

珍珠贝肉制曲过程中物质代谢与酶活之间的关系

崔春, 赖晨戎, 夏克胜, 赵海峰, 赵谋明

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510641)

摘要: 以马氏珍珠贝肉为原料固态发酵制备成曲, 通过监测发酵过程各营养底物及中间代谢产物变化趋势, 探究了制曲过程中物质代谢与酶活力的相互关系。研究表明: 制曲过程中, 曲质量和水分含量均呈现下降趋势, 曲中的干物质大体也是呈现下降的变化趋势, 曲温则是呈现先上升后下降的变化趋势。营养底物的代谢变化分为 4 个阶段, 24 h 是物质变化突变点, 此后, 柠檬酸循环是糖代谢的主要途径。24~36 h, 小分子糖和游离氨基酸吸收利用量达到最高值, 而 40~46 h 为蛋白酶活力最高值, 酶系分泌滞后于代谢中产物的消耗。糖代谢对蛋白酶活力影响最显著, 与中性蛋白酶活力呈显著负相关性 (皮尔逊指数 P 依次为: -0.943); 发酵前期提高淀粉酶活力, 成曲蛋白酶活力提高了 26.81%。

关键词: 马氏珍珠贝肉; 发酵; 酶活; 米曲霉; 代谢

文章编号: 1673-9078(2014)1-11-15

Relationship between Enzyme Activity and Biochemical Changes of *Pinctada martensi* Koji-making

CUI Chun, LAI Chen-rong, XIA Ke-sheng, ZHAO Hai-feng, ZHAO Mou-ming

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

Abstract: The solid-state fermentation of *Aspergillus oryzae* cultivated with *Pinctada martensi* were studied. The various biochemical changes were detected and compared in different growth conditions in order to explore the relationship between metabolism and protease activity during the fermentation. Results showed that the weight of koji and water content decreased with the extension of fermentation time, and the dry matter showed the same tendency. During the fermentation, the temperature of koji increased firstly, and then decreased. The metabolic change of nutritional material consumption was divided into 4 stages with 24 h being of the key point, and after then the citric acid cycle became the main way of glucose metabolism. During the period of 24~36 h, the reducing sugar and amino acids were rapidly absorbed and reached the highest values. While the protease activity was at its highest value at 40~46 h. Therefore, the secretion of enzyme lagged than the consumption of materials in metabolism. Glycometabolism was closely correlated with neutral protease activity (Pearson=-0.943). Meanwhile, the protease activity was increased by 26.81% after adding α -amylase at the beginning of the fermentation.

Key words: *Pinctada martensi*; fermentation; enzyme activity; *Aspergillus oryzae*; metabolism

固体发酵制曲是我国酿造工业的一项传统技术, 广泛应用于多类传统发酵食品(酒类、食醋、酱类、豆豉、酱油、腐乳等)的改进和新产品的开发^[1], 以及酶制剂的制备^[2~3]。固体发酵具有能耗低、操作简便、对无菌要求较低、发酵过程容易控制等的优点。制曲的实质就是创造微生物生长的最适条件, 例如严格控

收稿日期: 2013-04-23

基金项目: 广东省科技计划项目(2011A020102005); 广东省中国科学院全面战略合作项目(2010A090100023); 国家 863 科技计划项目(SS2012AA091606)

作者简介: 崔春(1978-), 男, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 食品生物技术、风味化学、海洋资源综合利用

通讯作者: 赵谋明(1964-), 男, 教授, 博士生导师。研究方向: 食品生物技术、蛋白质化学与工程、海洋资源综合利用

制好培养温度、时间以及营养物质的供给^[4~5], 保证微生物得以充分繁殖发育、分泌各种酶类, 制曲过程中所采用微生物种类、特性及如何调控其酶系的合成, 对提高原料的利用率及最终产品风味起到决定性作用^[6]。

