

# 混合菌种发酵生产酱油的工艺研究

## Study on the Fermentation Process of Soy Sauce by a Multiple Strain Culture

罗先群

LUO Xian-qun

(广西科学院生物研究所,广西南宁 530007)

(Institute of Biology, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China)

**摘要:**利用米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 和黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 混合接种,并在制曲后期混合添加嗜盐片球菌 (*Pediococcus halophilus*) 和高渗酵母进行多菌种发酵生产酱油实验研究。结果表明,混合发酵的菌种最佳培养时间为 36~40h,最佳发酵温度为 45~48℃。米曲霉和黑曲霉的接种比为 90%:10%时,全氮利用率提高 13.2%,氨基酸生成率提高 6.8%。将成熟曲拌以 10%的食盐水,在 pH 值为 6.5 的环境下,混合添加嗜盐片球菌和高渗酵母参与发酵可以提高酱油产品中的醇类含量和酸类含量,改进酱油的风味。

**关键词:**酱油 发酵工艺 曲霉 嗜盐片球菌 高渗酵母

中图分类号:TS264.2<sup>+</sup>1 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2012)04-0364-05

**Abstract:** *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger* were used in the production of soya source. In the late fermentation stage, the *Pediococcus halophilus* and hypertonic yeast were employed to improve the flavor of soya source. The results showed that the optimal duration of cultivation was 36~40 hours; the optimal temperature for fermentation was 45~48℃; the ratio of *Aspergillus oryzae* to *Aspergillus niger* were 90%:10%, which increased 13.2% of total nitrogen utilization and 6.8% of amino acid production. The mature koji was mixed with 10% salt solution in pH value 6.5, where adding the *Pediococcus halophilus* and hypertonic yeast enhanced the content of alcohols and acid contents, which further improved the flavor.

**Key words:** soy sauce, fermentation process, *Aspergillus*, *Pediococcus halophilus*, hypertonic yeast

酱油是我国传统的发酵食品之一,在我国有着悠久的历史。酱油不仅营养丰富,含有糖份、多肽、氨基酸、维生素、食盐和水等物质,而且赋予食品以咸味、鲜味、香味和颜色,增进人们的食欲,因而是人们生活中不可缺少的调味品<sup>[1]</sup>。随着世界上食用酱油的人数增加,对酱油的需要量也随之增加,同时,对酱油的质量也会提出更高的要求。因此,酱油酿造工业在食品工业中的地位愈加显得重要。

酱油种类比较多,按制造方法不同可以分为天然发酵酱油、人工发酵酱油和化学合成酱油。天然发酵酱油的发酵时间长、产量低,但是氨基酸含量比较高、香气浓,味道鲜,营养丰富。人工发酵酱油的风味和

酱香气味不如天然发酵酱油<sup>[2]</sup>,但是发酵时间短、产量高。为了提高效率,大多数酱油生产厂家都选用人工发酵生产酱油。人工发酵酱油的主要原料是黄豆或豆粕、小麦粉及其制品,生产过程包括原料预处理、制曲、发酵、淋油等,是微生物活动中分泌的多种酶对原料中所含蛋白质和淀粉的水解作用。目前,国内大多采用低盐固态发酵法生产酱油,虽然其操作简便,发酵周期不长,蛋白质利用率比较高,但是其产品的风味和稳定性比较差<sup>[3]</sup>,同时低盐固态发酵法生产酱油是纯种发酵,使用单一微生物发酵生产酱油,从而造成酶系比较单一,产品风味不够饱满等不足,甚至由于单一优良菌种的全国推广,造成各地酱油产品风味基本一律,失去了各地不同的风格和特色。本文尝试在酱油发酵中采用多菌种混合发酵<sup>[4,5]</sup>,结合现代纯种培养和自然发酵复杂菌群两方面的优势,使发酵产品的质量进一步提高,并为恢复自然发酵酱油的风

