传统酿造酱油酱醪中的霉菌筛选及其部分酶系特征分析

赵谋明，林涵玉，梁卓雄，路怀金，谢诺意，冯云子
（华南理工大学食品科学与工程学院，广东广州 510640）

摘要：传统酿造酱油发酵过程中，微生物种类繁多，多数为环境中自然落入并参与发酵，本研究旨在从传统酿造酱醪中筛选不同的霉菌并探究其酶活力特性。本研究从酱醪中分离到 49 株霉菌，挑选形态有差异的 18 株霉菌进行分子生物学鉴定，鉴定结果归属于 4 个菌属，即青霉属、枝孢霉属、曲霉属和链格孢菌。对这些霉菌进行酶系分析，结果表明霉菌的酶系特点与霉菌类型密切相关，其中黑曲霉的酸性蛋白酶和 β-葡萄糖苷酶突出，米曲霉、红绶曲霉和链格孢菌中性蛋白酶、糖化酶和氨肽酶活力突出。根据酶活及菌种特性，选用黑曲霉 AN1 和 AN2 分别与米曲霉进行混合制曲，发现黑曲霉 AN2 和米曲霉混合制曲效果更佳，相比于米曲霉大曲，其中性蛋白酶与酸性蛋白酶分别提高了 42.84%和 22.27%，且糖化酶和氨肽酶提高 117.54%和 15.10%，具有较好的应用价值，该研究为筛选酱醪中优质的霉菌提供理论依据。

关键词：酱油；酱醪；霉菌；酶系；混合制曲

文章篇号：1673-9078(2020)06-114-120 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.6.0829

Screening of Molds in Traditional Soy Sauce *Moromi* and Analysis of Some Enzymatic Characteristics

ZHAO Mou-ming, LIN Han-yu, LIANG Zhuo-xiong, LU Huai-jin, XIE Nuo-yi, FENG Yun-zi
(School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: There are many types of microorganisms (most of which naturally occurring in the environment) participating in the fermentation of traditional soy sauce. The aim of this study was to isolate different molds from the traditional soy sauce *moromi* and examine their enzymatic activities. Forty-nine mold strains were isolated from *moromi*, among which 18 cultured mold strains with different morphologies were selected for molecular biological identification. The results revealed four genera, including *Aspergillus, Penicillium, Cladosporium* and *Alternaria*. Analysis of enzymes in these molds showed that the enzymatic characteristics were closely related to the mold species. Among which, the acid protease and *β*-glucosidase of *Aspergillus niger* (*A. niger*) were prominent, while neutral protease, glucoamylase and aminopeptidase of *Aspergillus oryzae* (*A. oryzae*), *Aspergillus nomius* and *Alternaria alternate* were prominent. According to enzymatic activity and strain characteristics, *A. niger* (AN1) and *A. niger* (AN2) were chosen to co-cultivate respectively with commercial *A. oryzae* to make mixed *koji*. It was found that the effect of the mixed *koji* with *A. niger AN2* and *A. oryzae* was better. Compared with pure *A. oryzae koji*, the activities of neutral protease and acid protease in mixed *koji* increased by 42.84% and 22.27%, respectively, and the activities of glucoamylase and aminopeptidase also increased by 17.54% and 15.10%, respectively, indicating a high application potential. This study provides a theoretical basis for screening high-quality mold from *moromi*.

Key words: soy sauce; *moromi*; fungi; enzyme; mixed *koji*

引文格式：

赵谋明,林涵玉,梁卓雄,等.传统酿造酱油酱醪中的霉菌筛选及其部分酶系特征分析[J].现代食品科技,2020,36(6):114-120

ZHAO Mou-ming, LIN Han-yu, LIANG Zhuo-xiong, et al. Screening of molds in traditional soy sauce *Moromi* and analysis of some enzymatic characteristics [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(6): 114-120

收稿日期：2019-08-25

基金项目：国家重点研发计划项目（2018YFD0400405）；国家自然科学基金项目（31701591，31972065）；广东省自然科学基金项目（A2017030310027）

作者简介：赵谋明（1964-），男，博士，教授，研究方向：食品生物技术

通讯作者：冯云子（1987-），女，博士，副研究员，研究方向：食品生物技术

酱油生产主要包括制曲和酱醪发酵两个阶段，制曲是酱油生产中极其重要的阶段，主要采用米曲霉沪酿 3.042，米曲霉将代谢生成蛋白酶、糖化酶、β-葡萄糖苷酶和氨肽酶等多种酶类，将原料中的蛋白、淀粉等物质降解成氨基酸、多肽和单糖，经过微生物的进一步转化和美拉德反应等，形成酱油复杂的风味[1]。

