.6mm \times 250mm, 5 μ m); 柱温: 40℃; 流速: 1.0mL/min; 紫外检测器: 检测波长 338nm。

谷氨酸、天冬氨酸标样: 精确称取质量恒定的固体标样 20mg 于 100mL 容量瓶中, 溶解、定容。

1.7 关键风味化合物的测定

采用 DB-WAX PEG 柱; 进样口温度 250℃; 载气 He, 流速 0.8mL/min; 升温程序为: 起始温度 40℃, 保持 3min, 然后以 6℃/min 升温到 230℃, 最后在 230℃ 保持 10min。

质谱条件: 电离方式为 EI; 电子能量为 70eV; 发

射电流为 350 μ A; 离子源温度 200℃; 接口温度 250℃; 扫描质量范围 33~450u。

1.8 酱醅的变温发酵工艺

氨态氮含量是豆酱的一项重要指标, 国家标准中规定大于 1.5%, 因此可以考虑在酱醅总氨态氮达到 1.4% 时进行变温, 后续需要增加的部分预计在发酵后期完成。酱醅采用保温控制发酵, 设计的温度组合方式见表 1。为保证数据的一致性, 在同一温度阶段的发酵是在一起的, 当氨态氮含量达到 1.4% 时, 将样品直接分为两部分分别控温发酵, 当总氨态氮达到 1.78% 时终止发酵。

表 1 豆酱变温发酵的温度组合方式

Table 1 Temperature settings for two-stage fermentation of soybean paste

组合方式	前期恒温/℃	变温条件	后期恒温/℃
A	20		30
B	20	氨态氮含量达到 1.4%	40
C	40		20
D	40		30

2 结果与分析

2.1 食盐含量对酱醅发酵的影响

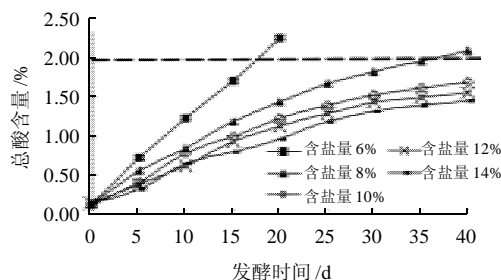


图 1 不同含盐量条件下豆酱保温发酵过程中总酸的变化

Fig.1 Effect of salt content on changes in total acids during soybean paste fermentation

由图 1 可知, 在豆酱保温发酵过程中总酸含量不断升高。起始阶段变化较快, 后又趋于变缓, 而且不同的含盐量条件下的变化也有不同。在含盐量为 6% 的酱醅中, 酸度增加最快, 发酵 17d 左右时总酸达到 2%, 已经超过国家标准的要求; 含盐量为 8% 的酱醅产酸也较快, 在接近 40d 时总酸也超过国家标准; 含盐量继续升高, 酸度增加减慢, 10% 含盐量的酱醅在发酵 40d 后酸度达到 1.70%, 表明 10% 的含盐量可以抑制杂菌的生长, 从而防止酱醅的酸败; 含盐量在 10% 以上, 酸度

变化比较缓慢^[7], 含盐量达到 14% 时, 经过 40d 的发酵, 总酸含量也仅仅达到 1.46%, 说明高盐浓度对产酸微生物的活动有较强的抑制能力, 致使微生物代谢活动较弱。

2.2 食盐含量对酱醅氨态氮含量的影响

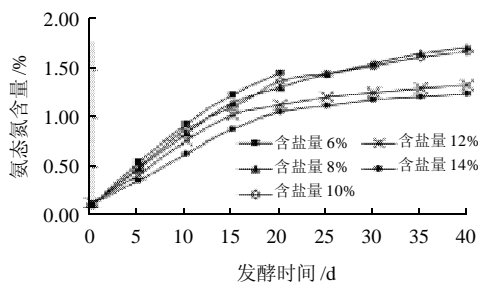


图2 不同含盐量条件下豆酱保温发酵过程中氨态氮含量的变化
Fig.2 Effect of salt content on changes in amino nitrogen during soybean paste fermentation

