

生物酶改善原酿酱油品质的研究进展

程宇勤, 崔春*, 冯云子

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 酱油是以大豆、小麦和盐为原料, 通过多种微生物发酵而成的中国传统调味品。生物酶是微生物发酵过程中改善酱油滋味、风味的有效手段。酱油的味道、香气和颜色之间的平衡作用赋予酱油独特的风味。在酱油酿造过程中, 原料中的蛋白质和淀粉在多种酶的共同作用下水解为氨基酸和糖类。一方面, 氨基酸和糖类之间的化学反应形成酱油饱满的色泽; 另一方面, 这些酶解产物不仅对酱油的口感有直接促进作用, 同时被多种微生物进一步代谢为各种有机酸和芳香族化合物, 从而产生独特的风味和香气。此外, 米曲霉是酱油生产中必不可少的微生物, 其可以产生各种酶用于原料的分解, 对酱油的发酵起着至关重要的作用。该文重点介绍了酱油酿造过程中关键生物酶的分类、来源及其在酱油中的应用情况, 讨论了相关的微生物改良技术和酶制剂在酱油酿造中的应用进展, 并对现阶段存在的问题与未来的发展方向提出了展望, 为改善原酿酱油品质提供理论支持。

关键词: 酶制剂; 酿造酱油; 菌种筛选; 品质改善

文章编号: 1673-9078(2024)07-334-342

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.7.0760

Research Progress of Quality Improvement of Original Soy Sauce using Enzymes

CHENG Yuqin, CUI Chun*, FENG Yunzi

(School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Soy sauce is a traditional Chinese condiment that is produced through fermentation by a variety of microorganisms, whose raw materials include soybean, wheat, and salt. Enzymes are effective means for enhancing the taste and flavor of soy sauce during microbial fermentation. The unique flavor of soy sauce is derived from the balance between flavor, aroma, and color. In the process of soy sauce fermentation, the proteins and starch in the raw materials are hydrolyzed into amino acids and sugars under the combined action of various enzymes. On the one hand, the chemical reactions between amino acids and sugars lead to the rich color of soy sauce. On the other hand, these enzymatic hydrolysates directly enhance the taste of soy sauce, as well as are further metabolized by a variety of microorganisms into various organic acids and aromatic compounds, resulting in a unique flavor and aroma. In addition, *Aspergillus oryzae* is an essential microorganism in soy sauce production, producing various enzymes for the decomposition of raw materials and playing a vital role in the fermentation of soy sauce. In this paper, the classification and sources of key enzymes in soy sauce fermentation and their applications in soy sauce are introduced in detail. The application progress of related microbial improvement technology and

引文格式:

程宇勤, 崔春, 冯云子. 生物酶改善原酿酱油品质的研究进展[J]. 现代食品科技, 2024, 40(7): 334-342.

CHENG Yuqin, CUI Chun, FENG Yunzi. Research progress of quality improvement of original soy sauce using enzymes [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(7): 334-342.

收稿日期: 2023-06-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31972065)

作者简介: 程宇勤 (2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: 1939204552@qq.com

通讯作者: 崔春 (1978-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: cuichun@scut.edu.cn

enzyme preparation in soy sauce fermentation are also discussed. Furthermore, existing problems and future development trends are presented. The findings of this study provide theoretical support for improving the quality of original soy sauce.

Key words: enzyme preparation; soy sauce fermentation; strain selection; quality improvement

酱油俗称豉油，是我国传统的调味品，距今已有 2 500 多年的历史，在传统调味品行业的众多种类中占据极其重要的位置，被冠以“中餐之魂”的称号^[1]。公元 754 年，唐朝高僧将酱油酿造技术传至日本，此后，该技术被逐渐传播到东南亚一带和世界各地。目前，酱油作为调味品在国际上已被广泛接受^[2]。酱油产业呈现蓬勃发展的势态，其年产量也在不断增加。当前，我国酱油的年产量已经突破 800 万 t，人均酱油消耗量已达到每年 8 L^[3]，并且仍然处于增长阶段。从酱油的应用价值来看，酱油中含有丰富的蛋白质、肽、氨基酸、有机酸、糖分、维生素、矿物质等有益元素，具有较高的营养价值；从酱油的生产工艺来看，其可分为高盐稀态发酵和低盐固态发酵两种^[4]。目前，应用高盐稀态发酵法生产的酱油在中国酱油市场较为普遍，高盐稀态发酵酱油的发酵时间为 90~180 d，工艺周期较长；而低盐固态酱油发酵时间为 15~30 d，相比于高盐发酵时间较短^[5]。酱油的生产通常以大豆和小麦为主要原料，混合之后接种质量分数为 1% 的米曲霉后制成发酵曲，此后还需要经历半年的发酵、熟成过程得到生酱油。酱油的生产可分为制曲、发酵和熟成三个步骤^[6]。其中酱油的制曲是酱油生产的关键步骤^[7]，在此过程会产生大量水解酶，如蛋白酶、纤维素酶、淀粉酶等，酶通过分解原料中的蛋白质和淀粉，生成氨基酸和糖类物质。这些酶解产物之间的协同作用，对酱油口感不仅有直接促进作用，还能在经过一系列生化反应之后促进醇类、酸类、酯类、醛类等芳香物质的形成和释放，从而形成酱油独特的色、香、味、体方面的感官特质^[8]。而鲜味的强弱是评价酱油品质的一个主要指标，酱油鲜味主要由酸性氨基酸引起，包括大豆蛋白和小麦酶解产物中的谷氨酸和天冬氨酸^[9]。

