黑豆酱油的开发及其品质分析

王 鹏[1,2],王文平[1]*,续丹丹[1,2],张 欣[1],马翛然[3],张 建[1,2],高丽华[3],崔金梅[3],郑晨曦[3]

(1.北京食品科学研究院,北京 100068;2.北京市食品酿造研究所,北京 100050;3.中国肉类食品综合研究中心,北京 100068)

摘 要:以黑豆为原料,采用原池浇淋工艺制备黑豆酱油,并对其品质进行分析。结果表明,黑豆酱油呈黑褐色、酱香浓郁、味道鲜美,其可溶性无盐固形物(16.62 g/100 mL)、全氮(1.53 g/100 mL)、氨基酸态氮(0.85 g/100 mL)含量均高于黄豆酱油,原花青素含量为24.2 mg/100 g,大豆异黄酮含量为6.82 mg/100 g,并可满足相关国标特级酱油要求。黑豆酱油中共鉴定出75种风味化合物,以醇类(740.54 μg/kg)、醛类(230.90 μg/kg)、酯类(121.01 μg/kg)为主;共检测出17种游离氨基酸(含7种必需氨基酸),总含量为37 749.61 μg/mL(其中必需氨基酸含量为16 793.43 μg/mL)。该工艺制备黑豆酱油生产周期短、产品风味丰满,具有良好的营养保健功效及开发应用前景。

关键词:黑豆酱油;品质分析;风味物质;游离氨基酸;原池浇淋工艺

中图分类号:TS264.2 **文章编号**:0254-5071(2018)10-0025-06 doi:10.11882/j.issn.0254-5071.2018.10.006

Development and quality analysis of black soybean sauce

WANG Peng[1,2], WANG Wenping[1]*, XU Dandan[1,2], ZHANG Xin[1], MA Xiaoran[3], ZHANG Jian[1,2], GAO Lihua[3], CUI Jinmei[3], ZHENG Chenxi[3]

(1.Beijing Academy of Food Sciences, Beijing 100068, China; 2.Beijing Food Brewing Institute, Beijing 100050, China; 3.China Meat Research Center, Beijing 100068, China)

Abstract: Using black soybean as raw material, black soybean sauce was prepared with the spraying-extraction-in-pool technology and the quality was analyzed. The results demonstrated that black soybean sauce was dark brown with rich sauce flavor and delicious taste. The contents of soluble salt free solids (16.62 g/100 ml), total nitrogen (1.53 g/100 ml) and amino acid nitrogen (0.85 g/100 ml) were higher than those in soybean sauce. The contents of procyanidine and soybean isoflavone were 24.2 mg/100 g and 6.82 mg/100 g, respectively. These indexes met the relevant National Standards of special grade soy sauce. A total of 75 volatile compounds were identified in black soybean sauce, predominantly including alcohols (740.54 μg/kg), aldehydes (230.90 μg/kg), esters (121.01 μg/kg). 17 free amino acids, including 7 essential amino acids, were detected with the amount 37 749.61 μg/ml and the amount of essential amino acids was 16 793.43 μg/ml. Therefore, black soybean sauce prepared with this fermentation process had short period, in addition, the product showed full-bodied taste, rich nutrient and health benefits with good prospect in development and application.

Key words: black soybean sauce; quality analysis; flavor compounds; free amino acids; spraying-extraction-in-pool technology

酱油起源于中国,有超过2 000年的历史[1]。酱油是以大豆、豆粕、小麦、麸皮、水、盐等作为原料,通过米曲霉制曲发酵,后期添加盐水自然发酵或乳酸菌和酵母菌厌氧发酵制得[2-3]。在多种微生物的共同作用下,酱油产生了独特的风味和滋味物质,如酯类、醇类、醛酮类、游离氨基酸、多肽以及美拉德产物等。它以独特的风味和咸鲜味在亚洲国家盛行,是人们日常饮食中必备的调味品。

我国酱油以工艺划分可以分为高盐稀态发酵、低盐固态发酵和原池浇淋发酵,目前我国酱油企业的工艺多以前两种发酵工艺为主。高盐稀态发酵工艺具有发酵时间长,酱醅盐分含量高(18%～20%),水分比例大(盐水:原料=2.0～2.5)等特点,这种工艺生产的酱油通常由于耐盐微生物及较长的发酵周期,其原料发酵更彻底,产生的酱油色泽较浅,风味物质更丰富,通常具有较好的风味[4-5];低盐固态发酵工艺发酵时间短,酱醅含盐量低(6%～7%),水分含量低(盐水:原料=1:1),生产效率高,成本低,产出的酱油色泽较深且酯香味不足[6];原池浇淋技术是在低盐固态发酵工艺的基础上进行改进,含盐量通常为14%左右,酱醅含水量在57%左右,采用先固后稀工艺,通过回流方式对发酵底物浇淋,充分利用酶活以提高原料的利用率和氨基酸的生产率,其发酵周期较短,产出的酱油色泽光亮,通过在发酵前期或者中期加入酵母菌和乳酸菌,能明显改善产品风味质量[7-8]。

