

以糙米为主要培养基延长米曲霉菌种的保藏期

符姜燕¹, 滑欢欢¹, 梁亮¹, 刘占¹, 杨俊¹, 劳浩晶¹, 陈穗¹, 杨明泉¹, 高献礼²

(1. 广东美味鲜调味食品有限公司, 广东中山 528401) (2. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212013)

摘要: 本研究以糙米为主要培养基并结合真空干燥(-0.1 MPa)和冷冻保藏(-80 ℃)工艺开发出一种米曲霉长期保藏技术。生产实验表明, 利用该方法保藏20年的米曲霉菌种直接制备的大曲中性蛋白酶、酸性蛋白酶、淀粉酶和葡萄糖淀粉酶的酶活分别达到1871、319、256和2110 U/g干曲。利用该大曲所生产的酱油总氮、氨基酸态氮、总糖、还原糖、无盐固形物含量及原料蛋白质利用率分别达到1.53、0.92、5.39、3.52、19.88 g/100 mL和82.20%。上述指标显著优于利用常规冻干管法保藏20年的米曲霉所制备大曲和酱油的相应指标($p < 0.05$), 与利用常规冻干管法保藏5年的米曲霉所制备大曲和酱油的相应指标无显著差异($p > 0.05$)。由聚类分析可知, 本方法可比冻干管法延长米曲霉保藏时间15年, 在实际生产中可减少菌株复壮次数, 避免传代过程中米曲霉突变和污染的几率, 进而提高酱油质量稳定性。

关键词: 米曲霉; 糙米; 酱油; 真空干燥; 冻干管保藏

文章编号: 1673-9078(2020)08-31-37

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.8.0432

Prolongation of the Preservation Period of *Aspergillus oryzae* by Using Brown Rice as the Main Culture Medium

FU Jiang-yan¹, HUA Huan-huan¹, LIANG Liang¹, LIU Zhan¹, YANG Jun¹, LAO Hao-jing¹, CHEN Sui¹, YANG Ming-quan¹, GAO Xian-li²

(1. Guangdong Meiweixian Flavoring Foods Co., Ltd., Zhongshan 528401, China)

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

Abstract: The long-term preservation of *Aspergillus oryzae* was achieved through the use of brown rice as the main culture medium and vacuum drying (-0.1 MPa) and cryopreservation (-80 ℃). Koji prepared using *A. oryzae* that had been preserved for 20 years by this novel method exhibited neutral protease, acidic protease, amylase, and glucoamylase activities of 1871, 319, 256, and 2110 U/g dry Koji, respectively. In soy sauce prepared using the aforementioned Koji, the contents of total nitrogen, formaldehyde nitrogen, total sugars, reducing sugars, and salt-free solids and the rate of utilization of proteins in the raw materials were 1.53, 0.92, 5.39, 3.52, and 19.88 g/100 mL and 82.20%, respectively. These indicator values were significantly superior to those of Koji and soy sauce prepared using *A. oryzae* preserved for 20 years by the conventional tube freeze-drying method ($p < 0.05$) and were not significantly different from those of Koji and soy sauce prepared using *A. oryzae* preserved for 5 years by the conventional tube freeze-drying ($p > 0.05$). According to the hierarchical cluster analysis results, compared with the conventional tube freeze-drying method, the novel method prolonged the preservation of *A. oryzae* by 15 years, reduced the number of times needed for its rejuvenation during actual production, and lowered the possibility of its mutation and contamination during passage. These attributes would enhance the quality stability of soy sauce.

Key words: *Aspergillus oryzae*; brown rice; soy sauce; vacuum drying; tube freeze-drying

引文格式:

符姜燕, 滑欢欢, 梁亮, 等. 以糙米为主要培养基延长米曲霉菌种的保藏期[J]. 现代食品科技, 2020, 36(8): 31-37

FU Jiang-yan, HUA Huan-huan, LIANG Liang, et al. Prolongation of the preservation period of *Aspergillus oryzae* by using brown rice as the main culture medium [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(8): 31-37

收稿日期: 2020-05-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(31301538); 中山市重大科技专项项目(2018A1007)

作者简介: 符姜燕(1984-), 女, 高级工程师, 研究方向: 食品生物发酵技术

通讯作者: 杨明泉(1968-), 男, 高级工程师, 研究方向: 食品生物发酵技术; 共同通讯作者: 高献礼(1979-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品生物技术

