

传统发酵豆酱发酵过程中养分动态及细菌多样性

高秀芝^{1,2} 王小芬¹ 李献梅¹ 王慧¹ 李梦莹² 张薇² 崔宗均^{1*}

(1. 中国农业大学农学与生物技术学院/中国农业大学生物质工程中心 北京 100094)

(2. 北京农学院食品科学系 北京 102206)

摘要: 以山东传统发酵豆酱作为研究对象, 测定了发酵不同阶段的总酸、可溶性糖、有机碳、粗蛋白、氨基酸态氮、主要挥发性产物等指标, 对样品中细菌进行 PCR-DGGE 分析, 探讨了传统发酵豆酱中养分动态及细菌多样性。结果表明发酵过程中总酸含量先上升后下降而后又上升, 最后成品酱中为 6.26%; 有机碳和可溶性糖含量都逐渐减少; 粗蛋白相对含量先略有平稳上升后下降; 氨基酸态氮含量一直在增加, 成品酱中为 101.2 g/kg; 乳酸和甘油含量随发酵进程而增加, 成品酱中分别为 5.65 g/kg 和 14.72 g/kg。DGGE 分析表明发酵 15 d 时细菌种类最多, 随后一部分逐渐消失, 种类趋于稳定, 最后成品酱中出现有几种明显的优势种, 主要包括: 未培养细菌 (Uncultured bacterium)、乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*)、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 的近缘种。

关键词: 传统豆酱, 养分动态, 细菌多样性

Changes of Nutrition and Bacterial Diversity During Traditional Soypaste Fermentation

GAO Xiu-Zhi^{1,2} WANG Xiao-Fen¹ LI Xian-Mei¹ WANG Hui¹
LI Meng-Ying² ZHANG Wei² CUI Zong-Jun^{1*}

(1. Center of Biomass Engineering, College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094)

(2. Department of Food Science, Beijing Agricultural College, Beijing 102206)

Abstract: Nutrient dynamics and bacterial diversity of traditional soypaste were analyzed and discussed with samples from Shandong province by nutrition and denaturing gel gradient electrophoresis (DGGE) analysis. The nutrition value was determined by following parameters: total acid, water-soluble carbohydrate (WSC), organic carbon (OC), crude protein (CP), amino-acid nitrogen and volatile products. Results showed that the total acid was increased at first, and decreased, and then increased again up to 6.26%. The contents of OC and WSC remained decline. As for CP, it was decreased after increased stable. The amino-acid nitrogen was kept increasing during the whole progress and its concentration was up to 101.2 g/kg in final soy-paste. The concentration of lactic acid and glycerol were increased during the fermentation, and were up to 5.65 g/kg and 14.72 g/kg in final soypaste, respectively. DGGE analysis indicated that there were the most kinds of bacteria in 15d soypaste, and then some of bacteria were disappeared gradually. Uncultured bacterium, *Lactococcus lactis* and *Bacillus licheniformis* of final soypaste were predominant species in final soy-

paste.

Keywords: Traditional soypaste, Changes of nutrition, Bacterial diversity

豆酱(Soypaste)是以大豆为主要原料制成的酱,经自然发酵而成的半流动状态的发酵食品,也称黄豆酱、黄酱或大豆酱^[1]。在家庭式传统发酵豆酱的制作过程中,随着外界环境温湿度的变化,多种微生物在发酵过程中产生多种物质,使得发酵体系的酸碱环境发生变化,原料的成分也在逐渐被转化和利用,伴随发酵体系中营养物质和组成成分以及酸碱条件的变化,不同的微生物在交替中协同完成发酵最终得到产品。

豆酱之所以具有浓郁的香味、适宜的口感和色泽是因为发酵过程中大豆蛋白在微生物分泌的酶的作用下,通过一系列生化反应,其中包括蛋白质水解、酒精发酵、有机酸发酵、脂类形成等^[2],这些物质有的被微生物利用,有的作为其它反应的基质或者作为发酵食品的营养成份。

