

酱油酿造过程中微生物及生物酶的研究进展

赵雪, 张展开, 张智宏, 高献礼*

(江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212013)

摘要: 酱油是以大豆或豆粕、小麦粉或麸皮为原料, 依靠微生物发酵而产生的一种液态调味品。在发酵过程中, 微生物对原料中的蛋白、淀粉等营养物质进行分解, 此过程起主导作用的是微生物所分泌产生的生物酶。当前国产酱油采用米曲霉沪酿 3.042 (*Aspergillus oryzae* 3.042) 进行发酵, 利用其产生的碱性和中性蛋白酶把原料中的蛋白分解为氨基酸和多肽, 为酱油提供以鲜味为主的多种滋味, 但仅以米曲霉单菌种酿造的酱油存在原料利用率低、风味相对差等问题。随着消费者对酱油品质要求的提高, 学术界和生产企业正在通过微生物诱变、多菌种发酵、生物酶制剂应用等多种方式改善发酵过程中生物酶的种类和活性, 以进一步提升酿造酱油的品质。该文重点综述了酱油酿造过程中的关键微生物、生物酶及其研究进展和在酱油中的应用, 以期对利用微生物、生物酶制剂提升酱油品质提供理论指导。

关键词: 酱油; 微生物; 生物酶; 质量

文章编号: 1673-9078(2024)02-329-337

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.2.1120

Progress on Microorganisms and Biological Enzymes during Soy Sauce Fermentation

ZHAO Xue, ZHANG Zhankai, ZHANG Zhihong, GAO Xianli*

(School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: Soy sauce is a liquid condiment produced by microbial fermentation using soybean/soybean meal and wheat flour/bran. During fermentation, the proteins, starch, and other nutrients in the raw materials are degraded by microorganisms, and the biological enzymes secreted by these microorganisms play a dominant role in this process. Currently, soy sauce manufacturers in China usually use *Aspergillus oryzae* 3.042 as a brewing starter. It produces alkaline and neutral proteases that decompose the proteins in the raw materials into amino acids and peptides, lending soy sauce a complex, predominantly umami flavor. However, soy sauce fermented solely by *A. oryzae* has limitations, such as inefficient raw material utilization and a relatively poor flavor. With increasing consumer demand for high-quality soy sauce, academia and production enterprises are improving the types and activity levels of the biological enzymes used in the fermentation process through microbial mutagenesis, multi-bacterial fermentation, and biological enzyme preparations, among other methods, to further enhance soy sauce quality. This review focuses on the key microorganisms and biological enzymes involved, and their research progress and application in soy sauce fermentation. It is hoped that this review can provide theoretical guidance for the use of microorganisms and biological enzyme preparations to improve soy sauce quality.

Key words: soy sauce; microorganism; biological enzyme; quality

引文格式:

赵雪,张展开,张智宏,等.酱油酿造过程中微生物及生物酶的研究进展[J].现代食品科技,2024,40(2):329-337.

ZHAO Xue, ZHANG Zhankai, ZHANG Zhihong, et al. Progress on microorganisms and biological enzymes during soy sauce fermentation [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(2): 329-337.

收稿日期: 2023-09-18

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32372254)

作者简介: 赵雪 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: 2222118035@stmail.ujs.edu.cn

通讯作者: 高献礼 (1979-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: gaoxianli@ujs.edu.cn

酱油是我国传统的调味品,已有2500多年的历史^[1]。传统酱油采用自然接种的方式接入发酵菌种,导致大曲和酱醪中微生物群落复杂且不稳定,酱油质量稳定性差。此外,自然接种方式可能污染环境中的有害微生物,对酱油的质量和食用安全性造成潜在威胁。随着研究的深入,研究人员发现米曲霉为酱油酿造的关键微生物。为了提高酱油生产效率和安全性,20世纪70年代,我国科技人员从酱醪中分离出一株性状“优良”的米曲霉,后经物理诱变,其产酶性能得到进一步提升,被命名为米曲霉沪酿3.042,目前该菌株是国内酱油酿造的重要菌株^[2]。米曲霉3.042主要分泌中性和碱性蛋白酶,其耐盐性、耐酸性较差^[3-6]。然而,酱油酿造主要在酸性(pH值4.9~6.5)和高盐条件下进行,米曲霉产蛋白酶失活速度快,这是造成单菌株酿造酱油风味、外观质量相对差和原料利用率低的主要原因^[7,8]。

酱油生产过程中依靠微生物所产酶系(胞外酶)将原料(大豆/脱脂大豆、面粉、麸皮)降解成小分子物质(多数为滋味物质),部分小分子物质再经过微生物的生物转化作用(微生物体内酶系)形成酱油的香气物质,上述物质与酱醪中美拉德反应产物、食盐等共同形成了酱油的色、香、味、体^[2,6]。综上可知,酱油酿造的本质是发酵微生物所产生物酶系的催化作用,其种类和酶活对酱油品质具有直接影响。

本文首先综述了酱油生产过程中主要微生物的种类及其演替;其次介绍了酱油酿造过程中生物酶及其对酱油品质的影响;最后介绍了生物酶的研究进展和相关的国家政策及其在酱油生产中的应用案例。

1 酱油中酿造微生物的种类及其演替

酱油酿造依靠大曲和酱醪中各种微生物及其所产酶系的共同作用,而酿造过程中微生物群落的演替对酱油质量有重要影响,其中曲霉菌、乳酸菌、酵母菌是酿造过程中的主要微生物,曲霉菌主要通过其所产的胞外生物酶对原料中大分子的分解起主要作用,乳酸菌和酵母菌则主要通过体内酶系的作用对酱油香气的形成具有重要贡献。

1.1 霉菌

酱油制曲过程中的关键微生物是曲霉。国产酱油以米曲霉3.042为制曲菌种,而日式酱油以酱油曲霉(*A. sojae*)为制曲菌种。传统酱油制曲为自然接种,大曲中除了有米曲霉,还有毛霉、青霉、枝