近年来，由于米曲霉的酶系比较单一，导致其对酱油原料利用率不高影响酱油品质，为了提高菌株的酶系丰富度、提升酱油的原料利用率和品质，许多学者[2-4]提出多菌株制曲技术以提高成曲质量。有研究[5-8]表明黑曲霉和米曲霉混合制曲能够改善酱油品质，红曲霉和米曲霉混合制曲能够改善高盐稀态酱油的鲜味和焦糖香[9]，酱油曲霉和米曲霉混合制曲可以提高酱油的氨基酸生成，从而提升酱油的风味质量[2]。因此，从传统发酵酱油酱醪中筛选得到优质霉菌，将其应用到酱油实现多菌株制曲是提高改善酱油品质的有效手段。在酱油的实际发酵过程中，除米曲霉外，其他霉菌的种类也是非常丰富的，如 Yang 等[10]从传统酱油中筛选到黑曲霉、梗霉、芽枝状枝孢霉和布氏犁头霉等霉菌；Wei 等[11]发现酱油曲霉是发酵过程中主要的霉菌，而寄生曲霉在发酵前期出现。此外，Jung 等人[12]在传统韩国豆酱中分离得到红曲霉、毛霉、根霉、青霉、帚霉、地霉等霉菌。然而，大部分霉菌在酱油发酵过程中的作用并不明晰。

因此，本研究拟从酱油酱醪中分离纯化霉菌，探究其酶系组成及特点，并从中筛选具有应用潜力的优质菌种，与米曲霉进行混合制曲，以期为酱油发酵工业提供理论和技术支持。

1 材料与方法

1.1 原料

传统酿造酱油酱醪由广东省某酱油厂提供，采用高盐稀态酱油酿造法，取酿造 90 d 的样品。

1.1.1 试剂

孟加拉红培养基（g/L）：蛋白胨 5.0 g，葡萄糖 10.0 g，磷酸氢二钾 1.0 g，硫酸镁 0.5 g，琼脂 15.0 g，孟加拉红 0.033 g，氯霉素 0.1 g，购于广东环凯微生物科技有限公司。

豆汁培养基：5°Be'豆汁 1000 mL，硫酸镁（$MgSO_4·7H_2O$）0.5 g，可溶性淀粉 20.0 g，磷酸二氢钾 1.0 g，硫酸铵 0.5 g，琼脂 20.0 g，调节 pH 到 6.0。

无水碳酸钠，三氯乙酸，可溶性淀粉购于天津市大茂化学试剂厂；磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、干酪素、无水乙醇、无水乙酸钠、冰乙酸、无水葡萄糖、乳酸钠和乳酸购于国药集团化学试剂有限公司；氯化钠、氢氧化钠和浓硫酸购于广州化学试剂厂；L-亮氨酸-亮氨酸-对硝基苯胺和对硝基苯基-β-D-葡萄糖苷购于 Sigma 试剂有限公司；面粉和黄豆购于广东永辉超市。

1.1.2 主要仪器设备

LDZX-30KBS 立式压力蒸汽灭菌器，上海申安医疗器械厂；SW-CJ-2FD 洁净工作台，苏净集团苏州安泰空气技术有限公司；恒温培养相，上海恒科技仪器有限公司；ZXJP-A1403 霉菌培养箱，上海智城分析仪器制造有限公司；高速万能粉碎机，天津市泰斯特仪器有限公司；THZ-82A 恒温振荡器，常州奥华仪器有限公司；HWS-26 电热恒温水浴锅，上海一恒科技仪器有限公司；XW-80A 漩涡混合器，上海精科实业有限公司；UV754N 紫外可见光光度计，上海佑科仪器有限公司；Varioskn Flash 全波长扫描式多功能读数仪，美国 Thermo Scientific 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 霉菌的分离纯化

取 2.5 g 酱醪样品溶于 22.5 mL 无菌生理盐水混匀，取 100 μL 合适梯度的稀释液于孟加拉红培养基，用涂布棒涂布均匀，置于 28 ℃培养 2~3 d，挑选形态有差异的霉菌进行进一步划线分离，纯化后的霉菌于豆汁斜面培养基培养保藏。

1.2.2 霉菌的分子生物学鉴定

1.2.2.1 基因提取和扩增

将斜面培养基上的菌株于研钵研磨后，用试剂盒提取 DNA。采用真菌 ITS 序列通用引物 ITS1（5’-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3’）和 ITS4（5’-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3’），反应体系为 30 μL，包括 17.8 μL 纯净水，3 μL 脱氧核苷三磷酸（dNTP），3 μL 上、下游引物，2 μL DNA 模板和 0.2 μL 的酶。PCR 扩增条件为：95 ℃预变性 5 min，95 ℃变性 30 s，55 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 1 min，35 个循环，最后延伸 10 min，12 ℃保温。