黑豆营养价值丰富,蛋白质含量高达40 g/100 g,富含

收稿日期:2018-08-01 **修回日期**:2018-10-10

基金项目:国家重点研发计划资助(2016YFD0400500);北京市博士后基金(2018-ZZ-120);北京市属国有企业2018年度优秀创新团队项目

作者简介:王 鹏(1990-),男,硕士,研究方向为传统酿造食品。

***通讯作者**:王文平(1966-),女,教授,博士,研究方向为食品生物技术。

钙、硒、锌、镁、磷等多种微量元素及维生素[9]，其表皮中富含的原花青素（3.61%～5.59%）被认为是目前研究发现的一种高效的自由基清除剂，具有保护心血管系统、降血糖、抗肿瘤等作用[10-11]。金卫东等[12]采用低盐固态发酵工艺生产黑豆酱油，并对其理化、氨基酸、脂肪酸等指标进行分析，得出其含量明显高于普通酱油。潘丽梅等[13]对黑豆酱油制曲过程的影响因素进行了优化，获得了最优的制曲工艺。张欢欢等[14]对黑豆、黄豆两种蛋白原料制备的高盐稀态酱油的理化、抗氧化、风味组成等指标进行了分析，发现黑豆酱油抗氧化活性高于黄豆酱油，黄豆酱油醇香突出，黑豆酱油中醇、酯及醛酮类主要挥发性成分较均衡，风味协调。

本研究以黑豆为原料，采用原池浇淋发酵工艺制备黑豆酱油，分析其产品感官、理化及微生物指标，并采用顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用仪（headspace solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry，HS-SPME-GC-MS）和全自动氨基酸分析仪分析了酱油中的香气物质组成和氨基酸组成，为黑豆的深度开发和黑豆酱油的产业化生产提供一定的实验基础和科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 原材料

某品牌黄豆酱油（特级酱油）、黑豆、面粉、食盐：北京某市场；米曲霉（*Aspergillus oryzae*）AS3.951（沪酿3.042）和生香酵母FA-1：北京市食品酿造研究所提供。

1.1.2 化学试剂

3-辛醇、原花青素、大豆苷、大豆黄苷、染料木苷、大豆素、大豆黄素、染料木素、果糖、葡萄糖、麦芽糖、乳糖（纯度均≥99%）：上海安谱实验科技股份有限公司；氯化钠、甲醛、正丁醇、硫酸铁铵乙酸、酚酞、氢氧化钠、盐酸（均为分析纯），甲醇、乙腈（均为色谱纯）：国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 培养基

乳糖胆盐发酵培养基、金黄色葡萄球菌显色培养基、沙门氏菌显色培养基、平板计数琼脂培养基：北京陆桥技术股份有限公司。

1.2 仪器与设备

5975-7890A气相色谱质谱仪（配安捷伦GC多模式自动进样器）、LC1260液相色谱仪：美国安捷伦公司；65 μm PDMS/DVB萃取头：美国Supelco有限公司；L-8900氨基酸自动分析仪：日本日立公司；DHG-9051A电热恒温干燥箱、DHP-9051B微生物培养箱：上海一恒科学仪器有限公司；福斯KJELTEC 2300凯氏定氮仪：美国FOSS公司；722型数显可见分光光度计：上海光学仪器五厂有限公司。

1.3 方法

1.3.1 黑豆酱油加工工艺流程

面粉→炒制　盐水　盐水和酵母醪
↓　↓　↓
黑豆→浸渍除杂→蒸煮→制曲→固态发酵→液态发酵→抽油
↑　↓
菌种→种曲　酱油←灌装←灭菌←调配

1.3.2 操作要点

（1）原料处理：精选豆粒饱满、硕大的黑豆，去除杂质。将黑豆加入清水中，黑豆与清水质量比为1:3，浸泡6 h后，捞出淋干。将控好水的黑豆放入蒸锅中，压力0.1 MPa条件下蒸料40 min；面粉炒制15 min。将蒸煮好的黑豆放入冷却槽中冷却降温，温度降至60 ℃时，与炒制面粉混合均匀，继续自然冷却。

