

# 米曲霉 PRB-1 蛋白酶系和淀粉酶系与高盐稀态酱油理化特性关系的研究

林伟民, 闫喆, 刘帆, 凌秀仪, 胡文锋, 高向阳  
(华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

**摘要:** 本文采用一株自行分离的米曲霉 PRB-1 菌株 (AP) 进行制曲和高盐稀态酱油发酵。结果表明: AP 成曲的酸性和中性蛋白酶活力达到 398.53 U/g 干基和 1539.98 U/g 干基, 较米曲霉 3.042 (AO) 分别提高 71.79% 和 59.93%。AP 成曲淀粉酶活力比 AO 略低。AP 成曲含有 5 个中性蛋白酶组分, 2 个酸性蛋白酶组分和 4 个淀粉酶组分。其中, 蛋白酶 Rf<sub>6</sub> 和淀粉酶 Rf<sub>3</sub> 活力最大。随着发酵时间的延长, AP 和 AO 酱醪总酸含量呈现上升趋势。pH 值由中性持续下降至偏酸性。氨基态氮含量持续增加, 还原糖含量均呈现先显著上升后缓慢降低的趋势。发酵 55d AP 头油的氨基态氮含量为 0.86 g/100 mL, 原料利用率为 81.97%, 氨基酸生成率为 61.37%, 较 AO 均有较高的优势。AP 头油的还原糖含量为 4.82 g/100 mL, 低于 AO。成曲的中性蛋白酶活力和发酵酱油的氨基酸生成率呈正相关 ( $p < 0.05$ ), 对其他指标无显著影响 ( $p > 0.05$ )。

**关键词:** 米曲霉 PRB-1; 蛋白酶; 淀粉酶; 高盐稀态酱油; 理化特性

文章编号: 1673-9078(2015)11-142-148

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.11.023

## Relationship between the Protease and Amylase Systems of *Aspergillus oryzae* PRB-1 and the Physicochemical Properties of High-salt Diluted-state Soy Sauce

LIN Wei-min, YAN Zhe, LIU Fan, LING Xiu-yi, HU Wen-feng, GAO Xiang-yang

(College of Food Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** Isolated *Aspergillus oryzae* PRB-1 (AP) strain was applied in the manufacture of koji and high-salt diluted-state soy sauces. The results showed that the acid protease and neutral protease activities of AP koji were 398.53 U/g and 1539.98 U/g, which were increased by 71.79% and 59.93% when compared with those of *Aspergillus oryzae* 3.042 (AO), respectively. The amylase activity of AP koji was slightly lower than that of AO. AP koji contained five neutral protease components, two acid protease components, and four amylase components, among which protease Rf<sub>6</sub> and amylase Rf<sub>3</sub> showed the highest activity. The total acid content of AP and AO moromi samples increased as the fermentation time was prolonged and the pH value decreased from neutral to acidic. Amino acid nitrogen continuously increased in moromi and the reducing sugar content showed a slow downward trend after the initial sharp increase. The amino acid nitrogen content of AP first filtrate was 0.86 g/100 mL after 55 days of fermentation. Meanwhile, the utilization ratio of raw material (81.97%) and the amino acid production rate (61.37%) of AP were higher than those of AO. The reducing sugar content of AP first filtrate was 4.82 g/100 mL, lower than that of AO. The neutral protease activity of koji was positively correlated with the amino acid production rate ( $p < 0.05$ ), but had no significant impact on other indices ( $p > 0.05$ ).

**Key words:** *Aspergillus oryzae* PRB-1; protease; amylase; high-salt diluted-state soy sauce; physicochemical property

酱油酿造菌种是影响产品质量的主要内因。酱油发酵主要是利用微生物酶系对原料中的蛋白质和淀粉类物质进行分解, 生成多种氨基酸和糖类, 富有特殊

收稿日期: 2015-02-03

基金项目: 深圳市战略新兴产业发展专项资金 (CXZZ20140418101933991)

作者简介: 林伟民 (1989-), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品化学与营养

通讯作者: 高向阳 (1966-), 女, 博士, 副教授, 研究方向为食品生物化学

的色、香、味、体和营养价值。目前国内 90% 以上的酱油企业酿造菌种都是采用米曲霉沪酿 3.042, 也有少数采用酱油曲霉。米曲霉沪酿 3.042 具有生产周期短、较粗放等优点, 但制曲酶系不全, 产生的蛋白酶活力相对偏低, 原料中的蛋白质等不能被高效分解利用, 导致原料利用率偏低<sup>[1]</sup>。筛选性能优良的菌株, 提高原料利用率和降低生产成本, 一直是酱油行业菌种研

