

广式酱油中微生物蛋白组学分析样本的制备

陈聪^{1,2,3}, 李俊³, 温林凤², 徐婷³, 张慧婷², 钟梦丽², 林银山², 曹庸^{2*}, 符姜燕^{3*}, 刘占^{3*}

(1. 中炬高新技术实业(集团)股份有限公司, 广东中山 528400)

(2. 华南农业大学食品学院, 广东省功能食品活性物重点实验室, 广东省天然活性物工程技术研究中心, 广东广州 510642) (3. 广东美味鲜调味食品有限公司, 广东中山 528400)

摘要: 广式酱油发酵周期长、微生物种群多样、代谢物复杂, 缺乏微生物蛋白组学分析的样本制备方法。该研究通过比较改良的 TCA 浓缩法和超滤法两种蛋白纯化方法, 利用 SDS-PAGE 凝胶电泳和 LTQ Orbitrap Velos Pro ETD 质谱检测酱油微生物宏蛋白组样本制备效果。实验结果表明: TCA 浓缩法制备的蛋白样品, 其 SDS-PAGE 凝胶图谱有 26 个清晰条带, 比超滤法多 13 个; 两种法所制备的蛋白经胰蛋白酶酶切后的质谱图可分别鉴定到的 2 495 和 1 682 个肽段, 说明 TCA 浓缩法制备的蛋白样品酶切更充分; 不同发酵时期(0、60、120 d)的酱油经 TCA 浓缩法制备的蛋白样品, 烷基化、酶切后, 通过 LTQ Orbitrap Velos Pro ETD 质谱检测和 Proteome Discoverer 2.5 软件分析, 可分别鉴定到 1 035、1 104、1 046 种蛋白质。通过 TCA 浓缩法制备蛋白组分析样本, 操作简便, 实验速度快, 蛋白质鉴定率高, 适用于广式酱油微生物的蛋白质组学的检测分析, 为利用蛋白组学分析广式酱油的微生物发酵分子机制打下了一定的基础。

关键词: 广式酱油; 微生物; 宏蛋白组; 蛋白制备方法

文章编号: 1673-9078(2023)01-69-74

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.1.0287

Sample Preparation for Microbial Proteomics Analysis of Cantonese Soy Sauce

CHEN Cong^{1,2,3}, LI Jun³, WEN Linfeng², XU Ting³, ZHANG Huiting², ZHONG Mengli², LIN Yinshan², CAO Yong^{2*}, FU Jiangyan^{3*}, LIU Zhan^{3*}

(1. Jonjee Hi-Tech Industrial & Commercial Holding Co. Ltd., Zhongshan 528400, China) (2. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Nutraceuticals and Functional Foods, Guangdong Natural Active Object Engineering Technology Research Center, Guangzhou 510642, China) (3. Guangdong Meiweixian Flavoring Foods Co. Ltd., Zhongshan 528400, China)

Abstract: The long fermentation period, diverse microbial populations, and complex metabolites of Cantonese soy sauce have prevented the development of a standardized sample preparation method for microbial proteomics analysis. In the present study, two modified protein purification methods were compared, namely trichloroacetic acid (TCA) precipitation and ultrafiltration. Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and LTQ Orbitrap Velos Pro ETD mass spectrometry were used to determine the efficacy of the two sample preparation methods for metaproteomics analysis of soy sauce microbes. Twenty-six distinct bands were observed in the SDS-PAGE patterns of protein samples prepared by TCA precipitation, and 13 were observed in samples prepared by ultrafiltration. 2 495 and 1 682 respective peptides

引文格式:

陈聪, 李俊, 温林凤, 等. 广式酱油中微生物蛋白组学分析样本的制备[J]. 现代食品科技, 2023, 39(1): 69-74

CHEN Cong, LI Jun, WEN Linfeng, et al. Sample preparation for microbial proteomics analysis of cantonese soy sauce [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(1): 69-74

收稿日期: 2022-03-15

基金项目: 中山市科学技术局项目 (CXTD2020006)