（2）制曲：当物料冷却至33 ℃时，按接种量0.03%接种米曲霉AS3.951并混合均匀，入制曲盘，温度控制在32～34 ℃，14～16 h翻曲一次，培养42 h出曲。所制得的曲料呈黄绿色，表面有孢子，中性蛋白酶活力为800～1 000 U/g。

（3）酵母醪制备：将小麦用对辊式粉碎机破碎至3～4瓣，加温水润料1 h，0.1 MPa条件下蒸煮30 min，出锅冷却至31 ℃。接入质量分数为0.03%的AS3.951米曲霉，制小麦曲培养26～28 h。出曲拌15 °Bé的盐水，盐水与大曲的质量比为2:1。48 ℃培养5 d，待麦醪温度降至38～40 ℃时添加生香酵母FA-1培养液（10^6个/mL）培养3 d，即得酵母醪。

（4）发酵：每个46 ℃发酵罐中加入10 kg曲料，50 ℃的14 °Bé盐水，盐水和曲料的质量比为0.72:1，进行发酵，每天浇淋一次，发酵8 d，得前酵产物。向发酵罐中前酵产物补加45 ℃的18 °Bé盐水15 kg，每天浇淋一次。发酵10 d后，加入 500 mL酵母醪，发酵温度改为42 ℃，发酵40 d左右，即得黑豆酱油。

1.3.3 分析检测

黑豆酱油感官指标及理化指标（氨基酸态氮、全氮、可溶性无盐固形物）按照国标GB 18186—2000《酿造酱油》中的方法测定；微生物指标根据国标GB 4789.3—2016《食品微生物学检验大肠菌群计数》中的方法测定。

按照国标GB/T 5009.124—2003《食品中氨基酸的测定》测定游离氨基酸含量；大豆异黄酮含量测定参照GB/T 26625—2011《大豆异黄酮含量测定》中的高效液相色谱法；原花青素含量测定参照《保健食品检验与评价技术规范》中的方法；还原糖含量测定参照国标GB 5009.8—2016《食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的测定》。

1.3.4 黑豆酱油挥发性风味物质分析

样品前处理：称取2.0 g黑豆酱油样品于20 mL萃取瓶中，加入0.5 g氯化钠调节离子强度，吸取内标物100 μg/mL 3-辛醇溶液10 μL。在50 ℃条件下振荡40 min，然后萃取40 min。萃取后于气相色谱仪进样口解吸5 min，进行GC-MS分析。

气相色谱条件：HP-5MS毛细管柱（30 m×0.25 mm×0.25 μm），

载气为氦气(He),流速1 mL/min,采用不分流模式进样;进样口温度250 ℃。程序升温程序:40 ℃保持3 min,以5 ℃/min的速度升至100 ℃,然后以6 ℃/min的速度升至220 ℃并保持10 min。

质谱条件:电离方式为电子电离(electron ionization,EI)源,电子能量70 eV,离子源温度230 ℃,四级杆温度150 ℃,扫描模式为全扫描,扫描范围35～400 amu。

定性定量方法:化合物组成的分析以美国国家标准技术研究所(National Institute of Standards and Technology,NIST)08谱库检索结果进行确定,保留匹配度＞750的组分;采用内标法(质量浓度100 μg/mL 3-辛醇溶液10 μL)计算各组分的含量。

2 结果与分析

2.1 黑豆酱油的感官指标

表1 两种酱油感官指标结果

Table 1 Results of sensory indexes of two kinds of soy sauce

项目	黑豆酱油	某品牌黄豆酱油	国标(特级酱油)
色泽	呈黑褐色,鲜艳有光泽	呈红褐色,有光泽	红褐色或浅红褐色,色泽鲜艳,有光泽
滋味	味道鲜美适口,咸味适中	味道鲜美适口	味鲜美、醇厚、鲜、咸、甜适口
气味	醇厚的酱香气,无不良气味	酱香较浓,无不良气味	浓郁的酱香及酯香气
状态	澄清、无悬浮物、无杂质	澄清、无悬浮物、无杂质	澄清

由表1可知,与某品牌黄豆酱油比较,黑豆酱油色泽更厚重,呈黑褐色,酱香浓郁,味道鲜美,状态澄清、无悬浮物和杂质。结果表明,黑豆酱油的感官指标达到相关国标特级酱油标准。