孢霉、黑曲霉、链格孢菌、红绶曲霉^[9]、梗霉和布氏犁头霉^[10]等曲霉。Li等^[11]利用无标记蛋白质组学和HS-SPME-GC-MS代谢组学技术对以米曲霉3.042和酱油曲霉3.495为菌种制备大曲的酶系进行了分析。结果显示,以米曲霉沪酿3.042所制备成曲中糖苷酶和纤维素酶(阿拉伯糖内切酶、 β -葡萄糖苷酶、 α -半乳糖苷酶、 α -葡萄糖醛酸酶、阿拉伯糖内切酶、 β -1,4-内切木聚糖酶、阿拉伯糖内切-1,5- α -L-阿拉伯糖苷酶等)以及酯酶活性较高,而利用酱油曲霉3.495所制备大曲的蛋白酶(如肽水解酶、二肽基氨基肽酶和肽酶)活性较高。此外,两株菌株所制备大曲的挥发性醇、醛和酯含量不同,以米曲霉沪酿3.042所制备成曲中L-乳酸乙酯、9,12-十八碳二烯酸-甲酯和肉豆蔻酸甲酯三种酯类的含量较高,而以酱油曲霉3.495所制备成曲中的2,3-丁二醇、癸醛、己醛、2-甲基-4-羟基苯甲醛和5-甲基-3-庚酮等含量较高,说明不同发酵菌种所分泌的生物酶及其活性不同,进而影响了大曲的风味。

米曲霉沪酿3.042主要产中性和碱性蛋白酶,而酱油的发酵主要在弱酸性环境下完成,这导致米曲霉沪酿3.042所产碱性蛋白酶快速失活,影响原料中蛋白质的利用以及酱油风味物质的形成。黑曲霉具有大量分泌酸性蛋白酶的能力,且是公认安全微生物(GRAS)^[9]。因此,将米曲霉与黑曲霉以适当的比例混合制曲,可以在不影响酱油典型风味的情况下改善曲中蛋白酶系的分布,进而提高酱油原料蛋白质利用率和风味。如Gao等^[12]将米曲霉3.042和黑曲霉3.350(*A. niger* 3.350)按照3:1进行混合制曲,与仅以米曲霉3.042所制成曲相比,混菌成曲的葡萄糖淀粉酶和酸性蛋白酶活性分别提高62%和190%,混菌所制酱油的氨基酸态氮、总游离氨基酸、谷氨酸、肽(≤ 1 ku)和还原糖的含量比对照酱油分别提高6.14%、5.97%、10.40%、71.59%和9.62%。此外,采用混菌所制备酱油的香气化合物(如4-乙烯基愈创木酚、1-辛烯-3-醇、1-丙醇)含量显著提高,表明黑曲霉和米曲霉混合制曲可通过改善大曲酶系,进而提高酱油风味物质含量,提高酱油质量。赵谋明等^[9]从传统酿造酱油酱醪中分离纯化出黑曲霉AN2(*A. niger* AN2),并将该黑曲霉与米曲霉混合制曲,这种制曲方法比仅用米曲霉所制成曲的酸性和中性蛋白酶酶活分别提高了22%和43%,且氨肽酶和糖化酶的酶活分别提高了15%和118%,进而提高了酱油原料蛋白质利用率和改

善了酱油风味。综上可知,制曲过程中曲霉菌的种类和比例对其生物酶的构成有着重要影响,进而影响了酿造酱油的品质,合理调控酱油酿造过程中生物酶系是提高酱油质量和原料利用率的重要途径。

1.2 乳酸菌

乳酸菌是酱油发酵的重要微生物,对酱油风味的形成起重要作用^[13]。酱油发酵过程中出现的主要乳酸菌包括嗜盐四联球菌(*Tetragenococcus halophilus*)、魏斯氏菌(*Weissella*)、片球菌(*Pediococcus*)等。在酱油的酿造过程中,乳酸菌能分泌多种酶类,可作为米曲霉酶系的补充,促进原料水解^[14]。孙莉等^[15]在酱油制曲过程中接入乳酸菌与米曲霉共同发酵,发现酸性蛋白酶活力提高了47%; β -葡萄糖苷酶活力提高了460%(160.47 U/g),纤维素酶活力提高了18%(24.43 U/g);果胶酶活力提高了23%(38.53 U/g)。此外,乳酸菌还可以通过体内酶系的催化作用生成乳酸、乙酸等有机酸和多种风味物质,对酱油风味的形成有着重要的作用。除此之外,伴随着乳酸菌快速生长繁殖,导致酿造体系pH值下降,这既可抑制其他杂菌生长,又能提供低酸环境,为酵母菌生长繁殖创造发酵条件。在发酵过程中,乳酸菌的数量随着酒精发酵的进行而迅速下降,直到鲁氏接合酵母等主发酵酵母被其他酵母所替代,酱醪中会出现少量乳酸菌^[13]。嗜盐四联球菌是酱醪的优势种之一,可以在酱醪发酵15天被检测到,在酱醪发酵后期含量较少^[16,17]。在酿造过程中添加嗜盐四联球菌可以提高酱油中2-甲基丁醇、2-甲基丁酸和乙酸异戊酯的含量,从而改善酱油风味^[18]。氨基甲酸乙酯具有生物毒性,在酱油酿造时添加嗜盐四联球菌,可使原油中氨基甲酸乙酯前体物质瓜氨酸的含量降低85.6%,从而使酱油中氨基甲酸乙酯含量减少79.3%,提高了酱油的安全性^[19]。魏斯氏菌也是酿造过程中的优势菌,类肠膜魏斯氏菌(*W. paramesenteroides*)、食窦魏斯氏菌(*W. cibaria*)和融合魏斯氏菌(*W. confusa*)是最具优势的3株魏斯氏菌^[20-22]。类肠膜魏斯氏菌能分泌耐盐蛋白酶,食窦魏斯氏菌具有耐盐和耐酸性,在酱油发酵过程中产生大量的富马酸,因此魏斯氏菌可提高酱油的氨基酸含量和有机酸丰富度^[23]。片球菌具有较好的耐盐性,在酱醪发酵前期参与有机酸及氨基酸代谢,对酱油滋味具有一定影响^[24]。片球菌等不仅产酸性物质,还能分泌具有抑菌的特性的抑制肽和细菌素,从而保障酱油酿造的安全性^[25]。