究工作中的重点。针对酱油菌种的筛选研究众多,中性蛋白酶活是筛选的主要指标,但大多仅停留在实验室阶段,目前并没有应用于生产获得成功的报道<sup>[2]</sup>。周其洋等筛选得到目标菌株 80110,制曲中性蛋白酶活力较米曲霉 3.042 高出 43%,但发酵所得酱油总氮和氨基态氮含量较 3.042 仅高出 0.0392, 0.0255 g/dL<sup>[3]</sup>。李旋等通过诱变得米曲霉 UV-16,成曲中性蛋白酶活力较米曲霉 3.042 高出 40%,发酵所得酱油氨基态氮含量较 3.042 仅高出 0.031 g/100 mL<sup>[4]</sup>。因此,仅凭成曲酶活并不能有效预测菌种对产品质量的提升效果。此外,淀粉酶对原料淀粉的水解和产品质量也起着重要作用。因此,有必要从蛋白组水平上对蛋白酶和淀粉酶的组分进行研究。梁燕娣等对米曲霉 AS 3.951 在大曲培养条件下胞外分泌蛋白谱进行了鉴定<sup>[5]</sup>。闫博等发现不同来源的米曲霉菌株在蛋白酶、淀粉酶的组成和各组分活力分布上有很大差异<sup>[6]</sup>。潘力等对米曲霉 AS 3.951 种胞外蛋白进行了鉴定与分析<sup>[7]</sup>。

本研究以大豆和面粉为原料,以米曲霉沪酿 3.042 为对照菌种,探讨一株自行分离纯化的米曲霉 PRB-1 成曲蛋白酶和淀粉酶系与中试规模下高盐稀态酱油发酵过程相关理化特性的关系,包括氨基态氮、还原糖、总酸和 pH 值,为酱油酿造菌种选择依据和米曲霉 PRB-1 在酱油酿造上的应用提供指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) PRB-1 (AP), 由本实验室从酱油种曲中筛选获得,前期研究工作已表明该菌株生长快,遗传稳定性好,抗污染能力强;米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 沪酿 3.042 (AO), 市购;原料为大豆、面粉;其余试剂均为分析纯。

### 1.2 试验仪器

YXQ-LS-50A 立式压力蒸汽灭菌锅,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;LRH-250A 生化培养箱,广东医疗器械厂;PHS-3C 精密 pH 计,上海精密科学仪器有限公司;UV-2100 紫外可见分光光度计,尤尼柯(上海)仪器有限公司;XW-80A 旋涡混合器,海门市其林贝尔仪器制造有限公司。KJELTEC8200 凯式定氮仪,福斯有限公司;PowerPac Basic 电泳仪,美国伯乐(Bio-Rad)公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 发酵中试分组

以传统高盐稀态酱油发酵工艺为基础,将米曲霉 PRB-1 作为酿造菌种应用于酱油发酵中试,同时设置米曲霉沪酿 3.042 为对照组,每组 3 个平行。制曲和发酵过程对比两组的蛋白酶活力、淀粉酶活力、氨基态氮、还原糖、总酸及 pH 值变化。

#### 1.3.2 高盐稀态酱油发酵工艺

大豆→清洗除杂→浸泡→蒸煮→加种曲和面粉→制曲→成曲各项指标检测→加盐水制醪→入发酵罐发酵→酱醪发酵过程中取样,4℃冰箱贮藏待测→样品过滤(快速定性滤纸)→待检

#### 1.3.3 SDS-Gelatin-PAGE 检测成曲蛋白酶组分

粗酶液制备:称取 2.00 g 成曲,研磨后加 15 mL 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(中性蛋白酶 pH 7.2,酸性蛋白酶 pH 4.0),磁力搅拌 1 h,离心(5000 r/min, 10 min, 4℃),上清液即为粗酶液。

SDS-Gelatin-PAGE 电泳:配制非还原性 SDS-PAGE 电泳胶(浓缩胶 5%,分离胶 8%),加 5% 明胶溶液至终浓度为 0.5%,低温电泳。电泳完毕将凝胶置于 2.5% Triton-X100 溶液(pH 7.2 或 4.0)洗脱 2 次,每次 30 min,置于磷酸缓冲液(pH 7.2 或 4.0)中 40℃保温 3 h,考马斯亮蓝染色 30 min,体积分数为 10% 甲醇、7.5% 乙酸的脱色液脱色,至透明条带清晰。凝胶系统成像系统拍照,Image Lab 软件进行条带亮度分析。

#### 1.3.4 Native-PAGE 检测成曲淀粉酶组分

粗酶液制备:浸提缓冲液为 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.0),其余同 1.3.3。

Native-PAGE 电泳:配制 Native-PAGE 电泳胶(浓缩胶 5%,分离胶 6%),低温电泳以防止淀粉酶变性。电泳完毕将凝胶在 1% 的淀粉溶液(pH 6.0)中 40℃浸泡 1 h,用蒸馏水漂洗 3 次后将凝胶浸入稀碘液中,染至蓝色背景下的透明条带出现。凝胶系统成像系统拍照,Image Lab 软件进行条带亮度分析。