米曲霉是一类产复合酶的菌株, 除产蛋白酶外, 还可产糖化酶、纤维素酶、植酸酶、淀粉酶等。它是多种传统发酵食品的优良菌株, 具有安全性高, 生长优势明显, 酶系丰富, 是蛋白原料制曲生产调味品的重要功能性微生物。米曲霉酶系的合成会同时受到两个因素的调控: 酶诱导物和酶蛋白质前体物质, 酶诱导物一般为可利用的碳源, 而酶蛋白质的前体主要为氮源, 其类型和性质同样会影响酶的合成和分泌。目前, 对于米曲霉固态发酵制曲过程中营养底物的利用

和酶活关系的研究报告较少。因此本文通过对三羧酸循环中微生物代谢产物的监测,观察发酵过程中各营养底物及中间代谢产物的变化的趋势,从而探究阐述珍珠贝肉制曲过程中米曲霉利用碳源和氮源的规律与蛋白酶活力之间关系,以期科学地优化采用米曲霉制曲过程的营养的供给,有效地提高成曲的酶活,为珍珠贝肉的高效酶解与综合利用提供理论和方法的指导。

1 材料与设备

1.1 材料与试剂

马氏珍珠贝肉,面粉市售;曲精(沪酿 3.042):孢子发芽率 $\geq 80\%$,孢子数 ≥ 300 亿/克干基,水分 $\leq 10\%$;酶制剂购于诺维信公司;丙酮酸、柠檬酸、苹果酸等7种有机酸和18种氨基酸均为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器与设备

KDN-2C 型定氮仪,上海纤检仪器有限公司;GL-21M 高速冷冻离心机,长沙湘仪离心机仪器有限公司;ZJP-A1230 霉菌培养箱,上海智城分析仪器制造有限公司;THZ-82A 恒温振荡器,常州澳华仪器有限公司;UV-2100 型分光光度计,Unico(上海)仪器有限公司;DFT-200 手提式高速万能粉碎机,温岭市林大机械有限公司;LDZX-30KBS 立式压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂;Waters 600 型高效液相色谱仪,美国 Waters 公司

1.3 试验方法

1.3.1 成曲制备

称取 1500 g 新鲜珍珠贝肉匀浆,121 °C 蒸煮 10 min,冷却至室温,分装,添加面粉 25% (m/m) 混匀后接入 0.5% (以混料后总物质重量计) 曲精制曲,在培养箱中恒温(30 °C)培养,16 h 翻曲以防止品温过高,20 h 将培养箱温度降至 28 °C,分别在 0 h、12 h、19 h、24 h、36 h、40 h、42 h、44 h、46 h、48 h 取样,粉碎,置冰箱 4 °C 保藏待测。

1.3.2 添加外源性酶剂制曲

如上述操作各取 100 g 蒸煮后珍珠贝肉,添加 33 g 面粉,分别添加普鲁兰酶 30 U,胰蛋白酶 500 U,胃蛋白酶 1000 U (总添加量),其余操作均如上,于 44 h 取样,粉碎,置冰箱 4 °C 保藏待测。

1.3.3 有机酸测定

高效液相色谱法。

称取样品 10 g,添加 10 g 去离子水,充分震荡混匀,离心(8000 r/min \times 20 min),取上清液稀释 10 倍,过 0.22 μ m 滤膜。色谱柱:Spherisorb C18, ID 4 \times 250 mm, 5 μ m, 预柱:C18, ID 4 \times 30 mm, 柱温:30 °C;流动相:0.025 mM (NH₄)₂HPO₄-H₃PO₄ 缓冲液(pH 2.5),使用前用 0.45 μ m 滤膜抽滤,流速:1 mL/min,进样量:20 μ L;紫外检测波长:214 nm。

1.3.4 理化指标的检测方法

水分测定按照 GB/T 5009.3-2003 规定检测;总氮测定采用凯氏定氮法,按照 GB/T 5009.5-2003 规定检测;氨基酸态氮、挥发性盐基氮的测定均按照 GB/T 5009.44-2003 规定检测;总糖、可溶性糖测定采用苯酚硫酸法、按照 GB/T 15672-2009 规定检测;还原糖测定采用 DNS 法。

蛋白酶活力采用福林法(SB/T 10317-1999)测定。 α -淀粉酶按照 GB/T 24401-2009 规定检测。糖化酶按照 QBT 1803-1993 规定检测。