近年来，研究人员在酿造工艺以及酿造菌种上进行了大量研究以进一步提高发酵酱油的品质，从而更好地满足市场大众的需求。同时，大多数酱油生产企业也注重在生产技术方面进行创新以优化生产工艺条件，使酱油生产原料中的淀粉、蛋白质等能够分解更加完全，以提高原料的利用率，使酱油风味得到进一步改善，提升经济效益，而生物酶的

应用是其中的一个有效手段。然而，目前关于酱油发酵过程中生物酶的外源添加的研究较少，并且相关的新兴应用技术也尚未得到深入研究。本文针对酱油酿造过程中关键生物酶的分类、作用及其技术发展前景进行综述，并对改善原酿酱油品质提供一定的理论支持。

1 生物酶的发展为酿造酱油的品质提升提供新途径

酱油通常是由大豆、小麦作为原料，经曲霉、耐盐乳酸菌和耐盐酵母三种微生物所产酶系的共同作用下发酵而成。传统酱油生产过程如图 1 所示，主要包括蒸煮、接种制曲、发酵、淋油等过程。其中在制曲与发酵过程中常见的酶（表 1）有淀粉酶（ α -淀粉酶和葡糖淀粉酶）、蛋白酶、纤维素酶、果胶酶、乳酸脱氢酶、多酚氧化酶、酯酶、谷氨酰胺酶等^[10]。酱油酿造过程中作用的生物酶类型按其来源可分为三大类，分别是外源酶、内源酶和大豆中原有的酶类^[11]，三种来源的生物酶均对酿造酱油的滋味、风味有着重要的影响。外源酶一般来自人为添加的各类酶制剂，如外源性谷氨酰胺酶、中性蛋白酶、酸性蛋白酶、 α -淀粉酶等；内源酶则是来源于发酵过程中微生物分泌的各类酶，如酱油酿造过程中主要产酶微生物米曲霉所分泌的蛋白酶、纤维素酶、淀粉酶、谷氨酰胺酶等各种酶，其次还有空气中落入的酵母和细菌等繁殖分泌产生的多种酶类；酱油酿造的主要原料—大豆本身也含有多种酶类，如蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、转氨酶、糖苷酶、蔗糖酶等，而大豆中原本所含的酶经过蒸煮后将失去活性。

当前，有研究证明内源、外源生物酶方面的优化，可以丰富酱油酿造过程中的酶系组成，从根源上提升酿造酱油的品质特性^[10]。外源性谷氨酰胺酶添加使得影响酱油风味的关键性化学成分有机酸、碳类化合物、色素、含氮化合物等物质的含量明显增加，从而有效改善酱油口感，提升酱油的鲜味及厚味^[12]。随着对米曲霉等关键微生物的研究进展和酶制剂产业的发展，越来越多的改良手段和工业酶

制剂可应用于酱油生产,为酱油感官品质提升和品质差异化提供了更多的可能性。

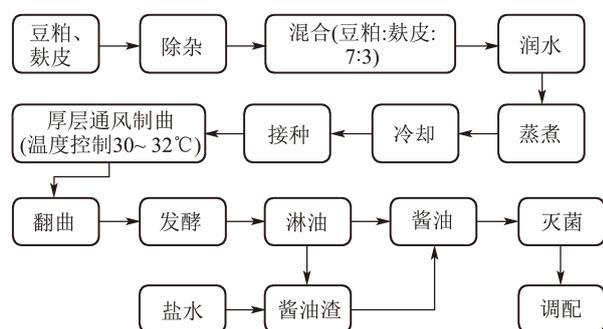


图1 传统酱油生产工艺流程图

Fig.1 Traditional soy sauce production process flow chart

表1 酱油酿造中的主要生物酶类别

Table 1 The main categories of biological enzymes in soy sauce brewing

分类	作用类型	主要种类
蛋白酶	内肽酶	碱性蛋白酶、中性蛋白酶I、II等
	外肽酶	天冬氨酸蛋白酶、亮氨酸氨基肽酶、羧肽酶、二肽基肽酶等
谷氨酰胺酶	—	γ -谷氨酰胺转氨酶、谷氨酰胺合成酶、谷氨酰胺转氨酶
淀粉酶	外切酶	葡萄糖淀粉酶、 β -淀粉酶
	内切酶	α -淀粉酶
果胶酶	—	聚半乳糖醛酸酶、果胶酯酶、果胶裂解酶
纤维素酶	外切酶	β -葡聚糖外切酶、 β -葡糖苷酶
	内切酶	β -葡聚糖内切酶
乳酸脱氢酶	NAD-依赖型	L-乳酸脱氢酶、D-依赖型乳酸脱氢酶
	NAD-非依赖型	膜蛋白、乳酸氧化酶、乳酸单氧酶、硫胺 b_2
多酚氧化酶	—	单酚氧化酶(酪氨酸酶)、双酚氧化酶(儿茶酚氧化酶)、漆酶(对苯二酚氧化酶)
酯酶	—	脂肪酶、羧酸酯酶

2 生物酶在酿造酱油中的应用

2.1 米曲霉分泌酶在酱油酿造中的应用

在酱油的酿造过程中,酱油成曲是其中最重要的环节。一方面可以通过改进生产工艺来生产质量较高的酱油成曲^[13],同时也可以通过对发酵菌种进行选择改善成曲的品质。米曲霉是进行酱油发酵的优良菌株,在酱油的酿造过程中占据重要地位,由于其悠久的应用历史,其安全性得到了世界

