

# 甘油与鲁氏酵母共固定在高盐稀态酱油 酿造中的应用

吴惠玲<sup>1,3</sup>, 魏鲁宁<sup>1,3</sup>, 高向阳<sup>2</sup>, 潘海朋<sup>2</sup>, 袁国新<sup>1,3</sup>, 颜喆<sup>1,3</sup>, 周紫琦<sup>2</sup>, 胡文锋<sup>2</sup>

(1. 广东珠江桥生物科技股份有限公司, 广东中山 528415) (2. 华南农业大学食品学院应用微生物研究室, 广东广州 510642) (3. 广东省食品生物工程技术研究开发中心, 广东广州 510640)

**摘要:** 本文旨在研究相容性溶质之一的甘油对高渗透压环境下鲁氏结合酵母的保护作用, 以及将甘油与鲁氏结合酵母共固定对高盐稀态酱油发酵的影响。添加不同浓度甘油至含 3 mol/L 氯化钠的 YPD 培养基中, 观察酵母菌生长情况。同时, 共固定甘油与鲁氏结合酵母, 应用于高盐稀态酱醪发酵。结果显示, 1.37 mmol/L 甘油即可有效缓解高盐环境对鲁氏结合酵母的生长抑制作用, 生长延滞期缩短达 4~6 h。高盐稀态酱油发酵中试结果显示, 与空白对照组相比, 试验组蛋白质转化率提高幅度达 2.23~5.64%, 头油中各理化指标平均提前 15 d 达到空白组相同水平。综上所述, 甘油作为一种相容性溶质可有效保护高盐环境下鲁氏结合酵母的生长繁殖, 及其在高盐稀态酱醪发酵中的代谢性能, 甘油与鲁氏结合酵母共固定技术能够提高酱油发酵的原料利用率、缩短发酵周期, 在酱油酿造领域具有一定的实际应用价值。

**关键词:** 酱油; 高盐稀态; 甘油; 鲁氏酵母; 共固定化; 相容性溶质; 蛋白质转化率

文章编号: 1673-9078(2013)8-1938-1942

## Co-immobilized Glycerol and *Zygosaccharomyces rouxii* Used in the Fermentation of High Salt Diluted-state Soy Sauce

WU Hui-ling<sup>1,3</sup>, WEI Lu-ning<sup>1,3</sup>, GAO Xiang-yang<sup>2</sup>, PAN Hai-peng<sup>2</sup>, YUAN Guo-xin<sup>1,3</sup>, YAN Zhe<sup>1,3</sup>, ZHOU Zi-qi<sup>2</sup>, HU Wen-feng<sup>2</sup>

(1. Pearl River Bridge Biotechnology Co. Ltd., Zhongshan 528415, China) (2. Laboratory of Applied Microbiology, College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China) (3. Research and Development Center of Food and Biological Engineering Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** The protective effect of glycerol, one of the compatible solutes, on *Zygosaccharomyces rouxii* in high osmotic pressure condition was studied and the growth of *Z. rouxii* was observed in 3 mol/L NaCl YPD mediums with different concentrations of glycerol. *Z. rouxii* and glycerol were co-immobilized and applied to the fermentation of high salt diluted-state soy sauce mash. The results indicated that, 1.37 mmol/L glycerol can relieve the inhibitory effect caused by high salinity on the growth of *Z. rouxii* efficiently, the lag phase in growth curve of *Z. rouxii* was shorten by 4~6 hours. Compared with the control group, the protein conversion rate of pilot-scale fermentation of soy sauce was increased by 2.23~5.64%, and the fermentation period of soy sauce was shorten by 15 days on average. It was concluded that glycerol could protect *Z. rouxii* under the high-salt conditions, and improve the metabolism rate of *Z. rouxii* in the fermentation of high salt diluted-state soy sauce mash. Co-immobilized glycerol with yeast can improve the utilization rate of raw materials and shorten the fermentation period, showing practical application potential in soy sauce brewing.

