

研究报告

酱醪细菌菌株的分离及功能分析

胡传旺^{1,2} 李巧玉^{1,2} 周朝晖³ 李铁桥³ 陈坚^{1,2,4} 堵国成^{1,4} 方芳^{1,2*}

(1. 江南大学生物工程学院 江苏 无锡 214122)

(2. 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

(3. 广东珠江桥生物科技股份有限公司 广东 中山 528415)

(4. 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室 江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】分离获得来源于酱醪的细菌,考察菌株与酱油品质相关的特性,初步评价其应用于酱油发酵的潜力。【方法】从日式酱油发酵的酱醪体系中分离和筛选优势或特征细菌菌株,比较它们的耐盐性及其在高盐条件下产蛋白酶、有机酸、挥发性物质和氨基酸等的的能力。【结果】从日式酱油酱醪中共分离得到9株细菌,分别属于魏斯氏菌(*Weissella*)、乳酸足球菌(*Pediococcus*)、乳酸杆菌(*Lactobacillus*)、芽孢杆菌(*Bacillus*)、四联球菌(*Tetragenococcus*)和葡萄球菌(*Staphylococcus*)属。其中耐盐的细菌有类肠膜魏斯氏菌(*Weissella paramesenteroides*) CQ03、嗜酸乳酸足球菌(*Pediococcus acidilactici*) JY07、戊糖乳酸足球菌(*Pediococcus pentosaceus*) JY08、葡萄球菌(*Staphylococcus* sp.) JY09和嗜盐四联球菌(*Tetragenococcus halophilus*) MRS1。在高盐条件下,对它们的特性分析表明:解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) B2产蛋白酶和糖化酶的能力较强,*W. paramesenteroides* CQ03可水解原料产生较多鲜味氨基酸,*T. halophilus* MRS1产有机酸能力较强,它和*S. sp.* JY09代谢产生的挥发性物质较多。【结论】筛选得到9株在促进原料水解和提高风味物质合成方面有潜力的菌株,如果应用到酱油工业生产中,将有利于缩短发酵周期,提高酱油品质。

关键词: 酱油, 魏斯氏菌, 嗜盐四联球菌, 足球菌, 芽孢杆菌, 风味物质

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31371821); Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (No. 2015B020205002)

***Corresponding author:** Tel: 86-510-85918307; E-mail: ffang@jiangnan.edu.cn

Received: November 08, 2016; **Accepted:** February 13, 2017; **Published online** (www.cnki.net): February 28, 2017
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31371821); 广东省科技计划项目(No. 2015B020205002)

***通讯作者:** Tel: 86-510-85918307; E-mail: ffang@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2016-11-08; 接受日期: 2017-02-13; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-02-28

Functional analysis of bacteria isolated from soy sauce moromi

HU Chuan-Wang^{1,2} LI Qiao-Yu^{1,2} ZHOU Chao-Hui³ LI Tie-Qiao³
CHEN Jian^{1,2,4} DU Guo-Cheng^{1,4} FANG Fang^{1,2*}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(3. Guangdong Pearl River Bridge Biological Limited Corporation, Zhongshan, Guangdong 528415, China)

(4. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] To isolate and characterize bacteria from soy sauce moromi and evaluate their potential applications in soy sauce production. **[Methods]** The dominant or specific bacterial strains will be isolated from Japanese-style soy sauce moromi. And their capabilities in salt tolerance, proteinase secretion and production of organic acid, amino acids, volatile compounds under high salt condition will be assessed. **[Results]** A total of nine strains belonging to the genus of *Weissella*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Tetragenococcus* and *Staphylococcus* were isolated from soy sauce moromi. *Weissella paramesenteroides* CQ03, *Pediococcus acidilactici* JY07, *Pediococcus pentosaceus* JY08, *Staphylococcus* sp. JY09 and *Tetragenococcus halophilus* MRS1 were found to be salt-tolerant strains. *Bacillus amyloliquefaciens* B2 exhibited stronger capability in secretion of protease and glucoamylase. *W. paramesenteroides* CQ03 produced more umami tasting amino acids than other isolates. Both *T. halophilus* MRS1 and *S. sp.* JY09 retained high activities in synthesis and accumulation of volatile compounds. The potential capability in organic acids production by *T. halophilus* MRS1 was also detected. **[Conclusion]** Nine strains that belong to different species with potential capability in promoting raw materials hydrolysis and improving soy sauce aroma were obtained. The results demonstrated their benefit for shortening fermentation duration and improving the quality of soy sauce.