#### 1.3.5 指标测定方法

水分的测定采用 GB/T 5009.3-2010 方法;酸、中性蛋白酶活力的测定采用 SB/T 10317-1999 方法;淀粉酶活力的测定采用 GB/T 5521-2008 方法;全氮的测定采用凯氏定氮法;氨基态氮的测定采用中性甲醛滴定法。还原糖的测定采用 GB/T 5009.7-2003 第一法即直接滴定法;pH 值使用 pH 计直接测定。总酸的测定采用滴定法。

### 1.4 数据分析

每次试验重复3次,使用 EXCEL 2013 和 SPSS 18.0 软件进行数据分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 成曲蛋白酶系

#### 2.1.1 蛋白酶活力

将米曲霉 PRB-1 (AP) 和米曲霉沪酿 3.042 (AO) 在同一工艺条件下制曲,出曲时的酸性和中性蛋白酶活力如图 1 所示。

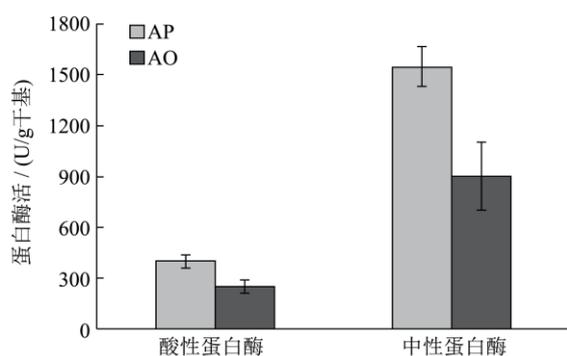


图 1 米曲霉 PRB-1 (AP) 和米曲霉 3.042 (AO) 成曲蛋白酶活力

Fig.1 Koji protease activities of AP and AO

蛋白酶活力直接影响到后期发酵的速率,与酱油原料利用率和氨基酸生成率密切相关。微生物分泌的蛋白酶,可将原料中的蛋白质水解为小分子的肽类和氨基酸<sup>[8]</sup>。高盐稀态酱油酿造过程中起主要作用的是中性蛋白酶和酸性蛋白酶。因为酿造体系中最初盐水的 pH 值呈中性,这时中性蛋白酶起主要作用。随着

发酵时间延长, pH 值不断下降,发酵环境逐渐处于偏酸性,这时酸性蛋白酶起主要作用<sup>[9]</sup>。

由图 1 可知 AP 成曲中性蛋白酶活力为 1539.98 U/g 干基,与 AO 相比高 71.79% ( $p < 0.05$ )。AP 成曲酸性蛋白酶活力达到 398.53 U/g 干基,与 AO 相比高 59.93%,但差异不显著 ( $p > 0.05$ )。

#### 2.1.2 成曲蛋白酶组分分析

采用 SDS-Gelatin-PAGE 检测 2 组成曲的蛋白酶组分,结果如图 2 所示。

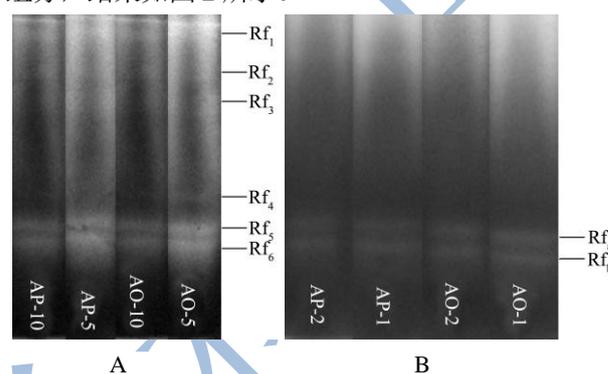


图 2 米曲霉 PRB-1 (AP) 和米曲霉 3.042 (AO) 成曲蛋白酶 SDS-Gelatin-PAGE 电泳图

Fig.2 SDS-Gelatin-PAGE patterns of koji proteases from AP and AO

注: A: 中性蛋白酶; B: 酸性蛋白酶; AP-10: 上样浓度为 AP 粗酶液稀释 10 倍; AP-5: 上样浓度为 AP 粗酶液稀释 5 倍; AO-10: 上样浓度为 AO 粗酶液稀释 10 倍; AO-5: 上样浓度为 AO 粗酶液稀释 5 倍; AP-2: 上样浓度为 AP 粗酶液稀释 2 倍; AP-1: 上样浓度为 AP 粗酶液; AO-2: 上样浓度为 AO 粗酶液稀释 2 倍; AO-1: 上样浓度为 AO 粗酶液; 上样量均为 20  $\mu$ L。

