

豆豉返霜现象的分析研究

叶云花¹, 陈丽莉², 涂宗财^{1,2,*}, 王 辉², 沙小梅², 阮传英²

(1.江西师范大学科技园, 江西 南昌 330022; 2.南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047)

摘 要: 通过微生物鉴定和理化性质测定, 对豆豉表面的颗粒状白色物进行分析。结果表明: 豆豉返霜并非微生物污染所致, 白色颗粒物大部分呈不规则块状结构, 伴有少量杆状或针状, 其溶解性差, 主要成分为酪氨酸。500W功率微波处理120s, 能有效抑制返霜现象的产生。

关键词: 豆豉; 返霜; 颗粒物; 酪氨酸; 微波

Analysis of Efflorescence on the Surface of Douchi

YE Yun-hua¹, CHEN Li-li², TU Zong-cai^{1,2,*}, WANG Hui², SHA Xiao-mei², RUAN Chuan-ying²

(1. Technology Park, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China;

2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: White granular substances on the surface of douchi were analyzed by means of microbiological identification and physio-chemical determination. Efflorescence on the surface of douchi was not caused by microbial contamination. Most white granular substances on the surface of douchi were massive in structure and small amounts of them had a rod-like or needle-like structure. They had poor solubility and the major composition was tyrosine. Efflorescence could be effectively inhibited by 500 W microwave treatment for 120 s.

Key words: douchi; efflorescence; granular substance; tyrosine; microwave

中图分类号: TS214.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)21-0104-03

豆豉是我国四大传统发酵豆制品(豆豉、酱油、腐乳和豆酱)之一, 是以大豆为主要原料, 经浸泡、蒸煮、制曲、发酵等工序加工而成的风味独特、营养丰富、能增进食欲的特色调味品^[1], 深受广大消费者的喜爱。近年来国内外已对豆豉中纤溶酶、分泌蛋白酶、异黄酮等多种功能性成分做了深入研究^[2-3], 但我国豆豉的发展仍然存在问题, 随着货架期的延长, 豆豉表面会有一些形状不规则的颗粒状物质出现, 极大地影响了豆豉产品形象, 严重制约了产品的销售和企业的发展。有研究发现, 瓶装豆豉酱中的白色结晶是由17种游离氨基酸组成, 其中酪氨酸的含量比例最高, 占70%^[4]。

基于此, 以豆豉表面颗粒物质为研究对象, 通过微生物培养和理化性质测定, 探究该颗粒物质主要成分, 并研究相应的保藏措施以抑制返霜现象的发生, 为延长豆豉产品保藏期提供理论指导依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

收稿日期: 2011-09-30

基金项目: 科技部科技型中小企业技术创新基金项目(09C26213601581)

作者简介: 叶云花(1969—), 女, 工程师, 学士, 研究方向为高新食品加工技术。E-mail: yeyunhua373@sohu.com

*通信作者: 涂宗财(1965—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食物资源开发与利用。E-mail: tuzc_mail@yahoo.com.cn

豆豉由南昌稻香园调味品有限公司提供, 利用沪酿3.042米曲霉发酵制成。

盐酸、硝酸银 上海试剂一厂; 氢氧化钠 天津市大茂化学试剂有限公司; 无水葡萄糖 上海润捷化学试剂有限公司; 蒽酮 国药集团化学试剂有限公司; 铬酸钾 汕头市西陇化工厂有限公司; 各试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

SW-CJ-1FD洁净工作台 苏州安泰空气技术有限公司; PYX-150H-B恒温恒湿培养箱 厦门精艺兴业科技有限公司; ZDX-35BI座式自动电热压力蒸汽灭菌器 上海申安医疗器械厂; XS-402生物显微镜 南京江南永新光学有限公司; KDY-9820凯氏定氮仪 北京通润源机电技术有限责任公司; T6新世纪紫外-可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司; L-8900氨基酸自动分析仪 日本日立公司; G80F20CN2L-B8微波炉 广东格兰仕微波炉电器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 样品收集

返霜豆豉原料烘干, 过80目筛, 筛下豆豉表面物质, 收集备用。

1.3.2 微生物培养^[5]

以无菌操作取新鲜豆豉和返霜豆豉分别置于装有灭菌生理盐水和数粒玻璃珠的锥形瓶中,制成适宜浓度的稀释液,用平板计数琼脂(PCA)培养基(胰蛋白胨5.0g、酵母浸膏2.5g、葡萄糖1.0g、琼脂15.0g、蒸馏水1000mL、pH(7.0±0.2))进行平板菌落计数,(36±1)℃培养(48±2)h后观察结果。

