

# 酱油酿造中米曲霉与风味酵母协同制曲的研究

刘晶晶<sup>1</sup>, 胡勇<sup>1</sup>, 陈梦<sup>1</sup>, 陈世贵<sup>2</sup>, 付彩霞<sup>2</sup>, 汪超<sup>1</sup>, 陈雄<sup>1</sup>, 徐宁<sup>1</sup>, 李冬生<sup>1</sup>

(1. 湖北工业大学, 工业发酵湖北省协同创新中心, 湖北省食品发酵工程技术研究中心, 湖北武汉 430068)

(2. 湖北土老憨调味食品股份有限公司, 湖北宜昌 44300)

**摘要:** 本文通过添加一株嗜盐产香酵母菌(鲁氏酵母)与米曲霉协同制曲, 探讨制曲过程中酶系、各项理化指标及风味与酵母代谢调控的相关性。动态监测制曲过程中酵母菌落数、米曲霉孢子数、酶系活力、理化指标的变化规律及采用 GC-MS 对成曲进行挥发性成分分析。结果表明, 当酵母的添加量为  $1.5 \times 10^6$  个/g 曲料, 米曲霉接种量为 0.15% (*m/m*) 时, 米曲霉孢子数无明显变化, 中性蛋白酶活与对照组相当, 36 h 时达到 3100 U/g,  $\alpha$ -淀粉酶活较对照组降低了 22%, 糖化酶活与对照组相比增加了 7%, 氨肽酶活、酸性羧肽酶活与对照组无明显差异。制曲结束时对照组与添加酵母氨基态氮和还原糖含量基本相近, 有机酸含量低于对照。添加酵母和对照组成曲中分别检测出 32 种, 23 种挥发性风味物质。综合分析知, 接种一定量的酵母菌协同制曲并未对米曲霉生长及酶系产生显著影响, 但改善了曲料的风味品质。

**关键词:** 风味酵母; 协同制曲; 酶活力; 挥发性成分

文章编号: 1673-9078(2015)9-230-237

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.9.038

## Preparation of Koji Using *Aspergillus oryzae* and a Halophilic Aromatic Yeast

LIU Jing-jing<sup>1</sup>, HU Yong<sup>1</sup>, CHEN Meng<sup>1</sup>, CHEN Shi-gui<sup>2</sup>, FU Cai-xia<sup>2</sup>, WANG Chao<sup>1</sup>, CHEN Xiong<sup>1</sup>, XU Ning<sup>1</sup>,  
LI Dong-sheng<sup>1</sup>

(1. Hubei Collaborative Innovation Center of Industrial Fermentation, Research Center of Food Fermentation Engineering and Technology of Hubei, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China) (2. Hubei Tulaohan Flavouring and Food Co., LTD, Yichang 44300, China)

**Abstract:** A halophilic aromatic yeast (*Zygosaccharomyces rouxii*) was added to *Aspergillus oryzae* and their synergistic effect on the preparation of koji was explored in terms of the metabolic regulation of yeast with enzymatic systems, physicochemical indices, and volatile compounds. Changes in the numbers of the yeast colonies and *Aspergillus oryzae* spores, the activity of the enzymatic systems, and physicochemical indicators during the preparation of koji were dynamically monitored, while the volatile components of the finished product were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The results showed that when the amount of yeast added was approximately  $1.5 \times 10^6$  yeast/g koji and the inoculum size of *Aspergillus oryzae* was 0.15% (*m/m*), the number of *Aspergillus oryzae* spores did not significantly change and the neutral protease activity was 3100 U/g at 36 h, which was comparable to the results obtained for the control group. However,  $\alpha$ -amylase activity decreased by 22% and saccharifying enzyme activity increased by 7% in the yeast-inoculated group, while aminopeptidase and acidic carboxypeptidase activities did not exhibit significant difference compared to the results obtained in the control group. After the preparation of koji was complete, the concentrations of amino nitrogen and reducing sugar were almost the same for the yeast-inoculated and control groups, while the organic acid content of the yeast-inoculated sample was lower than that of control. There were 32 and 23 volatile components identified by GC-MS in the yeast-inoculated and control groups, respectively. Comprehensive analysis showed that inoculation of a halophilic aromatic yeast during the preparation of koji did not show a significant effect on the enzymatic system and growth of *Aspergillus oryzae*; however, it improved the flavor and quality of the finished koji.

**Key words:** halophilic aromatic yeast; synergistic koji-making; enzyme activity; volatile compounds

酱油酿造包括制曲和发酵两个步骤, 制曲是生产

收稿日期: 2014-11-18

基金项目: 湖北省自然科学基金 (2013CFA096, 2013CFB032); 湖北省教育厅项目 (Q20141409)

作者简介: 刘晶晶 (1990-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 发酵食品

通讯作者: 徐宁 (1979-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 发酵工程

高品质酱油的关键过程<sup>[1]</sup>。其本质是获取酱油发酵时所需的各种酶<sup>[2]</sup>, 其中以蛋白酶和淀粉酶最为重要, 同时获得酱油后酵阶段所需要的微生物。曲料的优劣直接影响到酶的分解和成品的风味口感、理化指标以及原料的利用率。