2.2 黑豆酱油的理化指标

表2 两种酱油理化指标测定结果

Table 2 Results of physiochemical indexes of two kinds of soy sauce

项目	黑豆酱油	某品牌黄豆酱油	国标(特级酱油)
可溶性无盐固形物/(g•100 mL^{-1})	16.62	16.05	≥15.00
全氮(以氮计)/(g•100 mL^{-1})	1.53	1.42	≥1.50
氨基酸态氮(以氮计)/(g•100 mL^{-1})	0.85	0.75	≥0.80
染料木苷/(mg•100 g^{-1})	1.16	1.42	
大豆素/(mg•100 g^{-1})	1.98	1.68	
大豆黄素/(mg•100 g^{-1})	2.08	2.04	
染料木素/(mg•100 g^{-1})	1.60	1.48	
大豆异黄酮总量/(mg•100 g^{-1})	6.82	6.62	
果糖/%	0.5	未检出	
葡萄糖/%	未检出	1	
原花青素/(mg•100 g^{-1})	24.2	未检出	

由表2可知,黑豆酱油中可溶性无盐固形物、全氮、氨基酸态氮含量分别为16.62 g/100 mL、1.53 g/100 mL、0.85 g/100 mL,均高于某品牌黄豆酱油,并且达到特级酱油国标要求。

大豆异黄酮是豆制品中一种天然植物雌激素,具有预防心血管疾病、骨质疏松及更年期综合征等多种生物活性作用[15]。两种酱油中大豆异黄酮含量分别为6.82 mg/100 g和6.62 mg/100 g,两者相差不大,其中染料木苷、大豆素、大豆黄素、染料木素含量在1.16～2.08 mg/100 g范围。黑豆酱油中果糖(0.5%),黄豆酱油中葡萄糖(1.0%)。原花青素具有很强的抗氧化活性,具有保护心血管系统、抗肿瘤、降血糖、延缓皮肤衰老等作用[16]。黑豆酱油中原花青素含量为24.2 mg/100 g,这赋予了黑豆酱油一定的保健功效。

2.3 黑豆酱油的微生物指标

表3 两种酱油微生物指标结果

Table 3 Results of microbial indexes of two kinds of soy sauce

项目	黑豆酱油	某品牌黄豆酱油	国标
菌落总数/(CFU•mL^{-1})	＜10	＜10	≤30 000
大肠菌群/(MPN•100 mL^{-1})	＜30	＜30	≤30
沙门氏菌/25 mL	未检出	未检出	n=5 c=0 m=0
金黄色葡萄球菌/(CFU•mL^{-1})	＜10	＜10	n=5 c=2 m=100 M=10 000

注:n为同一批次产品应采集的样品件数;c为最大可允许超出m值的样品数;m为微生物指标可接受水平的限量值;M为微生物指标的最高安全限量值。

由表3可知,两种酱油中菌落总数均＜10 CFU/mL,大肠菌群＜30 MPN/100 mL,致病菌沙门氏菌均未检出,金黄色葡萄球菌检验结果为＜10 CFU/mL,结果表明,黑豆酱油微生物指标满足相关国标要求。

2.4 酱油的风味成分分析

采用气相色谱质谱联用仪(GC-MS)对两种酱油中的香气成分进行分析,结果见表4。由表4可知,两种酱油共有92种风味化合物检出,黑豆酱油和黄豆酱油中鉴定出的风味化合物分别为75和77种,其中黑豆酱油中的风味组成包括吡嗪类(8种)、醇类(8种)、酚类(5种)、含硫化合物(7种)、醛类(10种)、酸类(7种)、酮类(6种)、酯类(17种)、其他类(7种)。两种酱油中醇类化合物含量最高,醛类、酸类及酯类次之,这些化合物为酱油独特的风味贡献了极其重要的作用。

醇类物质在酱油风味化合物中含量最高,两种酱油中均鉴定出8种醇类化合物,黑豆酱油中总含量为740.54 μg/kg,以乙醇和苯乙醇为主,这与张艳芳等[17]的研究结果类似。

醇类通常具有令人愉快的甜香味，主要是在发酵过程中由微生物代谢，不饱和脂肪酸降解以及羰基化合物的还原反应生成的[18]。黑豆酱油中苯乙醇含量为334.76 μg/kg，远高于黄豆酱油中其含量（64.89 μg/kg）。苯乙醇具有玫瑰花香味，是酱油中的关键风味化合物[19]，是酱醪在发酵过程中由苯丙氨酸降解产生的[20-21]。