Keywords: Soy sauce, *Weissella*, *Tetragenococcus halophilus*, *Pediococcus*, *Bacillus*, Volatile compounds

酱油是一种源自我国的传统调味品，在人们的日常生活中占有重要地位。传统酱油酿造是以大豆和小麦为主要原料，经过微生物及其酶系的长期作用，最终形成特殊的色泽和良好的风味^[1]。随着生活水平的提高，人们对酱油品质和特色化的需求也逐渐增加。

酱油发酵是一个混菌发酵过程，微生物种群对于酱油的发酵进程和风味物质合成具有重要影响^[2]。通过分离酱油发酵混菌体系的优势或特征微生物，识别这些微生物的代谢特性及其与酱油发酵或风味相关的功能，是利用微生物提高酱油品质的一条有效途径。酱油功能微生物是指具有某些特殊代谢能力，并对酱油发酵具有一定作用的微生物。在食品发酵领域，已经有筛选潜在的功能微生物并分析其特性，最终强化应用于生产的成功案例，如

酿酒功能微生物^[3]和食醋功能微生物^[4]。目前，对于酱油微生物研究最多的是米曲霉和酵母。米曲霉能分泌大量胞外蛋白酶促进原料水解^[5]，而鲁氏接合酵母、假丝酵母、球拟酵母等能有效促进酱油风味物质的形成^[6-7]。相对而言，关于酱油细菌的研究较少，之前的研究结果主要是筛选得到一些对酱油品质具有促进作用的耐盐乳酸菌^[8]。近年来，有国内外学者通过宏基因组学的方法研究了酱醪微生物的组成结构，发现还有大量其它微生物，尤其是细菌参与酱油发酵^[9-11]。这些细菌的种群丰度大、总量多，但是它们在酱油环境中具有怎样的功能和特性尚不十分清楚。

本研究以日式工艺酱油为研究对象，从酱醪中分离可培养的细菌菌株，通过对菌株与酱油发酵和风味物质合成相关的功能特性进行分析，以期对酱

油发酵行业寻找可提高酱油品质的微生物提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 酱醪样品: 研究所用日式酱油的酱醪样品取自广东珠江桥生物科技股份有限公司。

1.1.2 培养基: 细菌分离培养基: 乳酸菌分离使用添加 0.1% 纳他霉素的 MRS 培养基^[12], 其他细菌分离使用添加 0.1% 纳他霉素的营养肉汤培养基^[12]。高盐培养基(g/L): 葡萄糖 20.0、蛋白胨 10.0、酵母膏 10.0、可溶性淀粉 10.0、吐温-80 1.0、氯化钠 180.0, pH 5.5。

1.1.3 主要试剂和仪器: 干酪素、2-辛醇、有机酸混合标准品、氨基酸混合标准品、邻苯二甲醛(OPA) 购自 Sigma 试剂公司; 其它试剂均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司。酶标仪购自美国伯腾仪器有限公司; HPLC 分析仪购自安捷伦科技有限公司; GC-MS 分析仪购自上海岛津有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 酱醪中细菌的分离筛选: 选取发酵第 25、56、120 天的酱醪样品分离菌株。称取 25 g 酱醪于三角瓶中, 加入 225 mL 无菌生理盐水并加适量玻璃珠, 100 r/min 振荡 5 min 后, 取少量菌悬液用生理盐水 10 倍梯度稀释。将 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 梯度稀释液分别涂布到细菌分离培养基平板上, 37 °C 培养 2 d。挑选不同菌落形态的单菌落分离纯化, 分离得到的菌株分别编号并转接于斜面培养基中 4 °C 保存用于后续研究。

1.2.2 细菌属种鉴定: 使用生工生物工程(上海)股份有限公司的细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒提取所筛选菌株的基因组 DNA, 并以此为模板利用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 扩增其 16S rRNA 基因。PCR 反应体系(50 μ L): 50 mg/L 模板 2 μ L, 10 μ mol/L 上下游引物各 1 μ L, *Pfu* PCR MasterMix 25 μ L, 双蒸水 21 μ L。反应条件: 94 °C

3 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。扩增产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 测序结果与 NCBI 数据库中序列进行比对, 并利用 MEGA 6.0 软件构建进化树^[13]。

1.2.3 菌株耐盐性分析: 在 MRS 培养基中将筛选到的酱油微生物分别培养到对数生长期, 6 000 r/min 离心 5 min 后收集菌体, 转接到高盐培养基中 30 °C 静置培养, 采用活菌计数法测定培养 0-10 d 的活菌数。

1.2.4 蛋白酶和糖化酶活性测定: 取 1.2.3 中各酱油微生物在高盐培养基中培养 1 d 后的培养液测定蛋白酶和糖化酶酶活。蛋白酶活力测定采用福林酚法^[14], 定义在 pH 5.5、18% 氯化钠浓度以及 30 °C 条件下, 1 h 水解干酪素产生 1 μ g 酪氨酸为一个蛋白酶活力单位; 糖化酶活力测定采用 DNS 法^[15], 定义在 pH 5.5、18% 氯化钠浓度以及 30 °C 条件下, 1 h 水解可溶性淀粉产生 1 μ g 葡萄糖为一个糖化酶活力单位。

1.2.5 有机酸测定: 取 1.2.3 中各酱油微生物在高盐培养基中培养 10 d 后的培养液 1 mL, 用超纯水稀释 10 倍后测定有机酸含量。测定使用 Agilent 1260 高效液相色谱仪并配备 Bio-Rad Aminex HPX-87H (300 mm \times 7.8 mm, 9 μ m) 色谱柱, 以 5 mmol/L 稀硫酸为流动相, 设置柱温 40 °C, 流速 0.5 mL/min, 采用紫外检测器在 210 nm 处进行检测^[16]。