表 1 中性蛋白酶各组分迁移率和亮度分析

Table 1 Rf values and intensity level of the components of koji neutral protease

条带	迁移率/Rf	亮度				所占比例/%			
		AP-10	AP-5	AO-10	AO-5	AP-10	AP-5	AO-10	AO-5
Rf <sub>1</sub>	0.167	31142	65268	31525	69752	12.96	12.48	12.03	11.49
Rf <sub>2</sub>	0.339	7946	16254	8395	15164	3.31	3.11	3.20	2.50
Rf <sub>3</sub>	0.371	7443	14994	7515	15748	3.10	2.87	2.87	2.59
Rf <sub>4</sub>	0.642	-	-	15525	31674	-	-	5.92	5.22
Rf <sub>5</sub>	0.719	69362	148554	65240	157472	28.87	28.41	24.89	25.93
Rf <sub>6</sub>	0.773	124377	277830	133875	317446	51.77	53.13	51.08	52.28

表 2 酸性蛋白酶各组分迁移率和亮度分析

Table 2 Rf values and intensity level of the components of koji acid protease

条带	迁移率	亮度				所占比例/%			
		AP-2	AP-1	AO-2	AO-1	AP-2	AP-1	AO-2	AO-1
Rf <sub>a</sub>	0.718	63054	264600	228430	397210	31.2	34.1	32.6	39.1
Rf <sub>b</sub>	0.784	139216	512442	472866	618640	68.8	65.9	67.4	60.9

粗酶液中的蛋白酶经非还原性 SDS-PAGE 分离,

各组分分别在中性或者酸性条件下水解所在位置的明

胶,经考马斯亮蓝染色后显示出透明条带,亮度越高,活力越高。按照其迁移率大小将条带命名为中性蛋白酶 Rf<sub>1</sub>、Rf<sub>2</sub>、Rf<sub>3</sub>、Rf<sub>4</sub>、Rf<sub>5</sub>和 Rf<sub>6</sub>号,酸性蛋白酶 Rf<sub>a</sub>和 Rf<sub>b</sub>号。蛋白酶 Rf<sub>1</sub>、Rf<sub>2</sub>、Rf<sub>3</sub>、Rf<sub>5</sub>和 Rf<sub>6</sub>号在 AO 和 AP 成曲中均存在, Rf<sub>4</sub>号为 AO 成曲特有的组分。其中,2 组成曲中酶活力最大的组分均为蛋白酶 Rf<sub>6</sub>号 ( $p < 0.05$ ),所占比例在 50% 以上。酸性蛋白酶 Rf<sub>a</sub>、Rf<sub>b</sub>在 AO 和 AP 中都存在。根据迁移率的大小,可知 Rf<sub>5</sub>与 Rf<sub>a</sub>对应, Rf<sub>6</sub>与 Rf<sub>b</sub>对应。在酸性条件下,蛋白酶 Rf<sub>b</sub>活力最大,所占比例均在 60% 以上 ( $p < 0.05$ )。AP 与 AO 之间各组分亮度和所占比例差异不显著 ( $p > 0.05$ )。

由图 2A 和图 2B 比较可知,两组成曲共检出 2 种酸性蛋白酶组分,明显少于中性蛋白酶(6 种),并且没有出现中性蛋白酶中不存在的组分。分析认为米曲霉所分泌的蛋白酶组分是固定的,部分蛋白酶的最适 pH 范围相对较窄,如蛋白酶 Rf<sub>1</sub>、Rf<sub>2</sub>、Rf<sub>3</sub>和 Rf<sub>4</sub>号只在中性条件下才显示出活性,而蛋白酶 Rf<sub>5</sub>和 Rf<sub>6</sub>号的最适 pH 范围相对较宽,在酸性和中性的条件下都能显示出活性,特别是酶活最大的蛋白酶 Rf<sub>6</sub>号。因此,这 2 个蛋白酶组分可能对原料蛋白质的水解起主要作用,但其酶学性质和耐盐性以及对其酱油品质的影响值得进一步研究。

## 2.2 成曲淀粉酶系

### 2.2.1 淀粉酶活力

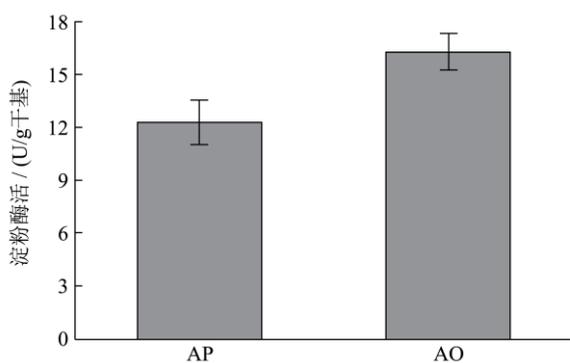


图 3 米曲霉 PRB-1 (AP) 和米曲霉 3.042 (AO) 成曲淀粉酶活力

Fig.3 Koji amylase activities from AP and AO

在酱油生产中,淀粉酶对原料中淀粉的水解至关重要,直接影响到原料利用率和后期发酵的产品质量。酶解产生的单糖和寡糖是酱油甜味形成的重要因素。淀粉和蛋白质原料经过淀粉酶和蛋白酶的作用最终分解为糖和氨基酸,氨基与羰基的反应即美拉德反应,是酱油发酵过程色泽形成的非酶褐变反应<sup>[10]</sup>。由图 3 可知,AP 成曲淀粉酶活为 12.26 U/g 干基,低于 AO ( $p < 0.05$ )。