1.2.2.2 基因测序

取扩增产物 3 μL 制成琼脂糖凝胶电泳（1%），在凝胶成像系统上观察结果，PCR 产物测序送北京六合华大基因科技有限公司完成，将测序结果在 NCBI 数据库中比对。

1.2.3 种曲制备

将麸皮:水:面粉以 4:4:1 的比例充分搅拌均匀，过 10 目的筛子，取 20 g 过筛的麸皮混合物于 250 mL 锥形瓶中，于 121 ℃加热 15 min 进行灭菌，在无菌操作台挑取不同霉菌孢子至锥形瓶内，于 30 ℃下培养 4 d，

每日轻敲锥形瓶底部使得麸皮分散疏松。

1.2.4 大曲制备

参考高献礼[13]的制曲工艺。取干豆在水中浸泡6~8 h 沥干后于 121 ℃蒸煮 13 min，取出冷却至 40 ℃左右开始拌曲。按照干豆:面粉=4:1（*m/m*）的比例均匀混合，分别拌入 0.2%商业米曲霉种曲、黑曲霉 AN1 种曲和黑曲霉 AN2 种曲，制得纯菌株大曲；拌入 0.2%商业米曲霉种曲后，再分别拌入 0.2%的黑曲霉 AN1 种曲和黑曲霉 AN2 种曲，制得混合大曲 1 和混合大曲 2。拌匀后置于霉菌培养箱，初始温度 30 ℃，湿度 95%，培养 16 h 后，进行第一次翻曲；将温度降至 28 ℃培养 4 h 后，进行第二次翻曲；出曲前 6 h，将培养箱湿度降至 80%，之后每隔 2 h 降低湿度 5%，培养到 44 h 出曲。

1.2.5 种曲和大曲酶系测定方法

1.2.5.1 种曲和大曲酶液的制备

根据 Kaewkrod[14]的方法略微修改进行酶液提取，准确称取 2.50 g 种曲或大曲至装有 30 mL 无菌水的锥形瓶中，于 40 ℃、120 r/min 振荡提取 30 min，用 4 层纱布过滤后用无菌水定容到 50 mL，所得粗酶液用于后续酶活测定。

1.2.5.2 中、酸性蛋白酶测定方法

测定方法参照 GB/T 28715-2012。1 g 大曲在 40 ℃，pH 7.2 条件下，每分钟水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸，即为 1 个中性性蛋白酶酶活力单位（U/g）；在 40 ℃，pH 3.0 条件下 1 min 水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸，即为 1 个酸性蛋白酶酶活力单位（U/g）。

1.2.5.3 糖化酶测定方法

测定方法采用 DNS 法[15]。1 g 大曲在 40 ℃，pH 4.6 条件下，1 h 水解可溶性淀粉产生 1 mg 葡萄糖，即为一个糖化酶酶活力单位（U/g）。

1.2.5.4 *β*-葡萄糖苷酶测定方法

测定方法参考 Peng[16]。1 g 大曲在 pH 4.8，50 ℃条件下，1 min 内 1 mL（1g）*β*-D-葡萄糖苷酶水解底物对硝基苯基-*β*-D-葡萄糖苷产生 1 μmol 的对硝基苯酚所需的酶量。

1.2.5.5 氨肽酶测定方法

测定方法参考雷芬芬[17]。1 g 大曲在 40 ℃，pH 8.0 的条件下，每分钟水解 L-亮氨酸-对硝基苯胺生成 1 μmol 对硝基苯胺所需的酶用量定为一个酶活单位。

1.3 数据分析

采用 MEGA-X 制作菌种 ITS 基因序列系统进化树；采用 Excel 2017 进行数据处理和图表绘制，数据表示为平均值±标准差；采用 Origin 8.0 软件和 SIMCA 14.1 软件对种曲酶系数据进行分析。