酱油风味品质的提升和稳定一直是行业研究的

热点。现代工艺为纯种制曲,具有工艺简单、易于控制、规模化、时间短的优点,然而由于单一菌种所形成的酶系和代谢产物较传统自然界中微生物简单得多,很难形成传统酿造的酱油风味,所以有必要采用其它微生物以加强酿造过程中的风味。李志江等人<sup>[3]</sup>曾采用米曲霉和黑曲霉双菌种制曲,提高了原料利用率,但局限于曲霉与曲霉之间混合制曲,酱油风味提升效果一般。20世纪80年代,日本最早提出多菌种发酵的概念<sup>[4]</sup>,通过后后期添加酵母和乳酸菌使酱油的风味有明显的改善,但这些微生物需要适应新的生态环境,对添加量和时机要求较高,同时需要搅拌、翻料等操作工序,且因发酵设备与发酵工艺条件控制上的不同,获得的成品酱油风味差异很大<sup>[5]</sup>。

目前关于添加其他酱油风味微生物参与制曲提高酱油品质与风味方面的研究较少。本研究通过在制曲过程中添加一株经筛选的嗜盐产香鲁氏酵母菌,模拟天然酿造酱油多菌种的制曲过程,与复合米曲霉共同制曲,突破多菌种制曲的局限性(曲霉与曲霉复合),利用微生物之间存在拮抗与共生关系达成和谐的制曲生态环境,为发酵阶段提供丰富的酶系和适量风味微生物,以期为酱油现代生产技术的提升提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料

米曲霉(*Aspergillus oryzae*) 沪酿3.042,鲁氏酵母,以上菌种均保藏于湖北工业大学湖北省食品发酵工程技术研究中心。大豆、面粉均购于湖北工业大学农贸市场。

### 1.2 主要仪器和设备

T6新世纪型紫外可见分光光度(北京普析通用仪器有限公司); DZKW-D-2 电热恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器厂); DT5-4B型低速自动平衡离心机(北京时代北利离心机有限公司); ZPX-35BI 立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂); FA1104N, YP601N 电子天平(上海精密仪器有限公司); SPME 萃取装置 57330U(SUPELCO); SPME 手动进样手柄、萃取头: 50/30 $\mu$ mDVB/CAR/PDMS(二乙烯基苯-碳分子筛-聚二甲基硅氧烷)(美国 Supelco 公司); Agilent GC-MS 7890A 气相色谱-质谱联用仪(美国安捷伦公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 曲料的制备

将筛选的耐高盐产香型酵母菌接入液态培养基中,30℃培养20h。

以重量百分比计,取70%黄豆,1.2倍润水,用高压蒸汽灭菌锅115℃蒸料15min。熟料快速冷却至37~40℃,拌入30%的面粉,按原料重量接入0.15%(m/m)米曲霉,根据前期单因素实验的结果确定最适酵母添加量为 $1.5 \times 10^6$ 个/g曲料,拌匀。制曲室34℃培养10~12h,松曲一次,接着控温32~35℃,19~22h第二次松曲。最后调节培养温度28~30℃,36h后制曲结束(其中,未添加酵母为对照组)。

#### 1.3.2 样品收集

收集不同制曲时间段(8、12、16、20、24、28、32、36h)的曲料样品进行分析。

#### 1.3.3 孢子数、酵母数和酵母菌落数的测定

孢子数的测定:参照SB/T10315-1999<sup>[6]</sup>,采用血球计数板法测定;酵母数的测定:采用血球板计数法测定;酵母菌落计数:参考GB4789.15-2010<sup>[7]</sup>,采用平板计数法。

#### 1.3.4 酶活的测定

##### 1.3.4.1 粗酶液的提取

不同酶活测定,分别称取5g成曲,加50mL蒸馏水研磨,40℃浸提1h,其间搅拌两次。根据不同酶活测定所需的缓冲液分别定容到合适的浓度,中速定性滤纸过滤即为粗酶液。同时测定曲料水份含量,酶活力统一用曲料干基重量表示,即U/g。

##### 1.3.4.2 蛋白酶活测定

参照国标GB/T23527-2009<sup>[8]</sup>,采用福林酚法测定中性条件下pH值为7.2蛋白酶活力。在40℃下每分钟水解酪蛋白产生1 $\mu$ g酪氨酸所需酶量,定义为一个蛋白酶活力单位。

##### 1.3.4.3 淀粉酶活测定

$\alpha$ -淀粉酶活的测定:参照文献<sup>[9]</sup>,采用可溶性淀粉为底物测定。在40℃、pH7.2条件下,30min液化10mg可溶性淀粉成为糊精所需的酶量,即为一个酶活力单位。

糖化酶活的测定:参考国标GB8276-2006<sup>[10]</sup>,40℃、pH4.6的条件下,1h分解可溶性淀粉产生1mg葡萄糖,即为一个酶活力单位。

##### 1.3.4.4 氨肽酶活力测定

参考Nampoothiri et al测定方法<sup>[11]</sup>,略做修改。L-亮氨酸-对硝基苯胺(L-Leu-pNA)在氨肽酶的作用下生成黄色的对硝基苯胺,在405nm下测定吸光度。

##### 1.3.4.5 酸性羧肽酶活力测定

参考Dio et al.测定方法<sup>[12]</sup>,通过紫外分光光度法,在505nm处测定吸光值。40℃、pH3.7条件,每分

钟水解生成 1  $\mu\text{mol}$  酪氨酸或甘氨酸所需的酶量定义为一个酶活力单位。

### 1.3.5 水分含量和 pH 值测定

水分含量测定: 参照 AOAC 测定方法<sup>[13]</sup>; 曲料 pH 测定参照 Yunzi Feng<sup>[14]</sup>测定方法。

### 1.3.6 氨基态氮和还原糖测定

氨基态氮含量的测定: 甲醛滴定法, 参考国家标准 GB/T 5009.39-2003<sup>[15]</sup>; 还原糖含量的测定: 直接滴定法, 参考国家标准 GB/T 5009.7-2008<sup>[16]</sup>