1.3.3 显微镜观察

取样品于载玻片上涂成薄层,进行镜检。

1.3.4 溶解性

分别对样品用蒸馏水、乙醇、5% HCl溶液、5% NaOH溶液、加热进行溶解。

1.3.5 定量分析

1.3.5.1 总氮含量

采用凯氏定氮法测定。

1.3.5.2 氨基态氮含量

采用甲醛滴定法测定。

1.3.5.3 氨基酸组成分析^[6]

精确称取5mg样品放入水解样品瓶中,加入7mL 6mol/L HCl溶液,充氮气约8min,密封。将样品瓶放在110℃恒温干燥箱内水解24h。水解结束后,冷却至室温,用去离子水定容至10mL,摇匀,过滤,取1mL滤液55℃真空干燥后,用0.5mL 0.02mol/L HCl溶解、摇匀,调pH值至1.7~2.2之间,0.45μm滤膜过滤,全自动氨基酸自动分析仪检测。

1.3.5.4 总糖含量测定^[7]

准确称取0.5g样品加蒸馏水约3mL于研钵中研磨成浆,洗入三角瓶,再加入6mol/L 10mL HCl沸水浴水解0.5h,冷却后用10% NaOH中和,然后定容至100mL,摇匀,过滤。取滤液0.5mL用蒽酮-硫酸法测定总糖含量。

1.3.5.5 盐分含量测定

准确称取4g样品,放入烧杯内,加蒸馏水40mL,加热煮沸10min,冷却后定容至50mL,摇匀,过滤。取滤液5mL于锥形瓶中,加入蒸馏水100mL,铬酸钾指示液1mL,用硝酸银标准溶液滴定,至初显橘红色即为终点,计算NaCl含量。

1.3.5.6 灰分测定

样品于105℃干燥至恒质量,小火炭化后放于(550±25)℃马弗炉中灰化4~5h,冷却恒质量后加入约25mL蒸馏水加热至将沸腾时,无灰滤纸过滤,并用热水洗涤,然后把灰分连同滤纸一起炭化、灼烧、恒质量,计算可溶性灰分和水不溶性灰分含量。

1.3.6 抑制返霜方法

将发酵后未经烘干的豆豉在微波炉500W功率条件下经过不同时间处理,包装前烘干豆豉,控制水分在20%左右,然后在37℃、75%相对湿度的恒温恒湿培养箱放置1个月,期间观察豆豉外观变化情况。

2 结果与分析

2.1 平板分离培养

表1 不同豆豉分离培养结果

Table 1 Comparison on total plate counts of normal douchi and efflorescent douchi

类别	10 ⁻¹ 稀释度/CFU	菌落总数/(CFU/g)
新鲜豆豉	14, 13, 9	120
返霜豆豉	1, 0, 1	7

注:*.3个平行数值表示3个平行平板分别所得菌落数。

两种豆豉分别在PCA培养基上培养48h后观察所有平板菌落形状,发现没有霉菌菌落出现,平板中所有菌落都疑似为细菌菌落。由表1可知,新鲜豆豉的菌落总数(120CFU/g)要比返霜豆豉的菌落总数(7CFU/g)大,但都在发酵性豆制品卫生标准^[8]范围内。返霜豆豉含菌量要比新鲜豆豉少,且不含有曲种菌株的残留,原因可能是豆豉中含盐量较高,微生物在此环境下较难生存。由此可知,返霜豆豉表面的颗粒物质并非微生物污染所致。

2.2 显微镜观察结果

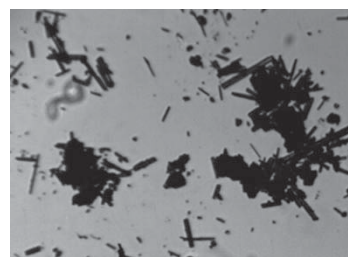


图1 豆豉返霜白色物质的显微观察图(×100)

Fig.1 Microscopic observation of white granular substances on the surface of douchi(×100)

由图1可知,此颗粒物质大部分为不规则块状结构,大小不一,并含有少量杆状或针状物质。

2.3 溶解情况

颗粒物质在蒸馏水和乙醇中都不溶,微溶于5% HCl溶液和5% NaOH溶液。样品加入蒸馏水后加热煮沸10min,只有部分溶解,仍有一部分物质不可溶解。天新^[9]用腐乳上的白点与饲料混合后喂养小白鼠,结果在小白鼠粪便里仍能看到该白色结晶物。豆豉同腐乳都是发酵豆制品,因此推测,豆豉表面颗粒物质可能未被人体吸收,其对豆豉营养与卫生的影响有待进一步研究。