收稿日期:2012-06-08

修回日期:2012-09-16

作者简介:罗先群(1965-),男,高级工程师,主要从事生物工程与技术研究。

味做些探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种和培养基

米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 3.042 购自上海工业微生物所。黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 菌株是广西科学院生物研究所保藏菌种,由日本酱油种曲中分离。嗜盐片球菌 (*Pediococcus halophilus*) 筛选分离自南宁市调味食品厂成熟酱醪,耐 NaCl 浓度 18%~20%。高渗酵母是广西科学院生物研究所保存菌种。

曲霉菌的斜面培养用马铃薯培养基,扩大培养用麸皮固体培养基,菌种分离用酪素培养基。嗜盐片球菌的培养基组成为蛋白胨 1%,酵母膏 0.3%,NaCl 10%,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5%,葡萄糖 2%,pH 值 7.0。富集用以上培养基加 2%琼脂筛选,并采用上覆无菌水,以达到部分厌氧,发酵性能试验用培养基为上述液体培养基中 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 减为 0.13%。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 发酵生产酱油的工艺流程

原料(豆饼 60%,麸皮 40%)→加水→蒸煮→冷却→拌曲种→制曲→拌入 20~22°C 盐水→保温发酵→原油→调配→杀菌→沉淀→过滤→再杀菌→灌装→成品。

#### 1.2.2 蛋白酶活性测定

将酱油曲的原料(豆饼 60%,麸皮 40%)加水后蒸煮或消毒、接种(分别单一纯种和混合接种)、培养,取样测定蛋白酶活性。

#### 1.2.3 嗜盐片球菌和高渗酵母混合发酵试验

在 500L 发酵池中,以成熟曲按工业生产条件拌以 10%食盐水,并上部覆盖避免表层过度氧化及水分散失,置 42°C 下发酵 5 天,逐渐升温至 55°C 发酵 4 天,然后降温至 32°C,分别加入嗜盐片球菌培养液(甲),嗜盐片球菌与高渗酵母培养液(乙)及空白对照(丙),继续发酵 3 天后比较。

表 1 pH 值对米曲霉和黑曲霉蛋白酶活性的影响

Table 1 The effect of pH value on enzyme activity of *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger*

pH 值 pH value	米曲霉产生的蛋白酶活性 Enzyme activity of <i>Aspergillus oryzae</i> (U/g)					黑曲霉产生的蛋白酶活性 Enzyme activity of <i>Aspergillus niger</i> (U/g)			
	1	2	3	4	5	1	2	3	4
3.5	650	617	586	673	531	822	852	740	624
4.5	520	864	913	1273	846	880	954	754	725
5.5	1030	1346	2154	3437	1469	680	764	525	507
6.5	2100	2623	3457	3536	2216	281	427	301	254
7.5	2500	2733	3839	3989	2196	<200	<200	<200	<200
8.5	2314	2060	3197	3275	2099	—	—	—	—
9.5	2160	2025	3148	3364	1827	—	—	—	—
10.5	2060	1790	2407	2724	1696	—	—	—	—

### 1.3 测定方法<sup>[6~9]</sup>

粗酶液用福林法进行蛋白酶活性测定。在 60°C 下每分钟水解酪素产生 1 $\mu$ g 酪氨酸定义为一个酶活力单位。采用硼砂氢氧化钠缓冲液系统测定碱性蛋白酶。采用乳酸缓冲液系统测定酸性蛋白酶。采用三氯乙酸缓冲液和三氯乙酸缓冲液系统测定中性蛋白酶。

氨基酸总量测定采用甲醛滴定法,总氮量测定采用凯氏定氮法。产品风味采用气相色谱法进行物质分析。气相色谱法用日本岛津公司 6C-14A 气相色谱仪,色谱柱内径 4mm,长 3m,U 形不锈钢管柱,固定相 GDX-103,柱温 175°C,气化室温度 210°C,气体流量氮气 70ml/m,空气 500ml/m,氢气 50ml/m,进样量标准品 1 $\mu$ l,样品 2.5 $\mu$ l,记录纸速 300mm/h,按保留时间定性,计算峰面积定量。标准溶液组成:分析纯乙醛 28mg,甲醇 12mg,异丙醇 30mg,正丙醇 50mg,乙酸乙酯 88mg,异丁醇 18mg,正丁醇 40mg,乙酸 86mg,*x*-戊醇 18mg,乳酸 500mg,乳酸乙酯 200mg,溶解定容 100ml,冰箱保存备用。