1.4 数据处理

文中试验重复三次,采用 SPSS 13.0 和 Excel 2007 进行数据统计分析。

2 结果与分析

2.1 制曲过程中整体质量变化规律

表 1 制曲过程中珍珠贝大曲物料基本理化指标变化规律

时间/h	总量/g	水分/%	温度/°C	干物质/g
0	100.1 \pm 1.00 ^a	56.11 \pm 2.31 ^a	30.0 \pm 0.0 ^a	43.91
12	92.57 \pm 1.86 ^b	54.05 \pm 1.99 ^{ab}	34.3 \pm 0.7 ^b	42.54
19	85.06 \pm 1.54 ^c	53.12 \pm 1.03 ^b	38.6 \pm 1.2 ^c	39.87
24	78.36 \pm 1.28 ^d	50.47 \pm 1.41 ^c	36.3 \pm 0.8 ^d	38.81
36	64.80 \pm 1.63 ^e	44.14 \pm 1.32 ^d	34.9 \pm 1.1 ^b	36.84
40	53.18 \pm 2.41 ^f	32.90 \pm 1.23 ^e	31.4 \pm 2.1 ^e	35.68
42	50.04 \pm 3.10 ^f	28.33 \pm 1.90 ^f	28.6 \pm 1.0 ^f	35.86
44	52.74 \pm 1.35 ^f	30.85 \pm 2.02 ^e	27.4 \pm 0.9 ^e	36.47
46	51.75 \pm 1.40 ^f	31.83 \pm 2.25 ^e	27.5 \pm 1.2 ^{de}	35.28
48	49.08 \pm 2.00 ^f	26.31 \pm 2.11 ^f	26.9 \pm 1.6 ^e	36.16

注:不同字母代表在不同的制曲时间下,曲的总量、水分、温度、干物质含量具有显著性差异(P<0.05)。

从表 1 可知,马氏珍珠贝肉制曲过程中,大曲质量和水分含量均呈现下降趋势,0~40 h 大曲质量与水分均呈快速下降的趋势,40 h 后大曲质量无显著性变化,制曲结束后大曲质量为初始质量的 49.05~52.71%。

大曲质量减少主要由水分散失引起，总质量和水分含量的变化具高相关性（皮尔逊相关系数 $P=0.9574$ ），而干物质损失质量仅占大曲总质量损失的 15.22~19.48%。

大曲中水分主要以游离水的形式存在，对微生物的生长不仅能够起到运输介质的作用，还参与了微生物的繁殖和代谢作用。同时水分蒸发带走部分热量，有利于曲温的保持以及蛋白酶的分泌，其中曲料温度的上升期（0~19 h）和高温期（19~40 h）水分散失速度快。此后由于微生物的生长代谢和繁殖速度下降，曲温变化幅度减小，其水分含量减少幅度趋于平缓，出曲时水分含量由初始值 56.14% 下降至 26.31%。

2.2 制曲过程中碳源营养物质的变化趋势

曲料中干物质的减少主要由于微生物利用糖等碳源物质代谢消耗，总糖质量变化趋势与大曲总质量变化趋势之间的皮尔逊相关指数 $P=0.9760$ 。面粉作为曲料中主要碳源，其碳水化合物含量为 65~70%，主要是淀粉、少量游离糖（1~2%）和戊聚糖（2~3%）等。在制曲过程中，一方面米曲霉分泌大量的淀粉酶^[7]，将淀粉分解生成葡萄糖、麦芽糖和糊精等，导致大曲中可溶性糖和还原糖总量上升；另一方面，米曲霉在生长繁殖过程中对还原糖和可溶性糖吸收利用，导致大曲中还原糖和可溶性糖总量下降。因此，整个制曲过程中，还原糖和可溶性糖处于产生和消耗的动态平衡中。