卫生组织的认可。米曲霉可以分泌产生多种不同的水解酶,包括葡萄糖淀粉酶、中性蛋白酶、酸性蛋白酶、果胶酶、葡萄糖苷酶、木聚糖酶、谷氨酰胺酶、纤维素酶和氨基肽酶等^[14],极大地促进了酱油发酵原料分解、转化与风味物质合成。此外,由于米曲霉具有在固态发酵中产生异源蛋白的能力,人们对米曲霉的关注也日益增加。Oda等^[15]借助基质辅助激光解析电离-飞行时间质谱(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF-MS)评估了在液态和固态培养条件下以小麦为发酵原料的米曲霉RIB40细胞外蛋白质组成情况并确定了蛋白质分泌图谱,发现其在液态和固态发酵条件下都会分泌产生木聚糖酶G1,在固态发酵条件下发现其会分泌二肽基肽酶,在液态发酵条件下表达产生葡萄糖淀粉酶A和木聚糖酶G2。Liang等^[16]通过MALDI-TOF-MS分析了在酱油曲(大豆)上生长的米曲霉As3.951和RIB40的细胞外蛋白,发现多种氨基肽酶和蛋白酶在蛋白质组水平上是相同的,这说明米曲霉As3.951和米曲霉RIB40对大豆蛋白具有较强的消化能力,同时作者发现在固态和液态发酵培养过程中葡萄糖苷酶被大量分泌,显著提高酱油酿造过程中的原料利用率。

蛋白酶是米曲霉表达分泌的主要胞外酶,米曲霉可分泌多种蛋白酶,包括氨基肽酶、羧肽酶、二肽酶、三肽酶、丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶和天冬氨酸蛋白酶等,蛋白酶可以将酱油原料中的大分子蛋白质水解成小分子肽,研究表明,酱油中的小分子肽类化合物有助于鲜味产生^[17]。2005年Nature^[2]报道了基于米曲霉RIB40基因组分析(表2),发现米曲霉可分泌135种蛋白酶,其中氨基肽酶基因数量19种,丝氨酸羧肽酶基因数量12种,金属羧肽酶基因数量12种,丝氨酸蛋白酶基因数量11种,半胱氨酸蛋白酶基因数量12种,天冬氨酸蛋白酶基因数量14种,金属蛋白酶基因数量18种,未知蛋白酶基因数量10种。其中以亮氨酸氨基肽酶为主的氨基肽酶和羧基肽酶属于蛋白质外切酶^[18],其可以使得原料溶液中的小分子肽进一步的水解,进而产生各种氨基酸,而氨基酸的数量和种类又是影响酱油滋味和色泽的关键因素。酱油酿造过程中的蛋白质内切酶主要可以分为酸性蛋白酶、中性蛋白酶及碱性蛋白酶等。从米曲霉中分离得到的酸性蛋白酶的最适pH值一般在3.5左右,分子量约为39 000 u,但其并不

具备酸性羧基肽酶及氨基肽酶的活性，只能水解产生极少量的氨基酸，若将其与酸性羧基肽酶混合之后，可使蛋白质充分水解并且短时间内产生大量氨基酸，从而达到更好提升酱油风味品质的目的^[19]。Nakadait 等^[20]还从米曲霉中分离出了两种中性蛋白酶，其最适 pH 值一般在 5~7，并且具备一定的耐高温的能力，在 90 °C 条件下仍可以保留一部分的活力，可将大豆蛋白水解成氨基酸或寡肽，进一步提升酱油的鲜味。研究表明，在酱油酿造过程中，碱性蛋白酶显示出最高的活力^[21]。当前，已有多种碱性蛋白酶从米曲霉中被分离出来。有研究人员从米曲霉中分离纯化出一种可以水解如异亮氨酸-谷氨酰胺-天冬酰胺-亮氨酸-甘氨酸-亮氨酸-甘氨酸肽键等某些特定部位的肽键的碱性蛋白酶^[20]，其分子质量在 23 000 u 左右，同时未发现其氨基肽酶和羧基肽酶的功能活性。

表 2 米曲霉固态发酵分泌的蛋白酶种类及基因数量

Table 2 Types and gene numbers of proteases secreted by *Aspergillus oryzae* during solid state fermentation

	酶种类	酶学编号	基因数量
外切蛋白酶	氨肽酶	3.4.11.-	19
	二肽酶	3.4.13.-	3
	二肽酶或三肽酶	3.4.14.-	9
	丝氨酸羧基肽酶	3.4.16.-	12
	金属羧基肽酶	3.4.17.-	12
	未知肽酶		14
	合计		69
内切蛋白酶	丝氨酸蛋白酶	3.4.21.-	11
	半胱氨酸蛋白酶	3.4.22.-	12
	天冬氨酸蛋白酶	3.4.23.-	14
	金属蛋白酶	3.4.24.-	18
	未知蛋白酶	3.4.99-	10
	合计		65

2.2 谷氨酰胺酶在酱油酿造中的应用

1931 年，海带的鲜味成分 L-谷氨酸钠在酱油中被发现，之后的研究表明 L-谷氨酸是酱油中鲜味的主要来源^[22]。谷氨酰胺酶（L-谷氨酰胺酰胺水解酶 EC 3.5.1.2）是一种胞内酶，广泛分布于微生物中，包括细菌，酵母以及真菌^[23]。谷氨酰胺酶可以催化谷氨酰胺水解为谷氨酸，酱油中 L-谷氨酸含量的差别较大，可达到 7.45~146.30 mg/mL，中位值为 80.32 mg/mL^[24]。