**Key words:** soy sauce; high salt diluted-state soy sauce; glycerol; *zygosaccharomyces rouxii*; co-immobilization; compatible solutes; protein conversion rate

高盐稀态酱醪发酵是我国高档酱油的主要生产方式之一<sup>[1]</sup>。高盐稀态发酵过程是由多种微生物和各种

收稿日期: 2013-03-28

基金项目: 广东省食品生物工程技术研究开发中心资助项目

作者简介: 吴惠玲 (1973-), 女, 博士, 工程师, 酱油酿造

通讯作者: 胡文锋 (1964-), 男, 副教授, 微生物发酵

酶联合作用完成的, 如酵母和乳酸菌的生长代谢作用, 酶水解作用等<sup>[2]</sup>。然而, 由于高盐分造成的高渗透压胁迫作用, 使得微生物代谢及酶活力受到极大抑制, 导致发酵原料利用率低及发酵周期过长, 产能低, 并影响企业经济效益。

因此, 采用现代生物技术提高高盐稀态酱油发酵

过程蛋白质转化率和缩短发酵周期成为人们研究的热点。Eukushima<sup>[3]</sup>证明,与传统发酵酱油相比,固定化发酵技术能获得风味较佳的酱油。然而单独固定微生物在酱油发酵中的作用效果有限,Hamada<sup>[4]</sup>等人利用固定化菌与游离菌进行对比发酵,结果显示,固定化发酵组未能显著提高酱油质量及蛋白质转化率水平。还有研究发现,微生物在高渗透压环境下能通过一种渗透调节系统缓解高渗胁迫。它们可以迅速集聚多种代谢物作为渗透压保护物质,也称相容性溶质<sup>[5-7]</sup>。相容性溶质是一些小分子有机代谢产物,具有高水溶性,无毒性,与微生物生长体系相容等特点。此外,相容性溶质还可稳定细胞膜结构,维持酶的功能稳定性和缓解高渗透压环境对酶的抑制作用<sup>[8-9]</sup>。甘油是酵母菌属主要的相容性溶质之一。在高盐等高渗环境下,酵母菌能迅速积累甘油以调整细胞渗透压平衡<sup>[10]</sup>,从而有利于维持酵母细胞正常形态结构和生长代谢作用。本文研究了甘油对高盐环境下鲁氏结合酵母生长繁殖的影响;并利用相容性溶质与固定化技术对酵母的双重保护,将鲁氏酵母与甘油共固定,应用于高盐稀态酱醪发酵,以期改善发酵酱油质量,提高原料利用率及缩短发酵周期。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 主要原料

菌种:鲁氏酵母(*Zygosaccharomyces rouxii*),华南农业大学食品学院应用微生物实验室。

酱油发酵中试所需成曲、粗盐:广东珠江桥生物科技股份有限公司提供。

#### 1.1.2 主要试剂及培养基

##### 1.1.2.1 主要试剂

甘油为食品级;海藻酸钠、无水氯化钙、氯化钠等均为分析纯。

##### 1.1.2.2 培养基

YPD培养基:相应盐浓度按实验需要添加NaCl。

##### 1.1.2.3 主要设备

高盐蒸汽灭菌锅, Yamato 有限公司; LRH-250A 生化培养箱, 广东医疗器械厂; SW-CJ-2FO 型超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; 紫外分光光度计, 上海精密仪器有限公司制造; BT00-100M 蠕动泵, 常州科健蠕动泵厂; GB204 型电子天平, 瑞典 Mettler Toledo 公司; KJ2200 型凯氏定氮仪, 丹麦福斯分析仪器有限公司。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 菌悬液的制备

试验菌株在 YPD 培养基斜面上活化, 然后接种于一定盐浓度的 YPD 液体培养基中, 29 °C 培养过夜。4000 r/min, 离心 10 min, 用无菌生理盐水洗涤三次, 配成 10% 的菌悬浮液, 放置 4 °C 备用。

### 1.2.2 甘油对鲁氏酵母菌耐盐极限的影响

取一系列试管编号, 添加不同浓度的 NaCl (3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0 mol/L), 用移液管吸取 5 mL YPD 液体培养基至试管中, 注入 100  $\mu$ L 培养过夜的菌悬液, 同时分别添加 0 mmol/L (0 mL/L)、0.69 mmol/L (0.5 mL/L)、1.37 mmol/L (1 mL/L)、2.74 mmol/L (2.0 mL/L) 的甘油。测定初始的 OD<sub>600nm</sub> 值和第 48 h 的 OD'<sub>600nm</sub> 的值, 细菌生长量为 (OD'<sub>600nm</sub> - OD<sub>600nm</sub>), 允许 OD<sub>600nm</sub> 偏差  $\pm$ 0.01。