1.2.6 挥发性物质分析: 取 1.2.3 中各酱油微生物在高盐培养基中培养 10 d 后的培养液 10 mL, 采用 SPME-GC-MS 法对其中的挥发性物质进行测定。样品处理方法为: 在培养液中加入 2 g 氯化钠, 充分溶解后再添加 66.20 μ g/L 的 2-辛醇作为内标。固相微萃取方法、GC-MS 分析方法以及数据处理参照文献^[17]。

1.2.7 氨基酸测定: 取 1.2.3 中各酱油微生物在高盐培养基中培养 10 d 后的培养液 1 mL, 用 5% 的三氯乙酸稀释 5 倍后测定游离氨基酸含量。氨基酸测

定采用 ODS 柱前衍生化法, 衍生化方法和色谱条件如文献[18-19]所述。

1.3 数据分析

使用 SPSS 19.0 软件对数据进行相关性分析, 所有试验均重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 日式酱油细菌菌株的分离与鉴定

从酱油发酵前期(25 d)、中期(56 d)、后期(120 d)的酱醪中共挑选得到 107 株可在 MRS 或营养肉汤培养基中生长的细菌。经过初步筛选和鉴定, 共确定了 9 株不同属种的细菌, 分别是融合魏斯氏菌(*Weissella confusa*) CQ01、类肠膜魏斯氏菌(*Weissella paramesenteroides*) CQ03、食窦魏斯氏菌(*Weissella cibaria*) CQ02、嗜酸乳酸足球菌(*Pediococcus acidilactici*) JY07、戊糖乳酸足球菌(*Pediococcus pentosaceus*) JY08、唾液乳酸杆菌(*Lactobacillus salivarius*) B1、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) B2、嗜盐四联球菌(*Tetragenococcus halophilus*) MRS1 和葡萄球菌(*Staphylococcus* sp.) JY09, 它们的 16S rRNA 基因序列系统进化树如图 1 所示。

2.2 酱油细菌的耐盐性比较

对高盐的耐受能力不仅反映了各细菌菌株在酱油环境中的活性状态, 而且对于其发挥功能特性具有重要意义。将筛选到的 9 株细菌菌株培养到对数生长期后转接到高盐培养基, 菌株生长情况如图 2 所示, 这些菌株明显地被分为三类: (1) *L. salivarius* B1、*W. confusa* CQ01、*W. cibaria* CQ02 和 *B. amyloliquefaciens* B2 为不耐盐微生物, 它们在高盐环境中存活率最低; (2) *W. paramesenteroides* CQ03、*P. acidilactici* JY07、*P. pentosaceus* JY08 和 *S. sp.* JY09 为耐盐微生物, 它们在高盐环境中活菌减少速率较慢, 且培养 10 d 后活菌数在 10^6 – 10^7 CFU/mL 之间; (3) *T. halophilus* MRS1 为嗜盐微生物, 只有它的高盐环境中仍能缓慢生长, 最终活菌数能达到 10^8 CFU/mL 以上。

2.3 酱油细菌在高盐环境中产酶分析

筛选到的酱油细菌菌株在高盐低 pH 条件下的胞外蛋白酶和糖化酶酶活测定结果如表 1 所示。具有最高蛋白酶活力的是 *B. amyloliquefaciens* B2, 酶活达到 102 U/mL; *P. acidilactici* JY07 和 *B. amyloliquefaciens* B2 的糖化酶酶活分别为 266 U/mL 和 227 U/mL, 高于其它菌株。