### 1.3.7 固形物测定

固形物含量的测定: 105  $^{\circ}\text{C}$  恒温干燥至恒重。

### 1.3.8 有机酸测定

色谱柱: Agilent SB-Aq (150 mm $\times$ 4.6 mm $\times$ 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相: 乙腈:溶液 A=2%:98%, 溶液 A: 用磷酸缓冲液( $\text{H}_3\text{PO}_4$ +0.05 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )将超纯水 pH 调节至 2.0; 流速: 0.8 mL/min; 柱温: 35  $^{\circ}\text{C}$ ; UV: 210 nm。

### 1.3.9 挥发性风味物质测定

#### 1.3.9.1 固相微萃取条件

称取 6 g 样品放于 50 mL 螺口样品瓶中, 加入 12 mL 去离子水和 4 g NaCl, 用聚四氟乙烯隔垫密封, 60  $^{\circ}\text{C}$  置于磁力搅拌器中水浴平衡 15 min。然后用 DVB/ CAR/PDMS 50/30  $\mu\text{m}$ (二乙烯基苯/碳分子筛/聚二甲基硅氧烷) 萃取头顶空吸附 60 min 后, 将萃取头插入 GC 进样, 解析 5 min。

#### 1.3.9.2 色谱条件

柱型采用 Agilent HP-5ms 毛细管柱(60 m $\times$ 250  $\mu\text{m}$  $\times$ 0.25  $\mu\text{m}$ ); 程序升温: 初温 40  $^{\circ}\text{C}$  以 2  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  的速率升温到 90  $^{\circ}\text{C}$ , 保持 5 min。再以 8  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  的速率升温到 250  $^{\circ}\text{C}$  保持 1 min; 进样口温度 270  $^{\circ}\text{C}$ , 不分流; 载气为氦气; 体积流量为 1.0 mL/min。

#### 1.3.9.3 质谱条件

电离方式为: EI; 电子能量: 70 eV; 电压 350 V; 连接口温度 280  $^{\circ}\text{C}$ ; 离子源温度 230  $^{\circ}\text{C}$ ; 四极杆温度 150  $^{\circ}\text{C}$ ; 质量扫描范围 m/z 50~450。

#### 1.3.9.4 定性与半定量方法

化合物定性方法: 经 NIST08 数据库检索定性; 化合物定量方法: 面积归一化法。

## 1.4 数据处理

图以 Excel 软件绘制。所有数据通过三次重复检测实验得到, 并利用 SPSS 19.0 的 ANOVA、Duncan test 检验取 95% 作为置信区间分析得到各组数据是否具有统计学意义。

## 2 结果与讨论

### 2.1 制曲过程中酵母菌落数和孢子数的动态变化

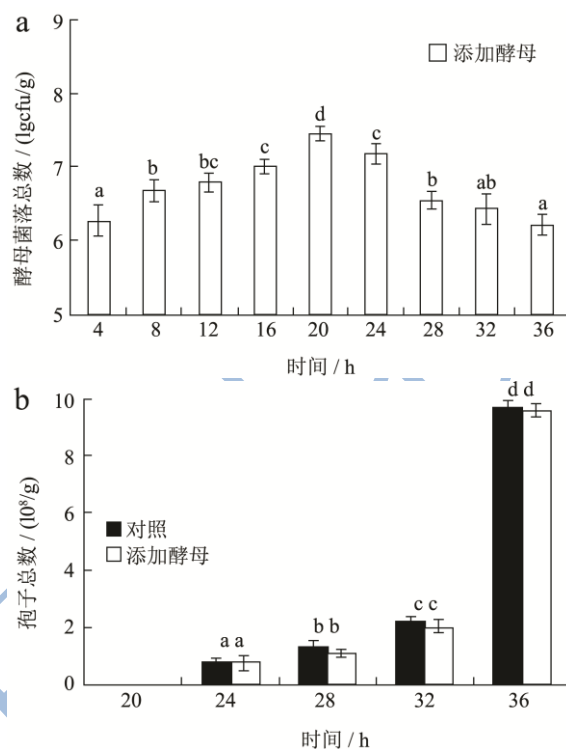


图1 制曲过程中酵母菌落总数和孢子数的变化

Fig.1 Changes in the total number of yeast colonies and number of spores during the preparation of koji

制曲过程中酵母菌落数和孢子数的动态变化如图 1 所示。由图 1a 可知, 添加酵母组 4 h 时酵母菌落数为 6.27 lg cfu/g, 在第 20 h 左右菌落总数达到最高值 7.45 lg cfu/g, 制曲结束时成曲中检出酵母菌落数为 6.21 lg cfu/g。酵母菌的生长受水分含量影响较大, 制曲后期由于水分的大量散失, 曲料水分含量较低, 不适宜酵母菌的生长, 可能是酵母数量减少的原因。图 1b 中对照组与添加酵母组 24 h 左右米曲霉孢子开始萌发, 36 h 时两组孢子数均达到  $9.5 \times 10^8$  以上, 且在相同时间下测得对照组与添加酵母组孢子总数无显著性差异 ( $p > 0.05$ ), 说明添加适量的风味酵母与米曲霉协同制曲不会抑制米曲霉的生长。