近年来,随着科学技术的进步以及试验设备的改善,使得商品豆酱生产周期缩短,产品品质也比较稳定。但是酱香、风味和适口性远不及传统酿制的豆酱。我国作为世界上这种传统工艺的发源地,地域宽广,风俗习惯各异,民间的传统工艺酿造的豆酱各具特色。但其特殊风味的形成过程及微生物群的变化和作用还不很清楚,搞清这些传统豆酱形成过程的机理对加深我国宝贵传统技术资源的理解和规模化豆酱生产工艺的改善具有重要意义。

目前对于传统豆酱发酵过程中养分的动态变化研究的并不多,在酱生产中,除霉菌和酵母菌作为主要发酵启动菌种外,细菌对酱风味形成有着非常重要的作用,如乳酸菌能把葡萄糖分解成乳酸,与酵母产生的醇类化合成酯类,形成豆酱的特殊风味^[3]。传统豆酱酿造过程中营养成分和细菌动态变化研究还不多见,本研究以山东梁山县一农户传统发酵豆酱作为对象,研究了传统发酵豆酱发酵过程中营养成分和细菌在发酵过程的动态变化,以期揭示传统豆酱发酵过程机理和为进一步改善规模化豆酱生产工艺提高风味提供重要依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料酱制作流程与取样

实验材料取自山东省济宁市梁山县小安山镇鹅

鸭厂村一户自制的豆酱。制作工艺为:准备25%玉米和75%黄豆分别炒熟后混合粉碎,加水至60%左右和匀,在宽20cm、长40cm、高6cm的木框内压坯,去除木框用刀横切成20cm×10cm×6cm的长方体块,用纸包裹之后放置发酵,发酵65d~70d后去除包裹纸刷洗表面打碎成小块,用18%~20%的盐水调水分成80%左右(称下酱),放进缸里每天用木棍搅拌1次,等不再产生气泡状态稳定后按口味习惯再适当加盐混匀后即可食用。在此过程中分别在发酵时间0d、15d、30d、45d、60d和90d(成品酱直接取)锯开发酵块,在横断面上从表面到块中心方向取条状样品作为分析样。

1.2 实验方法

1.2.1 总酸和pH测定:取干燥样品2.5g溶于20mL蒸馏水,加热使有机酸溶解,充分搅拌,加水定容至50mL,沸水浴30min,使其中有机酸充分溶解,冷却后用快速定性滤纸过滤,取10mL加60mL水,摇匀,用移液枪吸取约0.2mL样品液滴入HORIBA微量pH计上测定pH。总酸含量按GB/T 5009.40-2003^[4]测定。

1.2.2 营养成分测定:可溶性糖(WSC)是用蒽酮比色法测定^[5];总碳用重铬酸钾法^[6]测定,粗蛋白(CP)的测定为凯氏定氮法^[7];按GB/T 5009.40-2003测定干燥豆酱样品中氨基酸态氮含量,按GB/T 5009.40-2003测定样品的氨基酸含量。

1.2.3 GC-MS 测定豆酱样品中挥发性成分:取各鲜样品5.0g放入3倍(W/V)的纯水中充分溶解,离心后去上清液过0.2μm微孔过滤器后,取1μL进PQ-2010型气质联机测定。测定条件为分析柱:CP-Chirasil-Dex CB型毛细管柱(25m×0.25mm);柱箱温度:50℃,(1min)100℃,(8min)195℃,(18min),共17min.;汽化温度:190℃;监测器温度:200℃;监测器电压:1.5kV;载气:氦气(75kPa);流量:38.8mL/min.;进样器:Splitte:1/22。对测定的数据,利用NIST数据库进行定性分析。又根据出峰物的定性分析结果,配制相应标准样品的稀释液作为标准物进样,用于该物质的定量分析。