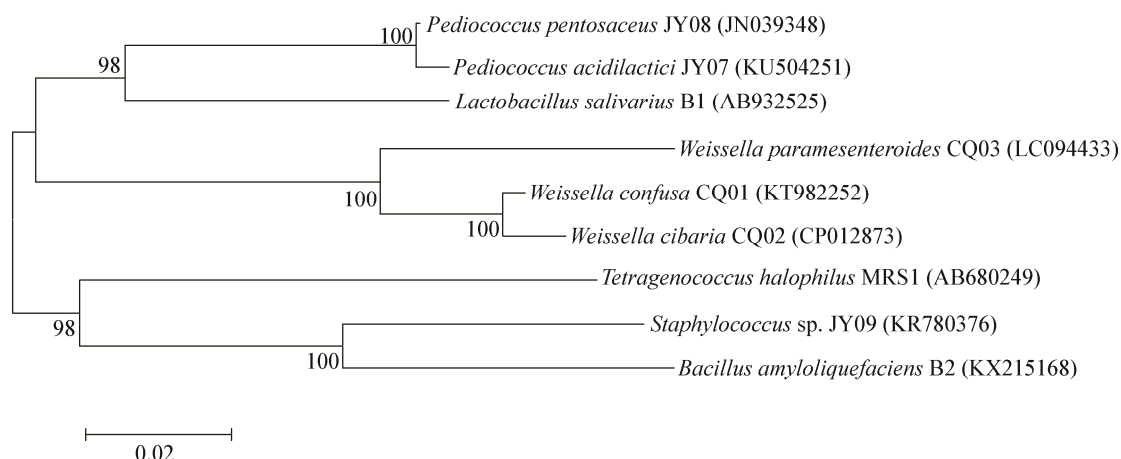


图 1 酱醪细菌 16S rRNA 基因序列系统进化树

Figure 1 Phylogenetic tree of moromi isolates based on their 16S rRNA gene

注: 分支点数值是基于 Neighbor-Joining 法自展 1 000 次后的自律值($\geq 50\%$); 差异值(0.02)是 2% 的序列差异, 即 100 个核苷酸序列有 2 个核苷酸缺失或者被置换突变; 括号内序号表示与测序结果最相近的 GenBank 登录号。

Note: Numbers at nodes indicate the bootstrap values ($\geq 50\%$) based on Neighbour-Joining analyses of 1 000 resampled datasets; Bar, 2 substitutions per 100 nucleotides position; The numbers in parenthesis represent the GenBank accession numbers which is most similar to sequencing results.

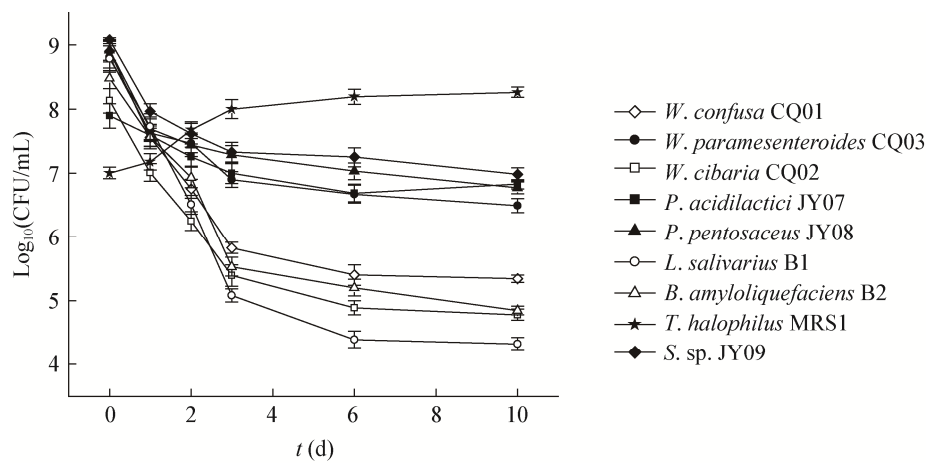


图 2 酱醪细菌耐盐性比较
Figure 2 Comparison of tolerance to salt of moromi bacteria

表 1 酱醪微生物产酶分析 Table 1 Detection of protease and glucoamylase activity of moromi bacteria		
菌株 Strains	蛋白酶 Protease (U/mL)	糖化酶 Glucoamylase (U/mL)
<i>W. confusa</i> CQ01	ND	ND
<i>W. paramesenteroides</i> CQ03	36	30
<i>W. cibaria</i> CQ02	ND	ND
<i>P. acidilactici</i> JY07	10	266
<i>P. pentosaceus</i> JY08	ND	ND
<i>L. salivarius</i> B1	ND	ND
<i>B. amyloliquefaciens</i> B2	102	227
<i>T. halophilus</i> MRS1	ND	33
<i>S. sp.</i> JY09	ND	ND

注：ND：未检测到酶活。
Note: ND: No enzyme activity.

2.4 酱油细菌在高盐环境中产风味物质分析
2.4.1 产有机酸分析：筛选到的酱油细菌菌株在高盐低 pH 条件下产有机酸能力如表 2 所示。筛选到的细菌菌株都能产乳酸，它们的乳酸合成能力与高盐条件下培养 10 d 后的活菌数量呈显著性相关 ($r=0.806$, $P=0.009$)，耐盐性最好的 *T. halophilus* MRS1 培养液中乳酸含量高于其它微生物。乙酸、丙酮酸、柠檬酸和富马酸也是酱油风味的重要组成部分，*S. sp.* JY09 和 *T. halophilus* MRS1 的培养液中乙酸含量最多，*L. salivarius* B1 和 *B. amyloliquefaciens* B2 合成柠檬酸能力较强，而 *W. cibaria* CQ02 则主要产富马酸。另外 *L. salivarius* B1、*B. amyloliquefaciens* B2 和 *T. halophilus* MRS1 还具有产焦谷氨酸的能