2.4 定量分析结果

由豆豉表面颗粒物质中总氮含量,根据总氮含量乘以蛋白质换算系数6.25进行计算,由表2可知,总氨基酸含量约为40%。另由氨基态氮含量可知,总氨基酸中大部分是游离氨基酸。该物质中盐分和总糖的含量不大,但其中水不溶性灰分占6.59%,这可能是该表面颗粒物质里含有少量杂质的原因。

表2 样品中各物质含量($\bar{x} \pm s$, n=3)

Table 2 Proximate analysis of white granular substances on the surface of douchi($\bar{x} \pm s$, n=3)

指标	总氮	氨基态氮	NaCl	总糖	可溶性灰分	水不溶性灰分
含量/%	6.31±0.41	5.22±0.37	8.55±0.40	7.73±0.43	0.98±0.29	6.59±0.22

2.5 氨基酸含量分析

表3 氨基酸组成分析

Table 3 Amino acid composition of white granular substances on the surface of douchi

氨基酸	含量/(μg/g)	氨基酸	含量/(μg/g)
天冬氨酸(Asp)	12773.47	异亮氨酸(Ile)	11918.05
苏氨酸(Thr)	6604.40	亮氨酸(Leu)	77676.42
丝氨酸(Ser)	7642.21	酪氨酸(Tyr)	161020.48
谷氨酸(Glu)	46119.35	苯丙氨酸(Phe)	10884.01
甘氨酸(Gly)	7109.91	赖氨酸(Lys)	8977.00
丙氨酸(Ala)	8973.01	组氨酸(His)	3982.22
半胱氨酸(Cys)	1049.19	精氨酸(Arg)	9291.77
缬氨酸(Val)	10855.21	脯氨酸(Pro)	9018.55
甲硫氨酸(Met)	537.76	总氨基酸	393632.99

由表3可知, 豆豉表面颗粒物中酪氨酸含量最大, 占总氨基酸含量的41%; 其次是亮氨酸和谷氨酸, 分别占总氨基酸含量的19%和11%。

豆豉中氨基酸主要是在蛋白酶和肽酶的共同作用下产生, 其中与酪氨酸形成有关的酶可能有如下两类: 1) 内肽酶: 切断肽链中酪氨酸肽键的蛋白酶; 2) 外肽酶: 内肽酶作用生成了以酪氨酸为末端的肽链, 接着再受酪氨酸羧肽酶(酸性蛋白酶)的作用生成酪氨酸^[10]。在发酵过程中由于盐的加入抑制了其他酶系的协同作用, 而酪氨酸羧肽酶在10%左右的食盐存在下仍有较高的活性, 因此生成了大量的酪氨酸, 此外, 酪氨酸的溶解度较小, 25℃水中的溶解度为450mg/L, 所以随着时间的延长, 越来越多酪氨酸结晶析出, 形成了发酵豆制品的白点^[11-12]。同时, 酪氨酸是一种白色针状结晶, 这与显微镜观察到的结果相符合。

2.6 抑制返霜情况分析

以上分析研究表明, 返霜豆豉表面的颗粒物主要成分是酪氨酸。豆豉中积累的蛋白酶系将蛋白质分解, 析出的酪氨酸将杂质包裹起来。而积累的蛋白质水解酶系越多, 致使蛋白质消化程度越大, 析出酪氨酸越多。因此, 可以考虑用灭酶手段来防止豆豉的返霜现象出现。

微波技术是广泛应用于食品领域的一门新兴技术。常规加热依靠物料热传导得到升温, 而微波加热是将微波能量透射物体内部转为热量使物料升温, 其加热具有能对物料整体加热、温度分布均匀的优点^[13]。因此微波灭酶法能使豆豉在短时间内温度迅速升高, 使蛋白酶变性而失活, 灭酶较彻底, 能耗较小, 方便调控, 具有简单、经济、高效、节能的特点^[14]。

表4 微波处理后豆豉感官变化情况

Table 4 Sensory changes of microwave treated douchi during storage at 37 °C and 75% relative humidity