1.2.4 DNA 提取:各取2.0g豆酱鲜样品,用氯苯法^[8]提取细菌总DNA,用RNA酶纯化。

1.2.5 PCR-DGGE: 以总 DNA 为模板, 引物 357F-GC 序列为: GC clamp^b-5 -CCTACGGGAGGC AGCAG-3 (其中 GC-clamp 序列为 5 -CGCCCGCC GCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGCACGGGGG-3); 引物 517R 的序列为 5 -ATTACCGCGTCTGG-3^[9]。PCR 反应体系为(50 μ L): 10 \times PCR Buffer (Tiangen) 5 μ L, 2 mmol/L dNTP mix 4 μ L, 45 pmol 357F 和 517R 各 0.5 μ L, 5 U/ μ L Taq DNA Polymerase (Tiangen) 0.2 μ L, 模板 10 ng/ μ L DNA 1 μ L。反应程序为 95 10 min; 93 变性 1 min, 48 退火 1 min, 72 延伸 1 min 10 s, 共 30 个循环; 最后引物 72 延伸 5 min。扩增产物以 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

对 PCR 产物进行变性梯度胶电泳(DGGE), 具体方法参见文献[10]。胶回收的条带, 进行一次无 GC-Clamp 的 357F 和 517R 引物 PCR 扩增。PCR 产物送三博远志测序公司进行测序。

根据 16S rDNA 序列, 查询联网数据库 Blast (DDBJ nucleotide sequence database)进行检索, 分析亲缘关系及相似性, 申请获得 GenBank 的登录号。

2 结果与讨论

2.1 发酵过程中总酸及 pH 的变化

豆酱在发酵过程中总酸呈现出先上升后下降而后又上升的趋势, 0 d 时总酸含量开始为 1.89%, 15 d 增加至 3.87%, 随后到 45 d 下降为 2.18%, 而后总酸含量又增加, 成品酱总酸含量为 6.26% (如图 1 所示)。豆酱发酵初期 pH 为 4.5, 发酵 15 d 后开始上升, 在固态发酵后阶段一直是 6.5 左右, 而后期成品酱维持在 4 左右的微酸性。从图 1 中可以看出总酸先升后降再上升, 在豆酱制作初期微生物利用原料中的糖产生酸, 使总酸含量增加, 但发酵物本身具备一定的缓冲能力, 使发酵初期 pH 能稳定一段时间。随着发酵过程的进行可利用糖逐渐减少, 总酸下降, 蛋白逐渐被分解, 生成氨类物质, 体系 pH 缓冲系统平衡打破, pH 上升, 发酵中后期尤其下酱后含水量增加, 乳酸菌占据优势地位, 使得总酸含量又上升, pH 下降。随豆酱酿造工艺和周期不同, pH 变化也不尽相同。文献[11]中规模化商品豆酱的 pH 变化是先下降后上升。其原因可认为原料中碳水化合物较多, 生产周期只有 45 d, 在简短的周期中人工强化物质分解产生较多有机酸, 初期使 pH 下降, 到后期分解平稳有机酸积累减少, pH 就回升。

