

解淀粉芽孢杆菌SWJS22和米曲霉混合制曲在酱油发酵中的应用

赵 龙, 周池虹伶, 赵谋明, 崔 春*, 王 炜
(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东 广州 510640)

摘 要:以解淀粉芽孢杆菌SWJS22和米曲霉为发酵菌株, 考察米曲霉单独制曲发酵、米曲酶和解淀粉芽孢杆菌曲料混合发酵以及双菌种混合制曲发酵对酱油理化指标及风味的影响。结果表明: 曲料混合发酵的酱油氨基酸转化率有较大提高, 色率和色深物质均低于米曲霉单独制曲发酵的酱油和双菌种混合制曲发酵的酱油, 曲料混合发酵酱油和双菌种混合制曲发酵的酱油谷氨酸含量有明显提高。采用气相色谱-质谱对比分析3种不同曲料发酵酱油的风味物质, 结果表明: 3种酱油的风味物质种类差别不明显, 重要风味成分在3种酱油中均有检出, 曲料混合发酵的酱油酸类物质的含量最低。

关键词:解淀粉芽孢杆菌SWJS22; 双菌种混合制曲发酵; 曲料混合发酵

Application of Mixed Cultures of *Bacillus amyloliquefaciens* SWJS22 and *Aspergillus oryzae* in Soy Sauce Fermentation

ZHAO Long, ZHOU Chihongling, ZHAO Mouming, CUI Chun*, WANG Wei
(School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: *Bacillus amyloliquefaciens* SWJS22 and *Aspergillus oryzae* were used as starters for soy sauce fermentation in this paper. To study the effects of koji making on soy sauce fermentation, soy sauces produced with koji containing *Aspergillus oryzae* alone (control) and in combination with *Bacillus amyloliquefaciens* SWJS22 and with mixed koji cultures of the strains were tested for physicochemical parameters and flavor compounds. Compared with the control group and soy sauce fermented by koji containing mixed strains, soy sauce fermented by mixed koji cultures showed higher amino acid conversion, lower color index and lower pigment content. Soy sauce fermented by mixed cultures had a significantly higher content of glutamic acid compared with the control group. Comparative analysis of flavor compounds by gas chromatograph-mass spectrometry (GC-MS) indicated that only a slight difference was seen in the flavor substances of three soy sauces and the important ones were detected in all of them. The content of acids was lowest in soy sauce fermented by mixed koji cultures.

Key words: *Bacillus amyloliquefaciens* SWJS22; koji containing mixed strains; mixed koji cultures

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201722019

中图分类号: TS264.21

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2017) 22-0125-06

引文格式:

赵龙, 周池虹伶, 赵谋明, 等. 解淀粉芽孢杆菌SWJS22和米曲霉混合制曲在酱油发酵中的应用[J]. 食品科学, 2017, 38(22): 125-130. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201722019. <http://www.spkx.net.cn>

ZHAO Long, ZHOU Chihongling, ZHAO Mouming, et al. Application of mixed cultures of *Bacillus amyloliquefaciens* SWJS22 and *Aspergillus oryzae* in soy sauce fermentation[J]. Food Science, 2017, 38(22): 125-130. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201722019. <http://www.spkx.net.cn>

酱油是广受人们欢迎的传统调味品, 其制作原料主要包括豆粕、大豆、小麦、面粉、麸皮等。在米曲霉等微生物分泌的酶系作用下, 大分子的淀粉和蛋白质被降

解成多种糖类、小分子肽和氨基酸等小分子物质, 并经乳酸菌、酵母菌在后期进一步发酵形成的风味独特、色泽诱人、滋味鲜美的调味液^[1-2]。目前国内90%以上的酱

收稿日期: 2016-12-21

基金项目: 中国科学院生化重点实验室开放基金项目 (2015KF-04); 广州市科技计划项目 (201604020067);

中央高校基本科研业务费专项 (2017ZD093)

作者简介: 赵龙 (1992—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。E-mail: 410891730@qq.com

*通信作者: 崔春 (1978—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: cuichun@scut.edu.cn

油制造商使用米曲霉沪酿3.042菌种进行制曲,但单一菌种制曲容易导致分泌酶系不全,原料利用率较低,酱油原液鲜味不足^[3]。

为提高酱油品质和生产效率,有不少研究者对混菌制曲方面进行了研究。徐欢欢等^[4]通过往米曲霉中加入适量的糖化增香曲,混合制曲来酿造酱油,发现发酵58 d时,混合制曲酿造酱油的还原糖、总氮、氨氮、氨基酸转化率较纯米曲霉制曲酱油分别增加了5%、12%、14%和9%,且红黄指数都有明显提高。Feng Jie等^[5]在酱油保温发酵30 d和60 d时两次接入埃切假丝酵母,发酵结束时其氨氮和无盐固形物质量分数较对照组分别高出了23.1%和17.6%,且游离氨基酸和香气物质含量大幅度提高。韩国全明希等^[6]将一株从传统酱曲中分离出来的高产蛋白酶的解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) CJ3-27和米曲霉(*Aspergillus oryzae*) CJ KG混合制造韩式酱曲,将解淀粉芽孢杆菌运用到酱料产业,使蛋白质分解酶价得到改善,氨基酸态氮含量增加,酱香和滋味得到提高,大酱的整体口味得到改善。Lee等^[7]的研究结果发现,酱醪发酵过程中乳酸菌和酵母菌通过不同的代谢途径,生成不同的风味物质,进而可以接种乳酸菌和酵母菌来改善酱油风味。