酱油是以大豆/豆粕和面粉/麸皮为主要原料,利用米曲霉为主要发酵菌种生产的液体调味品^[1]。米曲霉的质量和稳定性是决定酱油品质和稳定性的关键因素之一。目前国内酱油发酵主要利用米曲霉 3.042, 该菌种可分泌丰富的蛋白酶、淀粉酶和葡萄糖淀粉酶,能够有效将原料中的蛋白质降解成呈味肽、氨基酸,将淀粉降解成糊精、低聚糖和单糖等呈味物质^[2]。但在工业化生产过程中需要不断对该菌种进行复壮和筛选,以保持其产酶、生长速度和产生香气物质等性能的稳定性。菌种的复壮和筛选不但耗时和需要大量的人力投入,而且在此过程中易造成菌种变异和污染^[3]。因此,能够长期保持米曲霉性能的保藏方法具有重要的应用价值。

目前国内外米曲霉主要采用冻干管法保藏^[4],该方法利用脱脂奶粉作为培养基, -80 ℃ 冻干, 4 真空保存, 保藏期一般为 5~10 年。但该方法存在一定的缺陷, 如该法不适用于产孢子少的米曲霉, 且采用该法保藏的菌种在使用之前需要连续活化 3 次以上以恢复其性能。此过程不但耗时, 而且在活化过程中存在污染杂菌及挑取衰退菌株的风险^[3,5]。

糙米是稻谷脱壳后不加工或较少加工所得的全谷粒米, 由米糠、胚和胚乳三大部分组成^[6]。与脱脂奶粉相比, 糙米作为米曲霉培养基具有如下优点: ①营养丰富和均衡。与奶粉相比, 单一配方的糙米培养基具有丰富的淀粉、脂肪和微量元素及均衡的 C/N 比。这可使米曲霉在进入休眠环境前积累大量的孢子, 提升孢子对休眠环境的耐受能力。此外, 糙米的蛋白质更多分布于糙米表皮, 菌丝生长时无需深入米芯即可被刺激而分泌较多的蛋白酶, 从而确保菌种蛋白质分解能力。②吸水 and 失水易于控制。与脱脂奶粉相比, 糙米吸水 and 失水易于控制, 脱水后培养基不易再吸水返潮, 降低培养基水分含量。菌种保存前培养基吸水, 孢子易再次萌发生成菌丝, 再次萌发的菌丝在保存过程中易于死亡, 引起保存时有效孢子数的损失。因此, 利用糙米作为培养基可降低次代孢子因再萌发而产生的孢子损失。③易于维持合适的颗粒度。糙米具有较高的纤维素含量, 可保证菌种在培养后保持培养基适当的颗粒度, 在后续使用时可用“多少粒”的方式来对接种量进行定量。综上, 与脱脂奶粉相比, 糙米在米曲霉菌种保藏中具有潜在的应用价值。

基于上述分析, 本文主要内容包括: (1) 介绍本公司开发的一种以糙米为主要培养基的米曲霉长期保藏方法; (2) 以冻干管法保藏的米曲霉为对照, 分析与该法保藏的米曲霉所生产酱油的理化性质差异。

1 材料和方法

1.1 材料、试剂和设备

1.1.1 菌种和原料

米曲霉 3.042 由广东美味鲜调味食品有限公司技术中心提供; 黄豆、面粉、麸皮、食盐分别购于、广州市南方面粉股份有限公司(广东省广州市)和中山市盐业总公司。糙米购于广东省中山市华润万家超市; 福林酚、酪蛋白、三氯乙酸、碘化钾、碘、甲醛、盐酸、硫酸、硼酸、硫酸铜、葡萄糖、氢氧化钠、硝酸银、磷酸氢二钠等均为分析纯, 购自中国医药集团上海化学试剂公司。

1.1.2 主要仪器和设备

Kjtec2300 凯氏定氮仪, 瑞典 FOSS 分析仪器有限公司; WFZ UV-2100 紫外分光光度计, 尤尼柯(上海)仪器有限公司; 5415D 高速离心机: 德国艾本德股份公司; FE 20 pH 计: 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; MJ-70-I 培养箱: 上海恒一科学仪器有限公司; ULTS1368 超低温冰箱: 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; DZF-6020 真空干燥箱: 绍兴市苏珀仪器有限公司; NK 式旋转蒸煮锅: 温州市商泰轻工机械有限公司; 60 m³玻璃钢发酵罐: 温州市伯泰机械科技有限公司。