### 1.2.3 甘油对鲁氏酵母菌生长情况的影响

取一系列的 50 mL 三角瓶按取出时间顺序编号, 用移液管吸取 20 mL YPD 到相应的瓶中。在 YPD 中含 3.0 mol/L NaCl 条件下, 添加甘油浓度分为 0、0.5、1、2.0 mL/L。用移液枪吸取 100  $\mu$ L 菌悬液接入各三角瓶中, 并测定零时的 OD<sub>600nm</sub> 值。各三角瓶放入恒温培养箱中, 200 r/min, 29 °C 摇床培养。按预先设置的时间取出三角瓶, 测定波长为 600 nm 时该时间的 OD 值。在分光光度计测定中需要用空白对照培养液来校正分光光度计的零点。

### 1.2.4 共固定化颗粒制备

取一定量的甘油, 按比例与制备的菌悬液混合均匀后与 3% 的海藻酸钠溶液混匀, 通过蠕动泵将混合液泵入 5% 的 CaCl<sub>2</sub> 溶液中制备凝胶颗粒, 并放置 24 h 进行固化, 然后 4 °C 保藏备用<sup>[11-12]</sup>。

### 1.2.5 发酵中试分组

以传统高盐稀态酱油酿造工艺为基础, 结合共固定化技术, 将渗透压保护剂甘油与鲁氏酵母共固定化后应用于酱油发酵中试。具体实施分组如下: 添加包埋有鲁氏酵母与甘油的共固定化试验组; 仅包埋鲁氏酵母菌株的试验组, 添加等量游离鲁氏酵母与甘油的试验组, 同时设置空白组, 每组 3 个平行。发酵三个月后对比各组氨基态氮、总酸、全氮含量及蛋白质转化率变化。

### 1.2.6 常规指标测定方法

氨基酸态氮 (总酸): 滴定法<sup>[13]</sup>。

全氮: 凯氏定氮法<sup>[13]</sup>。

## 2 结果与分析

## 2.1 不同浓度甘油对鲁氏酵母耐盐极限的影响

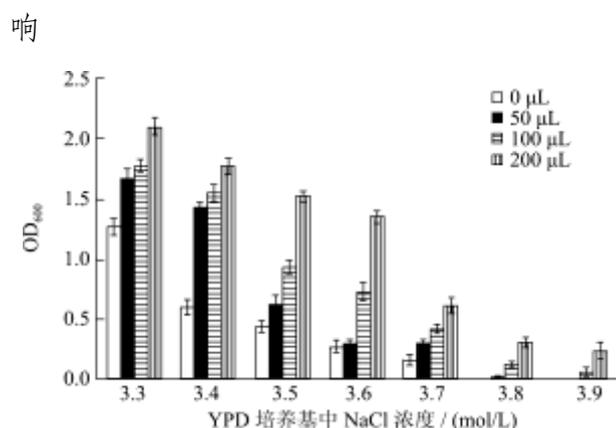


图1 鲁氏酵母在含有不同浓度甘油的YPD培养基中培养48h后的生长情况

Fig.1 Growth of *Z. rouxii* with different concentrations of glycerol in YPD medium after 48h culture

鲁氏酵母在YPD培养基中的生长量随着NaCl浓度的增加而迅速下降。当NaCl浓度达到3.6 mol/L时,鲁氏酵母在YPD培养基中生长受到极大抑制,培养36h后,细胞数量基本未见增加。

在不同盐浓度的YPD培养基中,当添加一定浓度的甘油后,鲁氏结合酵母菌株耐盐能力有了显著改善。在含有3.6 mol/L NaCl的培养基中,不添加甘油的对照组生长量 $OD_{600nm}max=0.228$ ,而添加了100 μL 10%的甘油后培养36 h,  $OD_{600nm}max=0.735$ ;添加200 μL 10%甘油,  $OD_{600nm}max=1.35$ 。同时,鲁氏酵母菌株的耐盐极限随着添加甘油的量的增加也不断提高,当添加100 μL 10%的甘油时,鲁氏结合酵母菌株的耐盐极限达到3.7 mol/L;添加200 μL 10%甘油时,其耐盐极限接近3.9 mol/L。以上结果表明在高盐环境下添加一定量的甘油对耐盐性鲁氏结合酵母有明显的保护效果。

## 2.2 不同浓度甘油对高盐环境下鲁氏酵母生长特性的影响

在高渗培养基中添加甘油可有效减弱高渗透压环境对鲁氏酵母生长繁殖的抑制作用,并可有效缩短其生长延滞期。与不添加甘油的对照组相比,在含有3.0 mol/L NaCl的YPD培养基中添加甘油试验组与空白对照组相比(未添加甘油),延滞期缩短了2~4 h,提前进入对数生长期。