食盐含量对豆酱发酵过程中氨态氮含量的影响如图2所示, 含盐量不高于 10% 时氨态氮含量增加较快, 可能是因为蛋白酶受盐的影响较小, 保持了较高的活力^[3,9]; 含盐量为 12%、14% 时, 氨态氮含量增加缓慢, 可能是蛋白酶的活力受到抑制的原因。SB/T 10309—1999《黄豆酱》中的推荐标准为氨态氮含量 $\geq 1.5\%$ (以干基计), 在盐含量为 10% 时, 在 30d 已达到 1.56%, 而盐含量为 14% 时, 酱醅发酵 40d 后氨态氮含量仅为 1.25%。

2.3 温度对酱醅发酵的影响

在豆酱发酵过程中, 高温 40℃ 有利于蛋白酶的作用, 缩短蛋白质水解的时间; 低温 20~30℃ 则有利于乳酸菌、酵母菌的生长代谢, 对豆酱良好风味的形成是必需的, 但发酵周期较长。在我国有人采用先高温后低温的方式控制发酵生产酱油, 在日本则较多采用先低温后高温的发酵方式。为了寻求较佳的发酵工艺, 提高产品质量, 有必要研究两种变温控制方式下的变化规律。

2.3.1 阶段控温对酱醅氨态氮含量的影响

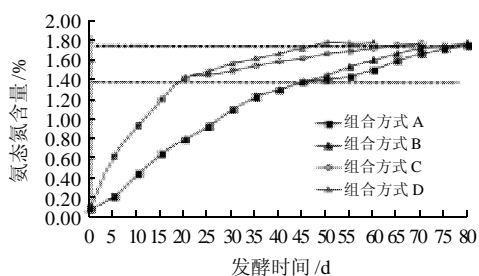


图3 不同温度组合方式下豆酱发酵过程中氨态氮含量的变化
Fig.3 Effect of different stepwise temperature settings on changes in amino nitrogen during soybean paste fermentation

豆酱变温发酵过程中氨态氮含量随时间的变化情况如图3所示, 前期采用 20℃ 发酵 (即 A 和 B) 时, 由于蛋白酶的活力低, 氨态氮的生成速率也低, 发酵 20d 时氨态氮含量仅达到 0.8%, 45d 时才达到 1.39%。因此, 在第 46 天开始进行变温发酵。在后期发酵 (A) 30℃ 条件下的氨态氮含量在第 80d 时达到 1.77%, 在后期发酵 (B) 40℃ 条件下的氨态氮含量在第 70 天达到 1.76%。前期 40℃ 发酵 (即 C 和 D) 时, 氨态氮含量增加较快, 在 20d 时就达到 1.41%, 因此在第 21 天开始变温。在后期发酵 (C) 20℃ 条件下的氨态氮含量在 60d 时达到 1.77%, 在后期发酵 (D) 30℃ 条件下氨态氮含量在 50d 时达到 1.77%。由此确定 4 种变温组合方式的发酵时间分别为: A: 20℃ 发酵 45d, 30℃ 发酵 35d, 合计 80d; B: 20℃ 发酵 45d, 40℃ 发酵 25d, 合计 70d; C: 40℃ 发酵 20d, 20℃ 发酵 40d, 合计 60d; D: 40℃ 发酵 20d, 30℃ 发酵 30d, 合计 50d。

2.3.2 阶段控温对酱醅 pH 值、总酸的影响

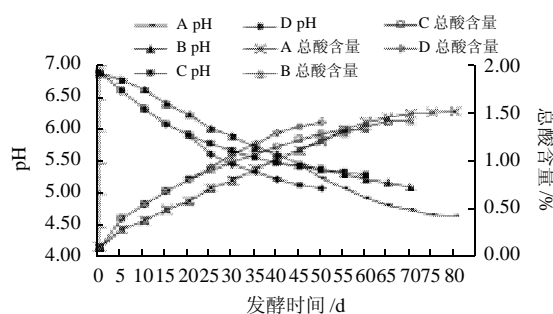


图4 不同温度组合方式下豆酱发酵过程中 pH 值和总酸含量的变化
Fig.4 Effect of different stepwise temperature settings on changes in pH and total acids during soybean paste fermentation