表 2 酱醪细菌产有机酸能力比较 Table 2 Production of organic acid by soy sauce moromi bacteria (mg/100 mL)						
菌株 Strains	乳酸 Lactic acid	乙酸 Acetic acid	丙酮酸 Pyruvic acid	柠檬酸 Citric acid	富马酸 Fumaric acid	焦谷氨酸 Pyroglutamic acid
<i>W. confusa</i> CQ01	174.26±9.43	20.83±1.09	ND	ND	ND	ND
<i>W. paramesenteroides</i> CQ03	110.32±5.88	67.33±1.24	ND	ND	ND	ND
<i>W. cibaria</i> CQ02	17.69±0.35	56.83±2.78	ND	ND	113.54±3.94	ND
<i>P. acidilactici</i> JY07	268.50±13.92	16.83±0.28	8.74±0.06	5.57±0.07	ND	ND
<i>P. pentosaceus</i> JY08	176.94±4.56	20.17±0.80	12.99±0.10	32.87±0.91	ND	ND
<i>L. salivarius</i> B1	213.81±15.38	ND	ND	78.20±1.99	ND	53.78±1.02
<i>B. amyloliquefaciens</i> B2	371.98±10.31	ND	ND	73.61±1.11	47.27±1.03	18.25±0.77
<i>T. halophilus</i> MRS1	589.01±15.50	107.83±6.36	ND	ND	ND	58.78±1.38
<i>S. sp.</i> JY09	206.03±6.60	87.31±0.97	14.79±0.73	20.90±0.37	ND	ND

注：ND：未检测出。
Note: ND: Not detected the organic acid.

力。焦谷氨酸是一种传统发酵食品的特殊有机酸,具有良好的改善记忆以及调节神经的功能。

2.4.2 产挥发性物质分析: 对各酱油细菌菌株培养液的挥发性物质进行分析发现,它们在高盐条件下产生的挥发性物质主要包括酸类、醛类、醇类、酮类和吡嗪类物质(图 3),这些物质都能在酱油中检测到,也是酱油的重要香气组成成分^[20-21]。细菌菌株产挥发性酸和醛类的相对含量多于其它物质。此外,耐盐性较好的 *S. sp.* JY09 和 *T. halophilus* MRS1 产挥发性风味物质的种类和

总量明显多于其它菌株,具有更好的提高酱油风味的能力。

2.4.3 产氨基酸分析: 酱油的鲜味主要来源于游离氨基酸,不同游离氨基酸的呈味特性也不同^[22],酱油细菌菌株在高盐条件下代谢产氨基酸情况如图 4 所示。*W. paramesenteroides* CQ03、*P. acidilactici* JY07、*P. pentosaceus* JY08 和 *B. amyloliquefaciens* B2 的培养液中总氨基酸水平较高,而且它们主要积累苦味氨基酸,而鲜味氨基酸和甜味氨基酸含量则没有明显变化。