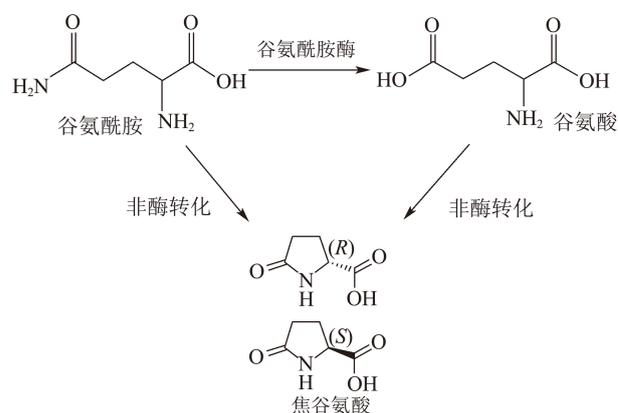


图 2 谷氨酰胺转化为谷氨酸和焦谷氨酸

Fig.2 Conversion of glutamine to glutamic acid and pyroglutamic acid

在酱油酿造中，谷氨酸可以通过四种不同的途径产生^[25]。（1）L-谷氨酸和 L-谷氨酰胺直接从原料蛋白质中释放出来；（2）释放的 L-谷氨酰胺可在米曲霉分泌的多种谷氨酰胺酶的催化下转化为谷氨酸；（3）通过其中部分谷氨酰胺酶将肽链的碳末端谷氨酰胺残基脱酰胺成谷氨酸，然后由肽酶释放；（4） α -酮戊二酸在谷氨酸脱氢酶的催化作用及 NH_4^+ 存在下生成谷氨酸^[26]。如图 2 所示，谷氨酰胺通过一个相对快速的非酶促反应转化为焦谷氨酸，而谷氨酸非酶转化为焦谷氨酸的速度非常缓慢，表明酱油中的谷氨酸与谷氨酰胺相比具有更高的稳定性。因此，在谷氨酰胺酶起关键作用的酱油酿造过程中，第三途径对提高酱油的鲜味更为重要。酿造酱油原料中所含有的谷氨酸中 46% 左右以谷氨酰胺形式存在，谷氨酰胺酶需要达到一定的酶活力才能将谷氨酰胺充分转化为谷氨酸^[27]。当酶活较低时，谷氨酰胺将进行非酶转化反应生成焦谷氨酸且反应不可逆，而焦谷氨酸不具备“鲜味”特征，从而使酱油鲜味被减弱^[28]。

米曲霉在制曲过程中产谷氨酰胺酶活性通常较低，因此导致大量的谷氨酰胺底物不能转化为鲜味谷氨酸，造成原料利用率的降低。针对这一问题，研究者通过引入外源谷氨酰胺酶以提高酱油中谷氨酸含量。有研究表明在酱油发酵初期一次性添加酱醪质量分数为 0.01% 的谷氨酰胺酶能使酱油的谷氨酸含量提升 45%，焦谷氨酸含量降低 68%，而氨基氮、总氮和总酸等指标不受影响^[28]。在感官方面，酱油的鲜味特征和口感的协调性有明显的改善，其咸味和苦涩味得到大幅度的减弱，使酱油品质得到进一步改善和提高。

此外也有研究发现谷氨酰胺酶也催化 γ -谷氨酰转移反应。Yang 等^[29]研究表明来自米曲霉的谷氨酰胺酶具有转肽酶活性,在谷氨酸和苯丙氨酸存在下,用米曲霉分泌产生的谷氨酰胺酶催化合成了 γ -谷氨酰-苯丙氨酸和 γ -谷氨酰- γ -谷氨酰-苯丙氨酸,其产物赋予了酱油一种厚味感觉,收敛阈值(2.5~3.92 mmol/L)约为厚味阈值浓度(0.78~1.53 mmol/L)的3倍,进一步提高了酱油的综合风味强度。与此同时,Tang 等^[30]利用谷氨酰胺酶在固体浓度高达50%的条件下通过 γ -谷氨酰转肽反应合成一类 γ -谷氨酰肽(γ -[Glu]_(n \geq 1)-Gln),聚 γ -谷氨酸残基位于N末端,谷氨酰胺残基位于C末端,其结构类似于聚 γ -谷氨酸^[31]。 γ -谷氨酰肽与聚 γ -谷氨酸都属于典型的厚味物质,在发酵食品中具有重要的呈鲜作用。研究发现50%固体浓度下产生的 γ -[Glu]_(n=1,2,3,4,5)-Gln 的强度高于10%固体浓度下的强度,表明在高固体浓度下谷氨酰胺酶生产 γ -[Glu]_(n \geq 1)-Gln 的可行性。

2.3 蛋白酶制剂在酱油酿造中的应用

蛋白酶在酱油的酿造过程中发挥着极其重要的作用,将原料中蛋白质水解成低分子蛋白胨、多肽及氨基酸,使酱油成为营养丰富含有鲜味的调味品^[32]。目前在酱油酿造过程中所使用到的蛋白酶制剂主要酸性有蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶、氨基肽酶、羧基肽酶和谷氨酰胺酶等。在高盐低pH值的发酵环境下,酱油曲中的内源性蛋白酶活力会大大降低而使得原料中蛋白质不能被充分利用,因此通过添加外源性蛋白酶制剂对提高原料蛋白质利用率和改善酱油品质有重要影响。有研究表明外源性中性蛋白酶与米曲霉分泌内源蛋白酶协同作用可以增强小肽和酶促作用效果,向酱油曲中添加适量中性蛋白酶后使酱油中氨基态氮和总氮分别提高7.45%和2.21%,并使500 u以下的肽、乳酸与乙酸的比例增加,从而提高了酱油的鲜味和厚味^[33]。因此外源性中性蛋白酶的使用可以提高酱油蛋白质的利用率和发酵质量。