### 2.2.2 淀粉酶组分分析

采用 Native-PAGE 检测 2 组成曲的淀粉酶组分,结果如图 4 所示。

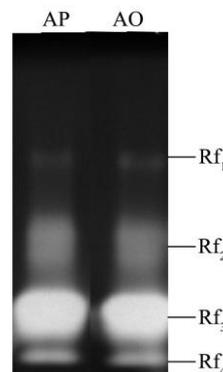


图 4 米曲霉 PRB-1 (AP) 和米曲霉 3.042 (AO) 成曲淀粉酶 Native-PAGE 电泳图

Fig.4 Native-PAGE patterns of koji amylase from AP and AO

注:上样浓度为粗酶液原液,上样量 20 μL。

表 3 成曲淀粉酶组分迁移率和亮度

Table 3 Rf values and intensity level of the components of koji amylase

条带	迁移率 /Rf	亮度		所占比例/%	
		AP	AO	AP	AO
Rf <sub>1</sub>	0.228	1045944	380880	1.9	0.7
Rf <sub>2</sub>	0.512	10021878	14871915	17.9	26.4
Rf <sub>3</sub>	0.775	39943629	34959609	71.2	62.1
Rf <sub>4</sub>	0.947	5067222	6039432	9.0	10.7

粗酶液中的淀粉酶经 Native-PAGE 分离,各组分水解所在位置的可溶性淀粉,经稀碘液染色后显示出透明条带,亮度越高,活力越高。淀粉酶 Rf<sub>1</sub>、Rf<sub>2</sub>、Rf<sub>3</sub>和 Rf<sub>4</sub>号在成曲 AO 和 AP 中都存在,酶活力大小顺序均为 Rf<sub>3</sub>>Rf<sub>2</sub>>Rf<sub>4</sub>>Rf<sub>1</sub> ( $p < 0.05$ )。其中,淀粉酶 Rf<sub>3</sub>号活力分别达到总活力的 71.2%和 62.1%,这表明该组分在水解原料中淀粉时起主要作用。但 AP 和 AO 之间各组分亮度和所占比例差异不显著 ( $p > 0.05$ )。

### 2.3 酱醪发酵过程总酸和 pH 值的变化

米曲霉 PRB-1 (AP) 和米曲霉 3.042 (AO) 酱醪发酵过程总酸含量和 pH 值的变化如图 5~6 所示。

由图可知,AP 和 AO 酱醪的总酸含量总体呈现上升趋势。发酵前 15 d,总酸含量持续上升且速度较快,之后变化趋于平缓,维持在 1.47~1.60 g/100 mL 之间,AP 和 AO 之间差异不显著 ( $p > 0.05$ )。与总酸含量变化趋势相对应,0 d 时酱醪 pH 值接近中性,发酵前 15 d 持续下降且幅度较大,之后变化趋于平缓且偏酸性,维持在 4.70~4.80 之间。整个发酵过程,AP 酱醪的 pH 值一直保持略高于 AO,但差异不显著 ( $p > 0.05$ )。

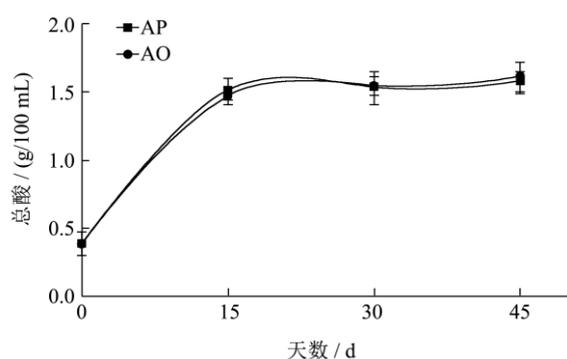


图5 米曲霉 PRB-1 (AP) 和米曲霉 3.042 (AO) 酱醪发酵过程的总酸含量变化

Fig.5 Variation of total acid content during AP and AO mash fermentation

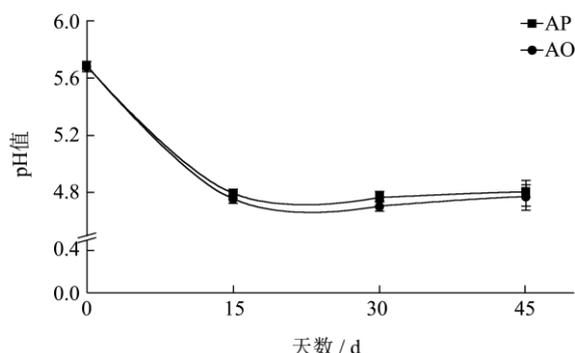


图6 米曲霉 PRB-1 (AP) 和米曲霉 3.042 (AO) 酱醪发酵过程的 pH 值变化

Fig.6 Variation of pH during AP and AO mash fermentation

研究表明,引起酱醪中总酸升高和 pH 值降低的原因主要有:发酵过程中蛋白质被水解生成酸性多肽和游离氨基酸,乳酸菌等微生物利用碳水化合物生成乳酸等有机酸,游离脂肪酸也是一大因素<sup>[11]</sup>。发酵过程 pH 值的变化对酶活力影响很大, pH 下降越快,起主要作用的蛋白酶和淀粉酶也越易失活,从而影响到原料利用和酱油品质。