表4 两种酱油中挥发性化合物GC–MS分析结果

Table 4 Results of volatile compounds in two kinds of soy sauce analysis by GC–MS

保留时间/min	化合物	含量/(μg·kg^{-1})	
		黑豆酱油	某品牌黄豆酱油
	吡嗪类(8种)		
8.855	2,5-二甲基吡嗪	8.92	1.27
11.881	三甲基吡嗪	23.91	-
14.252	3-乙基-2,5-二甲基吡嗪	5.71	2.97
14.492	四甲基吡嗪	39.26	-
16.701	6-乙基-三甲基吡嗪	6.07	-
17.844	2,5-二甲基-3-异丁基吡嗪	1.43	-
19.145	2-异戊基-6-甲基吡嗪	6.42	15.27
20.710	2,5-二甲基-3-异戊基吡嗪	6.42	4.24
	总和	98.14	23.74
	醇类(8种)		
1.557	乙醇	239.83	351.99
1.863	2-甲基丙醇	56.03	70.40
3.875	3-甲基丁醇	27.48	8.91
3.949	2-甲基丁醇	13.92	7.21
5.125	2,3-丁二醇	51.75	2.97
12.694	2-乙基己醇	2.86	41.14
12.846	苯甲醇	13.92	2.97
15.437	苯乙醇	334.76	64.89
	总和	740.54	550.46
	酚类(8种)		
11.405	苯酚	21.06	9.33
14.585	愈创木酚	66.38	17.39
16.929	4-乙基苯酚	3.57	5.94
19.835	4-乙基愈创木酚	10.71	30.11
20.696	2-甲氧基-4-乙烯基苯酚	-	5.09
21.577	2,4-二甲氧基苯酚	-	2.54
25.071	2,4-二叔丁基苯酚	35.33	49.19
27.309	4-甲基-2-苯基苯酚	-	1.27
	总和	137.04	120.86
	含硫化合物(8种)		
4.058	二甲基二硫	7.49	3.39
7.173	糠醇	41.76	26.29
8.634	3-甲硫代丙醛	6.42	8.91
10.637	二甲基三硫	6.78	-

续表

保留时间/min	化合物	含量/(μg·kg^{-1})	
		黑豆酱油	某品牌黄豆酱油
11.122	3-甲硫代丙醇	36.76	13.57
14.802	硫代糠酸甲酯	6.42	8.91
14.900	3-甲硫基丙酸乙酯	-	3.82
18.426	苯并噻唑	3.21	-
	总和	108.84	64.89
	醛类(10种)		
2.581	3-甲基丁醛	25.70	41.56
2.694	2-甲基丁醛	44.61	69.97
10.376	苯甲醛	14.99	10.18
13.113	苯乙醛	39.61	50.04
15.010	壬醛	3.21	2.12
15.090	可可醛	2.86	4.24
19.685	α-亚乙基-苯乙醛	9.28	9.33
22.108	α-(2-甲基亚丙基)苯乙醛	37.47	22.48
24.647	可卡醛	34.26	18.66
29.950	3,5-二叔丁基-4-羟基苯甲醛	12.49	-
	总和	224.48	228.58
	酸类(7种)		
2.269	乙酸	12.85	77.61
4.796	2-甲基丙酸	6.07	2.54
5.633	丁酸	7.14	-
7.646	3-甲基丁酸	50.68	20.36
8.117	2-甲基丁酸	66.74	16.54
10.806	4-甲基戊酸	2.86	6.79
33.139	十六烷酸	2.14	0.85
	总和	148.46	124.68
	酮类(7种)		
5.636	2-甲基二氢-3(2H)-呋喃酮	-	0.85
10.079	2,6-二甲基-3-庚酮	2.50	1.70
11.287	3-辛酮	4.28	2.97
12.018	1-(2-呋喃基)丙酮	5.35	4.66
15.764	苯基丙酮	4.64	-
16.194	2,3-二氢-3,5二羟基-6-甲基-4(H)-吡喃-4-酮	4.28	6.79
17.574	2-甲基-3-甲氧基-4H-吡喃-4-酮	9.99	-
	总和	31.05	16.96
	酯类(28种)		
2.206	乙酸乙酯	24.27	50.04
4.439	2-甲基丙酸乙酯	-	1.70
4.845	乙酸异丁酯	2.50	-
5.493	丁酸乙酯	4.64	-
5.859	2-羟基丙酸乙酯	3.57	4.66
8.530	2,3-戊二烯酸乙酯	-	12.72
10.236	γ-戊内酯	2.86	-
10.624	4-甲基戊酸乙酯	-	2.97