余洁瑜等^[34]在高盐稀态发酵酱油的发酵初期添加酸性蛋白酶,考察外源性酸性蛋白酶对酱油发酵的影响。以未添加酸性蛋白酶的样品为对照组,在酱油发酵初期添加1%的酸性蛋白酶样品为实验组。结果显示,实验组酱油的pH值下降至4.50、总酸、氨基酸态氮含量分别增加36.71%、16.49%,从而在一定程度上可以提高原料的利用率。Zhao 等^[35]通过

建立在55℃下可行的两段水解法,即用中性蛋白酶水解非酱油原料来源蛋白(大豆分离蛋白、大米蛋白、小麦蛋白或豌豆蛋白)12 h,后用氨基肽酶再水解12 h,以产生富含鲜味增强肽,如天冬酰-脯氨酸和丙氨酰-组氨酸的蛋白质水解物。结果显示,两段水解产物的天冬酰-脯氨酸和丙氨酰-组氨酸含量分别是中性蛋白酶一段水解产物的3.32倍、1.15倍,向酱油中加入5% (m/V)的水解液可以显著提高酱油鲜味,同时降低苦味,使酱油品质得到明显改善。

2.4 淀粉酶制剂在酱油酿造中的应用

酱油中使用的淀粉酶制剂主要有 α -淀粉酶和糖化酶。 α -淀粉酶属于内切酶,能随机水解淀粉、可溶性糊精及低聚糖中的 α -1,4葡萄糖苷键,酶作用后生成糊精及少量葡萄糖和麦芽糖;糖化酶能将从淀粉非还原性末端水解 α -1,4葡萄糖苷键产生葡萄糖,也能缓慢水解 α -1,6葡萄糖苷键^[32]。淀粉酶通过对酱油的淀粉质原料进行水解,产生还原糖、糊精等成分,从而增加酱油固形物含量以及提供酒精发酵、有机酸发酵的原料^[6]。在历经半年的酱油发酵过程中,原料中的蛋白质以及糖类会被蛋白酶和淀粉酶降解,生成氨基酸、葡萄糖、麦芽糖等。据报道,谷氨酸、葡萄糖与鲜味强度有很强的相关性,被认为是鲜味的重要化合物^[36],产物之间通过美拉德等相互作用形成酱油独特的风味。徐欢欢^[37]在制曲时通过添加适量 α -淀粉酶,使得出曲时大曲的酸性蛋白酶活力提高14.55%、淀粉酶活力提高35.02%、羧基肽酶活力提高13.89%,同时使得酱油原油中的还原糖含量增加11.36%,并将其应用于工业化生产中,在一定程度上提高了酱油出油率和蛋白质的利用率。此外,若制曲时向小麦麸皮原料中添加1.75%中温淀粉酶制剂,酿造酱油中氨基酸态氮与总氮含量分别提高了47.40%和43.93%,还原糖含量达到4.88 mg/mL^[38],还原糖与氨基酸发生美拉德反应使得酱油呈现红棕色色泽,光泽饱满,香气浓郁,明显提升了酿造酱油的品质。

2.5 纤维素酶制剂在酱油酿造中的应用

纤维素酶由可以将纤维素水解为葡萄糖的一类酶组成,在1906年于蜗牛消化道内被首次发现,主要包括葡聚糖外切酶、葡聚糖内切酶和 β -葡萄糖苷酶^[39]。纤维素酶大多具有较高的热稳定性,其最适温度在40~65℃之间,最适pH值为4.00~6.00。

酱油的风味、色泽和味道是评价酱油品质高低的主要因素，而酱油的色泽主要由其中的还原糖和氨基酸发生美拉德反应而形成^[40]。在酱油酿造过程中蛋白酶可以分解蛋白质生成各类肽和氨基酸以增强酱油风味，若在入池发酵时添加适量的纤维素酶，可以有效提升原料的利用率。比如，纤维素酶的加入使得原本被纤维素包裹的蛋白质得到充分裸露，使其能够被蛋白酶充分水解，酱油的产率风味和品质都将大幅度提高^[41]。其次，纤维素被降解后产生的葡萄糖、木糖等增加了酱油中的还原糖和色度，也在一定程度上改善了酱油色泽和口感^[42]。

3 生物酶在酱油酿造应用技术中的发展

3.1 低温胁迫法提高酱油中生物酶活力

低温胁迫能够诱导微生物发生自身溶解反应，使微生物细胞膜、酶活性等生理特性和生化机能发生明显变化。周文斯在高盐稀态酿造酱油过程中利用低温胁迫米曲霉自溶，结果显示：在低温（4℃）条件下，米曲霉菌丝体的自溶程度更大，酿造酱油中谷氨酸和天冬氨酸的含量分别增加5.73%和3.47%，在感官评价后，其鲜味和厚味感较对照组明显增强^[43]。此外，Zhou等^[44]利用低温胁迫法，将酱油大曲与2.5倍质量饮用水混合后在4℃发酵9d，在发酵结束后添加食盐再进行常温发酵后，将酱油发酵上清液和酱油醪的谷氨酰胺酶活力较对照组（室温下发酵9d）提高1.52倍，上清液中谷氨酰胺酶活性提高了65.17%，增加了甜味氨基酸含量，酱油的鲜味感觉明显增强，苦味也得到明显减弱，使得酱油具有更加理想的口感，表明低温胁迫法在酱油发酵过程中具有较好的应用前景。