1.2 以糙米为主要原料制备米曲霉保藏菌种

以糙米为主要培养基的米曲霉菌种保藏方法: 糙米浸泡 2 h、加 2 倍自来水煮沸 5 min, 蒸煮后纱布过滤除水, 加入干糙米重量 5% 的麸皮混合均匀。糙米麸皮混合物装入三角瓶至覆盖瓶底约 1 cm, 棉塞密封。121 ℃ 灭菌 15 min, 冷却至室温, 接种米曲霉, 30 ℃ 培养至表面覆盖一层浅黄绿色孢子。成熟后的糙米三角瓶菌种放入真空干燥箱进行干燥 (-0.1 MPa), 至水分 < 10%, 即得糙米三角瓶保藏菌种(图 1A)。收集干燥的糙米米曲霉菌种密封于真空铝箔袋, 保藏于 -80 ℃ 超低温冰箱。

冻干管米曲霉菌种保藏方法: 用自来水配制 10% 脱脂奶粉溶液(m/V), 121 ℃ 灭菌 15 min、降温至 60 ℃ 时用灭菌移液管转移至安瓿管(121 ℃/15 min), 至安瓿管 1/3 高度。无菌条件下将马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)斜管上的米曲霉孢子挑入安瓿管脱脂奶粉培养基中, 于 -80 ℃ 冻干干燥至水分 < 10%。将安瓿管中空气抽成真空 (-0.1 MPa), 并将安瓿管口熔封即得冷冻管米曲霉菌种(图 1a), 保藏于 -80 ℃ 超低温冰箱。

1.3 糙米保藏米曲霉菌种与冻干管保藏米曲

霉菌种发酵性能对比分析

以保藏0、5、10、15和20年的上述两种米曲霉为菌种,按照高盐稀态酱油工艺(SB/T 10312-1999)分别制备大曲和酱油。利用糙米保藏0、5、10、15和20年米曲霉制备的大曲和酱油分别用SK0、SK5、SK10、SK15、SK20和SSS0、SSS5、SSS10、SSS15、SSS20表示,利用冷冻管保藏0、5、10、15和20年米曲霉制备的大曲和酱油分别用CK0、CK5、CK10、CK15、CK20和CSS0、CSS5、CSS10、CSS15、CSS20表示。对比分析大曲酶活和酱油理化指标,综合评价本文开发的米曲霉菌种保藏方法。

1.3.1 利用两种不同保藏方法的米曲霉制备大曲

麸皮与自来水按照5:1(m/m)充分混合,121℃灭菌15 min、降温至40℃直接接种上述两种不同保藏时间的米曲霉,30℃培养至麸皮表面覆盖一层浅黄绿色孢子。麸皮曲和面粉充分混合后待用。大豆用自来水清洗3次后浸泡16 h,121℃煮15 min,降温至40℃通过四车型种曲机接种(面粉),控制面粉与大豆重量(干重)比为75:25,接种量为麸皮曲重量占混合物料重量的0.3%。大曲在30℃培养,期间温度升至35℃上时翻曲2次,至表面覆盖一层浅黄绿色孢子时(约44 h)取样测中性蛋白酶、酸性蛋白酶、淀粉酶和葡萄糖淀粉酶酶活,并对大曲进行感官分析。

1.3.2 利用两种米曲霉大曲生产酱油

两种成熟大曲分别与25℃6%盐水经过真空罐混合后,采用螺旋泵投罐(60 m³),大曲与盐水的比例为1:2.2(m/V),日晒夜露发酵180 d。发酵结束后通过淋油法取原油,定性滤纸过滤后放于4℃冰箱用于测定理化指标。

1.4 大曲和原油理化指标分析

1.4.1 大曲酶活测定方法

采用福林酚法测定中性和酸性蛋白酶酶活,具体方法参照Gao等^[7]方法。淀粉酶和葡萄糖淀粉酶分别采用碘-碘化钾法和碘氧化法,具体方法分别参照QB/T 1803-1999和QB/T 1803-1999。水分含量采用105℃恒重法测定。

1.4.2 酱油理化指标分析

分别采用凯氏定氮法和甲醛滴定法测定全氮和氨基酸态氮含量,具体方法参照GB 18186-2000。原料

蛋白质利用率为原油(包括头油、二油和三油)总氮量占原料总氮量的百分比。采用硝酸银滴定法测定食盐含量,采用105℃恒重法测定总可溶性固形物含量,可溶性无盐固形物含量为可溶性总固形物含量减去食盐含量,具体方法参照GB 18186-2000。参照Gao等方法^[8]测定样品总糖和还原糖含量。采用氢氧化钠(0.1 M)滴定法测定样品总酸含量^[8]。