续表

保留时间/min	化合物	含量/(μg·kg⁻¹) 黑豆酱油	某品牌黄豆酱油
14.716	苯甲酸甲酯	-	5.09
16.976	苯甲酸乙酯	3.21	41.56
17.274	丁二酸二乙酯	11.06	7.63
17.690	辛酸乙酯	2.50	11.45
18.964	苯乙酸乙酯	18.92	41.14
20.238	壬酸乙酯	-	2.97
21.515	苯丙酸乙酯	-	5.09
23.812	丙酮香叶酯	6.07	7.21
23.889	邻苯二甲酸二甲酯	7.14	4.24
26.611	香草酸乙酯	-	6.36
26.664	十二烷酸乙酯	-	2.97
30.342	十四酸乙酯	-	2.97
31.686	邻苯二甲酸丁基异己酯	14.99	18.66
32.575	十六烷酸甲酯	5.00	20.36
33.249	邻苯二甲酸二丁酯	-	74.64
33.677	十六烷酸乙酯	8.21	24.60
35.776	十八烷酸甲酯	0.36	0.85
36.401	亚油酸乙酯	2.50	9.75
36.508	油酸乙酯	3.21	4.66
36.994	十八酸乙酯	-	1.27
	总和	121.01	365.56
	其他类(7种)		
9.105	苯基甲氧基亏	10.71	10.18
13.877	3-乙酰基吡咯	76.02	91.18
14.851	十一烷	7.14	7.21
16.056	苄腈	12.13	5.51
18.354	3-苯基呋喃	23.91	-
26.628	3-异丁烯基-1H-茚	12.13	-
28.638	十七烷烃	5.00	1.27
	总和	147.03	115.35

注:“-”表示未检出。

酸类化合物在酱油中的主要贡献是对酱油香气具有一定的缓和作用[22],并在发酵过程中与醇类发生酯化反应。酸类可能是由微生物产生的脂肪酶对大豆油脂降解所产生,低分子质量脂肪酸也可能通过酵母或乳酸菌代谢生成[23]。黑豆酱油中共检出7种酸,总含量达到148.46 μg/kg,其中2-甲基丁酸、3-甲基丁酸及乙酸的含量分别为66.74 μg/kg、50.68 μg/kg和12.85 μg/kg。

黑豆酱油和黄豆酱油中含硫化合物含量分别为108.84 μg/kg和64.89 μg/kg,对酱油的风味起着重要的作用,它们多存在于酿造产品中,是由含硫蛋白质酶解产生[24]。黑豆酱油中3-甲硫代丙醇含量很高,为36.76 μg/kg,占含硫化合物总含量的30%左右,其在较低浓度时呈现较为强烈的烤肉香气[25]。

两种酱油中的酯类化合物种类最多,黑豆酱油中共鉴定出17种酯类化合物,总含量为121.01 μg/kg。酱油中的酯类化合物主要以短链乙酯为主[25],通常具有较强的挥发性,具有更小的香气阈值且多呈果香味[26],如乙酸乙酯、乙酸异丁酯、丁酸乙酯、丁二酸二乙酯等,它们主要是通过酵母菌对大豆油脂作用产生醇类和酸类酯化反应得到[27],其中乙酸乙酯含量最高,为24.27 μg/kg;苯乙酸乙酯其次,为18.92 μg/kg,具有浓烈而甜的蜂蜜香气[28]。长链脂肪酸酯中含量较高的是十六烷酸乙酯,含量为8.21 μg/kg。

黑豆酱油中醛类化合物含量仅次于醇类,为224.48 μg/kg,共鉴定出11种,以2-甲基丁醛(44.61 μg/kg)和苯乙醛(39.61 μg/kg)为主。低分子质量醛主要是由氨基酸降解和微生物转化形成的,如2-甲基丁醛、苯乙醛、可卡醛、3-甲基丁醛以及苯甲醛等[29]。吡嗪类化合物也是酱油风味的重要组成部分,主要是通过蛋白质以及氨基酸的热分解或美拉德反应形成。2,5-二甲基吡嗪、三甲基吡嗪以及四甲基吡嗪都能为酱油提供烤可可和坚果的香气[25]。黑豆酱油中检出8种吡嗪类化合物,总含量为98.14 μg/kg,其中4-甲基吡嗪含量最高,达到39.26 μg/kg。