作者简介: 陈聪 (1983-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 天然活性物的活性及分子机理研究, E-mail: parker_cc@163.com

通讯作者: 曹庸 (1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然活性物的分离纯化鉴定及活性研究, E-mail: caoyong2181@scau.edu.cn; 共同通讯作者: 符姜燕 (1984-), 女, 正高级工程师, 研究方向: 食品开发与发酵技术, E-mail: fujiangyan123@163.com; 刘占 (1982-), 女, 正高级工程师, 研究方向: 食品生物发酵, E-mail: 191103455@qq.com

were identified from the mass spectra obtained after trypsin digestion of protein samples prepared by the two methods, indicating that protein samples prepared by TCA precipitation were digested to a greater extent. Protein samples were prepared from soy sauce at different fermentation stages (0, 60, and 120 days) using the TCA precipitation method. After alkylation and enzyme digestion, these samples were subjected to protein analysis using LTQ Orbitrap Velos Pro ETD mass spectrometry and Proteome Discoverer 2.5 software, from which 1 035, 1 104, and 1 046 proteins were respectively identified. These results indicate that the preparation of samples for proteomics analysis by TCA precipitation provides the advantages of simple operation, rapid experimentation, and a high protein identification rate. It is thus suitable for use in proteomics testing and analysis of microbes in Cantonese soy sauce. The results of this study provide a scientific basis for proteomics analysis of the molecular mechanisms of microbial fermentation in Cantonese soy sauce.

Key words: Cantonese soy sauce; microbes; metaproteome; protein preparation method

广式酱油属于高盐稀态酱油,是中国传统酿造酱油的一个重要流派,形成于以广东为主的华南地区^[1]。该类酱油以全大豆和面粉为主要原料,经3个月以上的日晒夜露天然酿造而成。酱油发酵经过多种微生物共同作用形成了其独特的香味,每种微生物在酱油酿造过程中不同时段的具体作用很难确切描述,尤其是采用常温高盐稀态发酵工艺,周期长,受自然环境影响较大,使得微生物之间的相互作用更加复杂。在酱油发酵过程中,微生物的种群结构及相互作用对酱油色、香、味和体态的形成及品质起到了关键的作用^[2,3]。

运用宏基因组、宏转录和组宏蛋白组等分子生物技术,可对环境中89%~99%不可培养或未培养微生物的检测^[4]。宏蛋白质组学是研究特定环境下各种微生物蛋白质种类和差异表达情况的重要技术方法^[5],使得人们可以更系统深入地研究发酵食品微生物群落结构及其功能。Xie等^[6]采用宏组学方法研究了传统大酱与商业大酱微生物分类学、功能特征和代谢模式的差异,强调了传统发酵大酱的食品安全风险。为了揭示微生物的耐盐机制,Li等^[7]从日本豆酱中筛选出菌株*Lb.plantarum* FS5-5,使用GO(Gene Ontology)和KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)对差异分泌蛋白进行功能分析,揭示了微生物耐盐回应性的分子机制。Zheng等^[8]利用宏蛋白质组学方法,比较了中国30~300年浓香型白酒的窖泥中微生物蛋白质的差异表达情况,证实产甲烷细菌,如梭菌和甲烷细菌,与一些风味物质如丁酸、己酸和乙酸的生成高度相关,从而生产优质白酒。

蛋白质组学样本的制备是宏蛋白质组学实验的关键步骤,适宜的蛋白样本制备技术可以获得更为丰富和客观的宏蛋白质组学信息^[9]。从发酵食品提取蛋白质存在一定的挑战,这是因为发酵食品中含有多种微生物,它们具有不同的细胞壁结构和不同水平的细胞裂解抗性^[10];同时,复杂的发酵环境也在不同程度上对蛋白质的提取造成影响,比如酱油的高盐环境^[11],食醋中的高酸性环境^[12],发酵谷物中的高酒精环境^[13]。发酵食