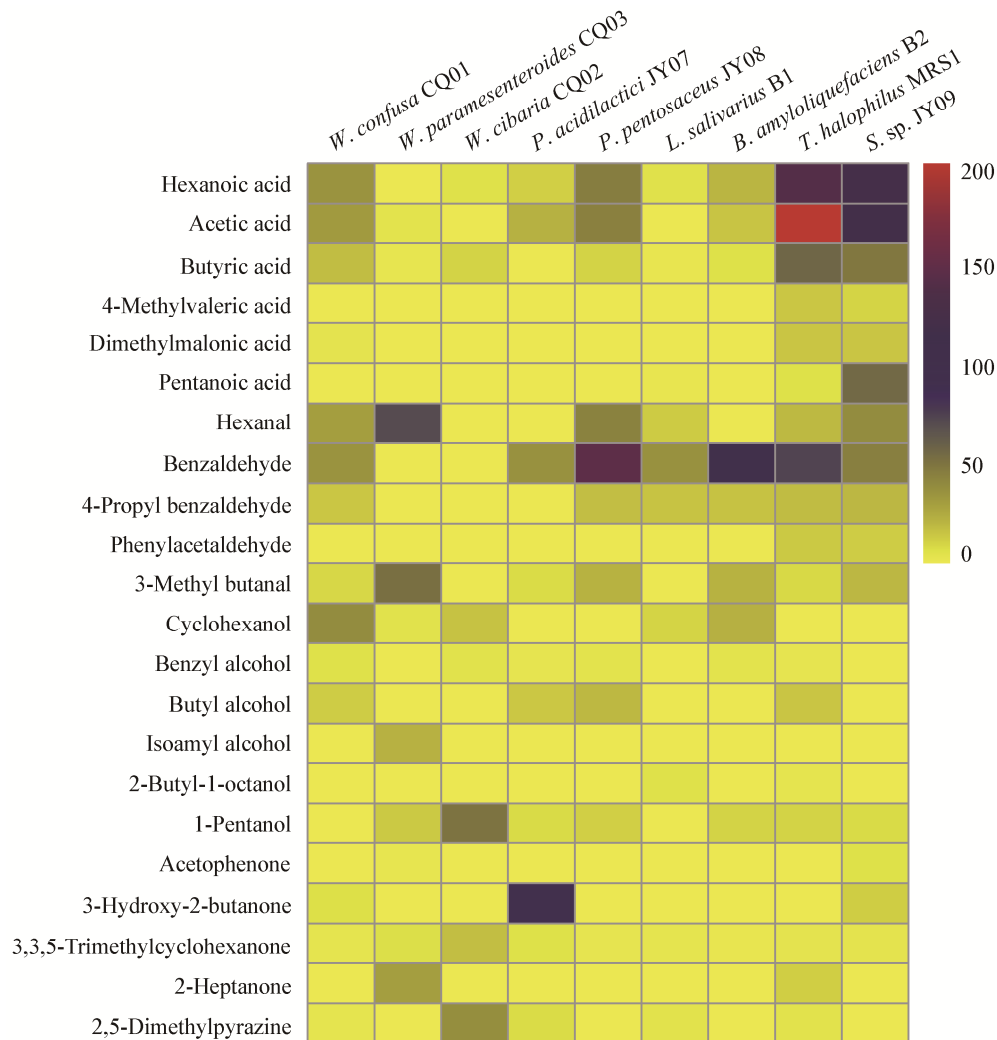


图 3 酱醪细菌产主要挥发性物质能力分析

Figure 3 Production of volatile substances by bacteria isolated from soy sauce moromi

注: 图中比例尺代表各物质浓度($\mu\text{g/L}$).

Note: The value on the bar expressed concentration of compounds ($\mu\text{g/L}$).

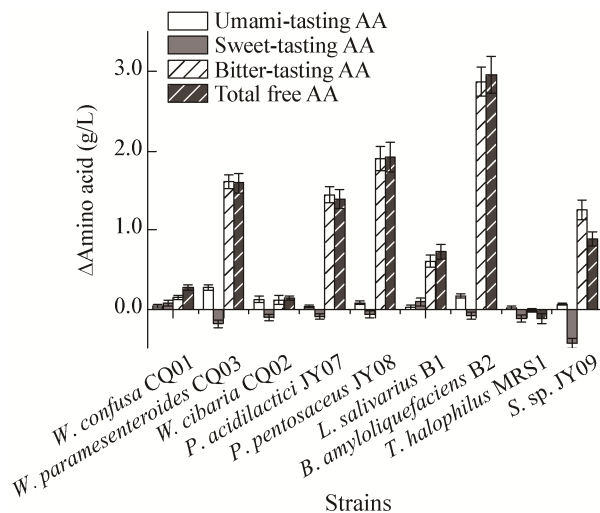


图4 酱醪细菌产游离氨基酸能力比较

Figure 4 Production of amino acids by bacteria isolated from soy sauce moromi

注: ΔAmino acid: 氨基酸生成量; AA: 氨基酸。

Note: ΔAmino acid: Amino acid production; AA: Amino acids.

3 讨论

酱油酿造是一个开放式的自然发酵过程, 混菌体系赋予了酱油独特的风味和营养价值^[23]。随着研究者们对酱油发酵机制的深入探究, 酱油发酵微生物种群也越发清晰, 对酱油微生物的发掘与利用也越来越受到重视。本研究筛选到9株酱油细菌菌株, 它们均来自于日式酱醪, 是潜在的酱油功能微生物, 具有良好的应用前景。酿造酱油的原料主要是大豆、小麦以及面粉, 这些原料含有的大量蛋白质和淀粉需要经过酶类作用转化为酱油的主要成分^[1]。王栋研究了盐度对酱油蛋白酶酶活的影响, 发现米曲霉的蛋白酶酶活随着盐浓度的升高而逐渐下降, 在20%的盐浓度下, 酶活仅存留17%左右^[14]。本研究筛选到的 *B. amyloliquefaciens* B2 在高盐条件下蛋白酶活力达到102 U/mL, 约为相同条件下米曲霉的1%–5%, 细菌虽然不是原料蛋白水解的主要微生物, 但它们是酱油发酵混菌体系的重要组成部分, 因而对酱油的成熟仍然具有重要的作用^[24]。因此通过在酱醪中强化某些功能菌如 *B. amyloliquefaciens* B2, 或许是进一步提高酱油氨基

酸态氮含量的有效途径。同样的, *P. acidilactici* JY07 和 *B. amyloliquefaciens* B2 在高盐条件下仍具有较好的糖化酶活性(表1), 如果在发酵前期强化它们, 将在一定程度上促进酱油原料的充分水解, 而且能为后面的乳酸、酒精发酵阶段提供良好的物质基础^[25]。利用酱油细菌的蛋白酶和糖化酶作为酱油发酵酶系的补充, 有助于实现酱油资源集约化生产并缩短发酵周期。

酱油良好的风味来自于有机酸、氨基酸、醇类、酯类等物质, 而这些风味物质的形成与微生物代谢密切相关。本研究筛选到的9株酱油细菌菌株在高盐条件下能产生多种有机酸, 尤其是乳酸, 耐盐性最好的 *T. halophilus* MRS1 产乳酸达到5 g/L 以上, 如果应用到生产上, 有机酸含量提高不仅能丰富酱油的风味, 而且能增强酱油本身的防腐能力^[17]。乳酸菌作为食品发酵剂能提供维生素、细菌素、胞外多糖等多种功能性物质^[26], 而且 *L. salivarius* B1 和 *T. halophilus* MRS1 还能产少量的焦谷氨酸等生理活性物质, 这也为保健品酱油的开发提供了思路。游离氨基酸水平是评价酱油质量最重要的指标, 我们发现 *W. paramesenteroides* CQ03、*P. acidilactici* JY07、*P. pentosaceus* JY08 和 *B. amyloliquefaciens* B2 具有良好的积累氨基酸能力, 然而它们积累的氨基酸以苦味氨基酸为主, 这可能与原料来源相关, 还需要进一步研究。除此以外, 酱油细菌菌株还能产生多种脂肪酸、脂肪醇及醛类物质, 这些物质不仅是酱油的风味组成, 还是很多风味物质的重要前体。这些具有良好产风味物质能力的细菌菌株如果强化到酱油发酵过程中, 有利于促进酱油风味及功能的多样化, 满足人们的个性化需求。