综上,乳酸菌可以丰富酱油风味物质的种类和含量,还能抑制杂菌繁殖并减少氨基甲酸乙酯等有害物质的生成。因此,研究乳酸菌对酱油原料的转化作用及其对酱油滋味、风味物质形成的影响具有重要意义,同时调控乳酸菌在酱油酿造过程中的代谢活动,对推动酱油产业的健康发展也具有重要意义。

1.3 酵母菌

酵母菌同乳酸菌一样,也是酱油酿造的重要微生物,它具有耐盐、耐高渗透压特性。在发酵后期,酱醪中的真菌以酵母菌为主^[26]。目前从酱醪中分离出的酵母菌有鲁氏接合酵母(*Z. rouxii*)、易变球拟酵母(*T. versatilis*)、埃契假丝酵母(*C. etchellsii*)等30多个种,其中对鲁氏接合酵母的研究最多^[27,28]。鲁氏接合酵母是一种耐高渗透压酵母,在较高浓度的离子和非离子(糖和醇)环境下均可生长和繁殖^[29],在酱醪中的检出率及丰度均较高^[21]。鲁氏接合酵母在自然条件下于酱油发酵前期大量繁殖,当成曲加入盐水后,米曲霉开始逐步消亡,耐盐乳酸菌被解除生长抑制开始繁殖并代谢产生乳酸,这为鲁氏接合酵母等耐酸性酵母提供适宜的生长环境,使其成为发酵后期的主要真菌^[30]。酵母菌具有分泌酱油关键香气化合物的能力,是酱油香气化合物的重要贡献者。鲁氏接合酵母以生物合成途径产生乙醇,通过Ehrlich途径由相应的氨基酸代谢产生大量的高级醇及芳香醇,其中包括苯乙醇、2/3-甲基-1-丁醇等,这些物质是酱油醇香的主要贡献者^[31,32]。此外,易变假丝酵母(*C. versatilis*)和埃契假丝酵母等假丝酵母也是酱醪中常见的产香微生物,可分泌乙酸、4-乙基愈创木酚、苯乙醛、2-苯乙酸酯等酱油关键香气化合物,改善酱油风味^[33]。球拟圆酵母(*T. globosa*)、易变球拟酵母(*T. versatilis*)、埃切球拟酵母(*T. etchellsii*)和莫格球拟酵母(*T. mogii*)等球拟酵母可将酱醪中发酵前期生成的醇类和有机酸合成为酯类、产生4-乙基愈创木酚和4-乙基苯酚等酱油特征香气成分,显著改善酱油香气。基于上述酵母菌优越的产香性能,在酱醪酿造阶段强化产香酵母以改良酱油风味是酱油行业的研究热点之一。如方冠宇等^[34]在酱醪中接种鲁氏接合酵母进行发酵,发现酱醪中的乙醇、甲硫醇、苯甲醇、苯乙醇等高级醇和芳香醇的含量及种类均得到大幅上升,改善了酱油风味。Liu等^[35]于酱油发酵第45天接种易变球拟酵母,结果显示成品酱油中棕榈酸乙

酯和愈创木酚的含量相比对照组分别增加了 7.9 和 1.77 倍, 3- 甲基 -1- 丁醇的含量也得到了显著提升, 酱油风味评分得到显著提高。Jiang 等^[36]发现, 在高盐稀态酱油发酵过程引入不同的酵母菌进行发酵, 其通过酯化反应或醇解反应生成的酯类物质增多, 推测与其中脂肪酶的作用有关。随着对酱油特征风味化合物及酱醪中耐盐酵母研究的深入, 这使得对酱油风味的定向调控成为可能^[37]。

综上, 酱油酿造过程中微生物的组成是动态变化的, 其主导微生物由制曲时的曲霉逐步变为酱醪发酵时的乳酸菌、酵母菌等微生物。微生物的动态变化决定了体系中生物酶的种类构成和活性变化, 进而对酿造过程中大分子的分解、小分子的生成, 以及酱油感官品质变化产生重要的影响。因此, 有必要对酱油酿造过程中的生物酶及其应用、改良进行进一步的研究, 以期使得对酱油风味的定向调控和原料利用率的提升成为可能。

2 酱油酿造过程中生物酶对酱油品质和原料利用率的影响

酱油酿造过程中的生物酶大部分由米曲霉产生, 如蛋白酶、糖化酶、氨肽酶、淀粉酶等, 这些酶对酱油风味和品质的形成至关重要, 其中蛋白酶、淀粉酶、果胶酶和纤维素酶等与原料利用率密切相关^[38]。除米曲霉外, 酱油中的其他微生物如解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*) 也可以产蛋白酶和淀粉酶, 对酱油质量产生影响^[39]。

2.1 蛋白酶对酱油品质和原料利用率的影响

蛋白酶是决定酱油质量的关键因素, 其在发酵过程中的种类和活性对酱油中的呈味氨基酸、多肽含量及其他物质的生成有着重要影响。其中, 米曲霉产生的蛋白酶主要为中性和碱性蛋白酶, 这两类蛋白酶主要把原料中的蛋白质水解为肽类和少量游离氨基酸。黑曲霉主要产酸性的蛋白酶, 这类蛋白酶多为肽酶, 可进一步将肽类水解为游离氨基酸^[9,40]。酱油的弱酸性酿造环境决定酸性和中性蛋白酶在蛋白质的水解过程中起重要作用, 而米曲霉主要存在于制曲阶段和酱醪发酵前期, 其所分泌的蛋白酶在发酵前期快速失活, 至发酵 20 d 时残余蛋白酶酶活不足初始值的 10%。因此, 优化酱醪发酵过程中蛋白酶酶系或提高酱醪发酵过程中蛋白酶酶活是提高酱油质量和原料利用率的有效途径。余洁瑜