### 2.2 制曲过程中主要酶系活力的动态变化

#### 2.2.1 蛋白酶活力

蛋白酶活力是评价成曲质量的重要理化指标<sup>[17]</sup>。米曲霉制曲过程中分泌的胞外蛋白酶系能将蛋白质降解成多肽, 氨基酸及其它一些小分子物质, 这些物质对提高酱油的品质及鲜味具有重要作用。由图 2 可知, 在制曲 28~32 h 时添加风味酵母与对照组在相同时间

下测得的中性蛋白酶活力无显著性差异 ( $p>0.05$ ), 制曲结束后两组蛋白酶活力约为 3100 U/g。故在制曲过程中风味酵母添加量为  $1.5 \times 10^6$  个/g 曲料时 (前期单因素实验确定的最适添加量), 没有抑制蛋白酶活力。

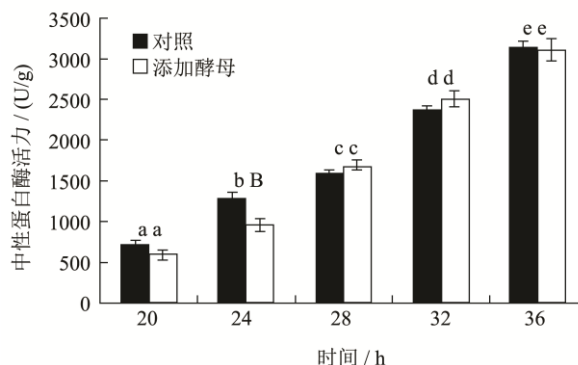


图2 制曲过程中中性蛋白酶活的变化

Fig.2 Changes in neutral protease activity during the preparation of koji

### 2.2.2 淀粉酶活力

淀粉酶主要包括  $\alpha$ -淀粉酶(液化酶)和糖化酶(葡萄糖苷酶)。淀粉质原料在淀粉酶系的作用下分解为葡萄糖、果糖及五碳糖, 不仅为曲料及酱醪中的微生物生长提供能源物质, 而且是发酵过程中美拉德反应及焦糖化反应还原糖的主要来源, 对酱油风味及色泽的形成起着至关重要的作用。

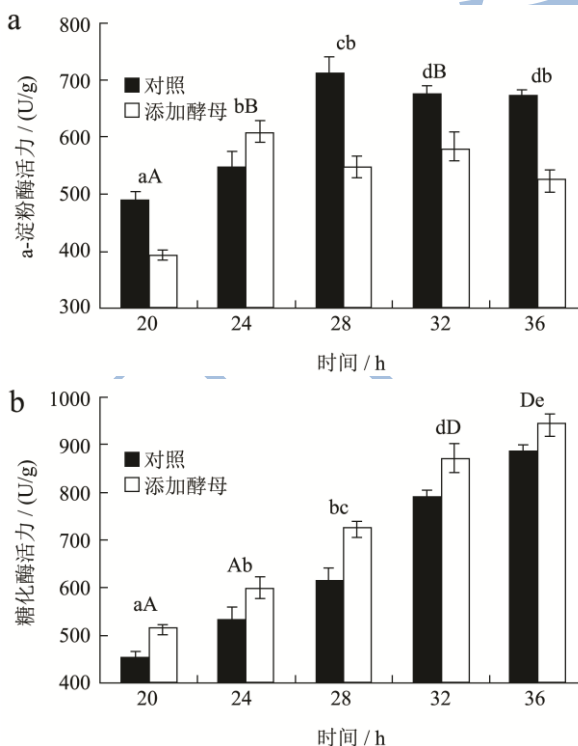


图3 制曲过程中淀粉酶活和糖化酶活的变化

Fig.3 Changes in  $\alpha$ -amylase activity and saccharifying enzyme activity during the preparation of koji

制曲阶段  $\alpha$ -淀粉酶和糖化酶活力的动态变化如

图3所示。由图3a可知, 相同时间下测得添加风味酵母与米曲霉协同制曲  $\alpha$ -淀粉酶活比对照组显著降低 ( $p<0.05$ ), 制曲结束后添加酵母组  $\alpha$ -淀粉酶活较对照组降低了 149 U/g。图3b中添加酵母糖化酶活始终高于对照组, 且有显著性差异 ( $p<0.05$ ), 制曲结束后糖化酶活分别达到 944.8 U/g、884.7 U/g。所以添加风味酵母与米曲霉协同制曲使得淀粉酶活略有降低。

### 2.2.3 氨基酶和酸性羧肽酶活力

米曲霉产生多种肽酶, 主要包括氨基酶和羧肽酶两类, 它们是分解大豆蛋白生成游离氨基酸的关键酶类。制曲过程中氨基酶和酸性羧肽酶的动态变化如图4所示, 图4a中20~24 h添加酵母组氨基酶活低于对照, 且具有显著性差异 ( $p<0.05$ ), 28~36 h对照组与添加酵母氨基酶活力无明显差异 ( $p>0.05$ )。制曲结束时对照与添加酵母氨基酶活分别达到 2112.7 U/g, 2197.7 U/g。由图4b可知, 制曲过程中两组酸性羧肽酶活均较低, 28~36 h相同时间段测得添加酵母组与实验组酶活力无显著性差异 ( $p>0.05$ ), 36 h时添加酵母与对照酸性羧肽酶活大约为 2.3 U/g。由此可知, 在制曲过程中风味酵母添加量为  $1.5 \times 10^6$  个/g 曲料时, 对肽酶活力没有显著影响。