3.2 利用菌种诱变筛选提高酱油中生物酶活力

通常，酱油的生产包括制曲阶段和发酵（Moromi）阶段。微生物是酱油发酵过程中风味形成的重要因素，微生物之间的协调作用对于酱油品质的改善非常重要。控制Moromi发酵步骤是改善酱油风味的一种重要手段。使用具有所需代谢途径和酶活性的新的或改进的微生物菌株是实现这一目的的有效方法^[45]。目前，主要通过物理化学诱变法^[46]和原生质体融合技术^[47]等菌种选育技术得到高蛋白酶活性菌株进而提高原料中氮氮利用率。徐德峰^[48]利用电场诱导原生质体融合筛选得到一株

融合子，其酸性蛋白酶活力较原米曲霉HN3042提高82.19%，实验发现，将新菌株应用于酱油发酵后，酱油中的总酸、总氮和氨基酸态氮含量与原米曲霉酱油发酵液相比均显著提高，使酱油风味得到进一步丰富。此外，研究人员通过诱变筛选米曲霉OR101得到突变菌株米曲霉AB390，与亲本菌株相比，突变体中的半纤维素酶和纤维素酶活性更高，而淀粉酶活性更低，从而减少葡萄糖的生成以生产浅棕色酱油^[49]。

近年来，由于等压室温等离子（Atmospheric Room Temperature Plasma, ARTP）诱变技术对于脱氧核糖核苷酸的诱变损伤机制更加多样化，更加容易获得突变体，操作难度低，在诱变技术领域逐渐兴起，被广泛应用于菌种的选育^[50]。而米曲霉沪酿3.042由于具有生长周期短、产酶种类丰富、安全性高等优点，是我国酱油生产中使用最多的菌种^[51]。樊嘉训等^[52]通过常压室温等离子体诱变，筛选得到突变株H34，其蛋白酶活力较出发菌米曲霉沪酿3.042提高145.60%。黄艳等^[53]利用ARTP对米曲霉A019进行诱变得得到突变株ZA131，突变菌株的产酶能力较出发菌株增强，其中蛋白酶产量提升38.46%，谷氨酰胺酶产量提升18.25%，谷氨酸生成率提升了11.18%，对酿造酱油鲜味特征有明显改善。Shu等^[54]利用此技术对米曲霉沪酿3.042菌株进行诱变得得到较出发菌的酸性蛋白酶活力增加55%的突变菌株B-2，在一定程度上弥补了蛋白酶在高盐环境下活力不足的缺陷，使其在高盐发酵环境下的使用成为可能。

3.3 通过添加外源性酶制剂提升酱油品质

酿造酱油发酵过程中，除了上述内源酶的改良技术以外，还会通过添加外源酶制剂来进一步提升酱油品质。小麦麸皮作为酱油酿造的主要原料之一，其戊聚糖含量可以达到13.85%~19.42%^[55]，经过木聚糖酶水解之后的水解产物戊糖与氨基酸的反应之后的产物使酱油获得优良的色泽^[56]。为提高酱油的出油率，研究人员在高盐稀态法酿造酱油发酵结束时分别添加果胶酶、中性蛋白酶、 α -淀粉酶和纤维素酶后发现，在30℃时酱油出油率随着酶添加量的增加而显著提升，但向酱油中添加木聚糖酶、 β -葡聚糖酶后酱油的出油率反而降低^[57]。此外，通过向酱油盐水发酵阶段添加酸性蛋白酶以可以弥补蛋白酶在盐水环境下活力不足的缺点，以提高原料蛋白质的利用率^[58,59]。研究人员通过将米曲霉与酸性

蛋白酶菌种混合制曲之后,酱油中的酸性蛋白酶活力也得到显著提升,进一步提高了原料利用率和氨基酸产率^[60]。魏鲁宁等^[61]将甘氨酸甜菜碱作为渗透压保护剂添加到高盐稀态酱油发酵的酱醪中,同时添加向其中外源复合纤维素酶,使得发酵酱油中蛋白质转化率提高2%~8%。除了在提升酱油原料利用率有显著优势之外,由于生产工艺的原因,酿造酱油在一定程度上存在着沉淀问题,其货架期二次沉淀现象,严重降低了酱油的品质,如何解决酿造酱油二次沉淀问题显得非常迫切。赵连俊等^[62]向酿造酱油中添加质量分数为1‰的木瓜蛋白酶并静置两天后,酿造酱油的二次沉淀得到明显消除,表明木瓜蛋白酶在作为酿造酱油的澄清剂方面具有一定的应用前景。

4 结论与展望

原酿造酱油从初次记载至今已有2 500余年的发展历史。受益于原料、发酵工艺、菌株选育等多方面的研究和积累,酿造酱油的品质一直在不断提升,也针对不同人群的需求形成了差异化的产品形式。随着感官分析、物质分析技术的进步,生物学、合成生物学的发展,利用生物酶对酱油酿造中关键呈味、呈香物质的调节也逐渐成为了当下的研究热点。酿造酱油中使用的生物酶主要分为以米曲霉分泌酶系为代表的内源生物酶,和以各类食品工业用酶制剂为代表的外源生物酶。其中,米曲霉对酱油酿造过程中风味的形成起到关键作用,其分泌的蛋白酶、淀粉酶等多种酶水解原料中蛋白质、淀粉等产生多种氨基酸及还原糖类物质,通过协同作用使得酱油具有独特的色泽、滋味和风味特征。生物酶制剂的使用则更为灵活。例如,谷氨酰胺酶制剂可以提升酱油中的谷氨酸的含量,从而提升酱油鲜味和厚味感。蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶的应用,则可以使酱油具有更加饱满的色泽和鲜味感,并提升原料的利用率和降低生产成本。通过对新曲霉菌株的筛选及改良,以及对酶制剂在酱油酿造中的应用进行研究,可以针对性地提升酱油酿造过程中的生物酶活力,从而提升其关键性的呈味、呈香物质,对于提升酱油品质及原料利用率,推动酱油产业的绿色可持续发展具有重要作用。随着食品营养与健康的理念日益受到消费者的重视,需要更加深入研究和推进现代生物技术及相关先进方法以加强目前的生产工艺,提升酶制剂的应用效率,探索其复合