黑豆酱油中酚类物质含量为137.04 μg/kg,且有5种酚类被检出,其中4-乙基愈创木酚在两种酱油中均被检出,酚类主要是在发酵过程中通过曲霉的降解作用产生。

2.5 酱油的游离氨基酸组成

对两种酱油中游离氨基酸组成进行分析,结果见表5。

表5 两种酱油样品中游离氨基酸检测结果

Table 5 Determination results of free amino acids in two kinds of soy sauce

名称	英文缩写	滋味	游离氨基酸含量/(μg·mL⁻¹) 黑豆酱油	某品牌黄豆酱油
谷氨酸	GLU	鲜	5 509.68	5 561.31
天冬氨酸	ASP	鲜	3 961.35	3 997.98
丙氨酸	ALA	甜	2 533.14	2 680.48
甘氨酸	GLY	甜	1 086.12	1 260.64
赖氨酸*	LYS	甜	2 882.60	3 024.60
脯氨酸	PRO	甜	898.34	1 269.33
丝氨酸	SER	甜	1 860.62	2 725.58
苏氨酸*	THR	甜	1 578.28	1 819.49
苯丙氨酸*	PHE	苦	2 814.67	3 104.25
蛋氨酸*	MET	苦	592.10	767.72
精氨酸	ARG	苦	2 184.25	3 756.49
酪氨酸	TYR	苦	1 944.28	2 073.21
亮氨酸*	LEU	苦	3 870.35	4 166.60
缬氨酸*	VAL	苦	2 750.38	3 396.81
异亮氨酸*	ILE	苦	2 305.05	2 784.02
组氨酸	HIS	苦	922.17	1 064.55
半胱氨酸	CYS	酸	56.23	64.89
总含量			37 749.61	43 517.95

注:“*”表示必需氨基酸。

由表5可知，黑豆酱油和黄豆酱油中均分别检出17种游离氨基酸（含7种必需氨基酸），对酱油滋味影响较大[30]。黑豆酱油游离氨基酸总量为37 749.61 μg/mL（其中必需氨基酸含量为16 793.43 μg/mL），而黄豆酱油中游离氨基酸总量为43 517.95 μg/mL（必需氨基酸含量为19 063.49 μg/mL）。黑豆酱油中鲜味氨基酸含量为9 471.03 μg/mL，苦味氨基酸含量为17 383.25 μg/mL，甜味氨基酸含量（10 839.1 μg/mL），酸味氨基酸含量（56.23 μg/mL）。黑豆酱油因其游离氨基酸含量较高，且含有人体所需的必需氨基酸，因此具有较高的营养保健价值。

3 结论

利用蛋白质含量较高的黑豆为原料，按照原池浇淋发酵工艺制备黑豆酱油，对其感官、理化、微生物指标进行了分析，结果表明，黑豆酱油呈黑褐色、酱香浓郁、味道鲜美，其可溶性无盐固形物、全氮、氨基酸态氮含量分别为16.62 g/100 mL、1.53 g/100 mL、0.85 g/100 mL，达到相关国标特级酱油的要求。黑豆酱油大豆异黄酮含量为6.82 mg/100 g，原花青素含量为24.2 mg/100 g。黑豆酱油中共鉴定出75种风味化合物，以醇类（740.54 μg/kg）、醛类（230.90 μg/kg）、酯类（121.01 μg/kg）为主，共检测出游离氨基酸17种（含7种必需氨基酸），总量为37 749.61 μg/mL（其中必需氨基酸含量为16 793.43 μg/mL）。该工艺制备黑豆酱油生产周期短、风味丰满，具有营养保健功效及良好开发应用前景。

参考文献：

[1] 赵谋明，蔡　宇，冯云子，等. HS-SPME-GC-MS/O 联用分析酱油中的香气活性化合物[J]. 现代食品科技，2014，30（11）：204-212.

[2] 王夫杰，鲁　绯. 我国酱油研究现状与发展趋势[J]. 中国酿造，2010，29（12）：3-7.

[3] 赵国忠，姚云平，曹小红，等. 2 种米曲霉发酵酱油风味物质比较[J]. 食品科学，2014，35（24）：249-253.

[4] 朱　莉，许长华. 酱油关键风味物质及其功能与发酵工艺研究进展[J]. 食品与发酵工业，2018，44（6）：287-292.

[5] 童　佳. 米曲霉发酵高盐稀态酱油过程中挥发性风味物质及蛋白酶表达规律研究[D]. 无锡：江南大学，2017.

[6] 张宗舟，张　扬. 酱油低盐固态发酵工艺的微生物研究[J]. 中国酿造，2006，25（10）：23-26.