1.5 聚类分析

本研究以大曲中性和酸性蛋白酶活、淀粉酶和葡萄糖淀粉酶酶活及总氮、氨基酸态氮、食盐、可溶性无盐固形物、总糖、还原糖、总酸含量为变量,采用SPSS 15.0软件(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)中的Z-score算法对上述指标去量纲和标准化,得样品和对照标准化变量。采用Between-groups linkage法作为样品之间的连接方法、采用Squared Euclidean Distance法定量样品之间的距离。样品之间的距离越大表示样品之间的“相似性”越大,反之则“相似性”越小。

1.6 统计分析

本文样品和对照均为3个重复,实验数据分析采用SPSS 15.0软件(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)完成,在检验水平为0.05的条件下进行显著性差异分析。

2 结果与讨论

2.1 糙米保藏米曲霉和冻干管保藏米曲霉所

制大曲感官分析

糙米保藏菌种(图1A-E)和其制备的大曲(图1 SK0-20)表面均布满浅黄绿色至浅绿色的菌丝和孢子,菌丝饱满、疏松,具有典型曲香。这与高昕明^[9]描述的米曲霉大曲感官属性一致,说明采用糙米保藏20年以内的米曲霉菌种感官性质稳定。随着保藏时间的延长,冻干管保藏菌种(图1a-e)的表面由浅绿色变至暗绿色,保藏20年时培养基表面出现少许干枯。冻干管保藏菌种所制大曲(图1 CK0、CK5)感官属性(外观色泽和香气)与糙米大曲基本一致,而保藏10年至20年菌种所制大曲(图1 CK10、CK15、CK20)色泽由浅黄绿色逐渐变至浅黄色和白色,说明冻干管法保藏菌种的繁殖和生长性能随着保藏时间的延长而下降。王瑞娟等^[10]研究了继代培养法、液体石蜡法、液氮法和蒸馏水法对金针菇(*Flammulina velutipes*)菌种的保藏效果。结果表明:在2年保藏期内液氮法保藏菌种子实体整齐度好、产量高、商品性状优良。

与金针菇菌种液氮保藏法相比,采用糙米为主要培养基的米曲霉保藏方法保藏期可提高9倍,在保藏时间上具有明显的优势。

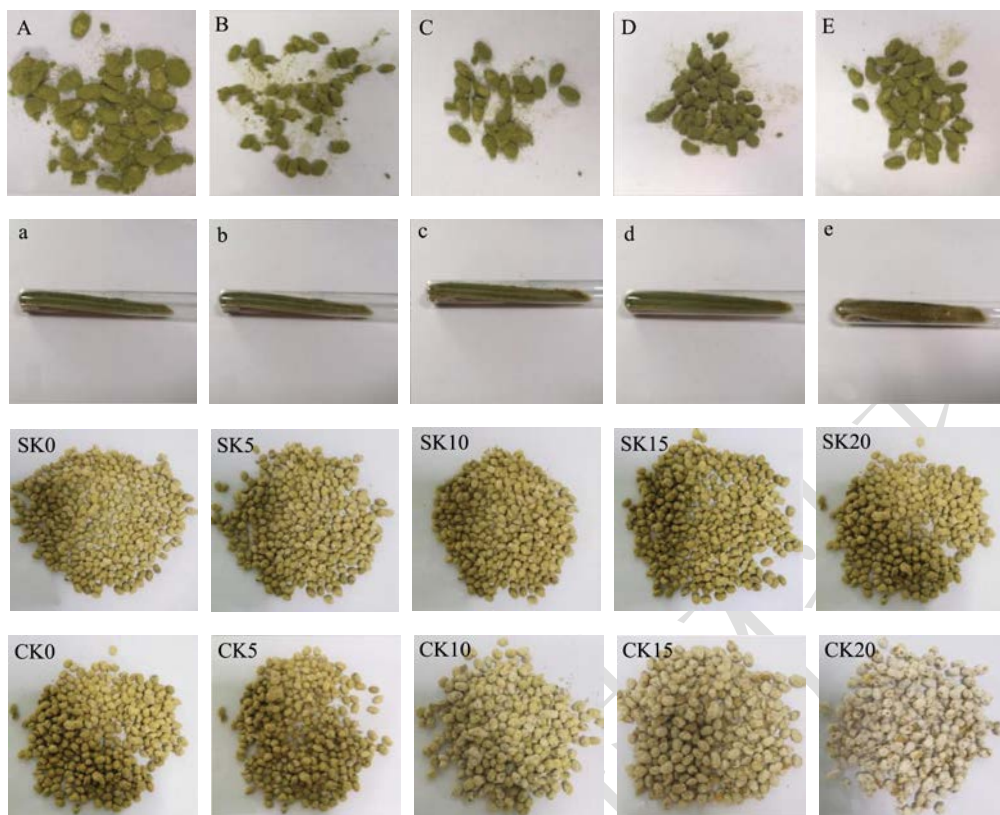


图1 不同保藏时间的糙米和冷冻管保藏菌种及其制备的大曲

Fig.1 Brown rice strain and freezing tube strain with different preservation time and Kojis prepared with these two kinds of strains