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵菌株及发酵时间和温度对发酵效果的影响

从表 1 结果可以看出,米曲霉菌株产生的蛋白酶在 pH 值为 4.8~10.5 时均有活性,活性峰值在 pH 值 6.5 附近,在酸性一侧蛋白酶活性下降迅速,而在中性至碱性一侧蛋白酶活性下降比较缓慢。黑曲霉产生的蛋白酶表现出较高活性的区域是在 pH 值 2.0~5.0,pH 值为 6.5 时蛋白酶的活性就已经很小,黑曲霉产生的蛋白酶活性峰值在 pH 值 3.0~3.5。这说明米曲霉和黑曲霉产生蛋白酶<sup>[10]</sup>存在着很大的差异,酶作用位点和方式都不同,结合两者的长处,从产酶能力考虑,在进一步的研究中选用经选育的米曲霉 3 号菌株和黑曲霉 2 号菌株。

从表 2 结果可以看出,米曲霉 3 号培养时间以

表 2 两种菌株产生蛋白酶的活性随时间的变化

Table 2 The protease activity change of two strains in different cultivation time

培养时间 Cultivation time(h)	米曲霉 3 号 <i>Aspergillus oryzae</i> No. 3			黑曲霉 2 号 <i>Aspergillus niger</i> No. 2		
	酶活性 Enzyme activity (U/g)	颜色 Color	孢子数量 Number of spore (个/克)	酶活性 Enzyme activity (U/g)	颜色 Color	孢子数量 Number of spore (个/克)
16	1220	未变 Unchanged		—		
20	1364	白色 White		201	未变 Unchanged	
24	2015	微黄 Light yellow		360	微黄 Light Yellow	
28	2525	淡黄 Yellow		384	金黄 Golden	
32	2760	黄绿 Olivine(+)		587	泛黑(++) Pan-Black	
36	3061	黄绿 Olivine(++)		726	泛黑(+++) Pan-Black	
40	3176	黄绿 Olivine(+++)		928	黑 Black	4.0×10 <sup>5</sup>
44	3274	黄褐 Cinnamon	3.0×10 <sup>6</sup>	952	黑 Black	7.2×10 <sup>7</sup>
48	3543	黄褐 Cinnamon	5.2×10 <sup>8</sup>	—	—	
52	3812	深褐 Sepia	6.8×10 <sup>10</sup>	—	—	
56	3219	深褐 Sepia		—	—	

36~39h 为宜, 延长培养时间虽然可以提高酶活, 但是孢子的出现对发酵不利, 因而宜适当缩短培养时间。同样, 黑曲霉 2 号在 42h 达到最高活性, 但是也已出现孢子, 适宜培养时间控制在 36h 左右。由此确定混合发酵的培养时间为 36~40h。

表 3 结果显示, 米曲霉 3 号菌株产生的蛋白酶活性在 30~60℃ 比较稳定, 最适温度在 50℃ 左右。黑曲霉 2 号菌株产生的蛋白酶活性在 40~55℃ 比较高, 最适温度在 48℃ 左右。由此确定混合发酵的发酵温度控制在 45~48℃ 比较适宜。

表 3 温度对两种菌株蛋白酶活性的影响

Table 3 The effects of temperature on the protease activity

温度 Temperature (°C)	蛋白酶活性 Protease activity(U/g)	
	米曲霉 3 号 <i>Aspergillus oryzae</i> No. 3	黑曲霉 2 号 <i>Aspergillus niger</i> No. 2
24	2277	652
32	3328	781
40	3942	948
48	4297	1158
56	4088	<200
64	2388	—