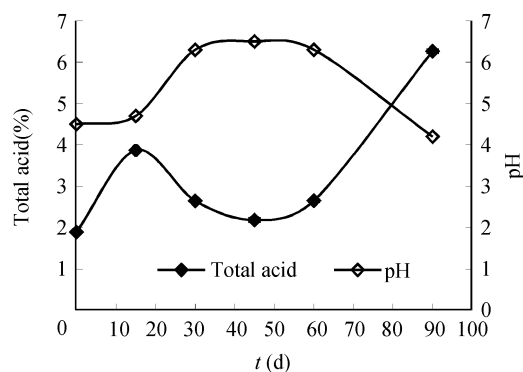


图 1 豆酱发酵过程中总酸和 pH 变化

Fig. 1 Changes of total acid and pH during the soybean paste fermentation

2.2 豆酱发酵过程中营养成分变化

2.2.1 发酵过程中有机碳和可溶性糖的变化: 豆酱发酵过程中有机碳和可溶性糖含量都呈现逐渐下降趋势(如图 2 所示), 0 d 有机碳含量为 517.42 g/kg, 最后 90 d 成品酱含量为 354.94 g/kg, 比 0 d 的有机碳下降了 30%。可溶性糖含量为 0 d 73.27 g/kg, 90 d 为 22.27 g/kg, 90 d 后比 0 d 下降了接近 70%。碳源主要作为微生物的能源, 随着发酵体系中微生物活动逐渐旺盛, 使有机碳和可溶性糖含量逐渐下降, 尤其可溶性糖更容易被微生物利用, 含量下降也更为明显。

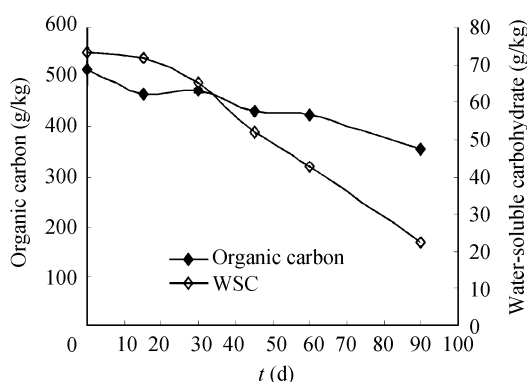


图 2 豆酱发酵过程中有机碳和可溶性糖变化

Fig. 2 Changes of organic carbon and WSC during the soybean paste fermentation

2.2.2 粗蛋白与氨基酸态氮在发酵过程中变化: 如图 3 所示豆酱在发酵过程中粗蛋白含量呈现出先上升后下降的趋势, 0 d 粗蛋白含量为 36.55%, 随后的发酵过程中逐渐上升, 60 d 粗蛋白含量最高为 48.31%, 发酵开始时微生物消耗环境中的糖, 使得蛋白的相

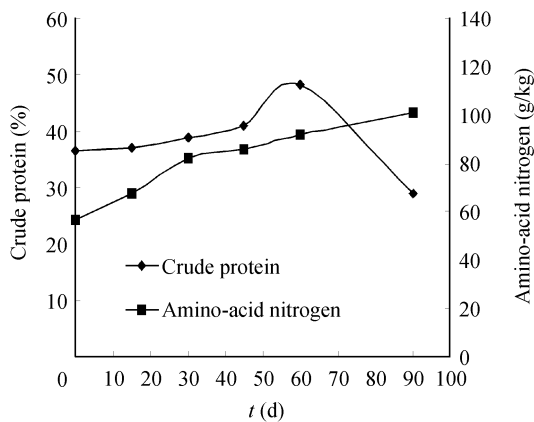


图3 豆酱发酵过程中粗蛋白和氨基酸态氮的变化
Fig. 3 Changes of crude protein and amino-acid nitrogen during the soybean paste fermentation

对比比例提高,最后成品酱 90 d 粗蛋白含量下降为 29.00%。豆酱发酵过程中氨基酸态氮含量逐渐增加,0 d 氨基酸态氮含量为 56.9 g/kg,最后成品豆酱 90 d 氨基酸态氮含量为 101.2 g/kg,比 0 d 增加了接近 0.8 倍;说明豆酱在发酵过程中在发酵体系中蛋白酶系的作用,水解产生游离氨基酸,使得环境中氨基酸态氮含量逐渐上升。氨基酸本身就是重要的呈味物质,特别是游离氨基酸与豆酱独特风味的形成密切

相关。其中谷氨酸和天门冬氨酸是重要的呈鲜味氨基酸,亮氨酸和异亮氨酸则具有苦味,而赖氨酸则可能和豆酱的特有滋味有联系^[12]。本研究的其它试验结果表明在山东传统发酵成品豆酱中谷氨酸和天门冬氨酸含量为总氨基酸量的 25%,对豆酱的风味形成有着重要的作用。