#### 2.4 酱醪发酵过程氨基态氮的变化

氨基态氮是衡量酱油蛋白质利用率和氨基酸生成率的重要指标。GB 18186-2000 规定,特级酱油的氨基态氮含量不低于 0.8 g/100 mL。米曲霉 PRB-1 (AP) 和米曲霉 3.042 (AO) 酱醪发酵过程氨基态氮的含量变化如图 7 所示。

由图 7 可知,0 d 时,AP 和 AO 的氨基态氮为 0.31 g/100 mL。发酵前 15 d 氨基态氮增加明显,AP 和 AO 酱醪分别为 0.73 和 0.68 g/100 mL。之后缓慢增加,发酵 45 d 时 AP 酱醪氨基态氮为 0.86 g/100 mL,与 AO 相比高 2.8%,达到特级酱油标准。

发酵 15 d 时,由于原料中的可溶性氮在渗透压

的作用下不断溶解到盐水中,使得氨基态氮含量快速增加。菌种产生的蛋白酶也有利于发酵初期成曲中蛋白和肽的分解和氨基酸的溶出。当其生成速率大于消耗速率时,表现为增加<sup>[12]</sup>。发酵后期的美拉德反应和微生物生长,消耗了部分蛋白质、肽类、氨基酸等含氮物质与还原糖。

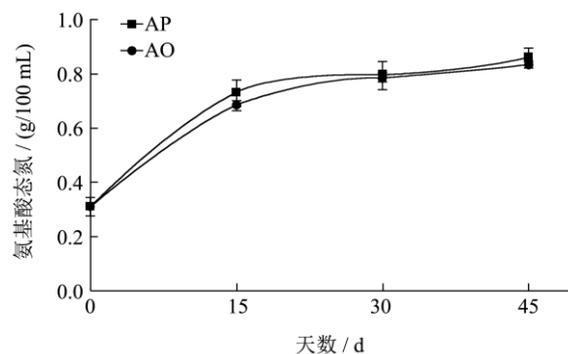


图7 米曲霉 PRB-1 (AP) 和米曲霉 3.042 (AO) 酱醪发酵过程的氨基态氮含量变化

Fig.7 Variation of amino acid nitrogen during AP and AO mash fermentation

#### 2.5 酱醪发酵过程还原糖的变化

米曲霉 PRB-1 (AP) 和米曲霉 3.042 (AO) 酱醪发酵过程还原糖的变化如图 8 所示。

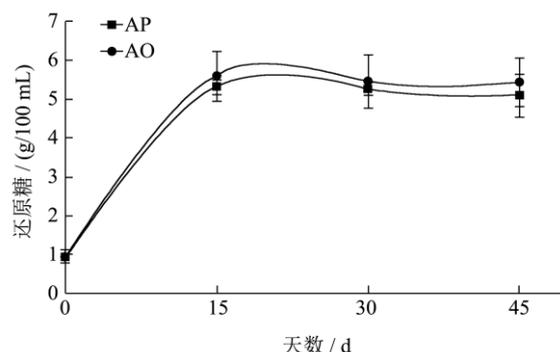


图8 米曲霉 PRB-1 (AP) 和米曲霉 3.042 (AO) 酱醪发酵过程的还原糖含量变化

Fig.8 Variation of reducing sugar content during AP and AO mash fermentation

由图 8 可见,随着发酵时间延长,两组酱醪中还原糖含量(以葡萄糖计)呈现先增加后缓慢降低的趋势。0 d 时 AP 和 AO 酱醪的还原糖含量为 0.9 g/100 mL,之后不断升高,发酵 15 d 时达到最大值,分别为 5.31 和 5.59 g/100 mL,之后还原糖含量缓慢降低。发酵 45 d 时 AP 酱醪的还原糖为 5.09 g/100 mL。发酵过程 AP 酱醪还原糖含量略低于 AO,但种间差异不显著 ( $p>0.05$ )。

制曲时产生的淀粉酶系将原料中的淀粉水解为

糊精、麦芽糖及葡萄糖等。产生的糖类也会不断溶入盐水中,此时还原糖的生成速率远大于还原糖的消耗速率,所以发酵 15 d 酱醪的还原糖含量迅速升高。发酵后期出现还原糖含量缓慢下降的现象,可能是因为淀粉酶系活力减弱,还原糖生成量减少。另外微生物的利用以及美拉德反应形成酱油色素,消耗了部分还原糖,其消耗速率大于生成速率<sup>[12]</sup>。