品中没有统一的蛋白质提取方法,目前主要针对高盐稀态酱油的优势菌米曲霉菌的蛋白质组学研究较多,鲜有高盐稀态酱油微生物宏蛋白质组学的研究^[14,15]。本研究通过比较不同的酱油微生物蛋白提取和纯化方法,探索一种适用于广式酱油发酵过程中微生物蛋白质组学研究的样本制备方法,以进一步揭开广式酱油微生物群落的神秘面纱。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料与试剂

酱油,广东美味鲜调味食品有限公司;细菌蛋白提取试剂盒,贝博公司;TCA蛋白浓缩试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司;BCA试剂盒,美国Thermo公司;乙醇、乙腈、甲酸(质谱纯),美国J.T.Baker公司。

1.2 实验设备

LTQ Orbitrap Velos Pro ETD 质谱仪、分析柱: C18 分析柱(50 μm×2 μm×15 cm),美国Thermo公司; Waters 2695 色谱仪,美国Waters公司;多功能酶标仪,美国珀金埃尔默仪器有限公司; LC-10 A 高效液相色谱仪,日本岛津公司。

1.3 实验方法

1.3.1 酱油样品蛋白的提取

取高盐稀态酱油发酵周期的酱醪50 g,水黄50 mL,充分混匀,纱布过滤,取滤液,3 000×g,4 °C,离心5 min,弃上清,得到菌沉淀,并用无菌水清洗2次。

根据贝博公司的细菌提取试剂盒方法改良,加入等体积蛋白提取液,珠磨机-20 °C研磨3 min,每研磨30 s,间隔20 s。冰上放置1 h,每间隔10 min混匀1次。冰上超声5 min,20 000×g,4 °C,离心15 min,将上清转移至预冷的新的1 mL离心管,得到酱油样品的蛋白提取液。

1.3.2 酱油样品蛋白的纯化

方法一：TCA 浓缩除杂，根据 TCA 蛋白浓缩试剂盒法改良，取 200 μg 酱油样品蛋白提取液，加入 1/4 体积沉淀剂 A，混匀，冰上静置 1 h，14 000 r/min，4 $^{\circ}\text{C}$ ，离心 10 min，弃上清，加入 600 μL 洗涤液 B，混匀，冰上静置 10 min，14 000 r/min，4 $^{\circ}\text{C}$ ，离心 10 min，弃上清，重复洗涤 1 次，用蛋白提取液溶解沉淀。

方法二：超滤管除杂，取 200 μg 酱油样品蛋白提取液转移至超滤管（10 ku），加 $\varphi=50\%$ 乙醇 500 μL ，12 000 r/min，4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min，弃滤液，重复清洗三次，用蛋白提取液溶解截流于滤膜的蛋白，转移至新的离心管。

1.3.3 酱油样品蛋白的定量

采用 BCA 法^[16]，测定蛋白含量。标准曲线见图 1。

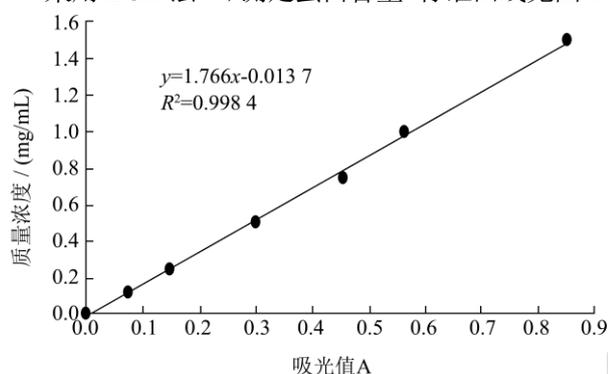


图 1 BCA 蛋白质浓度标准曲线

Fig.1 BCA protein concentration standard curve

1.3.4 SDS-PAGE 凝胶电泳

取 20 μg 蛋白样品与 5 μL 缓冲液（0.2 mol/L Tris-HCl， $m=2\%$ SDS， $\varphi=10\%$ 甘油， $m=0.02\%$ 溴酚蓝）混合，在 SDS-PAGE 凝胶（ $m=12.5\%$ 分离胶， $m=4\%$ 浓缩胶）中垂直电泳（浓缩胶 15 mA 恒定电流，分离胶 60 mA 恒定电流），然后用考马斯蓝染色 G-250 对 SDS-PAGE 凝胶进行染色。