## 2.3 高盐稀态酱油发酵中试各理化指标结果

及分析

### 2.3.1 发酵过程中总酸的变化

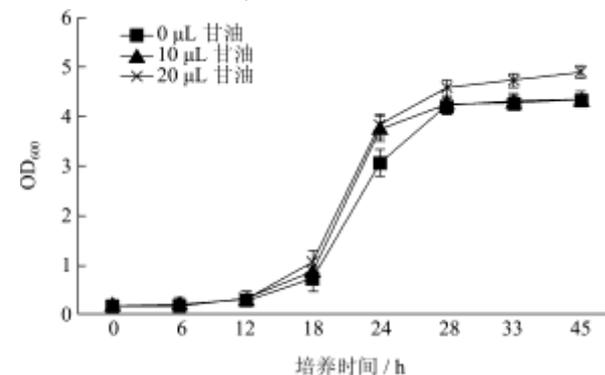


图2 含3.0 mol/L NaCl的YPD中添加不同浓度甘油对鲁氏酵母生长的影响

Fig.2 Growth of *Z. rouxii* with different concentrations of glycerol in YPD medium with 3.0 mol/L NaCl

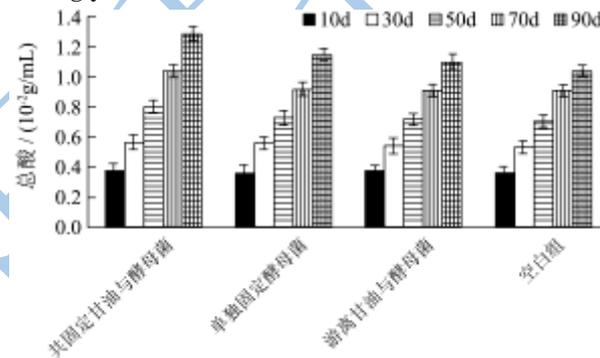


图3 高盐稀态酱油发酵过程添加共固定甘油与鲁氏酵母的总酸变化

Fig.3 Time course of total acids content during soy sauce mash fermentation process with the addition co-immobilized glycerol and *Zygosaccharomyces rouxii*

如图3所示,发酵90 d,共固定甘油与酵母菌组、单独固定酵母菌组与游离甘油与酵母菌组总酸含量分别为 $1.28 \times 10^{-2} \text{ g/mL}$  ( $P < 0.05$ ),  $1.15 \times 10^{-2} \text{ g/mL}$  ( $P < 0.05$ )和 $1.11 \times 10^{-2} \text{ g/mL}$  ( $P > 0.05$ ),均显著高于空白对照组 $1.04 \times 10^{-2} \text{ g/mL}$ 。以上结果显示,共固定化组较空白对照组提前15 d达到相应发酵水平,单独固定化组及游离组则提前约10 d达到相应发酵水平。

如图4所示,共固定甘油与酵母菌组、单独固定酵母菌组及游离甘油与酵母菌组发酵90 d时氨基酸态氮含量分别为 $0.73 \times 10^{-2} \text{ g/mL}$  ( $P < 0.05$ ),  $0.72 \times 10^{-2} \text{ g/mL}$  ( $P > 0.05$ )、 $0.71 \times 10^{-2} \text{ g/mL}$  ( $P > 0.05$ ),较空白对照组 $0.71 \times 10^{-2} \text{ g/mL}$ 有显著提高。与空白对照组相比,共固定组氨基酸态氮含量提前20 d左右达到相应发酵水平,单独固定酵母菌组及游离甘油与酵母菌试验组均

提前约 10 d 达到空白对照组相应发酵水平。

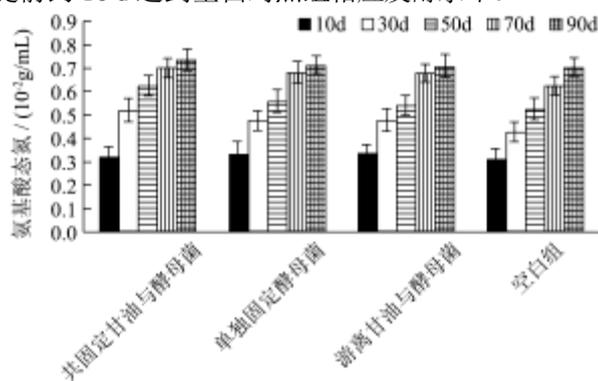


图 4 高盐稀态酱醪发酵过程添加共固定甘油与鲁氏酵母的氨基酸态氮含量变化

Fig.4 Time course of the production of amino acid nitrogen during soy sauce mash fermentation process with the addition of co-immobilized glycerol and *Zygosaccharomyces rouxii*