等^[41]发现, 在酱油发酵初期 (0 d) 添加 0.1% 的酸性蛋白酶, 其酸性蛋白酶、中性蛋白酶活性分别为未添加酶制剂对照组的 2.9 和 2.1 倍, 且在酱油 pH 值下降至 4.5 时, 总酸、氨基酸态氮含量分别提高了 36.71%、16.49%。

米曲霉所产蛋白酶的耐酸和耐盐性差导致以米曲霉单菌种发酵的酱油质量“相对低”。如米曲霉沪酿 3.042 产蛋白酶耐盐和耐酸性差, 使酱油中大豆蛋白 B₃ 亚基难以被彻底降解, 这不但导致酱油原料利用率低, 还会导致二次沉淀形成, 影响酱油外观质量^[42]。因此, 筛选高产耐酸和耐盐性蛋白酶的新米曲霉菌株成为提升酱油质量的研究热点。Xu 等^[43]通过电刺激将米曲霉和黑曲霉的原生质体进行融合, 获得高产酸性蛋白酶的新菌株 F76, 该菌株的酸性蛋白酶活为 1 500 U/g, 是其亲本的 1.82 倍。Salamin 等^[44]在米曲霉 NF1 中高表达米曲霉的脯氨酰羧肽酶 (AoS28D) 基因, 该菌株的脯氨酰羧肽酶活达到原菌株的 32 倍。此外, 在酱醪中添加生物酶也可以达到降低酱油二次沉淀的目的。如 Shan 等^[45]从黑曲霉产蛋白酶中筛选出一种耐盐酸性蛋白酶 (脯氨酰内肽酶), 该蛋白酶在酿造过程中能够降解约 50% 的大豆蛋白 B₃ 亚基, Zhang 等^[46]通过超声辅助使该酶对 B₃ 亚基降解率进一步提高, 不但显著减少了酱油的二次沉淀, 而且显著提高了酱油氨基酸态氮 (7.14%) 和总氮 (5.23%) 含量, 显著改善了酱油外观质量和风味。由此可见优化酱醪蛋白酶系对提升酱油质量具有重要的积极影响。

2.2 淀粉降解酶对酱油品质的影响

米曲霉是大曲中淀粉酶的主要生产者, 对酱油质量具有重要影响。这类酶主要包括 α - 淀粉酶和糖化酶, 其中 α - 淀粉酶能够切断淀粉链内部 α -1,4 糖苷键, 而糖化酶从淀粉非还原性末端依次切断 α -1,4 糖苷键。在酱油的酿造过程中, 淀粉颗粒糊化后能被 α - 淀粉酶分解成小分子的糊精和少量糖分, 使淀粉黏度降低, 糖化酶使短分子的糊精全部变成葡萄糖或麦芽糖^[47], 可以作为米曲霉等微生物的营养素。生成的葡萄糖等还原糖还可以被酵母菌、乳酸菌等微生物利用, 作为酒精、乳酸及谷氨酸等物质发酵的基础物质, 对酱油中酯类、有机酸和呈味氨基酸等风味物质的生成具有重要影响。同时, 还原糖还能与氨基酸等蛋白水解产物通过美拉德反应生成多种呈香、呈色物质。综上可知, 淀粉酶类催化的淀粉液化、糖化反应对酱油的色、香、味、体均

有重要影响。徐欢欢^[48]发现,在制曲时候添加 0.1% 的 α -淀粉酶,可以分别提升大曲酸性蛋白酶、淀粉酶、羧肽酶的活力 14.55%、35.02% 和 13.89%,终产品蛋白利用率和还原糖含量分别提升了 2.75% 和 11.36%,对产品的风味有一定的改良作用。综上可知,糖化完全则酱油的体态浓厚,甜味好且无盐固形物含量高。黑曲霉也产 α -L-鼠李糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶等淀粉降解酶,可用于补充米曲霉酶系,提高酱油质量^[12,49]。

2.3 其他生物酶对酱油品质和原料利用率的影响

其他生物酶对酱油品质和原料利用率也具有重要影响。首先,原料中纤维素是大豆细胞壁的主要成分,其分解不但可以直接为酿造微生物提供碳源,而且可释放细胞内部的蛋白质、淀粉,增加其与蛋白酶、淀粉酶的接触机会,提高蛋白质和淀粉的水解度和利用率。因此,纤维素酶不但具有提高酱油原料利用率的功能,而且可改善酱油风味。酱油发酵过程中纤维素酶包括 C1 酶、Cx 酶和 β -1,4 葡萄糖苷酶等。天然纤维素被 C1 酶分解为直链纤维素,而直链纤维素被 Cx 酶分解为纤维寡糖和纤维二糖,纤维二糖则在 β -葡萄糖苷酶的作用下被分解为葡萄糖^[47]。最近的研究表明, β -葡萄糖苷酶通过水解糖苷键使香气物质完成从结合态转化到游离态,从而增加酱油风味^[50]。

果胶酶包括原果胶酶、果胶甲酯水解酶、果胶酸酶三种酶。原果胶酶使天然果胶质转化为水溶性果胶,在果胶甲酯水解酶的催化作用下,果胶去甲酯基后生成果胶酸,而果胶酸中的 α -1,4-糖苷键被果胶酸酶切断后生成半乳糖醛酸,半乳糖醛酸进入糖代谢途径,为酱油酿造提供碳源^[47]。

此外,酱油酿造过程中还存在催化醛、酯、酚、呋喃酮及芳香环类物质生成相关的酶,影响酱油风味物质的生成。如乳酸脱氢酶能催化丙酮酸生成乳酸,乳酸可以使酱油的口感变得柔和、圆润^[51]。乙醇在乙醇脱氢酶的催化作用下氧化生成羰基化合物(乙醛),多酚氧化酶把单酚、邻苯二酚、邻苯三酚等酚类物质氧化为相应的醌类物质,醌聚合后与胞内蛋白质的氨基反应,形成黑色素^[47],进而影响酱油的色泽及其品质。酯酶(羧基酯酶)可以水解羧酯键,也对己酸乙酯等低级脂肪酸酯的形成起催化作用。脂肪酶(甘油酯水解酶)既能水解脂肪形成脂肪酸和甘油,又能催化脂肪的合成^[47]。谷氨酰