图4所示为豆酱发酵过程中 pH 值和总酸含量随时间的变化。随着发酵的进行, 体系 pH 值不断下降, 总酸含量不断升高。变温后 B 和 C 体系中 pH 值和总酸含量变化都比较缓慢, 而 A 与 D 体系变化都比较快。这是因为 A 与 D 后期发酵温度为 30℃, 利于乳酸菌的快速增殖, 使得 pH 值下降和总酸含量增加明显。但 A 与 D 之间又有差异, 图中 A 的 pH 值下降更快, 而 D 的 pH 值下降则相对比较缓和。推测可能是因为 A 低温 20℃ 条件下乳酸菌的生长受到抑制, 恢复到 30℃ 后又能大量增殖; 而 D 前期乳酸菌一直处于 40℃ 的高温下, 数量较少, 即使温度又降到 30℃, 长势也不好。

2.3.3 阶段控温对酱醅鲜味氨基酸含量的影响

鲜味是衡量豆酱品质的一项重要指标, 主要是由呈鲜味的谷氨酸和天冬氨酸的含量决定的^[10]。豆酱发酵过程中谷氨酸和天冬氨酸的含量变化见表2, 可以看出, A、B、C、D 4 种组合发酵中鲜味氨基酸的总量差别较小, 均在 27mg/g 左右。

表2 豆酱发酵过程中鲜味氨基酸含量的变化

Table 2 Effect of different stepwise temperature settings on changes in tasty amino acid contents during soybean paste fermentation (dry base)

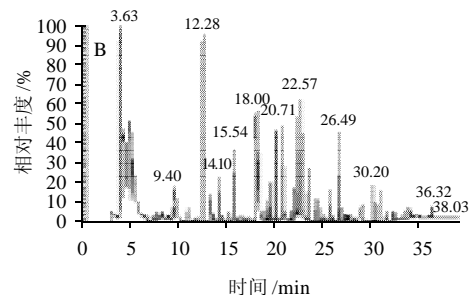
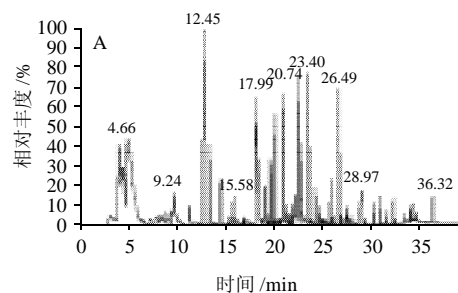
mg/g

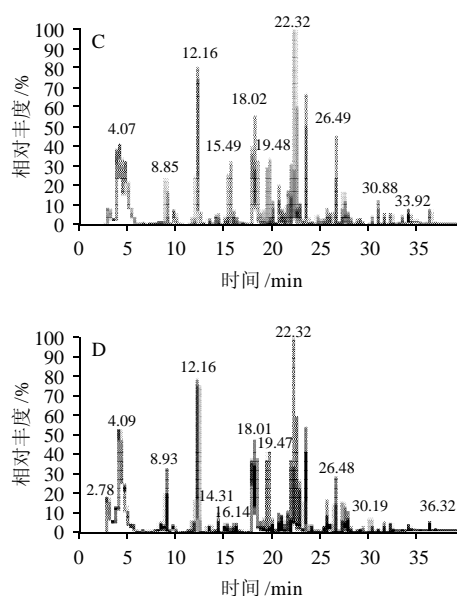
组合方式	鲜味氨基酸	发酵时间/d								
		0	5	10	15	20	25	30	35	40
A	天冬氨酸	2.11	2.58	3.12	3.61	4.17	4.62	5.01	5.47	5.88
	谷氨酸	5.45	6.34	7.41	8.57	9.49	10.32	11.11	11.98	12.73
	合计	7.56	8.92	10.53	12.18	13.66	14.94	16.12	17.45	18.61
B	天冬氨酸	2.04	2.6	3.05	3.58	4.12	4.65	5.1	5.62	5.92
	谷氨酸	5.42	6.3	7.32	8.49	9.4	10.25	11.12	11.89	12.64
	合计	7.46	8.9	10.37	12.07	13.52	14.9	16.22	17.51	18.56
C	天冬氨酸	2.08	3.82	5.67	7.53	9.61	10.32	10.73	11.21	11.39
	谷氨酸	5.4	6.98	8.74	10.39	11.88	12.25	12.78	13.34	13.89
	合计	7.48	10.8	14.41	17.92	21.49	22.57	23.51	24.55	25.28
D	天冬氨酸	2.1	3.77	5.7	7.61	9.63	10.53	10.86	11.22	11.54
	谷氨酸	5.43	7.03	8.79	10.44	11.86	12.66	13.34	13.85	14.42
	合计	7.53	10.8	14.49	18.05	21.49	23.19	24.2	25.07	25.96