2.3 豆酱发酵过程中主要挥发性成分的变化

通过 GC-MS 测定发酵各个阶段样品结果,检测到的挥发性代谢产物为乙醇、乙酸、乳酸、乙酸乙酯、丙酸、丙二醇、丁二醇、甘油、戊酸、己酸、安息香酸、苯丙酸己酯、对乙基苯甲酸庚酯、苯乙酸庚酯、3,4-二甲基-2-己醇、麦芽醇、甘露醇、己酸丙酯等 33 种物质。对其中主要产物乙醇、乙酸、乳酸及甘油作定量分析结果如表 1 所示。乙醇在固态发酵初期出现较高的量,随后下降,加水下酱之后的成品酱中含量最高;乙酸在固态发酵的第 15 d 和 45 d 两阶段表现较高,其它时期都较低;乳酸和甘油随发酵时间增加而增加,最后成品酱中乳酸达到了 5.56 g/kg FM,甘油达到 14.71 g/kg FM。正是最终成品酱中这些物质的丰富尤其是乙醇、乳酸和甘油量的增加使传统发酵产品风味浓厚。

表 1 豆酱发酵不同阶段挥发性产物含量
Table 1 Contents of volatile matters in different soybean paste fermentation stage

时间(d) Time	乙醇(g/kg FM) Ethanol	乙酸(g/kg FM) Acetic acid	乳酸(g/kg FM) Lactic acid	甘油(g/kg FM) Glycerol
0	0.08	-	-	5.00
15	4.94	1.20	-	6.58
30	3.28	0.73	0.09	10.70
45	0.71	1.47	0.39	11.52
60	0.27	0.28	0.49	15.17
90	8.26	0.53	5.65	14.71

Note: FM: Fresh matter

2.4 豆酱发酵过程中细菌群落的动态变化

从整体看(图 4),0 d 原材料中有一些杂菌条带,除了 a 维持较长时间外,在随后的检测中均很快消失;发酵 15 d 时条带数最多,之后逐渐减少趋于稳定,在最后的成品酱中,条带较集中,优势种明显。从各个条带的动态来讲可归纳为 3 种情形(如图 4 所示,具体信息及 GenBank 登录号见表 2): 发酵初期(15 d)集中出现而后消失,如条带 k、m、n 等,数据库比对结果为未知菌克隆和芽孢杆菌的近缘种,

认为这些微生物主要参与初期的物质分解; 发酵阶段较长时间出现,而后逐渐消失,如条带 a、r、s、t、u,数据库比对结果为魏斯氏菌属、芽孢杆菌、梭菌属的近缘种,认为这些在整个分解过程中起到一定的作用; 在发酵初期到成品酱中稳定存在的类型,如条带 f、g、j、l、o、p、q,这些包括明串珠菌、未培养菌、乳酸乳球菌、地衣芽孢杆菌、芽孢杆菌和弗氏柠檬酸杆菌的近缘种,认为这些是豆酱发酵过程的优势菌,在整个过程中起到重要的

作用。尤其是条带 g、j 和 l 是随着发酵进程逐渐变浓,最后形成成品酱的最主要的 3 个条带。其中条带 j 为乳酸乳球菌(100%)的近缘种,该种菌在发酵食品中如发酵食品尤其乳制品中常分离到^[13,14],乳酸菌在生长代谢过程中产生的乳酸和酵母菌代谢产物作用生成酯类物质,认为该菌在成品酱风味形成中起到重要的作用。另外乳酸菌合成的肽聚糖对免疫系统具有调节作用^[15];条带 l 是地衣芽孢杆菌(98%)的近缘种,在自然界有机物分解环境中常见的微生物,在传统食品中经常分离到^[16,17],该菌也将是豆酱发酵过程中的重要种类,它对葡萄球菌、酵母菌等致病菌有拮抗作用,而双歧杆菌、乳酸杆菌、拟杆菌、消化链球菌有促进生长作用,从而可调整肠道菌群平衡^[18]。这些微生物在豆酱发酵与品质形成过程及豆酱的保健等方面的作用有待于进一步研究。