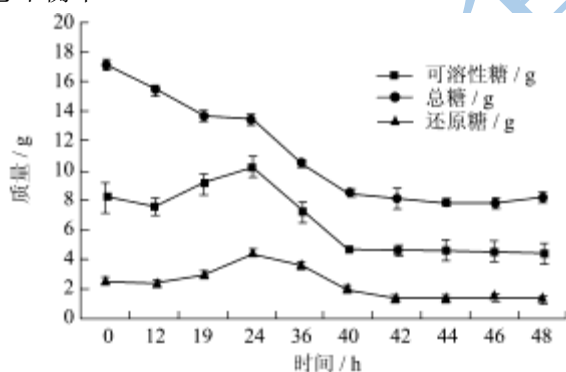


图1 制曲过程中糖类化合物变化趋势

Fig.1 The weight changes of various carbohydrate compounds during koji fermentation

由图1所示，还原糖、可溶性糖总量均于0~12 h缓慢下降，12~24 h时稳定上升，24~40 h再下降，40 h以后变化趋于平缓。0~12 h处于孢子萌发期，米曲霉基本不分泌淀粉酶，米曲霉直接利用曲料中已有的少量还原糖进行代谢，随米曲霉进入菌丝生长期，开始分泌 α -淀粉酶和糖化酶，分解淀粉产生还原糖和可溶性多糖；进入菌丝繁殖期，还原糖作为米曲霉的直

接能源物质被大量吸收利用；在整个制曲过程中还原糖处于产生和消耗的动态平衡，故实际上产生的还原糖总量高于测量值。最后孢子着生期，增殖和代谢速率变缓，能源消耗速度变缓，还原糖下降趋势也逐渐变缓。

2.3 制曲过程中有机酸含量的变化趋势

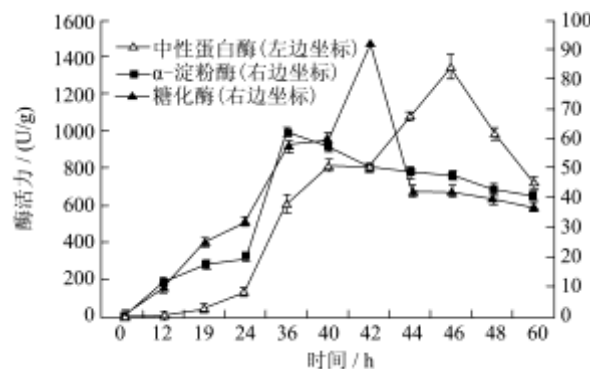


图2 制曲过程中各酶活力的变化规律

Fig.2 Results of enzymes activities during koji fermentation

有机酸的形成为来源于微生物的三羧酸循环与有机酸代谢，蛋白质、脂肪以及淀粉降解进入三羧酸循环而生成各种酸类物质。由图2可知，在制曲中期代谢旺盛，出现了生酸高峰。在0~19 h米曲霉利用碳源进行糖酵解，部分有机酸（丙酮酸、乳酸）大量积累；在24~36 h期间，菌丝处于生长繁殖期，需要大量的能量，糖主要通过呼吸作用降解生成 CO_2 和 H_2O ，有机酸的生成和消耗达到平衡，总量无明显变化；40 h后有机酸变化呈平缓下降趋势。

有机酸的最高值出现顺序依次为：丙酮酸（19 h）、乳酸（19 h）、柠檬酸（24 h）、 α -酮戊二酸（36 h）、琥珀酸（44 h）与其糖降解顺序相同。丙酮酸作为糖降解初始底物和TCA循环的前体物质，在孢子发芽期呈上升趋势，在米曲霉进入快速生长、繁殖阶段，其消耗量大于生成量，呈下降的趋势，此时还原糖被快速消耗。丙酮酸、乳酸在制曲前期大量积累，主要由于此期间米曲霉处于孢子发芽、菌丝生长初期，曲料粘度较大，透气性较差，氧气供给不足，缺氧的细胞必须用糖酵解产生的ATP分子暂时满足对能量的需要，由此初步判断在制曲前期，糖的消耗途径主要通过糖酵解；同时此时曲料供氧不足，故必须在16~20 h对曲料进行翻曲，以提高曲料透气性。

柠檬酸是柠檬酸循环式前体物质，由草酰乙酸与乙酰-CoA形成，是丙酮酸氧化所经历的途径，也是脂肪酸、氨基酸等各种燃料分子氧化分解所经历的共同途径^[8]。24 h后，柠檬酸消耗速率快于生成速率，表明米曲霉的进入菌丝体生长期后，糖代谢主要进入柠