组合方式	鲜味氨基酸	发酵时间/d							
		45	50	55	60	65	70	75	80
A	天冬氨酸含	6.22	7.03	7.9	8.92	9.75	10.66	10.86	11.28
	谷氨酸	13.41	14.05	14.43	14.77	15.09	15.36	15.81	16.08
	合计	19.63	21.08	22.33	23.69	24.84	26.02	26.67	27.36
B	天冬氨酸	6.31	7.52	8.99	10.81	11.14	11.5		
	谷氨酸	13.3	14.13	14.62	15.37	15.84	16.38		
	合计	19.61	21.65	23.61	26.18	26.98	27.88		
C	天冬氨酸	11.57	11.69	11.88	12.01				
	谷氨酸	14.26	14.73	15.1	15.32				
	合计	25.83	26.42	26.98	27.33				
D	天冬氨酸	11.93	12.3						
	谷氨酸	14.73	15.17						
	合计	26.66	27.47						

2.3.4 阶段控温对酱醅挥发性风味物质含量的影响

用顶空固相微萃取法(HS-SPME)提取传统发酵豆酱中的风味物质,通过气质联用(GC-MS)结合气相-嗅闻法(GC-O)分析豆酱的风味成分,确定 HEMF、亚油酸乙酯、苯乙酸乙酯、2,3-丁二醇、乙酸、苯甲醛、苯乙醛、2,6-二甲基吡嗪对豆酱的风味贡献较大^[11-13]。本实验测定了 A、B、C 和 D 4 种温度组合方式变温发酵结束时这些主要风味化合物的含量,图 5 为总离子流色谱图,表 3 列出了终产品中主要风味化合物的含量。其中, A 风味物质的总量最大,尤其是醇类和酯类含量比 B、C、D 高,这可能是因为 20~30℃ 条件下乳酸菌和酵母菌的生长较好,产酸、醇较多,而且发酵时间长,有利于酯类风味物质的形成^[14-15]。在 C、D 中,乳酸菌和酵母菌在前期 40℃ 条件下生长较差,代谢活动弱,发酵能力低,而当后期温度降至 20~30℃ 时,可以进行发酵产酸、产醇,形成了一些风味物质。





A~D.不同温度组合方式 A~D。

图5 不同温度组合方式下发酵豆酱中挥发性风味物质的MS总离子流色谱图

Fig.5 Total ion current chromatograms of flavor compounds in soybean paste prepared under different stepwise temperature settings

表3 不同温度组合方式下发酵豆酱中主要挥发性风味物质的含量
Table 3 Contents of key flavor compounds in soybean paste prepared under different stepwise temperature settings

化合物名称	A	B	C	D
2,6-二甲基吡嗪	26.8	25.4	26.2	24.6
乙酸	1013.5	680.9	783.1	843.2
苯甲醛	130.6	126.4	154.3	148.9
2,3-丁二醇	45.2	31.3	22.1	28.6
苯乙醛	178.6	165.3	186.2	182
苯乙酸乙酯	40.2	34.8	28.9	23.1
4-羟基-2(5)-乙基-5(2)-甲基-3(2H)呋喃酮	75.9	43.2	20.1	34.8
亚油酸乙酯	168.1	139.6	86.4	90.3
合计	1678.9	1246.9	1307.3	1375.5

3 讨 论

发酵就是利用微生物所分泌的酶,将酱醅中的原料分解成所需要的新物质的过程^[7]。根据食盐含量的不同,在酱油的酿造中可以分为固态低盐发酵和高盐发酵,酱醅含盐量的多少会对发酵周期和产品品质产生较大的影响。改变酱醅的含盐量,由总酸和氨态氮含量的变化规律可以得出,当盐含量为10%时,一方面可以有效地抑制腐败菌的生长,不致酸败的发生;另一方面蛋白酶仍然保持了较高的活力,氨态氮的生成速率较快,可以缩短发酵周期。因此,将酱醅的含盐量定为10%是合适的。