胺酶可以通过水解谷氨酰胺,生成对酱油鲜味有重要影响的谷氨酸。周尚庭等^[52]发现,在酱油发酵初期添加酱醪 0.01% 的谷氨酰胺酶可以在不显著影响氨基氮、全氮、总酸和盐分等指标的前提下,提升 44.55% 的谷氨酸含量,使得酱油的鲜味和口感协调性得到明显的提升,弱化酱油的咸味和苦涩味。

由此可得,酱油酿造的本质是酿造微生物所产酶系的催化作用,其催化作用对酿造过程中大分子的分解,关键呈味、呈香物质的生成有重要影响。随着人们生活水平的提升,消费者对酿造酱油的品质有了更高的要求,企业和学术界可以通过对生物酶及其应用进行更深层次的研究,以进一步提升酱油原料利用率和色、香、味物质的转化效率。

3 生物酶研究进展及其在酱油中的应用

3.1 微生物对酱油中生物酶的影响

在酱油酿造过程中主要通过新菌种、菌种改造和多菌种协同发酵达到调控生物酶的目的。Ao 等^[53]从自然发酵的蚕豆酱中筛选出一株米曲霉新菌株,该菌株所产酶具有较强的耐酸/耐热性能,可优化酱油酿造过程中的生物酶。Shu 等^[54]对米曲霉沪酿 3.042 的孢子进行常压室温等离子体(ARTP)处理(照射 150 s),得到所产中性和酸性蛋白酶酶活分别为亲本菌株 1.55 和 1.17 倍的新菌株。Gao 等^[55]也利用 ARTP 处理米曲霉 3.042 孢子,获得了一株米曲霉新菌株 H₈。新菌株所产生的耐盐碱性蛋白酶、中性蛋白酶、天冬氨酸氨基肽酶的酶活是其亲本菌株的 1.26、1.29、1.28 倍,具有较高的应用潜力。Hu 等^[56]利用 PCR 技术使米曲霉胞外中性蛋白酶 NPI 的编码基因发生随机突变,并在毕赤酵母 GS115 中表达,筛选出 NPI 酶突变体 Y122F 的最适 pH 值为 5.5,而野生型 NPI 的最适 pH 值为 7.5,且该酶在 40 °C 时的比活为 1 383.50 U/mg,是野生型的 2.75 倍,成功完成了对中性蛋白酶 NPI 的修饰,该酶有望在酱油酸性发酵过程中提高对原料的利用率。Sahar 等^[57]克隆米曲霉 S2 胞外 α -淀粉酶 AmyA 的编码基因并在巴斯德毕赤酵母 SMD1168H 中成功表达,获得酶活为 72 U/mL 的胞外淀粉酶且该酶的最适 pH 值为 5.6 并具有耐热性(60 °C),适合应用于酱油等发酵行业。郑博^[58]将黑曲霉 FND-A47 和米曲霉 B-2 以 4:1 的比例混合制曲,所得成曲的酸性和中性酶活力是米曲霉单菌种所制曲的 1.27 和 1.39 倍。上述生物酶调控技术均可有效调控和优化了酱油酿

造过程中的生物酶,提升酱油滋味物质含量和原料利用率,具有重要应用价值。

3.2 酶制剂对酿造酱油品质的影响

在确保酶的安全性的前提下,在酱醪酿造阶段补充适当的生物酶可有效提升酱油质量和原料利用率。路怀金^[59]在酱醪酿造阶段添加商品木聚糖酶降低酱油酸味强度 31.96%,提高了酱油咸味和鲜味强度 48% 和 68%,改善了酱油风味。史龙君^[60]在酱醪中添加适量的纤维素酶发酵 96 h 后,酱油氨基酸态氮和还原糖含量以及色度均明显提高,改善了酱油品质,且原料蛋白质利用率提高了 8%。Shan 等^[45]从黑曲霉产蛋白酶中筛选出一种耐酸、耐盐脯氨酰内肽酶,在酱醪酿造阶段添加 2 U/g 酱醪的该酶。终产品酱油总氮、氨基酸态氮、还原糖和非盐溶性固体的含量均显著提高,并且减少约 61% 的酱油二次沉淀,显著提升了酱油风味和外观质量。Lee 等^[61]从韩国豆酱中分离出一株米曲霉,该曲霉

所产蛋白酶 AOLK-101 具有优异的耐酸性 (pH 值 4.5~7.5)、耐盐性 (10%) 和耐高温性 (50 °C),在豆酱酿造过程中添加一定量的该酶可显著改善产品风味,说明该微生物所产蛋白酶在酱油酿造过程中也具有潜在应用价值。目前,市面上有较多的蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶等基础商用酶制剂可供选择,但部分新型生物酶的制备和应用仅限于实验室规模,需进一步降低成本以满足工业化应用的可行性。

3.3 食品工业用酶制剂

生物酶制剂是一类通过理化方法从同源微生物的组织或发酵代谢产物中提取出的蛋白质,具有改善食品的感官品质、延长货架期、提高产品的附加值等特点。食品工业用酶制剂在酱油中的应用符合酱油、原原本味酱油等国家、行业标准要求 (表 1),对设备、能源、环保等方面较为友好,相比新型发酵菌株的引入、低温胁迫诱变等技术方案具备更高的工业化应用可行性。