## 2.6 头油的相关理化指标

发酵 55 d 淋油得头油,对相关理化指标进行测定和计算,结果如表 4 所示。

发酵结束时 AP 头油的氨基态氮为 0.86 g/100 mL,达到特级酱油标准。AP 酿造酱油的原料利用率分别为 81.97%,高于 AO,但差异不显著 ( $p>0.05$ )。AP 的氨基酸生成率为 61.37%,较 AO 提高 3.52% ( $p<0.05$ )。AP 头油中还原糖含量达到 AO 水平,差

异不显著 ( $p>0.05$ )。

表 4 头油的理化指标

测定项目	米曲霉 PRB-1(AP)	米曲霉 3.042(AO)
氨基态氮/(g/100 mL)	0.86±0.04	0.84±0.01
全氮/(g/100 mL)	1.40±0.07	1.45±0.04
原料利用率/%	81.97±0.04	81.93±0.04
氨基酸生成率/%	61.37±0.45	57.85±1.70
还原糖/(g/100 mL)	4.82±0.74	5.43±0.75

注:氨基酸生成率:氨基态氮/全氮。

## 2.7 成曲酶活力与发酵酱油相关指标的关系

为研究米曲霉 PRB-1 成曲蛋白酶和淀粉酶活力与发酵酱油相关指标的关系,对其进行相关性分析,结果如表 5 所示。

表 5 成曲酶活力与酱油指标间的相关性分析

	氨基态氮	全氮	原料利用率	氨基酸生成率	还原糖
中性蛋白酶活力	0.306	-0.584	-0.290	0.884*	-
酸性蛋白酶活力	-0.371	-0.407	-0.007	0.151	-
淀粉酶活力	-	-	-	-	0.187

注:\*表示相关性显著 ( $p<0.05$ )。

由表 5 可知,成曲的中性蛋白酶活力和发酵酱油的氨基酸生成率呈正相关 ( $p<0.05$ ),即成曲蛋白酶的活力高则对应的发酵酱油中的氨基酸生成率也高。但成曲蛋白酶和淀粉酶活力和发酵酱油的其他指标均不存在相关性。

## 2.8 成曲酶组分与发酵酱油相关指标的关系

AP 成曲的中性蛋白酶和酸性蛋白酶活力分别是 AO 的 1.7 和 1.6 倍,但 AP 发酵酱油的氨基态氮、原料利用率没有预期的大幅度提高。而在成曲蛋白酶和淀粉酶组分上,AP 和 AO 之间并无显著差异,这与酱油指标结果较为一致。

分析认为通常蛋白酶活测定方法采用的温度条件为 40 °C,且大部分蛋白酶在 50~55 °C 的范围内发挥最大作用<sup>[13]</sup>,但发酵后期环境温度和 pH 值较低。酱醪盐分含量达到 17%,但李丹<sup>[14]</sup>等发现在高盐环境下,酱醪发酵前 15 d 蛋白酶活力迅速下降,与本试验酱醪发酵 15 d 时未能检出蛋白酶活力结果一致。因此,此发酵环境条件一般不利于蛋白酶作用。另外,发酵过程中起作用的是微生物分泌的组织分解酶,除了蛋白酶和淀粉酶,纤维素酶、木聚糖酶、果胶酶等酶类也能将原料中的不溶性高

分子物质分解成低分子化合物,是后期发酵发生各种化学变化的基础。以上原因可能造成酿造后期 AP 酱油氨基态氮含量、原料利用率为和氨基酸生成率并没有明显高于 AO。而电泳分析结果表明,AP 和 AO 成曲在蛋白酶和淀粉酶的组分及活力分布上并无显著差异,甚至 AO 成曲比 AP 多检测到 1 种活力相对较低的中性蛋白酶,与中性蛋白酶活力测定结果差别较大。因此,AP 成曲酶活与酱油理化特性不存在对应关系,其酶系对酱醪发酵环境的耐受性以及发酵过程的影响我们仍在进一步的研究中。

## 3 结论

3.1 米曲霉 PRB-1 制曲有较高的酸性和中性蛋白酶活力,达到 398.53 U/g 干基和 1539.98 U/g 干基,较米曲霉 3.042 制曲分别提高 71.79% ( $p<0.05$ ) 和 59.93%,淀粉酶活力比米曲霉 3.042 制曲略低 ( $p<0.05$ )。

3.2 在米曲霉 PRB-1 成曲中检测到 5 个中性蛋白酶组分,米曲霉 3.042 有 6 个中性蛋白酶组分,其中有 2 个组分在酸性条件下仍具有活力。2 组成曲中均含有 4 个淀粉酶组分。其中,蛋白酶 R<sub>f</sub> 6 号和