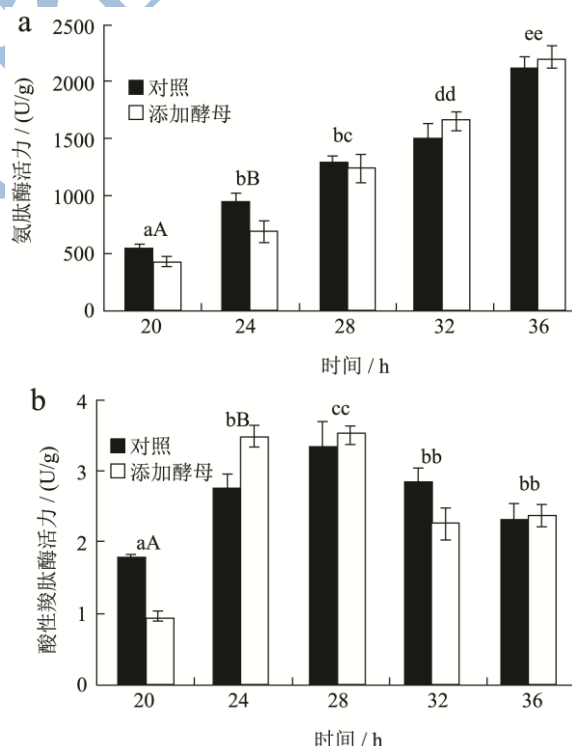


图4 制曲过程中氨基酶活和酸性羧肽酶活的变化

Fig.4 Changes in aminopeptidase and acidic carboxypeptidase activities during the preparation of koji

## 2.3 制曲过程中理化指标的动态变化

### 2.3.1 水分含量与 pH 值

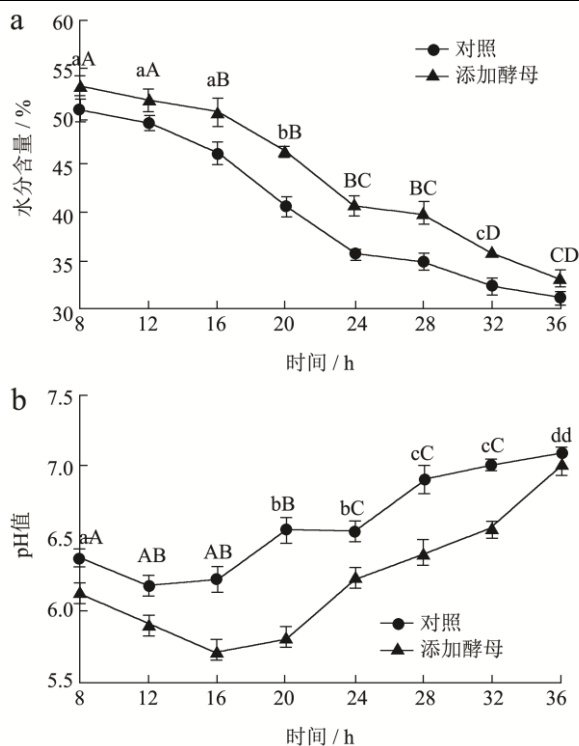


图5 制曲过程中水分含量和 pH 值的变化

Fig.5 Changes in moisture content and pH during the preparation of koji

大曲中的水分主要以游离水的形式存在, 不仅对微生物的生长起到运输介质的作用, 还参与了微生物的繁殖和代谢作用<sup>[18]</sup>。由图 5a 可知, 在制曲过程中添加酵母制曲与对照组水分含量一直呈现下降趋势, 同一时间条件下, 两组水分含量差异显著 ( $p < 0.05$ )。从 8 h 至 36 h, 对照组曲料的水分含量由 50.7% 降至 31.1%, 添加酵母制曲水分含量由 53.2% 降至 33.2%。添加酵母水分含量较高, 一方面前期生长较慢, 温度低, 水份蒸发较少, 另外酵母自身分泌粘性物质, 有益于保水。图 5b 中, 8~16 h 添加酵母与对照组 pH 值均有所下降, 16~36 h 基本上都呈上升趋势, 且同一时间下添加酵母组比对照组 pH 低, 且具有显著性差异 ( $p < 0.05$ )。添加酵母组前期 pH 低可能是酵母生长较慢, 消耗的曲料有机酸少。制曲后期突然升高的较快, 其机理有待探究。

### 2.3.2 氨基态氮与还原糖

制曲过程中曲料氨基态氮和还原糖含量的变化在一定程度上可以反映微生物生长状况以及曲料中蛋白质和碳水化合物的消耗量<sup>[19]</sup>。由图 6a 可知, 制曲过程中曲料(干基)氨基态氮含量随着制曲时间的延长而增加, 8~16 h 添加酵母组与对照组氨基态氮含量无显著性差异 ( $p > 0.05$ ), 可能是制曲初期生成较少或被酵母利用, 16 h 至出曲之前, 添加酵母组明显高于对照组 ( $p < 0.05$ ), 部分原因可能是由于酵母菌对

碳水化合物、蛋白质等营养物质的消耗使得曲料总固形物含量低于对照组, 制曲结束时两组氨基态氮的含量无显著性差异 ( $p > 0.05$ ), 具体原因有待进一步研究分析。图 6b 中添加酵母与对照曲料(干基)还原糖含量都随着时间的延长而增加, 制曲前期两组含量无显著性差异 ( $p > 0.05$ ), 后期(20~36 h)添加酵母组略低于对照, 可能是部分还原糖被酵母菌的生长所消耗。