表 1 酶制剂产品质量标准

Table 1 Product quality standards for enzyme preparations

项目	蛋白酶制剂		脂肪酶制剂		α-淀粉酶制剂		固定化葡萄糖异构酶制剂	
	固体剂型	液态剂型	固体剂型	液态剂型	α-淀粉酶制剂		固体剂型	
					中温	耐高温		中温
色泽	白色至黄褐色	浅黄色至棕褐色	白色至黄褐色	浅黄色至棕褐色	白色至黄褐色	浅黄色至棕褐色	—	
状态	粉末或颗粒,无结块和潮解	液体,允许有少量凝聚物	粉末或颗粒,无结块和潮解	液体,允许有少量凝聚物	粉末,无霉变、结块、潮解现象	液体,允许有少量凝聚物	不结块	
气味	无异味,微生物发酵产品或有特殊发酵气味		无异味,有特殊发酵气味		无异味	无异味	无异味	
干燥失重/% ≤	8.0	—	8.0	—	8.0	—	8.0	
细度 (过 0.40 mm 的试验筛)/% ≥	80	—	—	—	—	—	—	
酶活力/(U/g 或 U/mL)	符合声称	符合声称	5 000	—	2 000	2 000	2 000	
容重/(g/mL)	—	—	—	—	—	1.10~1.25	—	
耐热性存活率/% ≥	—	—	—	—	90	90	—	
pH 值 (25 °C)	—	—	—	—	—	5.5~7.0	5.8~6.8	—
国标	GB/T 23527.1-2023 ^[62]		GB/T 23535-2009 ^[63]		GB/T 24401-2009 ^[64]		GB/T 23533-2009 ^[65]	

当前,生物酶的固定化技术是生产具有工业化应用价值酶制剂的关键技术。该技术通过包封、共价结合、交联和吸附等手段将酶和固定基质相结合,

使酶在生物反应器中保持稳定,并能够重复利用^[66],从而进一步降低酶制剂的应用成本,并提升其在食品工业中应用的可行性。比如,吴惠玲等^[67]将固定

化中性蛋白酶凝胶颗粒应用于传统高盐稀态酱醪发酵中,发现固定化蛋白酶相比游离蛋白酶的酶活稳定性更高,蛋白质转化率较空白对照组与游离组分别提高达6.08%和1.88%。未来利用固定化等技术获得高质量生物酶仍是该领域研究热点。

在法规上,食品工业用酶制剂属于加工助剂,在食品生产过程、而非终产品中发挥作用,由负责食品添加剂的国际食品添加剂法典委员会(Codex Committee on Food Additives, CCFA)制定相关标准和指南进行管理。中国、美国、欧盟、澳大利亚等食品工业较为发达的国家均对食品工业用酶制剂有明确的质量要求规定和允许使用的酶制剂名单(欧盟的名单尚在制定中)^[68]。我国现批准使用的酶制剂有45种(包括黑曲霉所产的 α -半乳糖苷酶、阿拉伯呋喃糖苷酶、多聚半乳糖醛酸酶、半纤维素酶,米曲霉所产的氨基肽酶、葡萄糖氧化酶、蛋白酶、 α -淀粉酶、漆酶等)^[69],并对食品工业用酶制剂进行严格的要求。首先,酶制剂产品的酶活力必须在标示值的85%~115%。其次,产品中的铅含量不得超过5 mg/kg,总砷含量不得超过3 mg/kg。除此以外,产品中菌落总数($\leq 50\ 000$ CFU/g)、大肠菌群(≤ 30 CFU/g)、大肠埃希氏菌(≤ 10 CFU/g或 < 3 MPN/g)、沙门氏菌(不得检出)等微生物指标必须符合相应标准。最后,我国还针对微生物来源的酶制剂要求不得检出抗菌活性且基因重组微生物所生产的酶制剂不应检出生产菌^[70]。

由上可知,通过调控酿造过程中生物酶可有效提升酱油品质和原料利用率,目前主要通过运用具有高产特定生物酶的新菌种、非定向菌种改造、多菌种协同发酵和食品工业用酶制剂调控酱油酿造过程中生物酶,进而提升酱油品质和原料利用率。

4 结论和展望

酱油制备主要依靠微生物的形成的各种生物酶将原料中的蛋白质、淀粉等降解成小分子物质,并将其部分通过生物转化形成风味物质的一个复杂的过程。在酿造过程中起主要作用的微生物包括霉菌、乳酸菌和酵母菌等。霉菌是淀粉类降解酶、蛋白类降解酶、脂肪酶等生物酶的主要生产者;酵母菌和乳酸菌可以产生少量的酶,并提高酱油中酸、酚、酮等风味物质含量,是酱油发酵过程中的风味菌。优化酿造酱油的发酵菌种和风味菌的种类以及在酱醪中添加发酵所需酶制剂均能达到提高原料利用率、降低二次沉淀和改善酱油风味质量的目的,为

生产更优质的酱油提供了新的思路。我国当前仍然面临微生物产酶资源开发不足的问题,在发酵环境中鉴定和筛选高产特定生物酶的新菌种,丰富发酵微生物菌库和开发更多性能优良的食品工业酶制剂是未来研究的重要方向,也为发酵产业高质量发展提供了有力保障。

参考文献

- [1] ZHAO G Z, HOU L H, YAO Y P, et al. Comparative proteome analysis of *Aspergillus oryzae* 3.042 and *A. oryzae* 100-8 strains: Towards the production of different soy sauce flavors [J]. *Journal of Proteomics*, 2012, 75(13): 3914-3924.
- [2] ZHAO G Z, YAO Y P, HOU L H, et al. Comparison of the genomes and transcriptomes associated with the different protease secretions of *Aspergillus oryzae* 100-8 and 3.042 [J]. *Biotechnology Letters*, 2014, 36(10): 2053-2058.
- [3] ZHAO G Z, DING L L, YAO Y P, et al. Extracellular proteome analysis and flavor formation during soy sauce fermentation [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1872.
- [4] MASAYUKI M, KIYOSHI A, MOTOAKI S, et al. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae* [J]. *Nature*, 2005, 438(7071): 1157-1161.
- [5] ZHAO G Z, YAO Y P, WANG C L, et al. Transcriptome and proteome expression analysis of the metabolism of amino acids by the fungus *Aspergillus oryzae* in fermented soy sauce [J]. *BioMed Research International*, 2015, 2015: 2314-6133.
- [6] GAO X L, ZHAO X, HU F, et al. The latest advances on soy sauce research in the past decade: Emphasis on the advances in China [J]. *Food Research International*, 2023, 173(2): 113407.
- [7] ZHAO G Z, YAO Y P, CHEN W, et al. Comparison and analysis of the genomes of two *Aspergillus oryzae* strains [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(32): 7805-7809.
- [8] ZHAO G Z, LIU C, LI S, et al. Exploring the flavor formation mechanism under osmotic conditions during soy sauce fermentation in *Aspergillus oryzae* by proteomic analysis [J]. *Food and Function*, 2020, 11(1): 640-648.
- [9] 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.
- [10] YANG Y,DENG Y,JIN Y L, 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] LI J Y, LIU B, FENG X J, et al. Comparative proteome and volatile metabolome analysis of *Aspergillus oryzae* 3.042