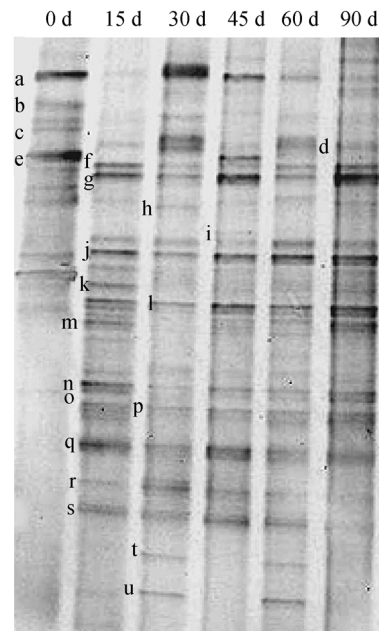


图 4 豆酱发酵各阶段细菌的 DGGE 分析图谱

Fig. 4 DGGE profile of different soypaste fermentation stage

表 2 图 4 中 DGGE 条带的近缘菌株
Table 2 Identities of DGGE bands in Fig. 4

条带 Band	登录号 GenBank accession no.	近缘菌株名称 Closest relatives		相似度 Identity (%)
		来源 Source	登录号 Accession no.	
a	EU360131	<i>Weissella cibaria</i>	EU121685	100%
b	EU360132	<i>Weissella cibaria</i>	EU099612	99%
c	EU360133	Uncultured <i>Bacillus</i> clone	EF663728	87%
d	EU360134	Uncultured <i>Bacillus</i> bacterium	EF703482	97%
e	EU360135	<i>Leuconostoc lactis</i>	AB295117	98%
f	EU360136	<i>Leuconostoc garlicum</i>	AB362724	91%
g	EU360137	Uncultured bacterium	AB233995	99%
h	EU360138	<i>Citrobacter freundii</i>	EU124385	92%
i	EU360139	<i>Streptococcus equinus</i>	AB362710	98%
j	EU360140	<i>Lactococcus lactis</i>	AB244439	100%
k	EU360141	Uncultured <i>Streptococcus</i> sp. clone	DQ016828	90%
l	EU360142	<i>Bacillus licheniformis</i>	EU071556	98%
m	EU360143	<i>Ureibacillus thermosphaericus</i>	AY299517	98%
n	EU360144	<i>Bacillus pumilus</i>	CP000813	100%
o	EU360145	<i>Bacillus</i> sp. Ni36	AF539677	90%
p	EU360146	<i>Citrobacter freundii</i>	AY186052	99%
q	EU360147	Uncultured bacterium	DQ346926	86%
r	EU360148	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	X95978	84%
s	EU360149	<i>Clostridium</i> sp. PML14	EF522948	90%
t	EU360150	<i>Bacillus</i> sp.	AB362829	82%
u	EU360151	<i>Clostridium</i> sp.	EF165015	91%

结合养分变化结果来看, 在豆酱发酵初期主要工作细菌为未知菌克隆、芽孢杆菌、魏斯氏菌属和梭菌属的近缘种, 认为这些菌株在整个分解过程协助米曲霉中对物质分解起一定作用, 对应总碳和可溶性糖含量在此阶段下降趋势, 由于碳比例下降相应粗蛋白比例有一定程度的增加。明串珠菌、未培养菌、乳酸乳球菌、地衣芽孢杆菌、芽孢杆菌和弗氏柠檬酸杆菌的近缘种为豆酱发酵过程的优势菌, 其中乳酸菌代谢产生乳酸使得体系中总酸含量增加。发酵过程中菌体一直需要消耗养分, 故碳含量一直呈下降趋势, 蛋白被分解成多肽和氨基酸, 对应氨基酸态氮含量逐渐增加。发酵后期细菌种类趋于稳定, 乙酸与乳酸含量增加, 同时由于豆酱中盐的存在, 这使豆酱能够长时间保持良好的风味和品质。