柠檬酸循环。柠檬酸经过三步异构化成为异柠檬酸，异柠檬酸的转变途径有两条：当需要能量时，即进行氧化脱羧形成 α -酮戊二酸，再氧化脱羧形成琥珀酸；当能量贮备充裕时，异柠檬酸裂解为琥珀酸和乙醛酸。24~36 h 期间，曲霉的生长繁殖需要大量能量，柠檬酸的消耗主要生成 α -酮戊二酸，而进入孢子着生期，能量贮备充足，此时 α -酮戊二酸逐渐下降，而琥珀酸变化呈上升趋势，在44 h 达到最高值。

制曲过程中，乙酸产生主要有两个原因，其一供氧能力不足使得呼吸受到限制；其二葡萄糖的摄入速率大于 TCA 循环的周转能力，通过磷酸转乙酰酶/乙酸激酶(Pta-Ack)途径，导致底物通过乙酰磷酸途径转化为乙酸^[9]。在0~19 h 乙酸含量快速上升，可进一步说明，此时供氧不足，因此发酵前期翻曲，提高氧气供给量，有利于后期曲霉的生长，此时翻曲是非常必要的。24~36 h 乙酸含量继续上升，此时由于 α -淀粉酶和糖化酶作用，还原糖含量上升，葡萄糖摄入量快速上升，与研究结果（图1）相符。

2.4 制曲过程中氮源营养物质含量的变化趋势

由表2可知，总氮质量略有下降，挥发性盐基氮呈上升趋势，在46 h 时达到总氮含量的3.73%，氨基酸态氮于24~36 h 达到最高值，24 h 氮氮占总氮含量的25.05%。总氮基本不被作为能源物质利用，在发酵

的过程中，总氮会被酶降解，部分降解成氨基酸和小分子的肽段，这会作为各种酶类的合成前体；在碳源不足的情况下，氨基酸作为能源物质被曲霉吸收利用，如丙氨酸脱氨生成丙酮酸，谷氨酸脱氨生成 α -酮戊二酸、天冬氨酸脱氨生成草酰乙酸^[8]。19~36 h 期间，曲料的挥发性盐基氮含量呈快速上升趋势，主要是由于微生物氨基酸脱氨形成，因此在制曲过程中，尤其是菌丝体生长、繁殖期阶段，适当提高曲料中小分子糖的含量，有利于降低微生物的脱氨作用，降低成曲中挥发性盐基氮，提高成曲质量。

表2 7种主要有机酸生成与降解规律

Table 2 Evolution of the seven organic acids during koji fermentation

时间/h	7种主要有机酸生成与降解规律/(mg/g)						
	乳酸	柠檬酸	丙酮酸	乙酸	苹果酸	琥珀酸	α -酮戊二酸
0	1.20	0.11	0.01	3.00	0.10	0.10	0.10
17	2.50	0.10	0.05	4.00	0.50	0.20	0.30
20	3.70	0.37	0.13	5.00	0.60	2.40	0.40
22	2.60	0.44	0.12	7.00	1.00	1.20	0.50
38	2.60	0.26	0.10	10.00	1.00	2.40	1.00
40	1.20	0.25	0.08	5.00	0.50	3.60	0.40
42	1.20	0.24	0.07	5.00	0.50	3.70	0.40
44	1.10	0.25	0.06	4.00	0.50	3.33	0.30

表3 制曲过程中含氮化合物质量变化趋势 (mg)

Table 3 Evolution of nitrogen compounds during koji fermentation

	0 h	19 h	24 h	36 h	42 h	46 h
总氮	2556±16 ^a	2539±28 ^a	2443±12 ^b	2419±24 ^b	2437±15 ^b	2457±29 ^b
盐基氮	35.75±1.19 ^a	44.68±0.94 ^b	69.38±4.75 ^c	88.50±2.75 ^d	83.31±1.63 ^e	91.75±3.56 ^d
氨基氮	71.94±5.56 ^a	358.8±22.8 ^b	611.9±26.6 ^c	511.4±8.3 ^d	224.3±0.9 ^e	322.4±21.4 ^b