结果表明，共固定化技术与甘油能有效保护高盐环境下鲁氏酵母代谢活性，维持其较高的代谢性能。

### 2.3.2 头油中氨基酸态氮含量对比

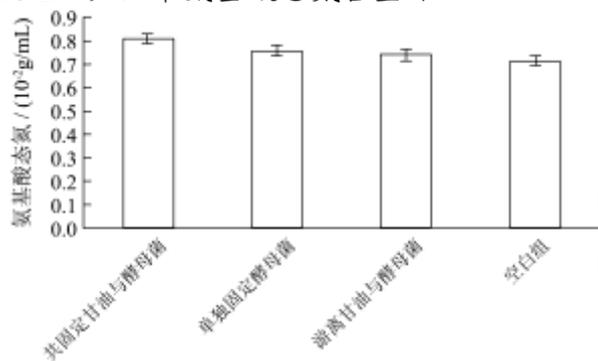


图 5 各试验组头油中氨基酸态氮含量对比

Fig.5 The contrast of nitrogen amino acid content of the first soy sauce in each experimental groups

如图 5 所示，各试验组头油中氨基酸态氮含量均高于空白对照组。共固定甘油与酵母菌组、单独固定酵母菌组及游离甘油与酵母菌组发酵头油中氨基酸态氮含量分别为  $0.81 \times 10^{-2}$  g/mL， $0.76 \times 10^{-2}$  g/mL， $0.74 \times 10^{-2}$  g/mL，较空白对照组  $0.71 \times 10^{-2}$  g/mL 分别提高了 13.18% ( $P < 0.05$ )、6.17% ( $P < 0.05$ ) 及 3.51% ( $P < 0.05$ )。

### 2.3.3 头油中全氮含量对比

如图 6 所示，各试验组中头油全氮含量均高于空白对照组。共固定甘油与酵母菌组、单独固定酵母菌组及游离甘油与酵母菌组发酵头油中氨基酸态氮含量分别为  $1.56 \times 10^{-2}$  g/mL， $1.42 \times 10^{-2}$  g/mL， $1.38 \times 10^{-2}$  g/mL，较空白对照组  $1.32 \times 10^{-2}$  g/mL 分别提高 18.03% ( $P < 0.05$ )、7.35% ( $P < 0.05$ ) 及 4.55% ( $P < 0.05$ )。共固定甘油与酵母菌组与单独固定酵母菌试验组及游

离甘油与酵母菌试验组相比，头油中全氮含量分别提高了 9.95% 和 12.90%。

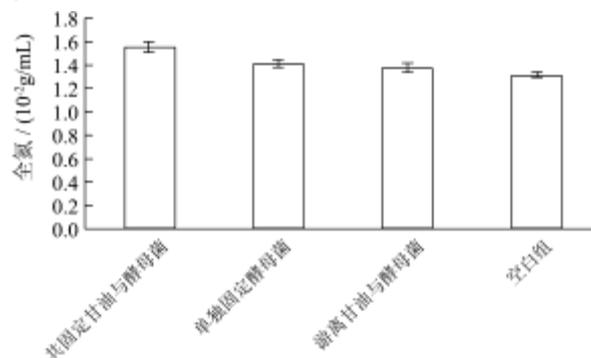


图 6 各试验组头油中全氮含量对比

Fig.6 The contrast of total nitrogen of the first soy sauce in each experimental group