注: A~E 分别为保藏0年、5年、10年、15年、20年的糙米菌种, a~e 为0年、5年、10年、15年、20年冻干管菌种。

2.2 糙米保藏米曲霉和冻干管保藏米曲霉菌

种所制大曲酶活分析

由表1可知,SK0和CK0中中性蛋白酶和酸性蛋白酶酶活分别为1930~1957 U/g大曲和367~378 U/g大曲,与王栋等^[11]的报道结果基本一致。淀粉酶和葡萄糖淀粉酶酶活分别为289~303 U/g大曲和2292~2301 U/g大曲,与Gao等^[7]报道结果基本一致。

随着保藏时间的延长,两种保藏菌种所制大曲的中性蛋白酶、酸性蛋白酶、淀粉酶和葡萄糖淀粉酶酶活均呈现下降趋势,但糙米保藏米曲霉菌种所制大曲四种酶酶活下降趋势显著低于冻干管保藏菌种所制大曲四种酶的酶活。对糙米保藏菌种所制大曲而言,20年保藏期内菌种所产中性蛋白酶和葡萄糖淀粉酶酶活

无显著下降($p>0.05$);但酸性蛋白酶和淀粉酶出现显著性下降($p<0.05$),下降率为13.08%和11.42%。而对冻干管保藏菌种所制大曲而言,在保藏第10年菌种所产四种酶酶活均出现显著下降($p<0.05$),四种酶酶活下降率为22.28%~41.58%,至第20年时四种酶酶活下降率为57.36%~65.32%。

上述结果表明,以糙米为主要培养基保藏米曲霉菌种,在15年保藏期内产酶稳定;而冻干管法保藏米曲霉菌种,其产酶稳定期仅为5年。以糙米为主要培养基保藏米曲霉,其保藏期显著长于冻干管法。Kállai等^[12]从储藏了100多年的Tokaj红酒中分离和鉴定出17种酵母菌,实验室规模红酒发酵实验证明上述酵母菌的发酵性能与商业酿酒酵母性能相当。上述研究结果表明菌种在合适的保藏环境下可以长期维持其发酵性能。

表 1 糙米保藏米曲霉菌种和冻干管保藏米曲霉菌种所制大曲酶活 (U/g 干曲)

Table 1 Enzyme activities of Kojis prepared with brown rice strain and freezing tube strain (U/g dry Koji)

	0 年		5 年		10 年		15 年		20 年	
	SK0	CK0	SK5	CK5	SK15	CK10	SK15	CK15	SK20	CK20
中性蛋白酶	1957±112 ^a	1930±120 ^a	1936±118 ^a	1813±126 ^a	1889±123 ^a	1500±117 ^b	1867±119 ^a	1163±100 ^c	1871±125 ^a	823±86 ^d
酸性蛋白酶	367±17 ^a	378±19 ^a	370±18 ^a	338±17 ^{ab}	353±20 ^{ab}	276±18 ^c	339±18 ^{ab}	209±19 ^d	319±18 ^b	153±16 ^e
淀粉酶	289±16 ^{ab}	303±17 ^a	286±18 ^{ab}	276±20 ^{ab}	268±15 ^{ab}	177±16 ^c	262±18 ^b	148±17 ^c	256±20 ^b	112±13 ^d
葡萄糖淀粉酶	2292±132 ^a	2301±129 ^a	2309±139 ^a	2190±128 ^a	2219±140 ^a	1530±136 ^b	2175±143 ^a	1334±127 ^b	2110±146 ^a	798±110 ^c

注: (1) 同一行数据右肩标注不同字母表示数据之间存在显著差异 ($p < 0.05$); (2) 本文样品和对照为 3 个重复 ($n=3$); 下同。

表 2 糙米保藏米曲霉菌种和冻干管保藏米曲霉菌种所生产酱油的理化指标

Table 2 Physicochemical indices of soy sauces prepared with brown rice strain and freezing tube strain