1.3.5 烷基化和酶切

取 100 μg 蛋白样品加入超滤管中，加入终浓度为 50 mmol/L 的 DTT，60 $^{\circ}\text{C}$ ，保温 40 min，冷却至室温，加入 50 mmol/L 的 IAM，避光反应 40 min，12 000 r/min，4 $^{\circ}\text{C}$ ，离心 10 min，弃滤液。

超滤管中加入 100 μL 25 mmol/L NH_4HCO_3 ，按蛋白:酶=1:50，加入胰蛋白酶，酶切 15 h。12 000 r/min，4 $^{\circ}\text{C}$ ，离心 10 min，取滤液，为制备好的多肽样品。

1.3.6 LTQ Orbitrap Velos Pro ETD 质谱检测

分离样品采用 LC-ESI-MS/MS 分析，使用 Waters 2695 nanoLC-LTQ Orbitrap Velos Pro ETD 系统进行分析。色谱梯度从 5% 逐步升高 40%，流动相 A 为 0.1% (V/V) FA；流动相 B 为 ACN。LTQ Orbitrap Velos Pro

ETD 质谱条件为：阳离子模式，ESI 电喷雾离子源，喷雾电压 2.0 kV，CID 碰撞模式，在 350~1 800 m/z 范围内扫描，采集时间为 120 min。

1.3.7 数据处理

LTQ Orbitrap Velos Pro ETD 所得原始质谱数据使用 Proteome Discoverer 2.5 软件进行蛋白肽段匹配和数据库搜索鉴定。搜库参数设置为：胰蛋白酶切，最多漏切位点数为 2，母离子质量偏差在 10^{-5} 以内，质量偏差为 0.6 u，FDR 假阳性率 <0.01 。

2 结果与分析

2.1 酱油发酵过程中微生物蛋白的提取

广式酱油发酵的原料为大豆，经蒸煮后面粉、曲霉混合制曲，并与盐水混合，自然发酵，发酵过程中酱醪与盐水会分层。将微生物与大豆、小麦等植物蛋白分离，在高盐和复杂发酵产物的环境下获得高质量的微生物蛋白，是进行酱油发酵过程微生物蛋白质组学分析的前提条件。本研究将发酵前期（0 d）、中期（60 d）和后期（120 d）的酱醪和盐水，混合均匀，分别取 25 g 酱醪与 25 mL 盐水混合成一个样品，另取 50 mL 盐水作为一个样品，经纱布过滤，滤液离心，所得沉淀在低温下经球磨机研磨后用细菌提取试剂盒提取，根据 BCA 法测定含量。本实验人工培养的大肠杆菌（OD 值 0.6），作为阳性对照，在相同条件下提取并测定其蛋白含量。

酱醪和盐水的混合物，其蛋白含量为 0.70 mg/100 g，是盐水中的蛋白（0.18 mg/100 g）的 388.89%，但是只有大肠杆菌的蛋白含量（1.24 mg/100 g）的 56.45%，如表 1 所示。说明酱醪中含有大量的微生物，可通过盐水和酱醪的混合搅拌，经纱布过滤，将大豆等杂质分离，获得比盐水中更多的微生物，同时，经纱布过滤、离心所得沉淀除了菌沉淀，还有酱油发酵过程中微生物代谢产生的各种杂质，从而影响其蛋白提取效率，且可能会带入其他杂质，所得蛋白初提物需要进行分离纯化。

表 1 BCA 蛋白含量测定结果

Table 1 BCA protein content determination results		
样品	取样量	蛋白含量/(mg/100 g)
酱醪+盐水	25 g+25 mL	0.70 \pm 0.22
盐水	50 mL	0.18 \pm 0.10
大肠杆菌	50 mL	1.24 \pm 0.14