日晒夜露方式发酵的豆酱以其良好的风味深受消费者的喜爱,发酵过程中不但有昼夜的温度变化,还有季

节温度的变化,正是这样阶段的变化,恰恰适宜了不同类微生物的生长和不同酶的最佳反应温度。结合传统的日晒发酵工艺和前期研究结果,可以采用阶段控温的方式来控制发酵,人为地模拟天然发酵过程中温度的变化,促进各类反应的进行,优化控制发酵产品的质量。

设计实验比较了前期采用20℃发酵,氨态氮含量达到1.4%时分别变为30℃和40℃继续发酵,和前期40℃发酵,氨态氮含量达到1.4%时分别变为20℃和30℃继续发酵等4种变温控制发酵方式,研究了pH值、总酸以及鲜味氨基酸含量变化,测定了产品中主要风味物质的含量。结果表明,采用20℃→30℃发酵80d时风味物质总量为1678.9ng/g,氨态氮含量为1.76%;采用20℃→40℃发酵70d时风味物质总量为1246.9ng/g,氨态氮含量为1.73%;采用40℃→20℃发酵60d时风味物质总量为1307.3ng/g,氨态氮含量为1.77%;采用40℃→30℃发酵50d时风味物质总量为1375.5ng/g,氨态氮含量为1.79%;从缩短发酵周期角度选择40℃→30℃是合适的。

因此,本研究确定酱醅控温发酵的条件是含盐量为10%,前期40℃发酵20d,调节温度至30℃继续发酵30d,发酵周期为50d。

参考文献:

- [1] 梁恒宇,程建军,马莺.中国传统大豆发酵食品中微生物的分布[J].食品科学,2004,25(11):401-404.
- [2] 李能树.酱油发酵料中微生物的分布[J].中国酿造,1997(6):14-15.
- [3] JAMES M J, MARTIN J L, DAVID A G.现代食品微生物学[M].何国庆,丁立孝,宫春波,译.北京:中国农业大学出版社,2008.
- [4] 孙常雁,马莺,李德海,等.自然发酵黄豆酱曲培养过程中蛋白酶的生成及蛋白质的分解[J].食品科技,2007,32(8):188-192.
- [5] 徐德峰,赵谋明.中国酱油菌株AS3.951的改良现状与思考[J].中国调味品,2009,34(5):32-38.
- [6] 潘力,苗小康,梁燕娥.酱油酿造米曲霉AS3.951(沪酿3.042)种曲胞外蛋白谱鉴定与分析[J].食品科学,2010,31(7):182-185.
- [7] 上海市酿造研究所.发酵调味品生产技术[M].北京:中国轻工业出版社,1998.
- [8] 孙常雁.自然发酵黄豆酱中主要微生物酶系的形成及作用[D].哈尔滨:东北农业大学,2007.
- [9] BRIAN J B W.发酵食品微生物学[M].徐岩,译.2版.北京:中国轻工业出版社,2001.
- [10] TSENG Y H, LEE Y L, LI R C. Non-volatile flavor components of *Ganoderma tsugae*[J]. Food Chemistry, 2005, 90(3): 409-415.
- [11] CHOI H S, MIN K C. Aroma-active compounds of *Elsholtzia splendens* using AEDA and HS-SPME-GC-O analysis[J]. Flavour and Fragrance Journal, 2008, 23(1): 58-64.
- [12] 赵建新,戴小军,田丰伟,等.气相-嗅觉法分析传统豆酱风味活性物质[J].食品科学,2009,30(20):394-397.
- [13] ZHAO Jianxin, DAI Xiaojun, LIU Xiaoming, et al. Comparison of aroma compounds in naturally fermented and inoculated Chinese soybean pastes by GC-MS and GC-Olfactometry analysis[J]. Food Control, 2011, 22(6): 1008-1013.
- [14] YAMABE S, KANEKO K, INOUE H, et al. Maturation of fermented rice-koji miso can be monitored by an increase in fatty acid ethyl ester[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2004, 68(1): 250-252.
- [15] WACHÉ Y, HUSSON F, FERON G, et al. Yeast as an efficient biocatalyst for the production of lipid-derived flavours and fragrances[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2006, 89(3/4): 405-416.