## 2.2 发酵菌株的接种比例和拌料水份对发酵效果的影响

表 4 结果表明, 单一米曲霉产生的蛋白酶可以在

中性和碱性区域表现最大活性, 黑曲霉的参与使米曲霉产酶在中性、碱性区域活性下降, 而在酸性区域上升。从发酵效果看, 在合适的接种比(90%米曲霉+10%黑曲霉)时全氮利用率提高 13.2%, 氨基酸生成率提高 6.8%, 此时尽管总的酶活下降, 但是蛋白质分解和产生氨基酸的情况明显改善, 这可能与不同酶作用机制的互补效应有关。

在调节不同 pH 值的水进行拌料制曲发酵时发现, pH 值对蛋白酶活性和发酵效果都有明显影响, 把拌料水 pH 值调节为 6.0~7.0 时就可望得到较好的发酵效果(表 5)。拌料水的水量对不同菌株的生长和产酶的影响是不同的, 拌料水的 pH 值为 6.5 时, 拌料水量为 70%~80% 的发酵效果最佳(表 6)。

## 2.3 混合添加嗜盐片球菌和高渗酵母对发酵效果的影响

### 2.3.1 嗜盐片球菌的发酵性能及其最适宜的食盐浓度和介质 pH 值

按照嗜盐片球菌的生理特性, 控制食盐浓度 10%, pH 值 7.0, 以平板覆盖琼脂层的方式分离经富集培养的酱醪中的嗜盐片球菌, 以 CaCO<sub>3</sub> 平板选出透明圈较大的 4 个单菌落进行发酵产酸试验, 3 天后其产酸量最大达到 90% 以上(表 7)。这说明添加嗜盐片球菌进行混合发酵是有效的。

表 4 混合培养的菌种接种比对蛋白酶活性和发酵效果的影响

Table 4 The protease activity and fermentation effects of *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger* with different ratios

接种比(米曲霉: 黑曲霉) Ratio ( <i>Aspergillus</i> <i>oryzae</i> : <i>Aspergillus</i> <i>niger</i> )	蛋白酶活性 Protease activity(U/g)			发酵效果 Fermentation effect(%)			
	pH 值 2.5	pH 值 6.5	pH 值 9.5	氨基酸 Amino acid	总氮 Total nitrogen	氨基酸生成率 Production of amino acid	全氮利用率 Rate of total ni- trogen utilization
0:100%	327	3250	2126	0.71	1.85	42.0	68.0
95%:5%	395	2109	1236	0.86	1.87	44.0	75.6
90%:10%	664	1982	1104	0.75	2.15	48.1	82.2
85%:15%	643	1376	867	0.91	1.79	43.9	70.4
80%:20%	853	854	584	0.65	1.57	40.0	61.3
100%:0	947	537	465	0.60	1.50	38.8	58.0

表 5 拌料水 pH 值对蛋白酶活性和发酵效果的影响

Table 5 The effect of water pH value on enzyme activity and fermentation

pH 值 pH value	蛋白酶 活性 Protease activity (U/g)	氨基酸 Amino acid(%)	总氮 Total nitrogen (%)	氨基酸 生成率 Produc- tion of amino acid(%)	全氮利 用率 Rate of total ni- trogen utilization (%)
3	567	0.201	0.47	46.4	63.3
4	754	0.245	0.50	44.3	68.3
5	1083	0.255	0.48	46.6	69.1
6	1762	0.203	0.52	46.3	71.0
7	2054	0.321	0.54	51.6	76.0
8	1065	0.197	0.51	46.8	73.5

表 6 拌料水量对蛋白酶活性和发酵效果的影响

Table 6 The effect of water volume on enzyme activity and fermentation

拌料水量 Water volume (%)	蛋白酶 活性 Protease activity (pH 值 6.5,U/g)	氨基酸 Amino acid(%)	总氮 Total nitrogen (%)	氨基酸 生成率 Produc- tion of amino acid(%)	全氮利 用率 Rate of total ni- trogen utilization (%)
40	1237	0.210	0.43	48.0	60.8
50	1687	0.202	0.46	42.6	65.9
55	2064	0.264	0.52	47.8	76.0
60	2158	0.262	0.56	47.2	79.2
70	2404	0.264	0.54	51.1	80.1