### 2.3.4 头油蛋白质转化率

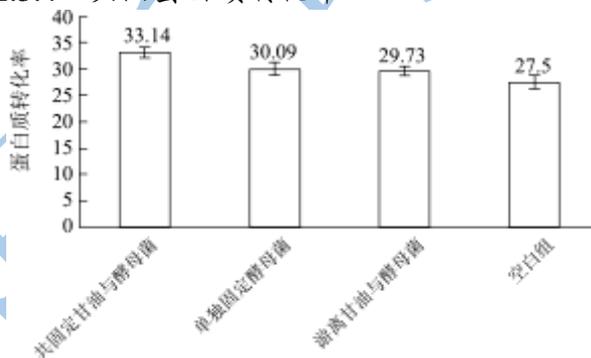


图 7 各试验组头油蛋白质转化率

Fig.7 The protein conversion ration of the first soy sauce in each group

由图 7 可知，共固定甘油与酵母菌组、单独固定酵母菌组及游离甘油与酵母菌组头油蛋白质转化率均高于空白对照组，分别为 33.14%、30.09% 和 29.73%，较空白对照组 27.50% 分别提高 5.64% ( $p < 0.05$ )、2.59% ( $p < 0.05$ ) 和 2.23% ( $p < 0.05$ )。试验结果显示，单独固定酵母菌及添加游离甘油及酵母菌均能显著改善发酵过程头油蛋白质转化率，其中，共固定甘油与酵母菌组蛋白质转化率提高幅度最大，较另外两组，分别提高 3.05% ( $p < 0.05$ ) 和 3.41% ( $p < 0.05$ )。

## 3 结论

3.1 通过对鲁氏酵母的生长特性的研究，发现在高渗透压环境下仅 1.37 mmol/L 渗透压保护剂甘油即能有效提高鲁氏结合酵母耐盐能力，并缩短其延滞期，显著缓解了高渗透压环境对鲁氏酵母的抑制作用，对其在实际生产中的推广应用有深远意义。

3.2 结合共固定化技术，共固定鲁氏酵母与甘油，并应用于高盐稀态酱油发酵中试，对比发酵过程各理化

指标含量,各试验组显著优于空白组,且添加甘油试验组头油蛋白质转化率较未添加试验组转化率提高了近3.05%。说明在实际生产中,渗透压保护剂的使用对提高生产效率有显著的作用。

### 参考文献

- [1] 行业标准:SB/T 10312-1999, 高盐稀态发酵酱油酿造工艺规程[S]  
Industrial Standard: SB/T 10312-1999, The Process Procedures of High Salt Diluted-state Soy Sauce Fermentation [S]
- [2] Kim J S, Lee Y S. A study of chemical characteristics of soy sauce and mixed soy sauce: chemical characteristics of soy sauce [J]. *European Food Research and Technology*, 2008, 227: 933-944
- [3] Fukushima Y, Okamura K, Imai K, et al. A new immobilization technique of whole cells and enzymes with colloidal silica and alginate [J]. *Biotechnology and bioengineering*, 1988, 32(5): 584-594
- [4] Hamada T, Sugishita M, Motai H. Contributions of immobilized and free cells of salt-tolerant *Zygosaccharomyces rouxii* and *Candida versatilis* to the production of ethanol and 4-ethylguaiacol [J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 1990, 33: 624-628
- [5] 赵百锁,杨礼福,王磊,等.中度嗜盐菌相容性溶质机制的研究进展[J].*微生物学报*,2007,47(5):937-941  
Zhao B S, Yang L F, Wang L, et al. Study progress on compatible solutes in moderately halophilic bacteria [J]. *Acta Microbiologica Sinica*,2007, 47(5): 937-941
- [6] Klahn S, Hagemann M. Compatible solute biosynthesis in cyanobacteria [J]. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(3): 551-562
- [7] Smiatek J, Harishchandra R K, Ruber O, et al. Properties of compatible solutes in aqueous solution [J]. *Biophysical Chemistry*, 2012, 160: 62-68
- [8] Chen H H, Murata N. Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications [J]. *Plant, Cell & Environment*,2011,34:1-20
- [9] Borges N, Ramos A, Raven N D.H, et al. Comparative study of the thermostabilizing properties of mannosylglycerate and other compatible solutes on model enzymes [J]. *Extremophiles*, 2002, 6: 209-216
- [10] 余秉琦,诸葛健.酵母细胞对高渗环境的适应与胞内甘油积累[J].*中国生物工程杂志*,2003,23(2):25-28  
Yu B Q, Zhu G J. Hyperosmoadaptation of Yeast Cells and Intracellular Accumulation of Glycerol [J]. *China Biotechnology*, 2003, 23(2): 25-28
- [11] Suriyawattaakul L, Surareungchai W, Sritongkam P, et al. The use of co-immobilization of *Trichosporon cutaneum* and *Bacillus licheniformis* for a BOD sensor [J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2002, 59: 40-44
- [12] Olcer Z, Tanriseven A. Co-immobilization of dextransucrase and dextranase in alginate [J]. *Process Biochemistry*, 2010, 45: 1645-1651
- [13] 国家标准:GB 18186-2000,中华人民共和国国家标准:酿造酱油[S]  
Government Standard: GB 18186-2000, National Standards of the People's Republic of China - Brewing Soy Sauce [S]