为了进一步提高酱油品质, 越来越多的研究者已经开始注重将强化功能微生物方法应用到酱油生产上来。然而目前对于酱油微生物的强化研究主要侧重于霉菌和酵母等真菌^[27-28], 对细菌菌株的利用则缺乏相关的理论指导。Cui 等^[29]在酱醪中添加嗜盐四联球菌与酵母共培养后发现酱油基础理化

指标没有明显变化,但酱油风味得到了显著改善,这证明了人工强化细菌在酱油生产上具有一定的可行性并具有良好的应用前景。本研究筛选到9株在促进原料水解和提高风味物质合成方面有潜力的菌株,尤其是5株耐盐性较好的微生物(图2),如果应用到酱油工业生产中,将有利于缩短发酵周期、提高酱油品质。

参考文献

- [1] Chen B, Lu F, Wang FJ, et al. Effect of salt-tolerant yeast on the flavor of soy sauce and its research progress[J]. China Brewing, 2010, 29(6): 1-3 (in Chinese)
陈彬, 鲁绯, 王夫杰, 等. 耐盐酵母菌对发酵酱油风味作用及其应用的研究进展[J]. 中国酿造, 2010, 29(6): 1-3
- [2] Wei QZ, Wang HB, Chen XZ, et al. Profiling of dynamic changes in the microbial community during the soy sauce fermentation process[J]. Applied Microbiology and Cell Biotechnology, 2013, 97(20): 9111-9119
- [3] Zhou XH, Chen X, Li H, et al. The research and application of beneficial microorganisms in the production of liquor[J]. Liquor Making, 2013, 40(5): 33-40 (in Chinese)
周新虎, 陈翔, 李浩, 等. 有益功能微生物在酿酒生产中的研究及应用[J]. 酿酒, 2013, 40(5): 33-40
- [4] Xu W. Analysis of the microbial diversity and function during acetic acid fermentation process of Zhenjiang aromatic vinegar[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2011 (in Chinese)
许伟. 镇江香醋醋酸发酵过程微生物群落及其功能分析[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2011
- [5] Liang YC, Pan L, Lin Y. Analysis of extracellular proteins of *Aspergillus oryzae* grown on soy sauce koji[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2009, 73(1): 192-195
- [6] Sluis CVD, Tramper J, Wijffels RH. Enhancing and accelerating flavour formation by salt-tolerant yeasts in Japanese soy-sauce processes[J]. Trends in Food Science & Technology, 2001, 12(9): 322-327
- [7] Song YR, Jeong DY, Baik SH. Monitoring of yeast communities and volatile flavor changes during traditional Korean soy sauce fermentation[J]. Journal of Food Science, 2015, 80(9): M2005-M2014
- [8] Chen BL. Application of lactic acid bacteria with high salt tolerance in the soy sauce fermentation[J]. Modern Food Science and Technology, 2011, 27(11): 1340-1343 (in Chinese)
陈伯林. 耐盐乳酸菌在酱油发酵中的应用[J]. 现代食品科技, 2011, 27(11): 1340-1343
- [9] Wei CL, Chao SH, Tsai WB, et al. Analysis of bacterial diversity during the fermentation of *inyu*, a high-temperature fermented soy sauce, using nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and the plate count method[J]. Food Microbiology, 2013, 33(2): 252-261
- [10] Sulaiman J, Gan HM, Yin WF, et al. Microbial succession and the functional potential during the fermentation of Chinese soy sauce brine[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 556-556
- [11] Tanaka Y, Watanabe J, Mogi Y. Monitoring of the microbial communities involved in the soy sauce manufacturing process by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis[J]. Food Microbiology, 2012, 31(1): 100-106
- [12] Yang WB. Microbiology Experiment[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004: 214-226 (in Chinese)
杨文博. 微生物学实验[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 214-226
- [13] Fu RM, Yu F, Chang HP, et al. Isolation, identification and characterization of an antagonistic bacterium against *Penicillium expansum*[J]. Microbiology China, 2016, 43(8): 1715-1724 (in Chinese)
付瑞敏, 于烽, 常慧萍, 等. 一株扩展青霉拮抗菌的分离、鉴定及抑菌活性物质[J]. 微生物学通报, 2016, 43(8): 1715-1724
- [14] Wang D. Catalytic kinetics of *Aspergillus oryzae* protease in high-salt environment and its application in soy sauce fermentation[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2013 (in Chinese)
王栋. 米曲霉蛋白酶在高盐环境的催化动力学及其在酱油酿造中的应用[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2013
- [15] Wei RX, Zhang L, Shi GY. Purification and characterization of a raw starch-digesting glucoamylase from *Aspergillus* sp. RSD[J]. Microbiology China, 2014, 41(1): 17-25 (in Chinese)
韦荣霞, 张梁, 石贵阳. *Aspergillus* sp. RSD 生淀粉糖化酶的分离纯化及酶学性质[J]. 微生物学通报, 2014, 41(1): 17-25
- [16] Ma R, Ouyang J, Li X, et al. Simultaneous determination of organic acids and saccharides in lactic acid fermentation broth from biomass using high performance liquid chromatography[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2012, 30(1): 62-66 (in Chinese)
马瑞, 欧阳嘉, 李鑫, 等. 高效液相色谱法同时测定生物质乳酸发酵液中有有机酸及糖类化合物[J]. 色谱, 2012, 30(1): 62-66
- [17] Yan LJ. Study on microorganism and technique for soy-sauce flavor improvement[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2008 (in Chinese)
严留俊. 改善酱油风味的微生物及工艺研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2008
- [18] Zhang JR, Fang F, Chen J, et al. Metabolism of ethyl carbamate precursors in soy sauce by *Zygosaccharomyces rouxii* ZQ02[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(6): 956-963 (in Chinese)
张继冉, 方芳, 陈坚, 等. 鲁氏接合酵母对酱油中氨基甲酸乙酯前体物的代谢[J]. 微生物学报, 2016, 56(6): 956-963
- [19] Heinrikson RL, Meredith SC. Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate[J]. Analytical Biochemistry, 1984, 136(1): 65-74
- [20] Feng YZ, Cui C, Zhao HF, et al. Effect of *koji* fermentation on generation of volatile compounds in soy sauce production[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2013, 48(3): 609-619
- [21] Feng YZ. The evolution and formation mechanism of key aroma compounds during the process of high-salt liquid fermentation