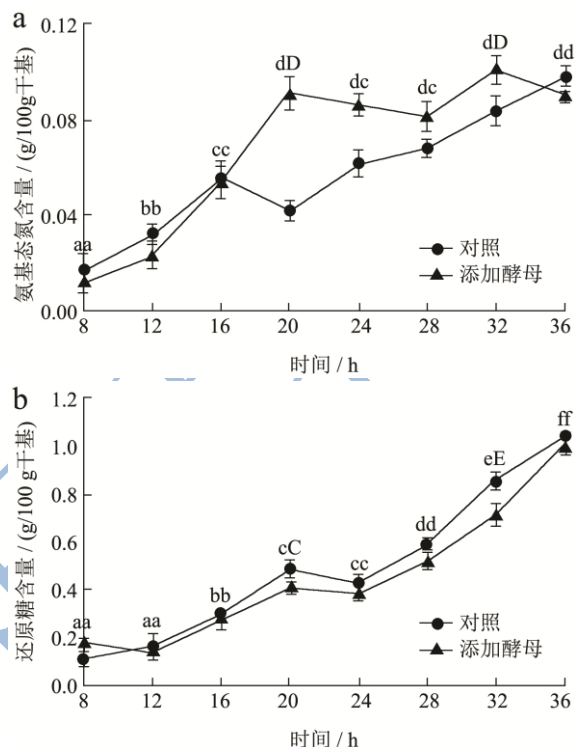


图6 制曲过程中氨基态氮含量和还原糖含量的变化

Fig.6 Changes in the contents of amino nitrogen and reducing sugar during the preparation of koji

### 2.3.3 固形物含量

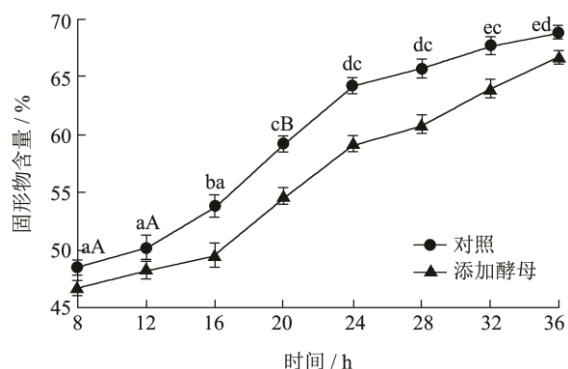


图7 制曲过程中曲料固形物含量的变化

Fig.7 Changes in solid material content during the preparation of koji

制曲是通过为微生物提供营养物质及适宜的环境使其大量生长繁殖的过程。制曲过程中曲料固形物含量变化如图 7 所示, 随着制曲时间的延长, 曲料水分大量蒸发, 对照与添加酵母组曲料固形物含量均呈上

升趋势。从 8 h 至 36 h, 对照组固形物含量由 48.5% 上升到 68.9%, 添加酵母组固形物含量由 46.8% 上升到 66.8%。添加酵母组固形物含量低于对照组的原因可能是酵母的生长繁殖需要消耗大量的营养物质, 这些减少的物质多以生物呼吸作用形式生成二氧化碳、水及生物呼吸热排放到大气中<sup>[20]</sup>, 从而使得曲料固形物含量较对照组明显降低( $p < 0.05$ )。

### 2.3.4 有机酸

制曲过程中由于微生物的代谢作用也会引起有机酸的变化。本实验测定四个制曲时间点的酒石酸、乳酸、柠檬酸、琥珀酸及乙酸的变化, 结果如表 1。

表 1 制曲过程中有机酸变化(mg/g 干基)

时间/h	酒石酸	乳酸	柠檬酸	琥珀酸	乙酸	
对照	12	ND	0.85 ± 0.06 <sup>a</sup>	4.32 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.08 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.07 ± 0.01 <sup>a</sup>
	20	ND	3.05 ± 0.15 <sup>b</sup>	3.05 ± 0.11 <sup>b</sup>	0.12 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.18 ± 0.02 <sup>b</sup>
	28	ND	5.26 ± 0.18 <sup>c</sup>	2.15 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.45 ± 0.04 <sup>c</sup>	0.30 ± 0.03 <sup>c</sup>
	36	ND	6.75 ± 0.31 <sup>d</sup>	1.40 ± 0.06 <sup>d</sup>	0.60 ± 0.07 <sup>d</sup>	0.25 ± 0.02 <sup>d</sup>
添加酵母	12	ND	0.35 ± 0.05 <sup>a</sup>	3.1 ± 0.14 <sup>A</sup>	0.1 ± 0.01 <sup>A</sup>	0.05 ± 0.01 <sup>a</sup>
	20	ND	1.79 ± 0.09 <sup>B</sup>	2.18 ± 0.17 <sup>B</sup>	0.25 ± 0.02 <sup>B</sup>	0.14 ± 0.01 <sup>b</sup>
	28	ND	3.52 ± 0.07 <sup>C</sup>	1.56 ± 0.09 <sup>C</sup>	0.76 ± 0.04 <sup>C</sup>	0.23 ± 0.02 <sup>c</sup>
	36	ND	4.6 ± 0.15 <sup>D</sup>	1.33 ± 0.05 <sup>d</sup>	1.1 ± 0.15 <sup>D</sup>	0.21 ± 0.01 <sup>d</sup>