华南理工大学食品科学与工程学院生物技术团队^[8-9]在深海海泥中筛选出一株高产蛋白酶和谷氨酰胺酶的解淀粉芽孢杆菌SWJS22。本实验利用解淀粉芽孢杆菌SWJS22丰富的酶系,将其运用到高盐稀态酱油的制曲过程中,采用复合菌制曲发酵和曲料混合发酵两种方式制备酱油,从滋味和香气两方面全面评价解淀粉芽孢杆菌在酱油发酵中的应用,旨在改善酱油品质,并拓宽解淀粉芽孢杆菌的应用范围。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

从中国南海海泥中筛选出的解淀粉芽孢杆菌SWJS22(*B. amyloliquefaciens* SWJS22, CGMCC No. 8425),由华南理工大学轻工与食品学院食品生物技术实验室提供^[8]。菌种保存于斜面培养基(4℃),每3个月转接一次。

斜面培养基:牛肉浸膏0.4%,蛋白胨0.6%,浸出酵母粉0.2%,氯化钠0.5%,琼脂2.0%,pH 7.0;ZoBell2261E:酪蛋白1.0%,牛肉浸膏0.3%,氯化钠0.5%,磷酸二氢钾0.2%,琼脂1.5%,pH 7.4±0.1;种子培养基:胰蛋白胨1.0%,酵母抽提物0.5%,蔗糖1.0%,Fe₂(SO₄)₃·XH₂O 0.01%,MnSO₄·H₂O 0.000 1%,CuSO₄·5H₂O 0.000 1%,pH 7.0。

豆粕、小麦粉、去离子水、食盐均为市购。氯化钠

天津市科密欧化学试剂有限公司;酪蛋白(干酪素)上海润捷化学试剂有限公司;磷酸氢二钠、硼酸天津市福晨化学试剂厂;甲醛广东光华化学有限公司;硫酸江苏省强盛功能化学股份有限公司;盐酸广东省东红化工厂;氢氧化钠天津市明亮化学试剂厂。

1.2 仪器与设备

VARIOSKAN FLASH型全波长扫描多功能读数仪美国赛默飞世尔科技公司;3-18K型台式离心机德国Sigma公司;KDC-2C型微量凯氏定氮仪上海纤检仪器有限公司;KDN-40消化炉上海新嘉电子有限公司;Tim840自动单位滴定仪雷迪美特公司;UV-2100紫外-可见分光光度计尤尼克(上海)仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 主要工艺流程

米曲霉单独制曲发酵得到的酱油,简称为空白样;解淀粉芽孢杆菌种子液-凉豆粕比6:100(mL/g),米曲霉和解淀粉芽孢杆菌复合制曲发酵得到的酱油,简称为双菌种发酵样;米曲霉制曲曲料与解淀粉芽孢杆菌制曲曲料质量比6:4混合曲料发酵得到的酱油,简称为混曲样。酱油制备工艺如图1所示。

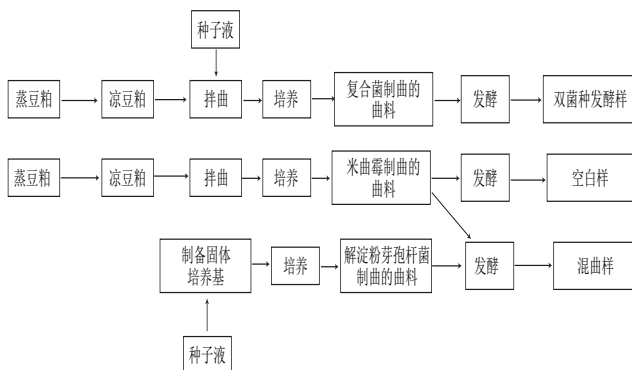


图1 酱油制备工艺流程图

Fig. 1 Flow chart of soy sauce preparation process

1.3.2 基本理化指标测定

蛋白酶活力的测定:参照GB/T 23527—2009《蛋白酶制剂》,1 mL酶液或1 g干质量曲料在40℃、pH 7.0的条件下,1 min水解酪蛋白产生1 μg酪氨酸,定义为1个酶活力单位(U)。淀粉酶活力的测定:采用3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)法,参照张艳芳等^[10]的测定方法。

总氮含量的测定:凯氏定氮法,参考GB 5009.5—2010《食品中蛋白质的测定》。氨基酸态氮含量的测定:甲醛滴定法,参照GB/T 5009.39—2003《酱油卫生标准的分析方法》。谷氨酸含量的测定:分别测定0.006、0.010、0.020、0.040、0.060 g/L的L-谷氨酸质量浓度对应的吸光度,以L-谷氨酸质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线;分别吸取酶解反应后试样