- soy sauce[D]. Guangzhou: Doctoral Dissertation of South China University of Technology, 2015 (in Chinese)
- 冯云子. 高盐稀态酱油关键香气物质的变化规律及形成机理的研究[D]. 广州: 华南理工大学博士学位论文, 2015
- [22] Zhang YJ. Study on flavor and physiological active of soy sauce[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang Gongshang University, 2012 (in Chinese)
- 张怡洁. 酱油的风味及其生理活性的研究[D]. 杭州: 浙江工商大学硕士学位论文, 2012
- [23] Wang YL, Wang CH, Ma Q, et al. Analysis of microorganisms and main flavor substance in first stage of soy sauce fermentation[J]. Food & Machinery, 2009, 25(4): 31-34 (in Chinese)
- 王远亮, 王传花, 马骞, 等. 酱油发酵前期微生物变化及其主要香味物质分析[J]. 食品与机械, 2009, 25(4): 31-34
- [24] Guan L, Cho KH, Lee JH. Analysis of the cultivable bacterial community in *jeotgal*, a Korean salted and fermented seafood, and identification of its dominant bacteria[J]. Food Microbiology, 2011, 28(1): 101-113
- [25] Sun CY, Li DH, Sun LJ. The function of enzymes in naturally fermented soybean paste and soybean sauce products[J]. China Food Additives, 2009(3): 164-169 (in Chinese)
- 孙常雁, 李德海, 孙莉洁. 传统酿造酱及酱油中酶系的作用[J]. 中国食品添加剂, 2009(3): 164-169
- [26] Leroy F, DeVuyst L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry[J]. Trends in Food Science & Technology, 2004, 15(2): 67-78
- [27] Liu JJ, Li DS, Hu Y, et al. Effect of a halophilic aromatic yeast together with *Aspergillus oryzae* in koji making on the volatile compounds and quality of soy sauce moromi[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2015, 50(6): 1352-1358
- [28] Wah TT, 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
- [29] Cui RY, Zheng J, Wu CD, et al. Effect of different halophilic microbial fermentation patterns on the volatile compound profiles and sensory properties of soy sauce moromi[J]. European Food Research and Technology, 2014, 239(2): 321-331

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于 1974 年, 月刊, 是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办, 国内外公开发行, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、微生物蛋白质组、微生物功能基因组、微生物工程与药物等领域的最新研究成果, 产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究改革等。

本刊为中文核心期刊。曾获国家优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 北京优秀科技期刊奖, 被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

据中国科学技术信息研究所信息统计, 本刊 2012、2013、2014、2015 年以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一名而连续 4 年获得“百种中国杰出学术期刊奖”, 并入选 300 种“中国精品科技期刊”, 成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。2014 年获得中国科学院科技期刊三等出版基金资助; 2015 年获得中国科协精品科技期刊工程项目资助。

欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买, 2017 年每册定价 80 元, 全年 960 元, 我们免邮费寄刊。

邮购地址: (100101)北京朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: M413