	0 年		5 年		10 年		15 年		20 年	
	SSS0	CSS0	SSS5	CSS5	SSS10	CSS10	SSS15	CSS15	SSS20	CSS20
总氮/(g/100 mL)	1.55±0.06 ^{ab}	1.53±0.05 ^{ab}	1.58±0.07 ^a	1.52±0.06 ^{ab}	1.56±0.07 ^a	1.42±0.06 ^b	1.57±0.07 ^a	1.05±0.05 ^c	1.53±0.06 ^{ab}	0.83±0.05 ^d
氨基酸态氮/(g/100 mL)	0.94±0.03 ^a	0.93±0.03 ^a	0.95±0.02 ^a	0.91±0.03 ^a	0.92±0.03 ^a	0.85±0.02 ^b	0.94±0.03 ^a	0.63±0.02 ^c	0.92±0.03 ^a	0.50±0.02 ^d
蛋白质利用率/%	85.52±3.15 ^a	83.28±3.10 ^{ab}	85.03±2.98 ^a	83.03±3.01 ^{ab}	84.54±2.93 ^a	78.55±3.01 ^b	84.46±2.95 ^{ab}	63.41±2.39 ^c	82.20±3.04 ^{ab}	55.62±2.57 ^d
总糖/(g/100 mL)	5.50±0.20 ^a	5.53±0.21 ^a	5.52±0.23 ^a	5.49±0.25 ^a	5.49±0.22 ^a	3.21±0.15 ^b	5.47±0.19 ^a	2.56±0.13 ^c	5.39±0.20 ^a	2.06±0.11 ^d
还原糖/(g/100 mL)	3.63±0.13 ^a	3.60±0.12 ^a	3.61±0.14 ^a	3.56±0.13 ^a	3.61±0.15 ^a	2.12±0.10 ^b	3.60±0.15 ^a	1.67±0.06 ^c	3.52±0.15 ^a	1.38±0.05 ^d
总酸/(g/100 mL)	1.45±0.05 ^a	1.44±0.06 ^a	1.46±0.06 ^a	1.43±0.05 ^a	1.46±0.07 ^a	1.52±0.06 ^a	1.47±0.06 ^a	1.50±0.05 ^a	1.46±0.06 ^a	1.43±0.05 ^a
NaCl/(g/100 mL)	17.28±0.26 ^a	17.35±0.25 ^a	17.32±0.23 ^a	17.26±0.22 ^a	17.34±0.27 ^a	17.28±0.26 ^a	17.36±0.21 ^a	17.34±0.25 ^a	17.24±0.22 ^a	17.52±0.20 ^a
无盐固形物/(g/100 mL)	19.87±0.38 ^a	19.79±0.40 ^a	19.57±0.43 ^a	19.52±0.41 ^a	19.89±0.48 ^a	16.53±0.46 ^b	19.82±0.50 ^a	13.85±0.48 ^c	19.88±0.44 ^a	11.09±0.38 ^d

2.3 糙米保藏米曲霉和冻干管保藏米曲霉菌

种所生产酱油理化指标分析

由表 2 可知, SSS0 和 CSS0 中总氮、氨基酸态氮、总糖、还原糖、总酸、食盐、无盐固形物含量及蛋白质利用率用分为 1.53~1.55 g/100 mL、0.93~0.94 g/100 mL、5.50~5.53 g/100 mL、3.60~3.63 g/100 mL、1.44~1.45 g/100 mL、17.28~17.35 g/100 mL、19.79~19.87 g/100 mL 及 83.28~85.52%, 这与前人分析的酱油中上述指标基本一致^[1,7,13]。

与 SK0 中的酸性蛋白酶和淀粉酶酶活相比, 虽然 SK20 中的酸性蛋白酶和淀粉酶酶活显著下降 ($p<0.05$), 但利用所有保藏年份糙米米曲霉所生产酱油的上述指标均未发生显著变化 ($p>0.05$)。这可能与酱醪发酵阶段还存在其它耐盐微生物有关^[14]。对利用冻干管保藏米曲霉菌种生产的酱油而言, 随着米曲霉保藏年份的增加, 酱油中的总氮、氨基酸态、总糖、还原糖、无盐固形物含量及蛋白质利用率呈现下降趋势, 在第 10 年上述指标均出现显著下降 ($p<0.05$), 至第 20 年时上述指标分别下降 45.75%、46.24%、62.75%、61.67%、43.96% 及 32.34%。

酱醪发酵阶段, 来源于大曲中的蛋白酶将大豆蛋白逐步降解成蛋白胨、低分子量肽和游离氨基酸, 是酱油发酵的主要“驱动力”^[2]。酱醪发酵阶段生成的低分子量肽和游离氨基酸是酱油的重要呈味物质, 是决定酱油品质的关键因素^[1]。蛋白质利用率是酱油原料中蛋白质转化为可溶性氮的指标, 和大曲中蛋白酶酶活正相关。因此, 大曲蛋白酶酶活是决定酱油中总氮、氨基酸态氮含量和蛋白质利用率的关键因素。综合表 1 和表 2 内容可知, SK10、SK15 和 SK20 中中性和酸性蛋白酶酶活显著高于 CK10、CK15 和 CK20 中的相应指标, 这是 SSS10、SSS15 和 SSS20 中总氮、氨基酸态氮含量和蛋白质利用率显著高于 CSS10、CSS15 和 CSS20 中相应指标的关键原因。