注: ND 表示“未检出”。

## 2.4 成曲中挥发性成分分析

采用 GC-MS 对添加酵母和对照组成曲中的挥发性香气成分进行检测分析。试验报道匹配度均大于 72 (最大值 100) 的鉴定结果如表 2 所示, 对照组与添加酵母组分别检测出 23 和 32 种挥发性风味物质成分。对照组主要包括酯类 5 种、酸类 4 种、醇类 3 种、醛类 4 种、酚类 1 种、其他类 6 种, 添加酵母主要包括酯类 10 种、酸类 4 种、醇类 4 种、醛类 3 种、酚类 2 种、其他类 9 种。

添加酵母与对照组风味成分上的差异, 主要是由

对照与添加酵母均未检出酒石酸, 对照乳酸含量高于添加酵母组, 而乳酸多产于细菌, 说明添加酵母后污染产乳酸细菌较少或具有一定的抗细菌生长能力。36 h 时, 添加酵母与对照柠檬酸含量无显著性差异 ( $p > 0.05$ ), 但制曲前期都明显低于对照 ( $p < 0.05$ )。柠檬酸等有机酸属于三羧酸循环所需有机酸, 可作为碳源被微生物消耗掉, 制曲前期的有机酸变化反映了微生物的生长情况<sup>[21]</sup>。琥珀酸随着制曲时间的延长都有所增加, 应该为制曲过程中微生物代谢产生。对照与添加酵母乙酸含量都较低, 两者无明显差异。

于制曲过程中酵母菌的作用<sup>[22]</sup>。由表 1 可以看出, 风味酵母的添加使得成曲中酯类物质和醇类物质的含量有所增加, 且种类也有所增多。其中酯类物质较对照组增加了 5 种, 相对含量增加了 9.31%, 醇类物质特别是乙醇相对含量增加了 18.82%。鲁氏酵母为醇香型酵母, 醇类物质与香气的组成密切相关, 在发酵后期它可以与酸类发生酯化反应生成酯类物质。可见, 在制曲阶段添加风味酵母, 所得到的成曲中的挥发性物质种类更加丰富, 而曲料的优劣直接影响到酱油的风味口感和品质, 故成曲风味成分的大幅度提高将进一步促进酱油的风味和品质的改善。

表 2 成曲中挥发性成分的分析

类别	编号	中文名	保留时间/min	相对含量/%	
				对照	添加酵母
酯类	1	苯乙酸乙酯	24.283	ND	0.14
	2	十四酸甲酯	45.152	0.08	0.18
	3	(Z)-十六烯酸甲酯	47.624	ND	0.17
	4	棕榈酸甲酯	47.886	ND	3.69
	5	棕榈酸乙酯	48.738	2.65	2.70
	6	亚油酸甲酯	49.981	0.94	1.91

转下页

接上页					
	7	硬脂酸甲酯	50.326	0.14	0.13
	8	亚油酸乙酯	50.755	ND	3.47
	9	油酸乙酯	50.813	3.41	3.75
	10	硬脂酸乙酯	51.082	ND	0.39
	总计			7.22	16.60
酸类	1	乙酸	4.080	6.34	3.28
	2	顺式-十八碳烯酸	48.174	0.06	0.10
	3	棕榈酸	48.386	4.12	5.19
	4	亚油酸	50.538	0.92	1.44
	总计			13.89	9.09
醇类	1	乙醇	2.021	4.10	22.92
	2	2, 3-丁二醇	6.678	ND	1.92
	3	1-辛烯-3-醇	13.186	7.82	6.51
	4	麦芽醇	23.350	1.29	1.34
	总计			13.21	32.69
醛类	1	己醛	5.570	ND	1.83
	2	庚醛	9.764	0.74	0.24
	3	苯乙醛	17.483	2.51	4.66
	4	壬醛	22.094	5.48	ND
	5	癸醛	29.687	0.62	ND
总计			9.35	6.73	
酚类	1	愈创木酚	21.511	ND	0.33
	2	2, 4-二叔丁基苯酚	41.700	1.17	1.42
	总计			1.17	1.75
其他	1	苯乙烯	9.137	ND	0.81
	2	2-正戊基咪喃	14.908	ND	0.23
	3	双戊烯	17.125	ND	0.41
	4	十一烷	21.767	5.91	5.69
	5	十四烷	39.177	0.27	0.24
	6	十五烷	41.374	0.74	0.58
	7	十六烷	43.173	0.39	0.17
	8	十七烷	44.755	0.24	0.20
	9	二十烷	46.189	0.12	0.26
总计			7.67	8.59	

### 3 结论

添加适量风味酵母与米曲霉协同制曲对米曲霉生长及酶系的分泌无显著性影响,其中中性蛋白酶活, 氨肽酶活和酸性羧肽酶活与对照组基本相近,  $\alpha$ -淀粉酶较对照组降低了 22%, 糖化酶活与对照组相比增加了 7%。添加酵母有机酸含量低于对照, 制曲后期曲料氨基态氮含量高于对照, 还原糖含量低于对照, 制曲结束时两组氨基态氮含量和还原糖含量基本相当。采用 GC-MS 对成曲进行挥发性成分分析, 发现添加

风味酵母与米曲霉协同制曲所得到的曲料挥发性风味物质种类和含量均有较高提升。通过添加其他酱油微生物与米曲霉协同制曲来提高酱油品质及风味值得进一步深入研究。

### 参考文献

- [1] Yan YZ, Qian YL, Ji FD, et al. Microbial Composition During Chinese Soy Sauce Koji-making based on Culture Dependent and Independent Methods [J]. Food Microbiology, 2013, 34: 189-195