滤液和空白样实验滤液20 μL ，用R-biopharm公司的L-谷氨酸检测试剂盒，在492 nm波长处测定其L-谷氨酸含量。

1.3.3 顶空-固相微萃取法提取酱油中的挥发性香气物质

参考Feng Yunzi等^[11]的方法。样品的准备：将8 mL的酱油装入20 mL气质瓶中，并加入1 g氯化钠，使其盐质量浓度达到饱和；进样前，加入内标20 μL 的2-甲基-3-庚酮甲醇溶液（1.724 mg/L）进待测样品中。固相微萃取的方法：45 $^{\circ}\text{C}$ 保温20 min，采用CAR/PDMS萃取头45 $^{\circ}\text{C}$ 萃取40 min，萃取结束后，萃取头插入进样口解吸3 min。萃取头在使用前以270 $^{\circ}\text{C}$ 老化1 h，每个样品间萃取头在270 $^{\circ}\text{C}$ 老化10 min以防止污染。

1.3.4 顶空-固相微萃取分离条件

色谱柱：TR-5MS弹性石英毛细色谱柱（30 m $\times$ 0.25 mm，0.25 μm ）；起始温度40 $^{\circ}\text{C}$ ，保持2 min，以5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至120 $^{\circ}\text{C}$ ，保持2 min，再以7 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至220 $^{\circ}\text{C}$ ，保持5 min；载气：高纯氦气；流量：1.0 mL/min；进样口温度：250 $^{\circ}\text{C}$ ；分流比：10:1；电子电离源，电子能量70 eV；电子倍增器电压350 V；离子源温度250 $^{\circ}\text{C}$ ；传输线温度250 $^{\circ}\text{C}$ ；质量范围 m/z 35~350；扫描速率3.00 scans/s。

1.3.5 风味化合物的定性、定量

参考Feng Yunzi等^[11]的方法。根据NIST08数据库对化合物进行鉴定，化合物的保留指数（retention index，RI）通过正构烷烃（ $\text{C}_6\sim\text{C}_{26}$ ）计算得到，定量分析采用内标法进行。气相色谱-质谱数据使用Xcalibur软件（版本2.0）分析处理。

1.4 数据分析

实验结果为3组平行样品的平均值，表示为 $\bar{x}\pm s$ ，使用Excel 2013软件进行数据分析，使用SPSS 22.0对统计数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 不同酱油曲料酶活力的比较

酱油生产中将大曲浸入盐水后形成的混合物，在日本酱油的生产中称为“moromi”，在我国生产的高盐稀态酱油中称为“酱醪”。在NaCl质量分数约17%条件下，米曲霉生长受抑制甚至失活，而其生成的酶系能继续参与降解作用，形成酱油独特的色、香、味。不同酱油曲料酶活力的结果见表1。

表1 各种酱油曲料的酶活力
Table 1 Enzyme activities of different soy sauce kojis

样品	中性蛋白酶	酸性蛋白酶	淀粉酶	谷氨酰胺酶
空白样曲料	2 139.89 $\pm$ 25.59 ^b	521.06 $\pm$ 3.85 ^b	55.08 $\pm$ 5.97 ^b	4.01 $\pm$ 0.12 ^b
双菌种发酵样曲料	2 510.32 $\pm$ 32.40 ^a	596.67 $\pm$ 23.71 ^a	58.40 $\pm$ 13.70 ^a	1.18 $\pm$ 0.40 ^a
混曲样曲料	2 190.84 $\pm$ 65.93 ^b	322.18 $\pm$ 6.10 ^c	48.85 $\pm$ 4.75 ^c	4.55 $\pm$ 0.90 ^c

注：同列肩标字母不同表示差异显著（ $P<0.05$ ）。下同。

蛋白酶是酱油酿造的关键酶类，其作用是将大分子质量的蛋白质分解成小分子蛋白、多肽和氨基酸。蛋白酶活力是制曲工艺中的关键指标，关系到酱油曲料的原料利用率以及酱油的品质。在高盐稀态酱油的酿造过程中，最初盐水的pH值为中性，大曲入池后，pH值显著下降至6左右，因此中性蛋白酶活力是考察重点。随着发酵时间的延长，pH值不断下降^[12]，致使酱油发酵过程中体系的pH值偏低，因此考察酸性蛋白酶活力对后期发酵工艺具有实际意义。如表1所示，空白样曲料和混曲样曲料的中性蛋白酶活力没有显著性差异（ $P>0.05$ ），而双菌种发酵样曲料中性蛋白酶活力最高，与其他酱油曲料有显著性差异（ $P<0.05$ ）。酸性蛋白酶活力表现为：双菌种发酵样曲料>空白样曲料>混曲样曲料，且差异显著（ $P<0.05$ ），双菌种发酵样曲料的酸性蛋白酶活力是混曲样曲料的1.85倍。