2 结果与讨论

2.1 传统发酵酱油酱醪中霉菌的筛选与鉴定

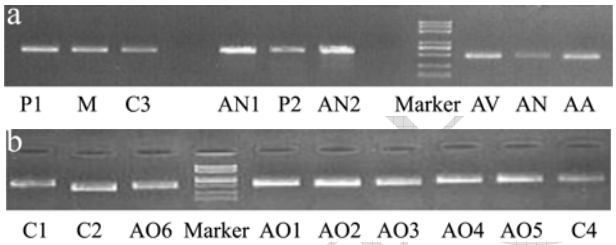


图 1 酱醪霉菌 ITS PCR 扩增结果

Fig.1 ITS PCR results of the molds isolated from *moromi*

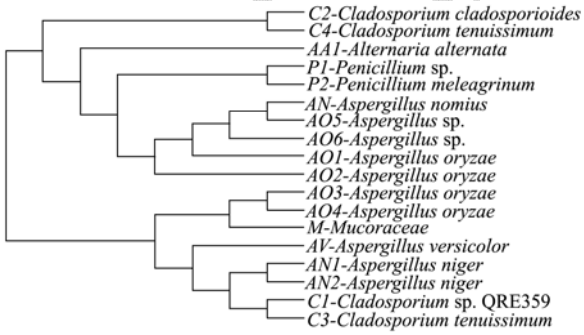


图 2 酱醪霉菌基因序列系统进化树

Fig.2 Phylogenetic tree of molds isolated from *moromi* based on their gene

从传统发酵酱油酱醪中总共筛选得到 49 株霉菌，根据其在菌落的形态差异，挑选其中 18 株霉菌进行 ITS 分子鉴定分析。18 株酱醪霉菌的琼脂糖凝胶电泳结果如图 1 所示，将测定结果与 NCBI 数据库进行同源性比较。并根据鉴定结果构建 18 株霉菌基因序列系统进化树，如图 2 所示。在进化树中，枝长累积距离越近的样本差异越小，反之差异越大。青霉属、曲霉属的差异较小，但是不同枝孢菌的差异较大。

18 株不同霉菌的菌落形态特征和鉴定结果如表 1 所示，鉴定为 4 种霉菌菌属，包括青霉属，枝孢霉属，曲霉属以及链格孢霉属，其中包括 2 株青霉（标记为 P1、P2）、4 株枝孢霉（标记为 C1、C2、C3 和 C4）、6 株米曲霉（标记为 AO1、AO2、AO3、AO4、AO5 和 AO6）、1 株毛霉（标记为 M）、1 株花斑曲霉（标记为 AV）、2 株黑曲霉（标记为 AN1 和 AN2）、1 株红绶曲霉（标记为 ANo）以及 1 株链格孢菌（标记为 AA1）。由此可见，虽然酱油原始菌种仅采用米曲霉，但随着发酵的进行，霉菌的种类越来越丰富，且酱醪中分离的霉菌以曲霉为主。

表 1 18 株霉菌的菌落形态特征和鉴定结果

Table 1 Morphological characteristics and identification results of 18 mold strains

菌种编号	菌种颜色	表面	质地	鉴定结果
P1	白色	疏松	毡状	青霉菌(*Penicillium sp.*)
P2	中间青绿色，边缘白色	致密	绒毛状	斑点青霉(*Penicillium meleagrinum*)
C1	中间暗绿色，边缘白色	致密	毡状	枝孢菌 QRF359(*Cladosporium sp. QRF359*)
C2	中间暗绿色，边缘白色	致密	毡状	枝孢样枝孢霉(*Cladosporium cladosporioides*)
C3	中间淡绿色，边缘白色	致密	毡状	极细枝孢菌(*Cladosporium tenuissimum*)
C4	中间黄绿色，边缘白色	致密	毡状	极细枝孢菌(*Cladosporm tenuissimum*)
AO1	中间绿黄色，边缘白色	疏松	絮状	米曲霉(*Aspergillus oryzae*)
AO2	绿黄色	疏松	絮状	米曲霉(*Aspergillus oryzae*)
AO3	绿黄色	疏松	絮状	米曲霉(*Aspergillus oryzae*)
AO4	绿黄色	疏松	絮状	米曲霉(*Aspergillus oryzae*)
AO5	绿黄色	疏松	絮状	米曲霉(*Aspergillus oryzae*)
AO6	绿黄色	疏松	絮状	米曲霉(*Aspergillus oryzae*)
M	白色	疏松	绒毛状	毛霉(*Mucor*)
AV	淡黄色	致密	毡状	花斑曲霉(*Aspergillus versicolor*)
AN1	黑色	疏松	絮状	黑曲霉(*Aspergillus niger*)
AN2	黑色	疏松	絮状	黑曲霉(*Aspergillus niger*)
ANo	黄绿色	疏松	絮状	红绶曲霉(*Aspergillus nomius*)
AA1	中间暗绿色，边缘灰色	致密	绒毛状	链格孢菌(*Alternaria alternate*)