2.2 蛋白纯化及检测

根据蛋白质的胶体性质和分子大小，分别用 TCA 浓缩法（方法一）和超滤管法（方法二）纯化酱油微生物蛋白初提液，并用 SDS-PAGE 凝胶电泳法检测其纯

度,结果如图2所示。利用 Image J 软件对凝胶图进行分析,发现采用 TCA 浓缩法可鉴定到 26 个条带,比超滤法鉴定到的 13 个蛋白条带更丰富、更清晰,在相同上样量的条件下,通过灰度值比较,两种方法的灰度值分别为 47 762.68 和 17 243.47,说明 TCA 浓缩法可得到更多更纯的蛋白。超滤法纯化虽然操作简便,但是纯化效果较差,其原因可能是因为在蛋白初提液中含有脂类、烷烃类等大分子^[17],无法通过超滤管的滤膜。

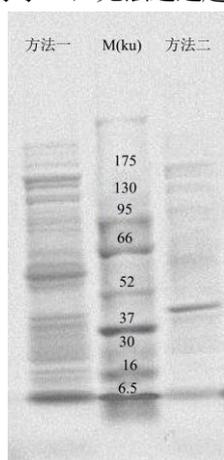


图2 不同纯化方法制备的酱油微生物蛋白 SDS-PAGE 凝胶图

Fig.2 SDS-PAGE gel diagram of soy microbial protein purified by different methods

2.3 酶切及 LTQ Orbitrap Velos Pro ETD 质谱检测

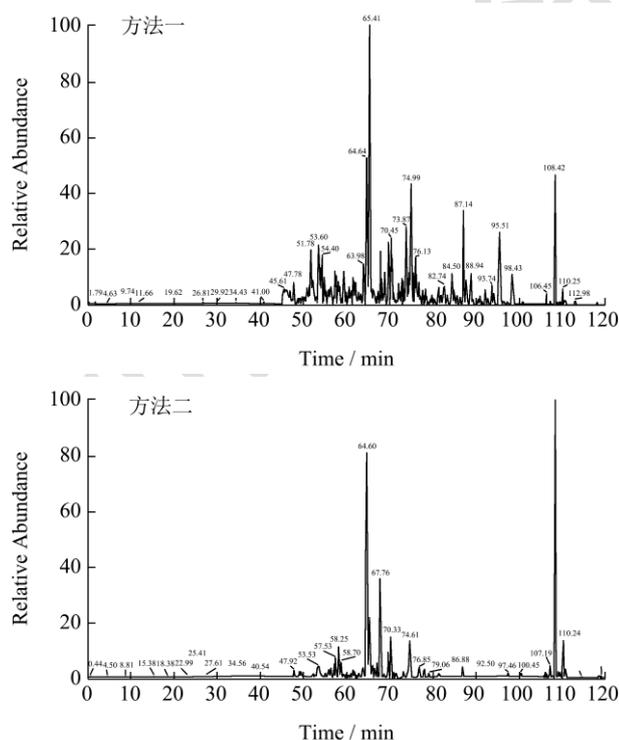


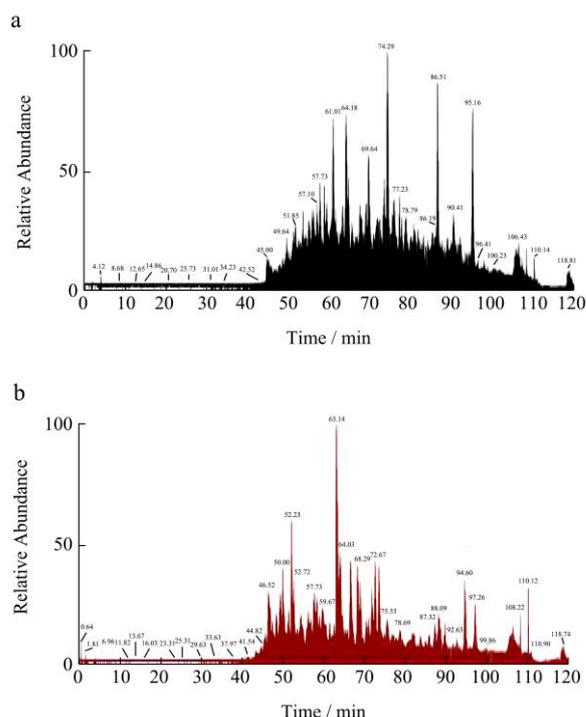
图3 不同纯化方法制备的酱油微生物多肽的一级质谱图

Fig.3 MS1 mass spectrometry of microbial peptides from soy sauce prepared by different purification methods