淀粉酶作为酱油成曲的主要酶系之一，能够使原料中的淀粉糖化，进而为米曲霉、酵母、乳酸菌等微生物的生长提供碳源，另外，糖化的后的淀粉还是酱油甜味的组成成分。淀粉酶有 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、糖化酶、1,4-葡萄糖苷酶、1,6-糊精酶、麦芽糖酶等，这些酶分别作用于淀粉分子中的不同部位，生成葡萄糖、麦芽糖、极限糊精等小分子糖类，且这些酶既单独作用又会产生协同作用，因此，本实验采用的测定方法为测定综合淀粉酶活力。淀粉酶活力之间有显著性差异（ $P<0.05$ ），酶活力高低的顺序为：双菌种发酵样曲料>空白样曲料>混曲样曲料。空白样曲料的淀粉酶活力达到55.08 U/g，而解淀粉芽孢杆菌固体发酵得到的曲料，其淀粉酶活力为39.51 U/g，低于米曲霉的淀粉酶活力，解淀粉芽孢杆菌的淀粉酶系与米曲霉的淀粉酶系在酶学特性上有很大差异^[13]。米曲霉和解淀粉芽孢杆菌复合发酵制曲得到的酱油曲料，既有米曲霉的淀粉酶系，又有解淀粉芽孢杆菌的淀粉酶系，故其淀粉酶活力值最高，能达到58.40 U/g，且差异显著（ $P<0.05$ ）。

谷氨酰胺酶可催化谷氨酰胺水解生成谷氨酸，而谷氨酸又是酱油中重要的鲜味氨基酸，故谷氨酰胺酶的作用十分重要^[14]。若谷氨酰胺酶活力低，谷氨酰胺会不可逆的转化成焦谷氨酸，对酱油的风味和滋味都没有提升作用，因此，酱油原油中谷氨酸含量会随谷氨酰胺酶活力的提高而得到提升，鲜味也得到增强^[15]。谷氨酰胺酶活力高低的顺序为：混曲样曲料>空白样曲料>双菌种发酵样曲料，且有显著性差异（ $P<0.05$ ）。该酶活力的差异有一定的特殊性，空白样的谷氨酰胺酶全部来自于米曲霉酶系，其谷氨酰胺酶活力高，但韩铭海等^[16]研究表明该种菌所产的谷氨酰胺酶不耐盐、易失活，不利于酱油中谷氨酰胺向谷氨酸转化，双菌种发酵样曲料的前3种酶活力都有一定提高，而谷氨酰胺酶活力最低，这可

能与微生物的产酶状态有关,米曲霉的制曲条件有利于解淀粉芽孢杆菌产其他酶,而对其产谷酰胺酶有抑制作用。混曲样曲料中,解淀粉芽孢杆菌在优化后的发酵条件与培养基的情况下产谷酰胺酶,因此,其产酶能力强,酶活力最高,达到 $4.55 \text{ U/g}^{[17]}$ 。

2.2 总氮和氨基酸态氮含量的变化

原料利用率是评价酱油发酵效率的重要指标之一,也是提高产品质量的基础。酱油生产中的原料利用率,主要指蛋白质和淀粉利用率,即原料中蛋白质和淀粉等成分进入成品中的比例。不同的曲料发酵对酱油总氮含量的影响结果见图2。

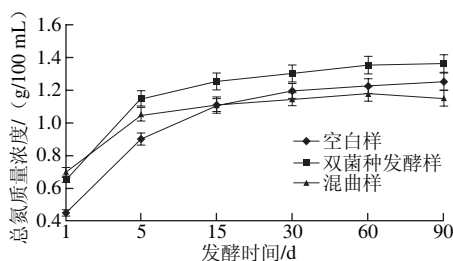


图2 不同曲料发酵酱油的总氮含量变化

Fig. 2 Changes in total nitrogen content in soy sauce produced with different soy sauce kojis

由图2可知,发酵结束时,总氮含量大小依次为:双菌种发酵样>空白样>混曲样,有显著性差异($P<0.05$)。混曲样酱油的总氮含量偏低,可能是由于米曲霉制曲的曲料与解淀粉芽孢杆菌固体发酵的曲料之间的水分含量差异较大,最终曲料干基质量较低所致。双菌种发酵样发酵得到的酱油,由于有耐盐的解淀粉芽孢杆菌的作用,其总氮含量高于其他酱油。从发酵速率分析,发酵前5 d,双菌种发酵样和混曲样的总氮含量显著高于空白样,说明解淀粉芽孢杆菌所产的蛋白酶具有一定的耐盐性,能促进蛋白酶解。空白样、双菌种发酵样和混曲样的总氮含量在发酵前15 d增加速率较大,增加速率均大于 $0.02 \text{ g/(100 mL} \cdot \text{d)}$,与李丹等^[12]的研究结果一致,总氮质量浓度分别达到1.16、1.26、 1.18 g/100 mL 。30 d后总氮含量增加逐渐趋于平缓,由于微生物对营养物质消耗过度,90 d呈略微下降的趋势,与60 d无显著性差异($P>0.05$)。