2.2 不同霉菌的酶系特征

表 2 18 株霉菌种曲的酶活结果

Table 2 Enzymatic activities of seed *koji* cultured by 18 mold strains

酶活（U/g 干重）	中性蛋白酶	酸性蛋白酶	糖化酶	*β*-葡萄糖苷酶	氨肽酶
P1	1350.39±81.20	576.89±60.01	368.39±31.95	243.53±17.05	50.67±6.25
P2	946.73±40.02	425.29±25.84	395.40±27.70	305.36±8.61	41.33±2.46
C1	32.32±7.65	73.13±19.52	29.28±28.34	44.59±2.04	2.65±0.16
C2	44.84±4.68	107.56±1.55	87.18±8.34	114.40±2.33	4.80±0.17
C3	36.44±0.78	32.24±3.15	ND[1]	31.05±0.89	2.02±0.06
C4	62.80±9.25	ND	122.31±15.06	12.26±0.75	0.84±0.09
AO1	2076.35±38.13	440.35±1.59	1050.41±103.48	31.82±0.33	188.54±10.05
AO2	1138.85±76.46	314.10±6.40	317.69±25.70	ND	401.47±12.34
AO3	1488.29±53.48	744.93±19.11	984.94±36.76	75.22±0.61	339.33±16.91
AO4	686.87±45.06	284.20±23.10	1068.38±29.83	86.68±0.50	26.61±2.96
AO5	1683.43±76.19	155.80±21.56	928.23±71.45	71.56±9.25	698.65±50.28
AO6	1750.34±17.61	1226.10±115.40	1025.8±53.01	60.39±3.44	377.46±1.40
M	418.14±12.08	1238.64±39.36	271.53±17.05	ND	ND
AV	44.24±11.53	28.43±31.09	157.39±1.11	315.22±7.90	33.59±3.86
AN1	45.53±6.72	2479.59±195.95	1120.94±27.31	343.02±14.00	0.36±0.22
AN2	42.28±2.63	1786.33±150.29	706.64±33.94	267.36±7.89	122.79±8.47
ANo	1831.09±29.04	716.40±60.70	834.21±8.28	63.31±5.74	671.03±31.30
AA	1122.86±73.17	213.82±17.17	519.38±44.20	118.17±2.86	260.23±18.42

注：上标 1 未检测到。

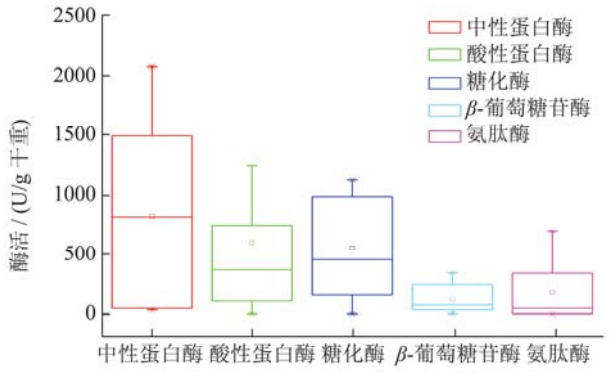


图 3 18 株霉菌种曲酶活的箱线图

Fig.3 The box tail of enzymatic activities of seed *koji* cultured by 18 mold strains

18 株霉菌种曲的中性蛋白酶、酸性蛋白酶、糖化酶、*β*-葡萄糖苷酶和氨肽酶酶活结果和箱线图如表 2 和图 3 所示。箱线图从上到下的每条线，分别代表样本的最大值、上四分位数、中位数、下四分位数和最小值，圆点代表样本的均值，箱线越大表示不同霉菌种曲的酶系差异也越大。由图 3 可知，不同霉菌种曲的各类酶活存在较大差异，其中中性蛋白酶差异最明显，而 *β*-葡萄糖苷酶的差异不大。

整体上看，18 株霉菌种曲的中性蛋白酶活力最高，活力差距也最大，酶活力在 32.32 U/g~2076.35 U/g，平均值为 822.32 U/g，其中米曲霉 AO1 的中性蛋白酶酶活最高，达到 2076.35 U/g，枝孢霉 C1 的中性蛋白酶酶活最低，仅为 32.32 U/g；其次是酸性蛋白酶（602.43 U/g）和糖化酶酶活（554.90 U/g），而 *β*-葡萄糖苷酶和氨肽酶酶活较低，*β*-葡萄糖苷酶在 0 U/g~343.02 U/g，均值为 121.33 U/g；氨肽酶在 0 U/g~698.65 U/g，均值为 179.02 U/g。

各类霉菌优势酶活各有特色，其中黑曲霉 AN1 的酸性蛋白酶、糖化酶和 *β*-葡萄糖苷酶酶活均为最高，酶活力分别为 2479.59 U/g、1120.94 U/g 和 342.02 U/g，这与报道中[18]黑曲霉高产酸性蛋白酶和糖化酶结果相符。米曲霉 AO1 的中性蛋白酶酶活和米曲霉 AO5 的氨肽酶酶活最高，酶活力分别为 2076.35 U/g 和 698.65 U/g，这与报道中[18]米曲霉的中性蛋白酶酶活突出一致。而枝孢霉的各类酶活均较低，其中枝孢霉 C1 的中性蛋白酶最低，枝孢霉 C4 没有检测到酸性蛋白酶，枝孢霉 C3 没有检测到糖化酶，枝孢霉是腐生真菌，属于室内和室外都常见的霉菌，并广泛存在土壤和空气中，某些动物的粪便、腐木和腐烂水果中[19]，在酱醪中检测到该菌株可能是室外空气落入，Yang 等人[10]在传统酱油中也筛选到该霉菌，但是该菌并非可食用真菌，根据本研究的酶系结果推测其在酱油生产中的应用价值不高。而毛霉 M 具有较高的酸性蛋白酶活力，这与报道中[20,21]毛霉高产蛋白酶的特性相符。