[7] 谢　韩. 酱油发酵工艺研究[J]. 江苏调味副食品，2015（3）：23-26.

[8] 黄持都，鲁　绯. 低盐固态与原池浇淋酱油工艺的比较[J]. 中国酿造，2010，29（9）：5-8.

[9] 丛建民. 黑豆的营养成分分析研究[J]. 食品工业科技，2008，29（4）：262-264.

[10] 朱学伸，赵　文，林淑鑫，等. 黑豆种皮中原花青素的提取和纯化研究[J]. 现代食品科技，2018，34（1）：154-160.

[11] 林纪伟. 黑豆皮中多酚类成分分析[D]. 天津：天津科技大学，2011.

[12] 金卫东，吕景良，董英山，等. 黑豆酱油生产工艺及营养成分的研究[J]. 中国酿造，1998，17（6）：21-23.

[13] 潘丽梅，孙广仁，由士江，等. 黑豆酱油的生产工艺及影响制曲的因素[J]. 北华大学学报：自然科学版，2001，2（6）：534-536.

[14] 张欢欢，耿予欢，李国基. 黄豆酱油与黑豆酱油抗氧化活性及风味物质的比较[J]. 现代食品科技，2018，34（6）：97-106.

[15] 王　帅，朱新贵，李学伟. 酱油渣中色素及大豆异黄酮的提取研究[J]. 中国酿造，2017，36（5）：46-52.

[16] 凌智群，张晓辉，谢笔钧，等. 原花青素的药理学研究进展[J]. 中国药理学通报，2002，18（1）：9-12.

[17] 张艳芳，陶文沂. 两种发酵酱油风味物质的分析研究[J]. 精细化工，2008，25（5）：486-490.

[18] LEE S M, SEO B C, KIM Y S. Volatile compounds in fermented and acid-hydrolyzed soy sauces[J]. **J Food Sci**, 2006, 71(3): C146-C156.

[19] STEINHAUS P, SCHIEBERLE P. Characterization of the key aroma compounds in soy sauce using approaches of molecular sensory science [J]. **J Agric Food Chem**, 2007, 55(15): 6262-6269.

[20] FENG Y, CUI C, ZHAO H, et al. Effect of koji, fermentation on generation of volatile compounds in soy sauce production[J]. **Int J Food Sci Technol**, 2013, 48(3): 609-619.

[21] KANEKO S, KUMAZAWA K, NISHIMURA O. Comparison of key aroma compounds in five different types of Japanese soy sauces by aroma extract dilution analysis (AEDA)[J]. **J Agr Food Chem**, 2012, 60(15): 3831-3836.

[22] 罗龙娟，高献礼，冯云子，等. 中式酱油和日式酱油香气物质的对比研究[J]. 中国酿造，2011，30（5）：150-155.

[23] 高献礼，赵谋明，崔　春，等. 高盐稀态酱油挥发性风味物质的分离与鉴定[J]. 华南理工大学学报：自然科学版，2009，37（10）：117-123.

[24] VARLET V, FERNANDEZ X. Sulfur-containing volatile compounds in seafood: occurrence, odorant properties and mechanisms of formation [J]. **Food Sci Technol Int**, 2010, 16(6): 463-503.

[25] GAO L, LIU T, AN X, et al. Analysis of volatile flavor compounds influencing Chinese-type soy sauces using GC-MS combined with HS-SPME and discrimination with electronic nose[J]. **J Food Sci Technol**, 2017, 54(1): 130-143.

[26] GAO X L, CUI C, ZHAO H F, et al. Changes in volatile aroma compounds of traditional Chinese-type soy sauce during moromi fermentation and heat treatment[J]. **Food Sci Biotechnol**, 2010, 19(4): 889-898.

[27] ZHANG Y F, TAO W Y. Flavor and taste compounds analysis in Chinese solid fermented soy sauce[J]. **Afr J Biotechnol**, 2009, 8(4): 673-681.

[28] 程　晓，袁江兰，陈怡均，等. 米渣生酱油和大豆生酱油的风味表征及比较[J]. 食品科学，2017，38（8）：153-158.

[29] 童　佳，赵国忠，赵建新，等. 米曲霉发酵高盐稀态酱油过程中典型挥发性风味物质的形成[J]. 中国酿造，2017，36（5）：22-29.

[30] SCHOENBERGER C, KROTTENTHALER M, BACK W. Sensory and analytical characterization of nonvolatile taste-active compounds in bottom-fermented beers[J]. **Technical Quart**, 2002, 39(4): 210-217.