- and *Aspergillus sojae* 3.495 during koji fermentation [J]. Food Research International, 2023, 165: 112527.
- [12] GAO X L, ZHAO H F, FENG Y Z, 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] 赖理智,李艳军,李荔.乳酸菌在酱油发酵过程中的影响及其研究进展[J].食品安全导刊,2022,32:163-166.
- [14] 张玉婕,孙晓灵,吴宝美,等.乳酸菌葡聚糖蔗糖酶及其胞外多糖功能的研究进展[J].生物化工,2023,9(2):181-188,199.
- [15] 孙莉,胡文康,黄瑶,等.非耐盐乳酸菌与米曲霉共生酿造酱油的研究[J].中国调味品,2020,45(5):13-18.
- [16] 彭勃,侯莎,周其洋,等.酱油发酵中乳酸菌的功能及其研究进展[J].中国调味品,2022,47(11):216-220.
- [17] 胡传旺,李巧玉,周朝晖,等.酱醪细菌菌株的分离及功能分析[J].微生物学通报,2017,44(8):1899-1907.
- [18] 崔瑞迎,郑佳,梁如,等.耐盐乳酸菌和酵母菌对高盐稀态发酵酱油品质的影响[J].食品工业科技,2013,34(6): 197-201.
- [19] 杨希飞.嗜盐四联球菌用于改善酱油风味和安全性的研究[D].无锡:江南大学,2016.
- [20] WANG H B, WEI Q Z, GUI S Q, et al. Metagenomic profiling of the bacterial community changes from koji to mash stage in the brewing of soy sauce [J]. Polish Journal of Microbiology, 2017, 66(4): 537-541.
- [21] 胡传旺.酱油发酵过程微生物群落解析及功能研究[D].无锡:江南大学,2017.
- [22] SULAIMAN J, GAN H M, YIN W F, et al. Microbial succession and the functional potential during the fermentation of Chinese soy sauce brine [J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 556.
- [23] CHIN H S, BREIDT F, FLEMING H P, et al. Identifications of predominant bacterial isolates from the fermenting kimchi using ITS-PCR and partial 16S rDNA sequence analyses [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2006, 16(1): 68-76.
- [24] ZHANG J R, FANG F, CHEN J, et al. The arginine deiminase pathway of koji bacteria is involved in ethyl-carbamate precursor production in soy sauce [J]. FEMS Microbiology Letters, 2014, 358(1): 91-97.
- [25] 李洁,李晓然,宫路路,等.乳酸片球菌发酵液中主要有机酸及其抑菌性研究[J].食品与发酵工业,2014,40 (5):124-129.
- [26] SINGRACHA P, NIAMSIRI N, VISESSANGUAN W, et al. Application of lactic acid bacteria and yeasts as starter cultures for reduced-salt soy sauce (moromi) fermentation [J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 78: 181-188.
- [27] 谢显华.酱油发酵过程微生物群落结构的动态研究[D].广州:华南理工大学,2010.
- [28] 宋江.酱油酿造用鲁氏接合酵母菌的生长及其产香气成分研究[D].长沙:湖南农业大学,2013.
- [29] DAKAL C T, SOLIERI L, GIUDICI P. Adaptive response and tolerance to sugar and salt stress in the food yeast *Zygosaccharomyces rouxii* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 185: 140-157.
- [30] CAO Z H, GREEN J, JULIA M, et al. Bioactivity of soy-based fermented foods: A review [J]. Biotechnology Advances, 2018, 37(1): 223-238.
- [31] SONG Y, JEONG D, BAIK S. Monitoring of yeast communities and volatile flavor changes during traditional Korean soy sauce fermentation [J]. Journal of Food Science, 2015, 80(9): 2005-2014.
- [32] JANSEN M, VEURINK J H, EUVERINK G W, et al. Growth of the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* in microtiter plates: Effects of NaCl, pH and temperature on growth and fusel alcohol production from branched-chain amino acids [J]. FEMS Yeast Research, 2003, 3(3): 313-318.
- [33] 张玲.嗜盐四联球菌、鲁氏接合酵母及易变假丝酵母的添加对日式酱油品质的影响[D].无锡:江南大学,2019.
- [34] 方冠宇,姜佳丽,蒋予箭.多菌混合发酵对酱油的风味物质形成及感官指标的影响[J].中国食品学报,2019, 19(9):154-163.
- [35] LIU B, LI Y, CAO Z N, et al. Effect of *Tetragenococcus halophilus*, *Zygosaccharomyces rouxii*, and *Torulopsis versatilis* addition sequence on soy sauce fermentation [J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2021, 69: 102662.
- [36] JIANG X W, PENG D, ZHANG W, et al. Effect of aroma-producing yeasts in high-salt liquid-state fermentation soy sauce and the biosynthesis pathways of the dominant esters [J]. Food Chemistry, 2021, 344: 128681.
- [37] 苗春雷,朱娅媛,黄卓权,等.酵母菌对高盐稀态酱油风味强化研究进展[J].食品与发酵工业,2023,49(17):308-315.
- [38] 黄振娥.酶制剂对酱油出油率的影响[J].中国调味品, 2015,40(7):124-125,133.
- [39] RISA H, MASANOBU Y, KOTARO I, et al. Influence of yeast and lactic acid bacterium on the constituent profile of soy sauce during fermentation [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2017, 123(2): 203-208.
- [40] 艾雨晴,陈松骏,秦娟,等.微生物产蛋白酶的研究进展[J].食品工业科技,2021,42(19):451-458.
- [41] 余洁瑜,林礼钊,李维新,等.酸性蛋白酶对高盐稀态酱油发酵的影响[J].中国酿造,2022,41(7):185-190.
- [42] GAO X L, SUN P F, LU J, et al. Characterization and formation mechanism of proteins in the secondary precipitate of soy sauce [J]. European Food Research and Technology, 2013, 237(4): 647-654.