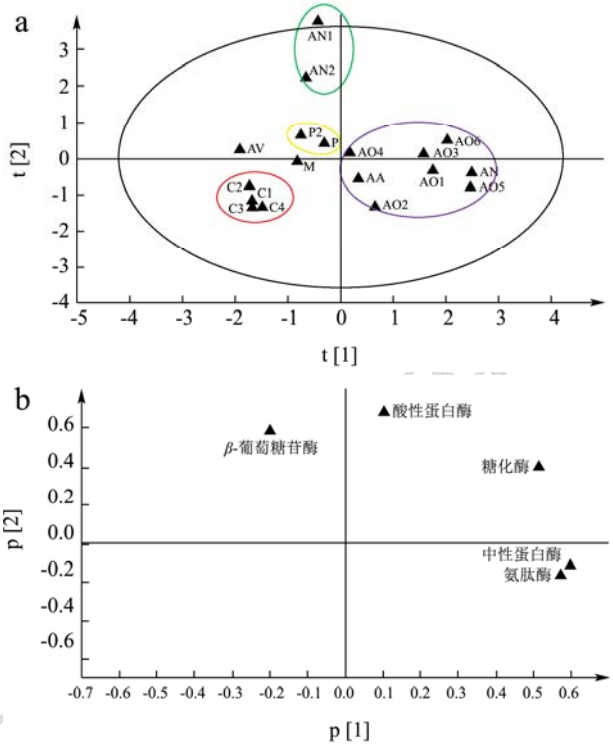


图 4 18 株霉菌种曲酶活主成分分析图（a）和载荷图（b）

Fig.4 Principal component analysis（PCA）score plot (a) and loading plot (b) of enzymatic activities of seed *koji* cultured by 18 mold strains

为了进一步比较不同霉菌种曲的酶系差异，对酶活力数据进行主成分分析，得分图和载荷图如图 4（a）和（b）所示。由图 4（a）可知，两个主成分可以代表 79.60%的变量信息，相同霉菌属的种曲酶系相近，即菌种的酶系特点与菌种类型密切相关。拟青霉是一株可以产糖化酶的菌株，并被应用到黄酒生产中[22,23]，这与本研究中青霉产糖化酶结果相符，具有一定的研究价值，但是该菌株尚未被应用到酱油生产。黑曲霉种曲的酸性蛋白酶和 *β*-葡萄糖苷酶突出，这与报道[18]中黑曲霉高产酸性蛋白酶结果相符。米曲霉、红绶曲霉和链格孢菌种曲的中性蛋白酶、糖化酶和氨肽酶突出，米曲霉是酱油酿造常用菌株，红绶曲霉在工业生产中具有降解苯酚和甲醛的特性[24]，而链格孢菌是一种导致多种植物病害的微生物，枝孢霉则主要存在于土壤和空气中[19]，但是这几种菌均不是食用菌，尚未被应用到食品生产。

2.3 纯菌种制曲和混合制曲的酶系特征

基于酶活力研究的结果和文献报道，本研究鉴定的菌种中仅米曲霉、毛霉和黑曲霉有应用到酱油生产的报道。黑曲霉种曲的酸性蛋白酶和 *β*-葡萄糖苷酶突出，与米曲霉的酶活形成互补，因此选用黑曲霉 AN1