淀粉酶 Rf<sub>3</sub> 号活力最大。

3.3 米曲霉 PRB-1 发酵 55 d 头油中氨基态氮含量达到 0.86 g/100 mL, 较米曲霉 3.042 高 2.4%, 符合国标特级酱油标准。原料利用率和氨基酸生成率较米曲霉 3.042 分别提高 0.04% 和 3.52%。头油的还原糖含量可达到米曲霉 3.042 的水平。

3.4 米曲霉 PRB-1 成曲的中性蛋白酶活力和发酵酱油的氨基酸生成率呈正相关 ( $p < 0.05$ ), 但酶活力与酱油其他指标之间不存在相关性。

3.5 经米曲霉 PRB-1 发酵制得的成曲和酱油, 各项指标均达到或优于米曲霉 3.042 的水平, 表明米曲霉 PRB-1 是一株较优良的菌株, 在酱油酿造上有一定的应用前景, 从蛋白组水平揭示其酶系与酱油品质之间的相互关系值得进一步研究。

## 参考文献

- [1] 靳文生. 酱油多菌种制曲改善酶系组成的研究[J]. 现代食品科技, 2011, 8: 977-979  
JIN Wen-sheng. Improvement of composition of enzyme system and sauce fermentation by using multi-strain koji starters [J]. Modern Food Science and Technology, 2011, 8: 977-979
- [2] 纪凤娣, 鲁绯, 程永强. 中国传统酱油生产用米曲霉菌种研究进展[J]. 北京工商大学学报(自然科学版), 2012, 4: 41-43  
JI Feng-di, LU Fei, CHENG Yong-qiang, et al. Study on *Aspergillus Oryzae* breeding in production of chinese traditional soy sauce [J]. Journal of Beijing Technology and Business University (Natural Science Edition), 2012, 4: 41-43
- [3] 周其洋. 酱油生产菌种改良及其工艺的研究[D]. 江南大学, 2009  
ZHOU Qi-yang. Strain improvement and process research on soy sauce production [D]. Jiangnan University, 2009
- [4] 李旋. 高产蛋白酶米曲霉的诱变选育及培养条件优化[D]. 山东轻工业学院, 2011  
LI Xuan. Mutation breeding of *Aspergillus oryzae* with high-yielding protease and optimizing of culture conditions [D]. Shandong Institute of Light Industry, 2011
- [5] LIANG Y, PAN L, LIN Y. Analysis of extracellular proteins of *Aspergillus oryzae* grown on soy sauce koji [J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 2014, 73(1): 192-195
- [6] 闫博. 酱油成曲分解酶系的组分检测及分析[D]. 河北大学, 2010  
Yan Bo. Detection and analysis of the components of lytic enzymes of soy sauce koji [D]. Hebei University, 2010
- [7] 潘力, 苗小康, 梁燕娣. 酱油酿造米曲霉 AS3.951 (沪酿 3.042) 种曲胞外蛋白谱鉴定与分析[J]. 食品科学, 2010, 7: 182-185  
PAN Li, MIAO Xiao-kang, LIANG Yan-chang. Identification of extracellular protein profile of *Aspergillus oryzae* AS 3.951 grown on wheat bran koji [J]. Food Science, 2010, 7: 182-185
- [8] 黄文彪, 李丹, 赵谋明. 糖化增香曲对高盐稀态酱油发酵过程中理化性质影响的研究[J]. 现代食品科技, 2011, 27(5): 490-494  
HUANG Wen-biao, LI Dan, ZHAO Mou-ming. Effect of glycos-esterifiable monascus on physicochemical properties during the fermentation of high-salt diluted soy sauce [J]. Modern Food Science and Technology, 2011, 27(5): 490-494
- [9] Yasuda M, Tachibana S, Kuba-Miyara M. Biochemical aspects of red koji and tofuyo prepared using *Monascus fungi* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 96(1): 49-60
- [10] Gao X, Cui C, Zhao H, et al. Changes in volatile aroma compounds of traditional Chinese-type soy sauce during moromi fermentation and heat treatment [J]. Food Science and Biotechnology, 2010, 19(4): 889-898
- [11] Luh B S. Industrial production of soy sauce [J]. Journal of Industrial Microbiology, 1995, 14(6): 467-471
- [12] Gao X, Zhao H, Feng Y, et al. A comparative study on physicochemical properties of Chinese-type soy sauces prepared using pure koji and mixed kojis [J]. African Journal of Biotechnology, 2010, 9(40): 6740-6747
- [13] Su N, Wang M, Kwok K, et al. Effects of temperature and sodium chloride concentration on the activities of proteases and amylases in soy sauce koji [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(5): 1521-1525
- [14] 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(09): 24-28  
LI Dan, CUI Chun, WANG Ya-Qin, et al. Study on protein degradation rules during the fermentation of high salt diluted soy sauce [J]. Food and Fermentation Industries, 2010(09): 24-28