表 8 结果表明,10%食盐浓度利于嗜盐片球菌的产酸,pH 值 6.5 附近的产酸效果比较好。10%食盐浓度和 pH 值 6.5 与酱油生产的实际条件比较接近,实际生产酱油是可以采用的。

表 7 嗜盐片球菌发酵时间与产酸量的比较

Table 7 The acid production of different *Pediococcus halophilus* in different fermentation time

发酵 时间 Fermen- tation time(d)	产酸量 Acid production(以 0.85mol/L NaOH 滴定毫 升数计 The volume titrated by 0.85mol/L NaOH)			
	菌株 1 Strain No. 1	菌株 2 Strain No. 2	菌株 3 Strain No. 3	菌株 4 Strain No. 4
1	0.38	0.40	0.37	0.41
2	1.80	2.00	1.95	2.00
3	2.40	2.12	2.20	2.25
7	2.55	2.25	2.35	2.50
10	2.55	2.30	2.50	2.45

表 8 食盐浓度和介质 pH 值对嗜盐片球菌产酸效果的影响

Table 8 The effects of the salt concentration and pH value on the acid production by *Pediococcus halophilus*

项目 Item	产酸量 Acid production(以 0.85mol/L NaOH 滴定毫 升数计 The volume titrated by 0.85mol/L NaOH)				
	菌株 1 号 Strain No. 1	菌株 2 号 Strain No. 2	菌株 3 号 Strain No. 3	菌株 4 号 Strain No. 4	
食盐浓度 Salt volume	5%	0.42	0.46	0.44	0.39
	10%	1.23	1.21	1.34	1.33
	15%	0.32	0.50	0.41	0.43
	20%	0.17	0.15	0.13	0.15
pH 值	6.0	1.0	1.2	0.9	1.1
	6.5	2.1	2.5	2.2	2.3
	7.0	1.5	1.5	1.7	1.5

### 2.3.2 嗜盐片球菌和高渗酵母参与发酵的酱油产品风味

以成熟曲按工业生产条件拌以 10% 食盐水,并上部覆盖避免表层过度氧化及水分散失,置 42℃ 发酵 5 天,逐渐升温至 55℃ 发酵 4 天,然后降温至 32℃,分别加入嗜盐片球菌培养液(甲),嗜盐片球菌与高渗酵母培养液(乙)及空白对照(丙),继续发酵 3

天。3天后比较,感官上甲,乙明显比丙香气浓郁,乙还带有醇香,经热水浸泡提取后以气相色谱测定其风味物质的组成情况,结果(表9)表明,醇类、酸类含量有较大提高,说明在酱油发酵中添加嗜盐片球菌和高渗酵母可以使酱油产品的风味有明显好转。

表9 嗜盐片球菌和高渗酵母参与发酵的酱油组分比较  
Table 9 The content analysis of soya source fermented by *Pediococcus halophilus* and hypertonic yeast

实验组 Experiment	酱油组分 The content of soya source (mg/100ml)							
	乙醛 Acetaldehyde	甲醇 Methanol	乙醇 Ethanol	异丙醇 Isopropanol	正丙醇 Propanol	正丁醇 Butanol	乙酸 Acetic acid	乙酸乙酯 Ethyl acetate
甲	6.6	1.2	9.5	—	—	11.4	70.9	1.1
乙	26.6	5.1	205.0	2.9	19.0	50.7	94.3	3.5
丙	6.3	1.0	38.3	6.5	2.3	14.5	68.0	0.3