- [43] XU D F, PAN L, ZHAO H F, et al. Breeding and identification of novel koji molds with high activity of acid protease by genome recombination between *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger* [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2011, 38(9): 1255-1265.
- [44] SALAMIN K, EUGSTER P J, JOUSSON O, et al. AoS28D, a proline-Xaacarboxypeptidase secreted by *Aspergillus oryzae* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(10): 4129-4137.
- [45] SHAN P, HO C T, ZHANG L, et al. Degradation mechanism of soybean protein B₃ Subunit catalyzed by prolylendopeptidase from *Aspergillus niger* during soy sauce fermentation [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70: 5869-5878.
- [46] ZHANG Z K, SHAN P, ZHANG Z H, et al. Efficiently degradation of soybean protein B₃ subunit in soy sauce catalyzed by ultrasound-assisted prolylendopeptidase and its primary mechanism [J]. Food Chemistry, 2023, 429: 136972.
- [47] 孙常雁,李德海,孙莉洁.传统酿造酱及酱油中酶系的作用[J].中国食品添加剂,2009,3:164-169.
- [48] 徐欢欢. α -淀粉酶在酱油制曲与发酵工艺中的应用研究[D].广州:华南理工大学,2014.
- [49] GAO X L, FENG T, LIU E M, et al. Ougan juice debittering using ultrasound-aided enzymatic hydrolysis: Impacts on aroma and taste [J]. Food Chemistry, 2021, 345: 128767.
- [50] 王哲,吴韶辉,刘福,等. β -葡萄糖苷酶对柑橘汁酶解增香调控及香气成分的影响[J].现代农业科技,2021,20:61-64,76.
- [51] 张露,梁寒峭,陈建国,等.酿造酱油中有机酸种类与含量的检测分析[J].食品科技,2019,44(3):295-299.
- [52] 周尚庭,李沛,郭辉.谷氨酰胺酶和酵母抽提物对无添加酱油的品质提升研究[J].中国调味品,2016,41(5):45-50.
- [53] AO X L, YU X, WU D T, et al. Purification and characterization of neutral protease from *Aspergillus oryzae* Y1 isolated from naturally fermented broad beans [J]. AMB Express, 2018, 8(1): 96.
- [54] SHU L, SI X G, YANG X D, et al. Enhancement of acid protease activity of *Aspergillus oryzae* using atmospheric and room temperature plasma [J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1418.
- [55] GAO X L, LIU E M, YIN Y Y, et al. Enhancing activities of salt-tolerant proteases secreted by *Aspergillus oryzae* using atmospheric and room-temperature plasma mutagenesis [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(9): 2757-2764.
- [56] HU Y C, LI T, TU Z, et al. Engineering a recombination neutral protease I from *Aspergillus oryzae* to improve enzyme activity at acidic pH [J]. RSC Advances, 2020, 10(51): 30692-30699.
- [57] SAHAR T, MOUNA S, FATMA E, et al. *Aspergillus oryzae*S2 AmyA amylase expression in *Pichiapastoris*: production, purification and novel properties [J]. Molecular Biology Reports, 2019, 46(1): 921-932.
- [58] 郑博.混菌制曲发酵对酱油品质影响的研究[D].天津:天津科技大学,2017.
- [59] 路怀金.米曲霉的酶系特性及其对酱油风味品质影响研究[D].广州:华南理工大学,2020.
- [60] 史龙君.纤维素酶在酱油酿造上的应用研究[J].中国调味品,2008,9:61-64.
- [61] LEE S K, HWANG J Y, CHOI S H, et al. Purification and characterization of *Aspergillus oryzae* LK-101 salt-tolerant acid protease isolated from soybean paste [J]. Food Science and Biotechnology, 2010, 19(2): 327-334.
- [62] 全国食品工业标准化技术委员会(SAC/TC 64).GB/T 23527.1-2023,酶制剂质量要求第1部分:蛋白酶制剂[S].
- [63] 全国食品工业标准化技术委员会工业发酵分技术委员会.GB/T 23535-2009,脂肪酶制剂[S].
- [64] 全国食品工业标准化技术委员会工业发酵分技术委员会.GB/T 24401-2009, α -淀粉酶制剂[S].
- [65] 全国食品工业标准化技术委员会工业发酵分技术委员会.GB/T 23533-2009,固定化葡萄糖异构酶制剂[S].
- [66] 柯彩霞,范艳利,苏枫,等.酶的固定化技术最新研究进展[J].生物工程学报,2018,34(2):188-203.
- [67] 吴惠玲,魏鲁宁,周紫琦,等.蛋白酶固定化条件优化及在酱醪发酵中的应用[J].现代食品科技,2013,29(5):1080-1084.
- [68] 张俭波.食品工业用酶制剂的管理[J].生物产业技术, 2019,3:83-90.
- [69] 中华人民共和国山东出入境检验检疫局,中华人民共和国浙江出入境检验检疫局,中华人民共和国安徽出入境检验检疫局,中华人民共和国广西出入境检验检疫局.SN/T 2360.12-2009,进出口食品添加剂检验规程第12部分:酶制剂[S].
- [70] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会.GB 1886.174-2016,食品安全国家标准食品添加剂食品工业用酶制剂[S].