方法一和方法二纯化后的酱油微生物蛋白,经烷基化和胰蛋白酶酶切后,通过 LTQ Orbitrap Velos Pro ETD 质谱检测其酶切效果。TCA 浓缩法(方法一)和超滤法(方法二)所得蛋白酶切后,其 nanoLC-MS/MS 一级质谱图的峰强分别为 5.56×10^7 和 3.34×10^7 ,通过 Proteome Discoverer 2.5 软件分析可鉴定到的多肽数量分别是 2 495 和 1 682,说明 TCA 浓缩法所得蛋白酶切更充分,多肽强度和鉴定率更高,而超滤法虽然操作更简便,但是其纯化后的蛋白可能含有大豆降解及微生物发酵产生的酚类物质,对胰蛋白酶的活性有影响^[18],酶切后多肽强度和鉴定率较低,说明其蛋白未酶切充分,会减少 MS/MS 的多肽鉴定率,且其本身含有的大分子杂质可能会造成 nanoLC 分析柱的堵塞,进而提高了 MS/MS 质谱鉴定的成本。

2.4 不同发酵时间的酱油微生物多肽样品的 MS/MS 质谱分析及蛋白鉴定

选取酱油发酵前期(0 d)、中期(60 d)和后期(120 d)的样品经上述优化后的方法制备多肽样品,通过 Waters 2695 nanoLC 液相和 LTQ Orbitrap Velos Pro ETD 质谱仪联用,进行多肽质谱的鉴定,其总离子流图如图4所示,结果显示高盐稀态酱油在不同发酵时间的微生物经过上述优化方法所得多肽,其总离子流图均呈正态分布,信噪比高,图谱信息丰富。



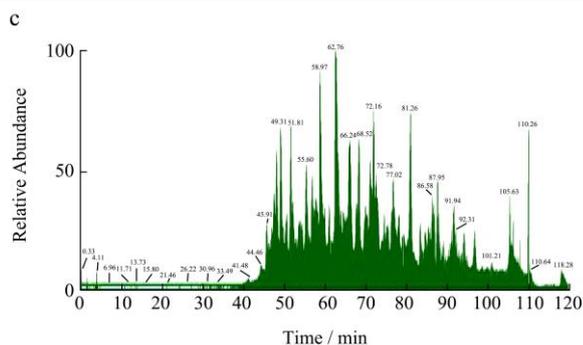


图 4 不同发酵时间的酱油微生物多肽样品的 MS/MS 总离子质谱图

Fig.4 MS/MS total ion mass spectrometry of soy sauce microbial peptides at different fermentation times

注: (a) 0 d, (b) 60 d, (c) 120 d.

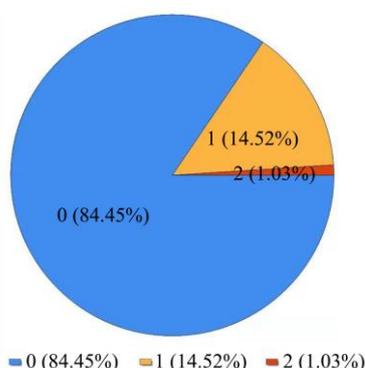


图 5 胰蛋白酶遗漏酶切位点数目统计

Fig. 5 Statistical analysis of no missed cleavage sites and missed cleavage sites in trypsin digestion