### 3 结束语

利用米曲霉和黑曲霉混合接种<sup>[11]</sup>,并在制曲后期混合添加嗜盐片球菌和高渗酵母进行多菌种发酵生产酱油。混合发酵的菌种最佳培养时间36~40h,最佳发酵温度为45~48℃。米曲霉和黑曲霉的接种比为90%:10%时全氮利用率提高13.2%,氨基酸生成率提高6.8%。以成熟曲拌以10%食盐水,在pH值为6.5的环境下,混合添加嗜盐片球菌和高渗酵母参与发酵可以提高酱油产品中的醇类含量和酸类含量,改进酱油的风味<sup>[12]</sup>。

本实验研究推广到实际酱油生产时,可以在低盐固态发酵原池浸出法生产酱油的发酵池(罐)的排油阀管道上,增加1台回浇泵和几个培养酵母菌和乳酸菌的发酵罐,通过淋浇手段在后发酵阶段补充耐盐性

酵母和乳酸菌,强化酒精发酵。这种先固后稀多菌种淋浇发酵<sup>[13]</sup>原池浸出法新工艺,保留了低盐固态发酵工艺,增加了酱油香气和有望改善酱油的风味。

参考文献:

- [1] 严留俊.改善酱油风味的微生物及工艺研究[D].无锡:江南大学,2008.
- [2] 陈陶声.生物技术在食品工业中的应用[J].中国酿造,1992(1):1.
- [3] 赵德安.酱油的质量[J].中国酿造,2005(3):1.
- [4] 王克明.多菌混合阶梯发酵新工艺研究[J].中国酿造,2006(7):34.
- [5] 林祖申.多菌种发酵是提高酱油、食醋质量的重要途径[J].中国酿造,2005(6):1-5.
- [6] GB18186-2000 酿造酱油[S].中华人民共和国国家标准化管理委员会,2000.
- [7] GB2717-2003 酱油卫生标准[S].中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,2003.
- [8] SB10336-2000 配制酱油[S].国家国内贸易局,2000.
- [9] SB/T10317-1999 蛋白酶活力测定法[S].中华人民共和国,1999.
- [10] 杨俊豪,陈宝英,吴培群,等.酱油曲霉蛋白酶活力的提高[J].工业微生物,1994(1):1-5.
- [11] 王素珍.利用双菌种制曲提高原料蛋白质利用率的探讨[J].中国酿造,2005(7):35-37.
- [12] 邹镜铭.多菌种混合制曲提高酱油质量[J].中国调味品,2005(4):33-34.
- [13] 史龙君,杨铎,孙岩.多菌种稀发酵酱油的对照试验[J].中国酿造,2004(10):18.

(责任编辑:邓大玉)

### 光镊揭示肺黏液阻止纳米粒子通过机理

通常被称之为“痰”的黏液黏附在人体呼吸系统气道的内表面。这种黏性凝胶滋润肺部并防止小颗粒的渗入,如病毒或柴油油烟颗粒等。以前科学家一直无法解释,为什么纳米粒子看似可以在肺黏液中运动,但是有时却不能到达肺细胞中的目标点,而只是吸附在了黏液上。最德国科学家研究揭示了肺黏液的物理属性,并在纳米尺度上解释了肺黏液阻止纳米粒子通过的原因。肺黏液与微观结构像纤细丝线绕成的孔隙组成的蜘蛛网似的“正常凝胶”不同,其微观结构看起来却像海绵一样:粘稠、厚的凝胶棒隔开了充满液体的大的孔隙,这种骨架蛋白被称为黏蛋白。在这种结构中纳米粒子就像陷在栅栏组成的笼子里一样,在孔隙内移动不受阻碍,想穿越孔隙时却会被“栅栏”阻挡住。科学家在研究中应用光镊(即用激光束控制极小的粒子,使粒子像被一对镊子捏住一样移动)的激光束测量在凝胶中移动颗粒所需要的力,用恒定的力可以让纳米球进入液相的孔隙里面,就像在一个正常的凝胶中那样。但是,当球碰到孔壁时,即遇到肺黏液的凝胶棒时,激光束就不能继续移动它了。这项研究结果可以帮助人们理解,呼吸道传染病是如何引起的,又如何能得到更好的治疗,从而研究发出吸入式新药物。

(据科学网)