- [2] 崔春,欧阳珊,尹文颖,等.淀粉原料焙炒对酱油制曲的影响[J].现代食品科技,2013,29(8):1911-1915  
CUI Chun, OU Yang-shan, YIN Wen-ying, et al. Effect of Roasted Starch on Soy Sauce Koji-making [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(8): 1911-1915
- [3] 李志江,戴凌燕,王欣,等.米曲霉和黑曲霉双菌种制曲对豆酱酶系影响的研究[J].农产品加工 创新版,2010,10:51-54  
LI Zhi-jiang, DAI Ling-yan, WANG Xin, et al. Study of Koji Making Technics of *Aspergillus Oryzae* and *Aspergillus Niger* on the Enzyme System in Soy-Bean Paste [J]. Innovational Edition of Farm Products Processing, 2010, 10: 51-54
- [4] Nuryani H, Wada K, Aoki T, et al. Chemical and Sensory Characteristics of Low Molecular Weight Fractions Obtained from Three Types of Japanese Soy Sauce (shoyu) Koikuchi, Tamari and Shiro Shoyu [J]. Food Chemistry, 2007, 100: 1669-1677
- [5] 徐高丹,陈敏,蒋予箭.酵母菌对酿造酱油风味形成的影响[J].中国调味品,2011,36(1):28-32  
XU Gao-dan, CHEN Min, JIANG Yu-jiang. The effect of yeasts for the flavor of brewing soy sauce [J]. China Condiment, 2011, 36 (1): 28-32
- [6] SB/T 10315,孢子数测定法[S]  
SB/T 10315, Spore number determination method [S]
- [7] 国家标准:GB 4789.15-2010,食品微生物学检验-菌落总数测定[S]  
Government Standard: GB 4789.15-2010, Food Microbiological Examination-total numbers of colony [S]
- [8] 国家标准:GB/T 23527-2009,中华人民共和国国家标准-酶制剂[S]  
Government Standard: GB/T 23527-2009, National Standards of the People's Republic of China-Enzyme [S]
- [9] Chutmanop J, Chuichulcherm S, Chisti YP, et al. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates [J]. Journal of Chemistry and Technology Biotechnology, 2008, 83: 1012-1018
- [10] 国家标准:GB 8276-2006,中华人民共和国国家标准-糖化酶制剂[S]  
Government Standard: GB 8276-2006, National Standards of the People's Republic of China- Glucoamylase [S]
- [11] Nampoothiri KM, Nagy V, Kovacs K, et al. L-leucine aminopeptidase production by filamentous *Aspergillus* fungi [J]. Letters in Applied Microbiology, 2005, 41(6):498-504
- [12] Doi E, Shibata D, Matoba T. Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay [J]. Analytical Biochemistry, 1981, 118(1): 173-184
- [13] AOAC(2000). Official methods of analysis (17th ed.). Gaithersburg, Maryland: Association of Official Analytical Chemists
- [14] Feng YZ, Chen ZY, Liu N, et al. Changes in fatty acid composition and lipid profile during koji fermentation and their relationships with soy sauce flavour [J]. Food Chemistry, 2014, 158: 438-444
- [15] 国家标准:GB/T5009.39-2003,中华人民共和国国家标准-酿造酱油[S]  
Government Standard: GB/T5009.39-2003, National Standards of the People's Republic of China - Brewing Soy Sauce [S]
- [16] 国家标准:GB/T5009.7-2008,中华人民共和国国家标准-还原糖测定[S]  
Government Standard: GB/T5009.7-2008, National Standards of the People's Republic of China - Reduced Sugar Determination [S]
- [17] 纪凤娣,鲁绯,袁圆,等.不同工艺制曲过程中微生物分布与蛋白酶变化研究[J].中国酿造,2010,5:52-55  
JI Feng-di, LU Fei, YUAN Yuan, et al. Distribution of Microorganisms and Changes of Protease During Koji-making with Different Technology [J]. China Brewing, 2010, 5: 52-55
- [18] 崔春,赖晨戎,夏克胜,等.珍珠贝肉制曲过程中物质代谢与酶活之间的关系[J].现代食品科技,2014,30(1):11-15  
CUI Chun, LAI Chen-rong, XIA Ke-sheng, et al. Relationship between Enzyme Activity and Biochemical Changes of *Pinctada martensi* Koji-making [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(1): 11-15
- [19] 黄持都,鲁绯,袁圆,等.酱油制曲过程中理化、生化指标动态变化[J].中国酿造,2010,5:38-41  
HUANG Chi-du, LU Fei, YUAN Yuan, et al. Dynamic changes of physiochemical and biochemical indicators during soy sauce koji-making [J]. China Brewing, 2010, 5: 38-41
- [20] 梁姚顺,朱新贵,孙胜枚,等.酱油酿造过程中物料衡算分析与研究[J].中国酿造,2012,(31)11:30-32  
LIANG Yao-shun, ZHU Xin-gui, SUN Sheng-mei, et al. Material balance analyzing and researching of soy sauce fermentation [J]. China Brewing, 2012, (31)11: 30-32
- [21] 包启安.酱油科学与酿造技术[M].北京:中国轻工业出版社,2011  
BAO Qi-an. Soy Sauce Science and Brewing Technology [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2011
- [22] Feng Y, Cui C, Zhao H, et al. Effect of koji fermentation on



generation of volatile compounds in soy sauce production.  
International Journal of Food Science and Technology [J].

2013, 48: 609-619

现代食品科技