利用 Proteome Discoverer 2.5 鉴定到的质谱图通过 Proteome Discoverer 2.5 分析样品酶切效果(图 5), 发现 84.45%的肽段完全酶切, 仅有 15.55%的遗漏酶切位点(14.52%的单位点遗漏酶漏切和 1.03%的双位点遗漏酶漏切), 比李倩等^[19]报导的胰蛋白酶遗漏酶切位点的比例(约 27%)要低, 说明酶切充分, 样品制备质量好。

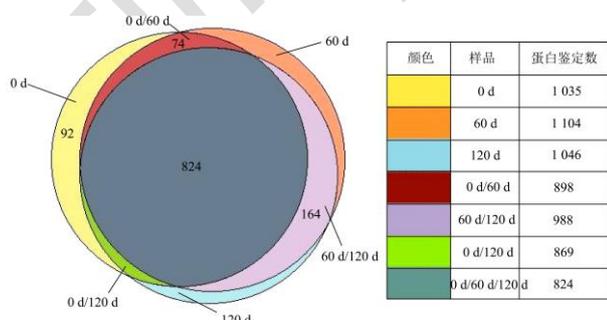


图 6 广式酱油不同发酵时间微生物蛋白质谱鉴定的韦恩图

Fig.6 Venn diagram of microbial protein spectrum identification of Cantonese soy sauce at different fermentation time

对所有质谱鉴定到图谱进行蛋白肽段匹配, 并和本批次的高盐稀态酱油宏基因组鉴定到前 15 种优势菌群数据库搜索, 共鉴定到不同酱油发酵时间的微生物蛋白数量分别为: 0 d, 1 035 种; 60 d, 1 104 种; 120 d, 1 046 种, 在三个时期鉴定到的共同蛋白为 824 种。说明该方法对不用发酵时期的酱油样品均可获得稳定且丰富的微生物蛋白鉴定数。与 SDS-PAGE 法相比较, 如 Zhang^[20]和乌日娜等^[21]采用 SDS-PAGE 分离纯化蛋白的方法分别鉴定到 441 个大酱蛋白和 232 个豆酱蛋白, 本研究采用 TCA 浓缩法制备的蛋白样品, 利用 nanoLC- LTQ Orbitrap Velos Pro ETD 质谱检测, 可鉴定到更多的蛋白。

3 结论

广式酱油发酵周期长, 微生物种群结构复杂, 通过对发酵过程中微生物蛋白组的研究, 可以深入地分析其组成、变化规律及对酱油风味物质的贡献与影响。在发酵酱油高盐和复杂代谢产物的环境下, 制备高质量的微生物蛋白, 是研究其微生物蛋白质组学规律的前提和关键。本研究从以下三个方面对广式酱油微生物蛋白组学分析的样品制备方法进行了优化: 第一, 通过等比例混合酱醪和盐水、纱布过滤的前处理方式, 洗脱原曲上的微生物, 去除大量大豆和小麦等原料蛋白。第二, 结合细菌提取试剂盒和 TCA 浓缩试剂盒, 提取纯化蛋白, 其 SDS-PAGE 凝胶图谱比使用超滤法纯化的蛋白, 条带更丰富, 蛋白纯度更高。第三, 利用超滤管的分子筛作用, 快速除盐除杂, 减少了酱油中的高盐和有机质对后续胰蛋白酶酶切效果的影响。使用上述方法, 制备广式酱油发酵早期(0 d)、中期(60 d)和晚期(120 d)的微生物蛋白样品, 经 LTQ Orbitrap 质谱检测, 分别鉴定到 1 035, 1 104 和 1 046 种蛋白, 验证了该方法的稳定性和适用广泛性。总之, 此方法操作简单, 实验速度快, 所鉴定到的微生物蛋白丰富, 为进一步从蛋白组学研究广式酱油发酵过程中微生物的功能本质及复杂的底物-微生物群系相互作用机制提供更丰富的生物信息, 同时也为研究其他发酵食品在复杂环境下的微生物蛋白质组学内容提供了一种样本制备方法的参考。