使用方法,对进一步提高酿造酱油的营养价值和商业价值尤为重要。

参考文献

- [1] ZHU Y, TRAMPER J. Koji-where east meets west in fermentation [J]. *Biotechnol Adv*, 2013, 31(8): 1448-1457.
- [2] MACHIDA M, ASAI K, SANO M, et al. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae* [J]. *Nature*, 2005, 438(7071): 1157-1161.
- [3] 张士侠,魏瑶,王霖.酱油,食醋食品安全国家标准实施存在问题和监管对策[J].*食品与发酵工业*,2022,48(7):319-324.
- [4] 范梦雪,王璐瑶,陈卫卫,等.酿造用米曲霉菌种选育的研究进展[J].*食品科学*,2023,44(5):346-354.
- [5] FENG Y, CAI Y, SUN-WATERHOUSE D, et al. Reducing the influence of the thermally induced reactions on the determination of aroma-active compounds in soy sauce using SDE and GC-MS/O [J]. *Food Analytical Methods*, 2017, 10(4): 931-942.
- [6] HUANG Z, FENG Y, ZENG J, et al. Six categories of amino acid derivatives with potential taste contributions: a review of studies on soy sauce [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2023, 3: 1-12.
- [7] 万萍,孙杰,周琳,等.酱油制曲工艺条件的影响研究[J].*食品与发酵科技*,2018,54(4):71-74.
- [8] JAO C L, KO W C, HSU K C. Studies on the cooking conditions and mechanical koji-making of black beans [J]. *Procedia Food Science*, 2011, 1: 1388-1395.
- [9] KANEKO S, KUMAZAWA K, NISHIMURA O. Isolation and identification of the umami enhancing compounds in Japanese soy sauce [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2011, 75(7): 1275-1282.
- [10] 冯纬,周利南,刘晔,等.酿造酱油发酵过程及其相关酶系[J].*价值工程*,2018,37,12:165-166.
- [11] 李丹,李莹,赵谋明.酱油生产中的头油、二油和三油组分分析及抗氧化活性评价的研究[J].*中国调味品*,2009,9:5.
- [12] 谭戈,肖亮琴,吴昌正,等.基于GC-MS分析不同酿造周期酱油产品的挥发性风味物质[J].*中国调味品*,2023, 48(4):161-165.
- [13] 王惠芳,樊君,荣秋亮,等.种曲工艺参数优化及其在酱油生产中的应用[J].*中国调味品*,2019,44(3):18-21,30.
- [14] KAEWKROD A, NIAMSIRI N, LIKITWATTANASADE T, et al. Activities of macerating enzymes are useful for selection of soy sauce koji [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2018, 89: 735-739.
- [15] ODA K, KAKIZONO D, YAMADA O, et al. Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(5): 3448-