处理时间/s	感官	放置时间/周			
		1	2	3	4
0	豆豉香味浓厚	-	+	++	+++
30	豆豉香味浓厚	-	-	++	+++
60	油润光亮, 香味浓厚	-	-	+	++
90	油润光亮, 酱香浓郁	-	-	-	+
120	油润光亮, 酱香浓郁	-	-	-	-
150	皮干燥且部分爆裂, 略有焦味	-	-	-	-

注: - 未出现返霜现象; + 出现返霜现象; ++ 返霜现象明显; +++ 返霜现象很明显, 表面积累了大量颗粒物。

由表4可知, 经过500W微波灭酶30s和60s后, 豆豉香味浓厚, 但可能由于灭酶不彻底, 在37℃、75%相对湿度的恒温恒湿培养箱放置3周后豆豉表面开始出现颗粒物; 而未经微波灭酶的豆豉在培养箱中第2周就开始出现返霜现象。经过120s微波灭酶的豆豉在1个月观察期内没有出现返霜现象, 且灭酶后豆豉表面油润光亮, 酱香浓厚。但随着微波时间的延长, 豆豉皮干裂并发出焦味, 破坏了豆豉品质。

3 结论

豆豉表面颗粒物质的主要成分是酪氨酸。制曲过程中霉菌分泌的蛋白酶在豆豉发酵完成后仍有少量残留, 酪氨酸就是由豆豉上积累的蛋白酶系分解豆豉蛋白质而来, 因其溶解度小, 容易富集析出。有关发酵豆制品中出现颗粒物质的研究, 有学者^[15]发现酸性条件可抑制腐乳白点的形成, 同时肖霄等^[16]通过控制制曲时间、原料处理、发酵过程等生产工艺方面也可消除豆豉中结晶物的出现。本实验通过对发酵后的豆豉进行120s微波灭酶处理, 观察豆豉返霜现象有所改善, 同时并没有改变豆豉原有的风味, 说明微波灭酶能防止豆豉中酪氨酸析出。但酪氨酸的形成机制仍不是很清楚, 尚需今后进一步研究。

参考文献:

- [1] 黄欣. 浏阳豆豉自然发酵菌相分析及人工接种发酵条件的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2007.
- [2] 张璇. 豆豉纤维溶酶研究概况及进展[J]. 粮食与油脂, 2011(5): 39-43.
- [3] 宋永生. 豆豉加工前后营养与活性成分变化的研究[J]. 食品营养, 2003, 24(7): 79-81.
- [4] 李国基, 唐伟强, 王海洪. 蒜蓉豆豉酱白点结晶问题的研究[J]. 食品与发酵工业, 1997, 23(1): 32-34.
- [5] 中华人民共和国卫生部. GB/T 4789.2—2010 食品安全国家标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [6] WANG Lin, XU Renjie, HU Bing, et al. Analysis of free amino acids in Chinese teas and flower of tea plant by high performance liquid chromatography combined with solid-phase extraction[J]. Food Chemistry, 2010, 123(4): 1259-1266.
- [7] 陈钧辉, 陶力, 李俊, 等. 生物化学实验[M]. 3版. 北京: 科学出版社, 2003: 13-16.
- [8] 中华人民共和国卫生部. GB 2712—2003 发酵性豆制品卫生标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [9] 天新. 瓶装腐乳中的白点可以“食用”吗[J]. 上海调味品, 2000(2): 15.
- [10] 王瑞芝. 中国腐乳酿造[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998: 171.
- [11] 鲍松林, 丁霄霖. 腐乳白点的成分鉴定[J]. 食品与生物技术学报, 1993, 12(4): 270-275.
- [12] FLEGEL T W, BHUMIRATANA A, SRISUTIPRUTI A. Problematic occurrence of tyrosine crystals in the Thai soybean paste tao chiao[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1981, 41(3): 746-751.
- [13] 崔利娜, 景文娟, 黄洪勇, 等. 鲜蒜灭酶方法的比较[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(4): 11-13.
- [14] 刘勇, 马海乐, 黎海珍. 小麦胚微波灭酶试验研究[J]. 粮油食品科技, 2005, 13(3): 19-21.
- [15] CHIOU R Y Y, FERNG S, CHEN M J. White particulate formation as a result of enzymatic proteolysis of protein substrates in brine-fermented foods [J]. LWT-Food Science and Technology, 1997, 30(3): 241-245.
- [16] 肖霄, 张艳茹, 杨立苹. 抑制曲霉型豆豉产生白色结晶物的方法研究[J]. 中国调味品, 2009, 34(11): 78-80.