和 AN2 进行进一步混合制曲研究。

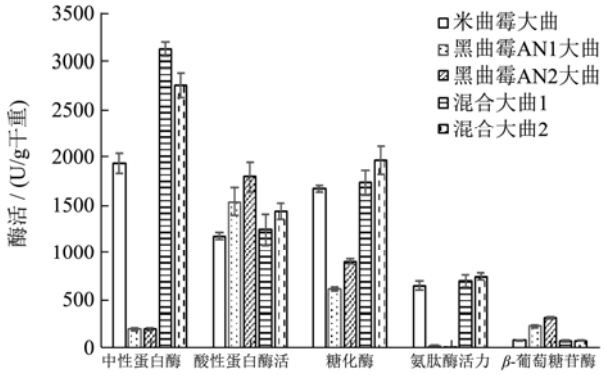


图 5 纯菌种大曲和混合大曲的酶活情况

Fig.5 Enzymatic activities of pure *koji* and mixed *koji*

纯菌种大曲和混合大曲酶活结果如图 5 所示，结果表明，米曲霉成曲的中性蛋白酶、糖化酶和氨肽酶酶活高于两个黑曲霉成曲，而黑曲霉成曲的酸性蛋白酶和 β-葡萄糖苷酶酶活较突出。整体而言，米曲霉和黑曲霉 AN2 混合制曲效果较好。中性蛋白酶与酸性蛋白酶分别比米曲霉成曲提高 42.84%和 22.27%，酶活力达到了为 2757.98 U/g 和 1433.08 U/g；糖化酶和氨肽酶分别提高 17.54%和 15.10%，酶活力达到 1965.07 U/g 和 742.89 U/g。李大锦等[25]发现米曲霉和黑曲霉混合制曲可以提高酸性蛋白酶约 2 倍；李保英[5]也发现米曲霉和黑曲霉混合制曲，酸性蛋白酶和糖化酶酶活比米曲霉成曲分别提高了 34.6%和 9.3%。因此，本研究筛选到的黑曲霉 AN2 具有一定的应用价值。

3 结论

从传统发酵酱油酱醪中分离纯化得到 49 株霉菌，对其中形态差异较大的 18 株菌株进行了基因鉴定，分别属于青霉属，枝孢霉属，曲霉属以及链格孢霉属。研究发现，菌种的酶系特点与菌种类型密切相关，其中黑曲霉的酸性蛋白酶和 β-葡萄糖苷酶突出，米曲霉、红绶曲霉和链格孢菌的中性蛋白酶、糖化酶和氨肽酶活力突出。本研究选用两株黑曲霉分别与商业米曲霉进行混合制曲，结果发现黑曲霉 AN2 与米曲霉混合制曲的效果较好。相比于米曲霉纯菌种大曲，中性蛋白酶、酸性蛋白酶、糖化酶和氨肽酶分别提高 42.84%、22.27%、17.54%和 15.10%，说明黑曲霉 AN2 具有一定的应用价值，此外，其他非常见食用菌的作用也有待进一步论证，它们对酱油品质的影响值得深入的研究。

参考文献

[1] 张艳芳.多菌株制曲促进酶系优化与提高酱油质量的研究[D].无锡:江南大学,2009
ZHANG Yan-fang. Study on optimzing enzyme system by using multi-strains during koji making and improving quality of soy sauce [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2009

[2] 李荔,童星.酱油酿造中米曲霉和酱油曲霉复合制曲的研究[J].中国调味品,2018,43(5):145-148
LI li. TONG xing. Study on mixed koji made by *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae* in soy sauce brewing [J]. China Condiment, 2018, 43(5): 145-148

[3] 闫冬梅,邓远均,刘凯,等.采用多菌种酿造酱油技术及应用于工业生产的研究进展[J].工艺技术,2018,1:142-146
YAN Dong-mei, DENG Yuan-jun, LIU Kai, et al. Researc progres on the application of multi-strain to brewing soy sauce and its application in industrial production [J]. Process Technology, 2018, 1:142-146

[4] 张齐军.双菌株在酱油制曲中的应用[J].中国调味品,2015, 40(2):77-80
ZHANG qi-jun. Application of two strains in koji-making of soy sauce fermentation [J]. China Condiment, 2015, 40(2): 77-80

[5] 李保英.多菌种酱油制曲工艺及其对酱油风味影响的研究[D].杭州:浙江工商大学,2013
LI Bao-ying. Study on kiji-making process of soy sauce with multi-strain and ITS impact on soy sauce flavor [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2013

[6] Ishiharn Kazuo. Development of a soy sauce brewing method using arnixed koji-makingsystem of two koji molds [J]. Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi, 1996, 9: 1063-1074

[7] 李莉.三菌种混合制曲提高酱油蛋白质利用率的研究[J].中国调味品,2010,9:60-65
LI li. Study on improving the utilization ratio of protein and enhancing flavor in soy sauce brewing [J]. China Condiment, 2010, 9: 60-65

[8] 张凤英,隋明.响应面法优化酱油蛋白质利用率的发酵条件[J].食品研究与开发,2019,6:52-56
ZHANG feng-ying, SUI Ming. Optimization of fermentation conditions of protein utilization in soy sauce using response surface methodology [J]. Food Research and Development, 2019, 6: 52-56

[9] 陈之瑶.红曲霉与米曲霉混合制曲对发酵离盐稀态酱油影响的研究[D].广州:华南理工大学,2014
CHEN Zhi-yao. The effects of making koji with mixed strains on physicochemical properties and sensory evaluation of high-salt and liquid-state soy sauce [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2014