3 结论

(1) 豆酱发酵过程中 15 d 后 pH 由 4.5 上升, 45 d 维持 6.5 左右, 后期成品酱维持在 4 左右的微酸性; 总酸含量在初期 15 d 形成一个单峰后下降, 后期又上升。

(2) 有机碳和可溶性糖含量都逐渐减少, 粗蛋白含量在固态发酵阶段缓慢下降, 下酱后下降明显, 与此对应, 总氨基酸态氮含量一直在上升。

(3) GC-MS 结果表明发酵过程检测到 33 种代谢物, 而乳酸和甘油随发酵进程而增加。

(4) 通过 DGGE 证明细菌在豆酱发酵 15 d 时种类最多, 之后一部分逐渐消失, 种类趋于稳定, 最后成品酱中出现几种明显的优势种。一种未培养细菌(Uncultured bacterium 99%)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis* 100%)和地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis* 98%)为成品酱中主要优势细菌。

参 考 文 献

[1] 包启安. 酱及酱油的起源及其生产技术(一). 中国调味品, 1992, 9: 1-4.
[2] 石彦国主编. 大豆制品工艺学. 北京: 中国轻工业出版社, 2005, pp.152-153.

[3] 李海梅, 马 莺. 黄豆酱的生产现状及发展方向. 中国调味品, 2004, 10: 8-12.
[4] GB/T 5009.40-2003, 酱卫生标准的分析方法. 北京: 中国标准出版社, 2003.
[5] Roe JH. The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent. *J Biol Chem*, 1955, 21(2), 335-343.
[6] 杨树筠. 用重铬酸钾法简便快速测定土壤有机质含量. 现代农业, 1997, 4: 23.
[7] AOAC. Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Analytical Chemists, Washington DC, 1990.
[8] Zhu H, Qu F, Zhu LH. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21: 5278-5280.
[9] Muyzer G, Waal ECD, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59: 695-700.
[10] 王小芬, 王伟东, 高丽娟, 等. 变性梯度凝胶电泳在环境微生物研究中的应用详解. 中国农业大学学报, 2006, 11 (5): 1-7.
[11] 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. 食品科技, 2007, 8: 188-192.
[12] 徐琳娜, 王 璋, 许时婴. 豆瓣酱后熟过程中氨基酸和风味物质的变化. 中国调味品, 2006, 9: 21-25.
[13] 刘红霞, 徐 杰, 云月英, 等. 蒙古戈壁地区自然发酵乳中乳酸菌的分离鉴定. 微生物学杂志, 2007, 27(3): 42-46.
[14] 刘 慧, 熊利霞, 易欣欣, 等. 藏灵菇中高产胞外多糖乳酸菌的筛选及其发酵性能的研究. 食品科学, 2007, 28(5): 211-215.
[15] 姚光国, 姚 文, 陆 扬, 等. 乳酸菌肽聚糖部分免疫增强作用的研究. 微生物学通报, 2007, 34(1): 105-107.
[16] 王 燕, 王开梅, 杨自文. 地衣芽孢杆菌 1801 的分离鉴定及其活性研究. 湖北农业科学, 2007, 3: 393-395.
[17] 牛天娇, 马 莺. 中国传统发酵豆制品中微生物的发掘与利用. 中国酿造, 2005, 2: 1-5.
[18] Lwdfiw. 枯草芽孢杆菌、蜡芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌在饲料中的作用. <http://bbs.cn-ferment.com/viewthread.php?tid=104>.