注：不同字母代表在不同的制曲时间下，总氮、盐基氮、氨基氮具有显著性差异 (P<0.05)。

2.5 制曲过程中酶活变化

米曲霉分泌的淀粉酶主要有液化酶(α -淀粉酶)与糖化酶(葡萄糖苷酶)，蛋白酶主要有酸性、中性、碱性蛋白酶。中性蛋白酶、 α -淀粉酶和糖化酶的酶活随时间的变化曲线如图3。

米曲霉的生长分成孢子发芽期、菌丝生长期、菌丝繁殖期、孢子着生期^[10]四个阶段。在孢子发芽期(0~12 h)时，此时米曲霉基本不分泌蛋白酶，而是分泌少量的淀粉酶；在培养12~24 h，米曲霉生长处于菌丝生长期，曲料的状态是：发白、结块，此时蛋白酶的活力较低，但是淀粉酶的活力则是不断地升高。在

培养的24 h之后，是菌丝繁殖期，淀粉酶和蛋白酶的活力均迅速升高， α -淀粉酶，在培养的36 h时达到最高，为61.79 U/g，曲料的颜色变化是由淡黄色逐渐变成嫩黄绿色。将曲料继续培养，米曲霉进入生长的后期，此时，米曲霉是处于过生长的阶段，其蛋白酶的活力降低。

如图3所示，在培养46 h时，中性蛋白酶活力达到最大值为1332 U/g，相比其它的培养时间段，中性蛋白酶活力显著提高。因为中性蛋白酶的活力对后期酶解的水解度影响最大，因此46 h为最佳的培养时间。

蛋白酶的分泌较氨基酸的利用滞后（表2），在36~42 h氨基酸处于消耗的高峰期，而蛋白酶在44~46 h

期间达到最高值.糖作为能源物质,其消耗速度直接影响酶系分泌,总糖与 α -淀粉酶、糖化酶、中性蛋白酶的皮尔逊指数P依次为:-0.919、-0.815、-0.943呈显著负相关性($P<0.05$),主要由于微生物将淀粉降解成葡萄糖等小分子物质,为蛋白酶合成提供能量。

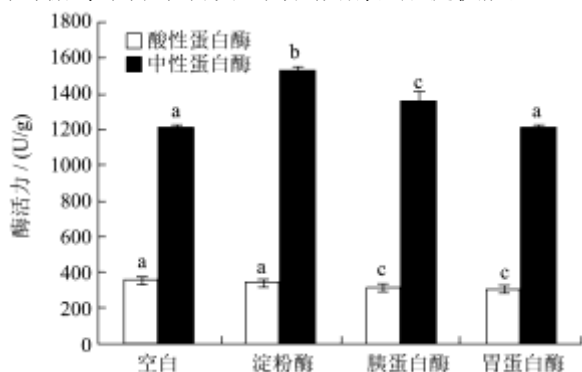


图3 外源性酶对成曲蛋白酶活力的影响

Fig.3 The effect of different enzymes on koji proteases activity

注:不同字母代表添加不同的外源性酶,成曲的蛋白酶活力具有显著性差异($P<0.05$)。

2.6 外源性酶对成曲蛋白酶活力的影响

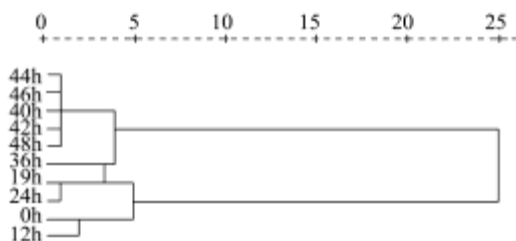


图4 不同阶段物质变化聚类分析

Fig.4 Cluster analysis about the material consumption during koji fermentation

入室培养前加入各种外源性酶系与曲料充分混合,观察成曲的中性蛋白酶变化规律,如图4所示,发现添加了淀粉酶的样品组中性蛋白酶较空白组提高了26.81%,而添加外源性蛋白酶对成曲蛋白酶活提高不显著。淀粉酶将淀粉降解为葡萄糖和麦芽糖等易吸收碳源,可为米曲霉生长提供能量物质并诱导米曲霉分泌酶系,进一步验证固体发酵制曲前期提高曲料中淀粉酶活力,增加底物中有效碳源含量,有利于蛋白酶活力的提高。