淀粉酶负责将酱油原料中的淀粉降解成糊精和多糖, 葡萄糖淀粉酶进一步将糊精和多糖降解成葡萄糖, 两种酶的活性是决定酱油中总糖和还原糖含量的关键因素^[2,7]。酱油中无盐固形物主要包括可溶性蛋白质、肽、氨基酸、铵盐、糊精、多糖、单糖及少量有机酸等有机物质, 蛋白酶酶活及淀粉酶和葡萄糖淀粉酶酶活是决定其含量的关键因素。综合表 1 和表 2 内容可知, SK10、SK15 和 SK20 中淀粉酶和葡萄糖淀粉酶酶活显著高于 CK10、CK15 和 CK20 中的相应指标, 这是 SSS10、SSS15 和 SSS20 中总糖、还原糖和无盐

固形物含量显著高于 CSS10、CSS15 和 CSS20 中相应指标的关键原因。

由于米曲霉在酱醪发酵阶段被高渗透压所抑制, 酱油中的有机酸主要来源于嗜盐微生物 (如嗜盐四联球菌、植物乳杆菌、酸化乳杆菌等) 发酵葡萄糖等的次级代谢产物^[14,15]。食盐属于无机盐, 其含量主要取决于初始添加量。因此, 本研究中菌种保藏方式和时间对酱油中总酸和 NaCl 含量均无显著影响 ($p>0.05$)。

2.4 聚类分析

聚类分析是依据样品指标的“相似性”程度将样品按照“相似性”程度大小进行分类的一种计算方法。不同样品越早归入同一个组, 代表样品之间的“相似性”程度越高。如图 2 所示, 首先, 样品 1、2、3、4、5、7、9 归入一组; 其次, 样品 6 和 8 归入一组, 两者随后与样品 10 归为一组, 最后所有样品归为一组。上述结果说明糙米保藏 20 年菌种和冻干管保藏 5 年内菌种之间不存在显著差异, 而上述菌种与冻干管保藏 5 年以上菌种存在显著差异。这与上述大曲酶活和酱油理化指标分析结果基本一致 (有机酸和 NaCl 含量除外), 再次说明利用糙米为主要培养基保藏米曲霉可显著延长菌种保质期 (与冻干管法相比), 保质期可达 20 年。

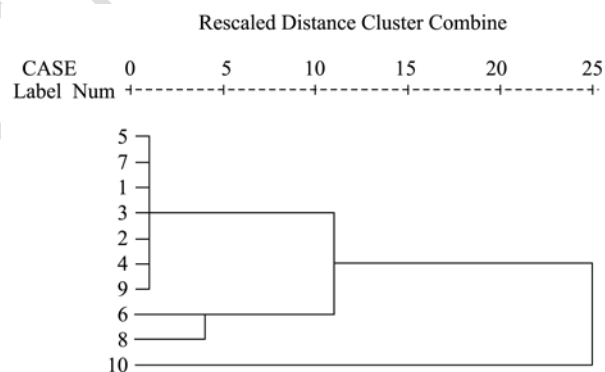


图 2 聚类分析结果

Fig.2 Result of hierarchical cluster analysis

注: 1、3、5、7、9 分别代表以糙米保藏 0、5、10、15、20 年米曲霉, 2、4、6、8、10 分别代表以冻干管保藏 0、5、10、15、20 年米曲霉。

3 结论

本文开发了一种以糙米为主要培养基并结合运用真空和低温保藏工艺的米曲霉菌种保藏方法。在 20 年保藏期内, 采用该方法保藏的菌种感官属性及利用其所制备的大曲和酱油理化指标均保持稳定。与冻干管法保藏米曲霉菌种相比, 采用本文技术可延长米曲霉保藏时间 15 年, 并减少菌种复壮、筛选等工序, 显著减少操作人员劳动强度、菌种自发突变和污染几率,