氨基酸态氮含量是评定酱油等级的重要指标之一,在酱油发酵的过程中,蛋白质被蛋白酶水解成肽类,又被肽酶水解成分子更小的小分子肽、氨基酸等物质,而这些物质是酱油中主要的呈鲜物质,一般氨基酸含量越高,酱油滋味越好^[18]。不同曲料发酵酱油的氨基酸态氮含量变化如图3所示。

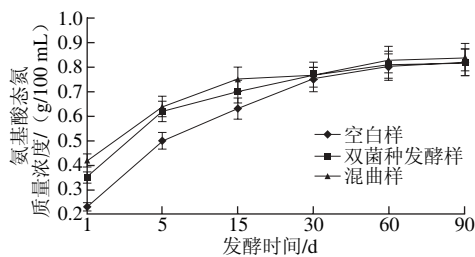


图3 不同曲料发酵酱油的氨基酸态氮含量变化

Fig. 3 Changes in amino acid nitrogen content in soy sauce produced with different soy sauce kojis

由图3可知,发酵结束时,氨基酸态氮含量大小依次为混曲样>空白样>双菌种发酵样,均达到了特级酱油的标准(氨基酸态氮质量浓度 $\geq 0.8 \text{ g/100 mL}$)^[12]。空白样与双菌种发酵样无显著性差异($P>0.05$),而空白样和双菌种发酵样与混曲样有显著性差异($P<0.05$)。从发酵速率分析,发酵前30 d,双菌种发酵样和混曲样的氨基酸态氮含量显著高于空白样,说明解淀粉芽孢杆菌在前期对氨基酸态氮含量的提高有一定作用。空白样、双菌种发酵样和混曲样的氨基酸态氮含量在发酵前5 d均有较大提升,且增加速率均大于 $0.06 \text{ g/(100 mL} \cdot \text{d)}$ ^[12],30 d后氨基酸态氮含量增加幅度较小($<0.01 \text{ g/(100 mL} \cdot \text{d)}$),变化趋势与总氮含量基本一致。

2.3 谷氨酸含量的变化

酱油中氨基酸的种类和含量决定了酱油的品质,高盐稀态酱油中的氨基酸主要是以游离氨基酸的形式存在,各种游离氨基酸的含量却存在着较大差异,其中谷氨酸含量居于游离氨基酸含量之首,而谷氨酸与鲜味的呈味有很大关系,谷氨酸可以作为判断酱油是否添加鲜味剂的特征氨基酸。不同曲料发酵对酱油谷氨酸含量的影响结果见表2。

表2 不同曲料发酵对酱油谷氨酸含量的影响

Table 2 Effects of different soy sauce kojis on glutamine acid content of soy sauce

酱油种类	谷氨酸质量浓度/(mg/mL)				
	1 d	5 d	15 d	30 d	60 d
空白样	1.69 ± 0.01^a	5.22 ± 0.01^a	11.30 ± 0.02^b	13.54 ± 0.03^b	12.40 ± 0.02^a
双菌种发酵样	3.01 ± 0.01^b	7.78 ± 0.10^b	9.84 ± 0.11^a	12.87 ± 0.11^a	16.70 ± 0.17^b
混曲样	5.63 ± 0.03^c	8.54 ± 0.29^c	13.24 ± 0.03^c	15.50 ± 0.01^c	16.47 ± 0.05^b

注:谷氨酸阈值为 3 mg/mL 。

由表2可知,发酵结束时,谷氨酸含量大小依次为双菌种发酵样>混曲样>空白样,有显著性差异($P<0.05$)。谷氨酸含量的变化,都遵循着先增加后下降的趋势,且增加速率大于下降速率。双菌种发酵样和混曲样在第60天谷氨酸质量浓度较空白样高,分别为 16.70 mg/mL 和 16.47 mg/mL ,比Kyoko等^[19]在酱油中添加 γ -谷氨酰胺转氨酶的效果略差,与Wakayama^[20]、叶茂^[21]、Ye Mao^[22]等研究的添加谷氨酰胺酶能够提高酱油谷氨酸

含量的结果一致。空白样、双菌种发酵样和混曲样的谷氨酸含量的最高值分别出现在30、60 d和60 d,且质量浓度的最大值分别为13.54、16.70、16.47 mg/mL。其中混曲样谷氨酸质量浓度在第1天即可达到5.63 mg/mL,明显高于其他曲料酱油,这与解淀粉芽孢杆菌SWJS22固态发酵的特性有关^[23],且根据文献报道,米曲酶所产的谷氨酰胺酶不耐盐^[24-25],而解淀粉芽孢杆菌所产的谷氨酰胺酶具有一定的耐盐性。

2.4 香气化合物的变化

酱油挥发性物质主要来源于酱油制曲和酱醪发酵的过程,所以原料、菌种、制曲工艺以及发酵方式的不同都会对酱油的香气产生各种不同程度的影响^[11]。3种不同曲料发酵的酱油,其香气化合物的种类见表3。

表3 香气化合物的种类
Table 3 Classes of aroma compounds detected in soy sauce produced with different soy sauce kojis