2.7 聚类分析

利用上述碳源、氮源、酶活变化规律,组成聚类分析的样本矩阵,按照类平均法对不同时间段变化情况聚类分析,并画出聚类图,如图4所示,这样根据理化指标变化规律把发酵过程的10个不同阶段分为4类,与曲霉生长周期的四个阶段相符,表明能量的消

耗利用与米曲霉生长状态密切相关。其中0h、12h为一类,19h、24h为一类,36h单独为一类,40h至48h为一类,这4类均有各自特点,0~12h米曲霉处于孢子发芽期,主要消耗曲料中原有小分子物质,当12h后部分淀粉酶开始分泌,曲料中大分子物质进入降解、积累阶段;24h后物质消耗进入快速增长期,此区间小分子物质和代谢中间产物的生产与消耗达到动态平衡;36h是各代谢中间产物处于高值,此后进入酶系分泌高峰期,米曲霉进入后生长期,表明制曲可终止。

3 结论

3.1 根据对各营养物质变化进行聚类分析,马氏珍珠贝肉成曲发酵过程可分为四个主要阶段,即曲霉生长周期的四个阶段,表明能量的消耗利用与米曲霉生长状态密切相关,24h是物质变化的关键点。总质量的减少主要由水分散失引起,而干物质损失质量主要与糖类营养物质的消耗有关。

3.2 总糖含量与 α -淀粉酶、糖化酶、中性蛋白酶活力呈显著负相关性,前期提高淀粉酶活力,有利于蛋白酶活力的提高,提高成曲质量。有机酸的最高值顺序与糖降解顺序相同,制曲前期,糖的消耗途径主要通过糖酵解,此时曲料湿度大,透气性差,抑制糖代谢,故在米曲霉发芽后期对曲料翻曲非常必要。米曲霉进入菌丝体生长期后,糖代谢主要进入柠檬酸循环,24~36h期间,米曲霉的生长繁殖需要大量能量,而36h后米曲霉进入孢子着生期,能量贮备充足,此时可减少单糖的供给。

参考文献

- [1] Singhania R, Patel A, Soccol C, et al. Recent advances in solid-state fermentation [J]. Biochemical Engineering Journal, 2009, 44(1): 13-18
- [2] Graminha E, Gonçalves A, Pirota R, et al. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition [J]. Animal Feed Science and Technology, 2008, 144(1-2): 1-22
- [3] Holker U, Hofer M, Lenz J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi [J]. Microbiology and Biotechnology, 2004, 64(2): 175-186
- [4] Vishwanatha K, Rao A, Singh S. Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: optimization of process parameters [J]. Journal of industrial microbiology, 2010, 2(2): 245-248
- [5] Chutmanop J, Chuichulcherm S, Chisti Y, et al. Protease

- production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates [J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2008, 83(7): 1012-1018
- [6] 纪凤娣,鲁绯,袁园等.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 F D, Lu F, Yuan Y, et al. Distribution of microorganisms and changes of protease during koji-making with different technology [J]. *China Brewing*, 2010, 5: 52-55
- [7] Brijwani K, Oberoi H S. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran [J]. *Process Biochemistry*, 2010, 45(1): 120-128
- [8] 王镜岩.生物化学(第三版下册)[M].北京:高等教育出版社,2002
Wang J Y. *Biochemistry (3rd Edition)* [M]. Beijing: Higher Education Press, 2002
- [9] Kuit W, Minton N, López-Contreras A, et al. Disruption of the acetate kinase (ack) gene of *Clostridium acetobutylicum* results in delayed acetate production [J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2012, 94(3): 729-741
- [10] 杨兰.高盐稀态酱油发酵过程工艺优化及作用机理的研究[D].广州:华南理工大学(轻工与食品学院)博士学位论文, 2010
Yang L. The Study on the Optimization and Mechanism during High-salt Soy Sauce Fermentation with Liquid State [D]. Guangzhou: South China University of Technology (College of light industry and Food) Doctor's thesis, 2010