具有重要的工业应用价值。

参考文献

- [1] Gao X L, Zhang J K, Liu E M, et al. Enhancing the taste of raw soy sauce using low intensity ultrasound treatment during moromi fermentation [J]. Food Chemistry, 2019, 298: 124928
- [2] Zhao G Z, Ding L L, Pan Z H, et al. Proteinase and glycoside hydrolase production is enhanced in solid-state fermentation by manipulating the carbon and nitrogen fluxes in *Aspergillus oryzae* [J]. Food Chemistry, 2019, 271: 606-613
- [3] 高永强. 黄酒酵母菌种和米曲霉菌种的保藏 [J]. 山东发酵食品, 2011, 163(4): 43-44
GAO Yong-qiang. The yeast and *Aspergillus oryzae*'s saving of rice wine [J]. Shandong Fermentation, 2011, 163(4): 43-44
- [4] 夏隆春, 郭慧君, 刘秋红, 等. 超低温冷冻保藏法在菌种保藏中的研究 [J]. 中国动物保健, 2015, 17(3): 66-68
XIA Long-chun, GUO Hui-jun, LIU Qiu-hong, et al. Study on preservation of strain in the ultra-low temperature freezing preservation [J]. Animal Health, 2015, 17(3): 66-68
- [5] 马洪波, 冯子力, 谭华. 菌(毒)种保存及复苏技术 [J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2006, 4: 54-58
MA Hong-bo, FENG Zi-li TAN Hua. Preservation and recovery technologies of bacterial (toxin) species [J]. Chinese Frontier Health Quarantine, 2006, 4: 54-58
- [6] Liu K L, Du R F, Chen F S. Stability of the antioxidant peptide SeMet-Pro-Ser identified from selenized brown rice protein hydrolysates [J]. Food Chemistry, 2020, 319: 126540
- [7] 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
- [8] Gao X L, Zhang J K, Regenstein J M, et al. Characterization of taste and aroma compounds in *Tianyou*, a traditional wheat flour-fermented condiment [J]. Food Research International, 2018, 106: 156-163
- [9] 高昕明. 以黄豆、面粉为原料的圆盘制曲工艺研究 [J]. 现代食品, 2017, 9: 90-93
GAO Ting-ming. Research on Koji-making process of disk starter with soybeans and flour [J]. Modern Food, 2017, 9: 90-93
- [10] 王瑞娟, 尚晓冬, 杨慧, 等. 不同保藏方法对金针菇“上研 1 号”栽培特性的影响 [J]. 食用菌学报, 2019, 26(1): 11-17
WANG Rui-juan, SHANG Xiao-dong, YANG Hui, et al. Effects of different preservation methodson the main cultivation characteristics of *Flammulina velutipes* “Shangyan 1” [J]. Journal of Edible Fungi, 2019, 26(1): 11-17
- [11] 王栋, 冯杰, 郑志永, 等. 酱油发酵用 2 种米曲霉中性蛋白酶酶学性质比较 [J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31(5): 179-185
WANG Dong, FENG Jie, ZHENG Zhi-yong, et al. Characteristic comparison of two neutral proteases used for soy sauce fermentation [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2012, 31(5): 179-185
- [12] Kállai Z, Pfliegler W P, Mitercsák J, et al. Preservation of diversity and oenological properties of wine yeasts during long-term laboratory maintenance: A study of strains of a century-old Tokaj wine yeast collection [J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 101: 789-798
- [13] 冯云子, 崔春, 高献礼, 等. 中式酱油与日式酱油非挥发性成分的比较 [J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(7): 62-66
FENG Yun-zi, CUI Chun, GAO Xian-li, et al. Comparative study on non-volatile components in traditional Chinese-type soy sauce and Japanese-type soy sauce [J]. Food and Fermentation Industry, 2010, 36(7): 62-66
- [14] Devanthi P V P, Gkatzionis, K. Soy sauce fermentation: microorganisms, aroma formation, and process modification [J]. Food Research International, 2019, 120: 364-374
- [15] Devanthi P V P, Linforth, Onyeakah, et al. Effects of co-inoculation and sequential inoculation of *Tetragenococcus halophilus* and *Zygosaccharomyces rouxii* on soy sauce fermentation [J]. Food Chemistry, 2018, 240: 1-8

(上接第 332 页)

- [43] 杨健, 刘冬梅, 何永吉, 等. 镉对河南华溪蟹卵黄磷蛋白在卵巢中表达含量的影响及 ELISA 法的建立 [J]. 水生生物学报, 2015, 39(2): 287-293
YANG Jian, LIU Dong-mei, HE Yong-jie, et al. Established of ELISA method of vitellin from fresh water crab (*Sinopotamon henanense*) and effect of cadmium on vitellin accumulation in ovary [J]. ACTA Hydrobiologica Sinica, 2015, 39(2): 287-293