- 3457.
- [16] LIANG Y, LI P, LIN Y. Analysis of extracellular proteins of *Aspergillus oryzae* grown on soy sauce koji [J]. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 2009, 73(1): 192-195.
- [17] LIOE H N, 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(4): 1669-1677.
- [18] 刘占. 酱油酿造中蛋白酶系的研究进展 [J]. 粮食流通技术, 2017, 5: 34-36.
- [19] 林剑青, 陈晓莹, 贺竹梅. 米曲霉与酱油曲霉高酶活菌株的诱变选育 [J]. 中国酿造, 2009, 11: 24-27.
- [20] HAYASHI K, TERADA M, MOGI K, et al. Reinvestigation of molecular weight and terminal amino acid residues of alkaline proteinase from *Aspergillus sojae* [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1970, 34(2): 289-295.
- [21] 于志成, 黄福气, 许宙, 等. 碱性蛋白酶酶解酱油渣蛋白制备免疫活性肽 [J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(11): 125-130.
- [22] JIANG X, XU Y, YE J, et al. Isolation, identification and application on soy sauce fermentation flavor bacteria of CS1.03 [J]. Journal of Food Science and Technology, 2019, 56(4): 2016-2026.
- [23] AMOBONYE A, SINGH S, PILLAI S. Recent advances in microbial glutaminase production and applications—a concise review [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2019, 39(7): 944-963.
- [24] KONG Y, ZHANG L, ZHANG Y, et al. Evaluation of non-volatile taste components in commercial soy sauces [J]. International Journal of Food Properties, 2018, 21(1): 1854-1866.
- [25] ITO K, MATSUYAMA A. Koji molds for Japanese soy sauce brewing: characteristics and key enzymes [J]. Journal of Fungi-Open Access Mycology Journal, 2021, 7(8): 658.
- [26] 段钢. 新型工业酶制剂的进步对生物化学品工业生产过程的影响 [J]. 生物工程学报, 2009, 25(12): 1808-1818.
- [27] 陈颖, 王斌, 潘力. 米曲霉谷氨酰胺酶在黑曲霉中的重组表达与酶学特性 [J]. 现代食品科技, 2022, 38(9): 126-134.
- [28] 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.
- [29] YANG J, SUN-WATERHOUSE D, CUI C, et al. Synthesis and sensory characteristics of Kokumi γ -[Glu]_(n≥1)-Phe in the presence of glutamine and phenylalanine: glutaminase from *Bacillus amyloliquefaciens* or *Aspergillus oryzae* as the catalyst [J]. J Agric Food Chemistry, 2017, 65(39): 8696-8703.
- [30] TANG R, SUN-WATERHOUSE D, XIONG J, et al. Feasibility of synthesizing γ -[Glu]_(n≥1)-Gln using high solid concentrations and glutaminase from *Bacillus amyloliquefaciens* as the catalyst [J]. Food Chemistry, 2019, 310: 125920.
- [31] CANDELA T, FOUET A. Poly-gamma-glutamate in bacteria [J]. Molecular Microbiology, 2010, 60(5): 1091-1098.
- [32] 李大锦, 王汝珍. 酶制剂在酱油生产中的应用技术 [J]. 江苏调味副食品, 2005, 22(1): 11-15.
- [33] SU W, WANG C, HAO L, et al. Solid-state fermentation of corn by-products mixture feed with *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus plantarum* and protease for improving protein quality and nutrient utilization [J]. 2020, 425: 136501.
- [34] 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.
- [35] A Y Z, B X Z, C S W A, et al. Two-stage selective enzymatic hydrolysis generates protein hydrolysates rich in Asn-Pro and Ala-His for enhancing taste attributes of soy sauce [J]. Food Chemistry, 2020, 345: 128803.
- [36] SHIGA K, YAMAMOTO S, NAKAJIMA A, et al. Metabolic profiling approach to explore compounds related to the umami intensity of soy sauce [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2014, 62(29): 7317-7322.
- [37] 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, 2012.
- [38] 闫华娟. 小麦麸皮酶解液对低盐固态发酵酱油品质的影响 [D]. 晋中: 山西农业大学, 2014.
- [39] JIAO H, SONG X, LAI C, et al. Progress in preparation of cellulase from lignocellulose using fungi [J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2021, 26(6): 871-886.
- [40] KATO, HIROMICHI. Studies on amino-carbonyl reactions in food and biological systems [J]. Nippon Nōgeikagaku Kaishi, 1992, 66(2): 101-109.
- [41] 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, 33(9): 61-64.
- [42] 钟冠山. 艰难的历程光明的前景 [J]. 中国酿造, 2002, 21(1): 45-47.
- [43] 周文斯. 低温胁迫米曲霉自溶制备鲜味酱油及呈味肽的分离鉴定 [D]. 广州: 华南理工大学, 2019.
- [44] ZHOU W, SUN-WATERHOUSE D, XIONG J, et al. Desired soy sauce characteristics and autolysis of *Aspergillus oryzae* induced by low temperature conditions during initial moromi fermentation [J]. Journal of Food Science and Technology -Mysore-, 2019, 56: 2888-2898.
- [45] 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, 2017, 78: 181-182.
- [46] ZHAO G, HOU L, LU M, et al. Construction of the mutant strain in *Aspergillus oryzae* 3.042 for abundant proteinase production by the N⁺ ion implantation mutagenesis [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2012, 47(3): 504-510.
- [47] XU D, PAN L, ZHAO H, 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 & Biotechnology, 2011, 38(9): 1255-1265.
- [48] 徐德峰.高活力酸性蛋白酶曲霉融合子的选育及其在酱油发酵中的初步应用[D].广州:华南理工大学,2010.
- [49] JUN, WATANABE, AND, et al. Loss of *Aspergillus oryzae amyR* function indirectly affects hemicellulolytic and cellulolytic enzyme production [J]. Journal of Bioscience & Bioengineering, 2011, 111(4): 408-413.
- [50] 舒冬梅,王德良,宋绪磊,等.常压室温等离子体诱变(ARTP)及高通量筛选高产蛋白酶米曲霉的初探[J].中国调味品,2016,41(12):67-73.
- [51] 王宪斌,冯霞,刘义,等.多菌种制曲在酱油发酵中的研究进展[J].食品与发酵科技,2016,(3):60-64.
- [52] 樊嘉训,刘松,陆信曜,等.高产蛋白酶米曲霉菌株的选育及对酱油风味生成的影响[J].食品与发酵工业,2021, 47(21):1-8.
- [53] 黄艳,王静,高庭,等.一株高产蛋白酶的米曲霉在酱油酿造中的发酵性能对比研究[J].中国调味品,2018, 43(12):80-82.
- [54] SHU L, SI X, YANG X, et al. Enhancement of acid protease activity of *Aspergillus oryzae* using atmospheric and room temperature plasma [J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1418.
- [55] 孙元琳,田玉荣,刘瑞,等.加工工艺对黑小麦麸皮戊聚糖组成与理化性质的影响[J].食品科学技术学报,2021, 39(5):56-62.
- [56] 鲁肇元.酱油生产技术(六)酱油生产用主要原料[J].中国调味品,2002,6:44-45.
- [57] 黄振娥.酶制剂对酱油出油率的影响[J].中国调味品, 2015,7:124-125.
- [58] 惠继星,岳军,宁艳春,等.酸性蛋白酶在玉米燃料乙醇浓醪发酵中的应用[J].化工科技,2020,28(4):68-72.
- [59] 李雪玲,颜喆,胡文锋.酱油酿造优良米曲霉菌株的高效选育[J].中国调味品,2021,46(8):20-23,28.
- [60] 罗雯,郭建,樊君,等.酱油酿造中复合米曲霉发酵制曲研究[J].中国调味品,2022,47(4):164-166.
- [61] 魏鲁宁,李芬芳,胡文锋,等.甘氨酸甜菜碱及复合纤维素酶对酱油发酵的影响[J].食品科学,2013,34(7):212-216.
- [62] 赵连俊,孙亚文.酶制剂在消除酿造酱油二次沉淀的应用试验[J].江苏调味副食品,2009,26(2):29-30.