[10] Yang Yang, Deng Yue, Jin Yulan et al. Dynamics of microbial

community during the extremely long-term fermentation process of a traditional soy sauce [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2017, 97(10): 3220-3227

[11] Wei Q Z, Wang H B, Chen Z X et al. Profiling of dynamic changes in the microbial community during the soy sauce fermentation process [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(10): 9111-9119

[12] Jung J Y; Lee S H; Jeon C O. Microbial community dynamics during fermentation of doenjang-meju, traditional Korean fermented soybean [J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 185: 112-120

[13] 高献礼.高盐稀态酱油在发酵和巴氏杀菌过程中风味物质的形成和变化的研究[D].广州:华南理工大学,2010
GAO Xian-li. Study on the formation and changes of flavor compounds in high-salt and diluted-state soy sauce during fermentation and pasteurization [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2010

[14] Aniwat Kaewkrod, Activities of macerating enzymes are useful for selection of soy sauce koji [J]. LWT - Food Science and Technology, 2018, 89: 735-739

[15] 王晓丹,胡宝东,班世栋,等.酱香型大曲酶系与大曲中微生物产酶关系的研究[J].酿酒科技,2015,9:1-7
WANG Xiao-dan, HU Bao-dong, BAN Shi-dong, et al. The relations between enzyme system in jiangxiang daqu and enzyme produced by microbial metabolism [J]. Liquor-making Science & Technology, 2015, 9: 1-7

[16] Mingye Peng, Jingyi Liu, Yao Huang et al. Effects of a mixed koji culture of Aspergillus oryzae HG-26 and *Aspergillus niger* HG-35 on the levels of enzymes, antioxidants and phenolic compounds in soy sauce during the fermentation process [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2017, 52: 1585-1593

[17] 雷芬芬.海洋来源 *Bacillus licheniformis* SWJS3 所产氨肽酶的研究及应用[D].广州:华南理工大学,2017
LEI Feng-feng. An aminopeptidase from marine *Bacillus licheniformis* SWJS33 and its application [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2017

[18] 王宪斌,冯霞,刘义,等.多菌种制曲在酱油发酵中的研究进展[J].食品与发酵科技,2016,52(3):60-64
WANG xian-bin, FENG Xia, LIU Yi. Research progress of multi-strains koji in soy sauce fermentation [J]. Food and Fermentation Technology, 2016, 52(3): 60-64

[19] 桑红,邓德权,何威.枝孢样枝孢霉的研究概况[J].中国真菌学杂志,2010,1:57-60
SANG Hong, DENG De-quan, HE Wei. Survey of cladosporium [J]. Chineae Journal of Mycology, 2010, 1: 57-60

[20] He Bin; Li Haoran; Hu Zhihong. Difference in microbial community and taste compounds between *Mucor*-type and *Aspergillus*-type douchi during koji-making [J]. Food Research International, 2019: 136-143

[21] 胡永金,任淑娣,王知荣,等.毛霉 40899 和毛霉 M/T 混合发酵腐乳的研究[J].轻工学报,2019,1:1-10
HU Yong-jin, Ren Shu-di, Wang Zhi-rong. Study on sufu fermented by Mucor 40899 and Mucor M/T [J]. Journal of Light Industry, 2019, 1: 1-10

[22] 肖长清.一株产生淀粉糖化酶的拟青霉[J].湖北第二师范学院学报,2008,2:43-45
XIAO Chang-qing. A strain of *Paecilomyces spp*. producing glucoamylase [J]. Journal of Hubei University of Education, 2008, 2: 43-45

[23] 刘双平,谢雅茜,江正强,等.嗜热拟青霉糖化酶的性质及其在黄酒酿造中的应用[J].酿酒科技,2019:1-8
LIU Shuang-ping, XIE Ya-qian, JIANG Zheng-qiang, et al. Properties of a glucoamylase (PtGA15) from *Paecilomyces thermophila* and its application in yellow wine production [J]. Liquor-making Science & Technology, 2019: 1-8

[24] 彭玲玲.红绶曲霉 *Aspergillus nomius* SGFA1 降解苯酚和甲醛的特性研究[D].哈尔滨:哈尔滨师范大学,2014
PENG Ling-ling. Study on phenol and formaldehyde degrading characteristics of the fungus *Aspergillus nomius* SGFA1 [D]. Harbin: Harbin Normal University, 2014

[25] 李大锦,王汝珍.提高低盐固态发酵法酱油风味的实用技术(下)[J].中国调味品,2006,8:25-30
LI Da-jin, WANG Shu-zhen. Practical techniques for improving the flavor of low-salt solid-state fermentation soy sauce (2) [J]. China Condiment, 2006, 8: 25-30