酱油种类	醇类	醛类	酸类	酯类	酚类	吡啶类	吡喃类	酮类	含硫化合物	其他	总计
空白样	14	5	5	6	2	7	1	6	1	3	50
双菌种发酵样	14	5	5	6	3	7	1	6	2	3	52
混曲样	15	5	5	5	2	7	0	6	1	4	50

从总种类上来看,3种不同曲料发酵的酱油的香气化合物种类相差不大,均在50种以上,其中双菌种发酵样酱油,种类有52种,多于其他曲料发酵的酱油。

各类不同风味化合物的含量上,3种不同曲料发酵的酱油有明显差别,结果见表4。对于醇类化合物,空白样和双菌种发酵样含量差别不大,混曲样醇类含量高于其他制曲方式,对于醛类化合物,双菌种发酵样含量高于其他酱油。对于酸类化合物,含量差别很大,空白样>双菌种发酵样>混曲样,空白样的酸类化合物总量是混曲样的7.93倍,说明解淀粉芽孢杆菌发酵酱油有明显的降酸作用,对于吡啶类化合物,空白样与双菌种发酵样明显高于混曲样。对于酮类化合物和酚类化合物,双菌种发酵样高于其他发酵样。综合香味化合物种类和各类化合物的含量分析,双菌种发酵样酱油较优。

酱油的挥发性醇类主要来自于原料和发酵过程中^[26]。乙醇、2-甲基丁醇、3-甲基丁醇、苯乙醇和1-辛烯-3-醇在3种酱油中均有检出,苯乙醇是芳香族醇,可能主要来自于酵母菌体内的Ehrlich反应,也可能来源于苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸的降解。1-辛烯-3-醇带有蘑菇香味,是米曲霉孢子的特征挥发性物质^[27],在3种不同曲料发酵的酱油中,1-辛烯-3-醇的含量差别不大。混曲样的酱油中3-甲基-1-丁醇的含量是空白样的4.31倍,是双菌种发酵样的6.32倍。

酱油中的醛、酮类化合物在含量较低时,具有令人愉悦的香味,如果香、草香、甜香和焦香等,浓度较高时,则会给人刺激感^[28-29]。其中,2-甲基丁醛、3-甲基丁

醛、苯甲醛和苯乙醛含量较高,2-甲基丁醛、3-甲基丁醛是酱油香气的重要组成部分,一方面来源于亮氨酸和异亮氨酸的Strecker降解,另一方面是微生物利用游离氨酸的去羧基和转氨作用^[28]。糠醛在空白样中含量不低,双菌种发酵样中含量较低,在混曲样中没有检测出。

表4 不同曲料酱油化合物的香气物质的含量
Table 4 The contents of aroma components in soy sauce produced with different soy sauce kojis

香气化合物	RI (5 ms)	定性定量 碎片 (m/z)	CAS号	质量浓度/ (μg/L)			
				空白样	双菌种发酵样	混曲样	
醇类	乙醇	<600	45 (46)	64-17-5	3.88	1.20	2.89
	3-甲基-1-丁醇	738	55 (42、43)	123-51-3	1.82	1.24	7.84
	2-甲基-1-丁醇	742	56 (70、41)	137-32-6	0.70	0.72	3.06
	1-辛烯-3-醇	988	57 (43)	3391-86-4	6.34	5.75	7.10
	2-苯乙醇	1 128	91 (92、120)	60-12-8	2.23	1.07	2.39
总计					14.97	9.98	23.28
醛类	2-甲基丙醛	<600	43 (41、72)	78-84-2	0.50	0.67	0.40
	3-甲基丁醛	658	44 (43、58)	590-86-3	1.94	2.80	2.07
	2-甲基丁醛	668	57 (58、41)	96-17-3	2.76	3.96	3.01
	苯乙醛	1 060	91 (92、120)	122-78-1	2.21	3.11	2.13
总计					7.41	10.54	7.61
酸类	乙酸	604	60 (43、45)	64-19-7	43.26	29.26	15.29
	2-甲基丙酸	765	43 (41、73)	79-31-2	7.83	7.08	2.65
	3-甲基丁酸	862	60 (41、43)	503-74-3	61.71	27.27	2.97
	2-甲基丁酸	871	74 (57、41)	11-53-0	71.27	31.14	2.31
总计					184.07	94.75	23.22
酯类	苯甲酸甲酯	1 108	105 (77、136)	93-58-3	0.57	0.82	0.52
	乙酸乙酯	612	61 (43、45)	141-78-6	0.35	0.16	0.28
总计					0.92	0.98	0.80
酚类	愈创木酚	1 099	124 (109、81)	90-05-1	1.54	7.69	1.44
	2-甲基吡嗪	834	94 (67)	109-08-0	1.39	0.71	0.56
总计					2.93	8.40	2.00
吡嗪	2,3,5-三甲基吡嗪	1 012	42 (122、39)	72200-41-0	5.56	8.97	1.07
	2,5-二甲基吡嗪	923	108 (42、39)	123-32-0	21.00	7.10	4.06
总计					26.56	16.07	5.13
呋喃/酮	糠醛	845	96 (95、39)	98-01-1	4.26	0.35	
含硫化合物	3-甲硫基丙醛	922	48 (104、47)	3268-49-3		1.03	
总质量浓度					214.12	142.10	62.04