参考文献

[1] 包启安. 酱油科学与酿造技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2011

[2] Wah T T, Walaisri S, Assavanig A, et al. Co-culturing of *Pichia guilliermondii* enhanced volatile flavor compound formation by *Zygosaccharomyces rouxii* in the model system

- of Thai soy sauce fermentation [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 160(3):282-289
- [3] Song Y R, Jeong D Y, Baik S H. Monitoring of yeast communities and volatile flavor changes during traditional Korean soy sauce fermentation [J]. *Journal of Food Science*, 2015, 80(7-9): M2005-M2014
- [4] 聂志强,王敏,郑宇.3 种分子生物学技术在传统发酵食品微生物多样性研究中的应用[J]. *食品科学*,2012,33(23): 346-350
- [5] Siggins A, Gunnigle E, Abram F. Exploring mixed microbial community functioning: Recent advances in metaproteomics [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2012, 80: 265-280
- [6] Xie M, An F, Yue X, et al. Characterization and comparison of metaproteomes in traditional and commercial dajiang, a fermented soybean paste in northeast China [J]. *Food Chemistry*, 2019, 301(Dec.15): 125270.1-125270.12
- [7] Li M, Wang Q, Song X, et al. iTRAQ-based proteomic analysis of responses of *Lactobacillus plantarum* FS5-5 to salt tolerance [J]. *Annals of Microbiology*, 2019, 69(4): 377-394
- [8] Zheng Q, Lin B, Wang Y, et al. Proteomic and high-throughput analysis of protein expression and microbial diversity of microbes from 30- and 300-year pit mounds of Chinese Luzhou-flavor liquor [J]. *Food Research International*, 2015, 75(sep.): 305-314
- [9] Speda J, Johansson M A, Carlsson U, et al. Assessment of sample preparation methods for metaproteomics of extracellular proteins [J]. *Analytical Biochemistry*, 2017, 516: 23-36
- [10] Zhang X, Chen W, Ning Z, et al. Deep Metaproteomics Approach for the Study of Human Microbiomes [J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89: 9407-9415
- [11] Do-Won, Jeong, Sojeong et al. Effects of the predominant bacteria from meju and doenjang on the production of volatile compounds during soybean fermentation - Science Direct [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 262:8-13
- [12] Gullo M, Giudici P. Acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar: Phenotypic traits relevant for starter cultures selection [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 125(1): 46-53
- [13] Zheng J, Wu C, Huang J, et al. Spatial distribution of bacterial communities and related biochemical properties in Luzhou-flavor liquor - fermented grains [J]. *Journal of Food Science*, 2015, 79(12): M2491-M2498
- [14] 童佳.米曲霉发酵高盐稀态酱油过程中挥发性风味物质及蛋白酶表达规律研究[D].福州:福建师范大学,2018
- [15] 胡荣涛.米曲霉不同核型分生孢子的蛋白质组学研究[D].无锡:江南大学,2017
- [16] Smith P K, Krohn R I, Hermanson G T. Measurement of protein using bicinchoninic acid [J]. *Analytical Biochemistry*, 1985, 163(1): 76-85
- [17] 朱新贵,李学伟,曾小波.典型广式酱油与日式酱油的风味物质差异研究[J].*中国酿造*,2016,35(7):30-35
- [18] 周阳,袁长彬,龚志华,等.六大茶类抑制 α -淀粉酶和胰蛋白酶的效应比较[J].*湖南农业大学学报(自然科学版)*,2018, 44(1):51-55
- [19] 李倩,冯钰,谭敏佳,等.赖氨酸C端内切酶/胰蛋白酶顺序酶切在蛋白质组学样本制备中的评估[J].*分析化学*,2017, 45(3):316-321
- [20] Zhang P, Zhang P, Xie M, et al. Metaproteomics of microbiota in naturally fermented soybean paste, Da-jiang [J]. *Journal of Food Science*, 2018, 83(4-6): 1342-1349
- [21] 乌日娜,薛亚婷,张平,等.豆酱微生物宏蛋白质组提取及分析[J].*食品科学*,2017,38(14):17-23