酸类化合物通常由细菌发酵阶段进行代谢活动产生,将糖类化合物转化成有机酸,酸类化合物是酯化反应的前提物质,一定含量的有机酸能够增加酱油风味。3种酱油的酸类化合物含量差异主要是乙酸、2-甲基丁酸、3-甲基丁酸,其中空白样的乙酸含量是混曲样的2.83倍,空白样的2-甲基丁酸是混曲样的30.85倍,空白样的3-甲基丁酸是混曲样制曲发酵酱油的20.78倍,差异十分显著。

酯类化合物是食品中重要的香气种类之一,具有果香、甜香或花香样气味。3种不同制曲方式发酵的酱油中均检测出乙酸乙酯、苯甲酸甲酯、苯乙酸乙酯、2-甲基丙酸甲酯、2-甲基丁酸甲酯,与已有文献报道相同^[30],乙酸乙酯是酱油中最常见的酯类物质,丁二酸-甲酯在空白样和双菌种发酵样中均有检出,而混曲样酱油中没有检出。

酚类和吡嗪化合物在发酵的豆制品中十分重要。愈创木酚在3种酱油中均有检出,研究表明愈创木酚与木质素代谢有关,且双菌种发酵样酱油含量最高,2,6-二甲氧基苯酚只在双菌种发酵样酱油中检测出。吡嗪类化合物种类丰富,2-甲基吡嗪、2,3,5-三甲基吡嗪、2,5-二甲基吡嗪、3-乙基-2,5-二甲基吡嗪和2-乙基-6-甲基吡嗪在3种酱油中均有检出。

含硫化合物虽然含量低,但对产品风味的影响很大。甲硫醇在3种酱油中均有检出,3-甲硫基丙醛只有在双菌种发酵样酱油中检出。此外, α -柏木烯、 β -柏木烯、1,3-辛二烯在3种酱油中均有检出,3-甲基-丁醛肪却只在混曲样酱油中检出。

3 结 论

利用解淀粉芽孢杆菌SWJ22和米曲霉为发酵菌株,探究米曲霉单独制曲发酵、解淀粉芽孢杆菌和米曲霉曲料混合发酵以及双菌种混合制曲发酵对酱油理化指标及风味的影响。考察不同曲料发酵酱油的基本理化指标,与传统发酵酱油进行对比,全面评价将解淀粉芽孢杆菌运用到酱油发酵的可行性。3种不同曲料发酵的酱油,总氮和氨基酸态氮均在发酵初期迅速生成,其中混曲样酱油氨基酸转化率最高,混曲样和双菌种发酵样,谷氨酸含量较空白样有明显提高。混曲样酱油色泽上与空白样、双菌种发酵样区别明显,色率和色深物质均低于其他曲料发酵酱油。从香气种类上来看,3种酱油的差别不大,重点香气成分在3种酱油中均有检出,混曲样酱油酸类物质含量最低。

参考文献:

- [1] 李军, 杨晓宽, 贾文伦. 复合菌群发酵酿造酱油的初步研究[J]. 河北职业技术师范学院学报, 1999(4): 48-53.
- [2] CUI C, ZHAO M, LI D, et al. Biochemical changes of traditional Chinese-type soy sauce produced in four seasons during processing[J]. CyTA-Journal of Food, 2014, 12(2): 166-175. DOI:10.1080/19476337.2013.810673.
- [3] FENG Y, CUI C, ZHAO H, et al. Effect of koji fermentation on generation of volatile compounds in soy sauce production[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2013, 48(3): 609-619. DOI:10.1111/ijfs.12006.
- [4] 徐欢欢, 欧阳珊, 尹文颖, 等. 混合制曲对酿造酱油理化特性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(7): 82-85. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.2012.07.029.
- [5] FENG J, ZHAN X B, ZHENG Z Y, et al. A two-step inoculation of *Candida etchellsii* to enhance soy sauce flavour and quality[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2012, 47(10): 2072-2078. DOI:10.1111/j.1365-2621.2012.03071.x.
- [6] 全明希, 李承妍, 赵敏珍, 等. 利用新菌株解淀粉芽孢杆菌CJ 3-27及米曲霉CJ KG的韩式酱曲大酱的制造方法: CN 104508119A[P]. 2015-04-08.
- [7] LEE K E, SANG M L, YONG H C, et al. Comparative volatile profiles in soy sauce according to inoculated microorganisms[J]. Bioscience Biotechnology & Biochemistry, 2013, 77(11): 2192-200. DOI:10.1271/bbb.130362.
- [8] 钟泓波, 邹惠杰, 雷芬芬, 等. 产蛋白酶深海细菌的筛选及其蛋白酶酶学性质[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(8): 108-112. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.2013.08.014.
- [9] 钟泓波. 产蛋白酶海洋菌株的选育及发酵豆粕的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2014.
- [10] 张艳芳, 陶文沂. 米曲霉40188产中性蛋白酶、 α -淀粉酶特性的研究[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(5): 35-37. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.2008.05.013.
- [11] FENG Y, CAI Y, SU G, et al. Evaluation of aroma differences between high-salt liquid-state fermentation and low-salt solid-state fermentation soy sauces from China[J]. Food Chemistry, 2014, 145: 126-134. DOI:10.1016/j.foodchem.2013.07.072.
- [12] 李丹, 崔春, 王娅琴, 等. 高盐稀态酱油酿造过程中蛋白质降解规律的研究[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(9): 24-28. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.2010.09.010.
- [13] 李尔汉, 彭思露, 李汉听, 等. 解淀粉芽孢杆菌 α -淀粉酶基因的克隆与表达[J]. 生物技术, 2014, 36(6): 13-18.
- [14] TOMITA K, YANO T, KITAGATA T, et al. Action of glutaminase in a model system of a soy sauce fermentation[J]. Agricultural & Biological Chemistry, 2014, 53(7): 1873-1878. DOI:10.1080/00021369.1989.10869590.
- [15] NANDAKUMAR R, YOSHIMUNE K, WAKAYAMA M, et al. Microbial glutaminase: biochemistry, molecular approaches and applications in the food industry[J]. Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic, 2003, 23(2/3/4/5/6): 87-100. DOI:10.1016/S1381-1177(03)00075-4.
- [16] 韩铭海, 赵娟娟, 华盛龙, 等. 一株高产谷氨酰胺酶菌株的鉴定和酶活特性的研究[J]. 大豆科学, 2008, 27(6): 1037-1040.
- [17] 马永强, 宫安旭, 陈晓昕, 等. 酱油制曲过程中蛋白酶和谷氨酰胺酶活力影响因素[J]. 食品科学, 2010, 31(17): 294-297.
- [18] 施思, 蒋予箭, 张海珍. 温度对高盐稀态酱油风味物质的影响[J]. 中国调味品, 2015(8): 69-73. DOI:10.3969/j.issn.1000-9973.2015.08.016.
- [19] KIJIMA K, SUZUKI H. Improving the umami taste of soy sauce by the addition of bacterial gamma-glutamyltranspeptidase as a glutaminase to the fermentation mixture[J]. Enzyme & Microbial Technology, 2007, 41(Suppl 1/2): 80-84. DOI:10.1016/j.enzymitec.2006.12.004.
- [20] WAKAYAMA M, YAMAGATA T, KAMEMURA A, et al. Characterization of salt-tolerant glutaminase from *Stenotrophomonas maltophilia* NYW-81 and its application in Japanese soy sauce fermentation[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2005, 32(9): 383-390. DOI:10.1007/s10295-005-0257-7.
- [21] 叶茂, 张远平, 邓毛程. 一种耐盐性谷氨酰胺酶在高盐稀态酱油酿造过程中的应用研究[J]. 中国调味品, 2014(7): 5-7. DOI:10.3969/j.issn.1000-9973.2014.07.002.
- [22] YE M, LIU X, ZHAO L. Production of a novel salt-tolerant L-glutaminase from *Bacillus amyloliquefaciens* using agro-industrial residues and its application in Chinese soy sauce fermentation[J]. Biotechnology, 2013, 12(1): 25-35. DOI:10.3923/biotech.2013.25.35.
- [23] 周池虹伶, 崔春, 赵谋明. 解淀粉芽孢杆菌SWJ22固体发酵产谷氨酰胺酶的优化研究[J]. 食品与机械, 2015(6): 33-37. DOI:10.13652/j.issn.1003-5788.2015.06.007.
- [24] 袁振远, 冯禧瑞. 米曲霉的谷氨酰胺酶[J]. 中国调味品, 1981(6): 6-9.
- [25] 林祖申, 陈红玲, 厉雪君. 谷氨酰胺酶高产菌株沪酿3.422米曲霉的育种与应用[J]. 上海调味品, 1986, 4(1): 7-21.
- [26] 包启安. 酱油科学与酿造技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2011: 115-118.
- [27] BULL S M, YONG F M, WONG H A. The production of aroma by *Aspergillus oryzae* during the preparation of soy sauce koji[J]. Food Chemistry, 1985, 17: 251-264. DOI:10.1016/0308-8146(85)90034-2.
- [28] LEE S M, SEO B C, KIM Y S. Volatile compounds in fermented and acid hydrolyzed soy sauces[J]. Journal of Food Science, 2006, 71: 146-156. DOI:10.1111/j.1365-2621.2006.tb15610.x.
- [29] 冯云子. 高盐稀态酱油关键香气物质的变化规律及形成机理的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2015.
- [30] SUN S Y, JIANG W G, ZHAO Y P. Profile of volatile compounds in 12 Chinese soy sauces produced by a high-salt-diluted state fermentation[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2012, 116: 316-328. DOI:10.1002/j.2050-0416.2010.tb00437.x.