

甘氨酸甜菜碱及复合纤维素酶对酱油发酵的影响

魏鲁宁¹, 李芬芳², 胡文锋^{1*}, 吴惠玲³, 周朝晖³, 李铁桥³, 韩春³, 黄早成³, 陈永泉¹

(1.华南农业大学食品学院生物工程系应用微生物研究室, 广州 五山 510642; 2.中国热带农业科学院海口实验站, 海南 海口 570102; 3. 珠江桥生物科技股份有限公司, 广东 中山 528415)

摘 要: 在高盐稀态酱油发酵过程中, 由于受高渗胁迫的影响, 微生物及酶的活性都很低, 这是导致原料转化率低, 发酵周期长的原因之一。甘氨酸甜菜碱是微生物在高渗环境合成的一种相容性溶质, 可以缓解高渗环境对微生物或酶的胁迫作用, 提高其抗高渗能力, 从而维持微生物的生长以及酶的活性。将甘氨酸甜菜碱作为渗透压保护剂, 于酱醪上罐时(0d)或酱醪发酵30d后添加到高盐稀态酱油发酵的酱醪中, 同时添加外源复合纤维素酶, 观察其对酱醪发酵的影响。结果显示: 在酱醪上罐时(0d)或酱醪发酵30d后同时添加不同质量分数的甘氨酸甜菜碱(0.20%、0.30%)及质量分数0.15%的复合纤维素酶(105 EGu/100g 酱醪), 均能有效提高发酵酱油中蛋白质转化率, 达2.26%~7.92%。添加甘氨酸甜菜碱能显著改善高盐稀态发酵酱油头油品质, 平均缩短发酵时间15d左右; 另外, 在酱醪发酵30d后再添加甘氨酸甜菜碱和外源复合纤维素酶其效果更佳, 同0d时添加相比, 蛋白质转化率平均提高3.17%。

关键词: 高盐稀态酱油; 相容性溶质; 甘氨酸甜菜碱; 复合纤维素酶; 蛋白质转化率; 发酵周期

Effect of Glycine Betaine and Complex Cellulase on the Fermentation of Soy Sauce

WEI Lu-ning¹, LI Fen-fang², HU Wen-feng^{1*}, WU Hui-ling³, ZHOU Zhao-hui³, LI Tie-qiao³, HAN Chun³, HUANG Zao-cheng³, CHEN Yong-quan¹

(1. Lab of Applied Microbiology, College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642;
2. Institute of Banana and Plantain of Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 570102;
3. Pearl River Bridge Biotechnology Co., Ltd, Zhongshan 528415)

*Correspondence Author: wfhu@scau.edu.cn

Abstract: The microorganisms and inherent or exogenous enzymes have very low activity because of high osmotic pressure during the traditional fermentation of high-salt liquid state soy sauce, which results in the low conversion rate of raw materials and the long term fermentation period. Glycine betaine is one of the compatible solutes synthesized by microorganisms under high osmotic pressure environment which protects the microorganisms and enzymes. Glycine betaine was used in different periods (0d or 30d) in the fermentation of high-salt liquid state soy sauce to protect microorganisms and external complex cellulase. The experimental results showed that adding 0.20% or 0.30% glycine betaine with 0.15% complex cellulase (105 EGu/100g sauce mash) simultaneously at 0d or 30d later of soy sauce fermentation could obviously improve protein conversion rate by 2.26% ~ 7.92%. Glycine betaine could improve the quality of soy sauce effectively, and shorten the fermentation period by 15ds. In contrast with the group that was added with glycine betaine and complex cellulase simultaneously at 0d, adding at 30d later could improve protein conversion rate by about 3.17%.

Key words: high-salt liquid state soy sauce; compatible solutes; glycine betaine; complex cellulase; protein conversion rate; 项目基金: 中山市科技局产学研项目(2009CXY027)。

作者简介: 魏鲁宁(1986.01-), 汉族, 男, 在读硕士研究生, 从事应用微生物研究。Email: luning851202@163.com

*通讯作者: 胡文锋(1964.05-), 汉族, 男, 博士, 副教授, 从事应用微生物学研究。Email: wfhu@scau.edu.cn

fermentation period

中图分类号: TS 264

文献标识码: A

文章编号:

传统的酿制酱油除作为调味品外,还具有保健功能,如抗氧化、抗癌、降血压、杀菌等作用^[1]。目前我国高档酱油发酵工艺主要以高盐稀态发酵为主,利用霉菌制曲后在高盐环境下经长期发酵而成,通过微生物以及各种酶系的共同作用,进行生化反应,如蛋白质水解、淀粉的糖化、酒精发酵和有机酸发酵等^[2]。但在高盐稀态环境中,渗透压高,微生物代谢活性或酶活力很低,从而导致发酵周期长、蛋白质利用率低,以及氨基酸态氮出品率低。因此提高发酵微生物或酶的活性是目前酱油发酵工艺研发热点。

近年来,国内外专家就如何提高高盐稀态发酵蛋白质转化率和缩短发酵周期做了大量研究,如利用固定化细胞工艺使酱油的理化分析值符合传统酿造酱油标准,酱油风味有较明显改善^[3]。但 Catrinus van der Sluis 等^[4]人也曾报道,将固定化酵母菌应用于高盐稀态酱油发酵,对改善各品质指标、提高蛋白质转化率及缩短发酵周期的作用并不明显。

另外,外源添加酶制剂亦能有效改善高渗环境下蛋白或淀粉原料的水解作用,利于后酿产香微生物的生长繁殖。史龙君研究了不同纤维素酶添加量(0.125%、1.25%)对低盐固态酱油发酵的影响,结果显示,试验组发酵 72 h 的酱醅氨基酸态氮含量接近空白对照组 96 h 发酵水平;且仅添加 0.125% 纤维素酶,氨基酸态氮含量较空白对照组提高近 3.17%^[5]。相关研究亦表明,于酱醅发酵不同阶段添加不同量纤维素酶,其对酱醅发酵的影响呈现不同水平;但可以看出,添加纤维素酶有利于提高酱油生产中蛋白质利用率的提高,缩短发酵周期^[6]。但未见在高盐稀态酱油发酵过程添加纤维素酶的报道和专利。

高渗环境中的微生物,在长期的进化过程中形成了独特的渗透调节系统以对抗高渗环境的胁迫作用。在高渗环境中,微生物体内能迅速积累一些小分子物质作为渗透压保护剂,亦称作“相容性溶质”(compatible solutes)^[7-8]。相容性溶质是一类在生理 pH 范围内不带电荷、极性、易溶的小分子有机物质,能与微生物内体系相容而又不影响其他大分子的正常生理功能。目前发现的存在于中度嗜盐菌中的相容性溶质包括海藻糖、四氢嘧啶、甘油和甘氨酸甜菜碱等^[9-10]。其中甘氨酸甜菜碱(Glycine betaine, N,N,N-trimethyl glycine)不仅存在于细菌,也存在于真菌、动植物体内,主要富集于细胞质中,是一种无毒害渗透压调节剂。另外,甘氨酸甜菜碱亦能稳定高渗环境下生物大分子与细胞膜结构,维持酶结构及功能的稳定性,减少高渗透压胁迫对酶活性的影响^[11-12]。

我们已经研究了甘氨酸甜菜碱对高盐胁迫下乳酸菌生长性能的影响(胡文锋等,2012,未发表,但已被《食品科学》接收),结果表明甘氨酸甜菜碱的确能改善乳酸菌对高盐胁迫的耐受性,改善其生长性能。本研究在前期研究基础上,向高盐稀态酱油发酵阶段同时添加一定量的甘氨酸甜菜碱与外源复合纤维素酶,充分发挥相容性溶质对酶的保护作用,提高外源或固有酶耐盐性能,提高酶活力,从而改善高盐稀态酱油发酵蛋白质转化率并缩短发酵周期。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与设备

1.1.1 原料

黄豆成曲、粗盐:由广东珠江桥生物科技股份有限公司提供。

1.1.2 试剂

复合纤维素酶,诺维信(中国)生物技术有限公司提供;食品级,木霉属真菌(*Trichoderma reesei*)的菌株经液态深层发酵而生成的液态纤维素酶制剂,密度约为 1.2 g/ml,产品酶活力 700 EGu/g,EGu=内葡聚糖酶单位。主要由纤维素酶、果胶酶及半纤维素酶组成。

甘氨酸甜菜碱(食品级,99%),芬兰出品,日本丸红集团代理。

1.1.3 主要仪器与设备

酸度计,GB204型,8-14.5V、5W,瑞典Mettler Toledo公司;752型紫外可见分光光度计,中国上海精密仪器有限公司;凯氏定氮仪,FOSS Scino KT206 & DT208,丹麦福斯集团公司;磁力搅拌器,MS300型,上海般特仪器有限公司。

1.2 试验设计

1.2.1 酱醪上罐时只添加甘氨酸甜菜碱

在酱醪上罐时添加质量分数0.20%甘氨酸甜菜碱于酱醪中。

1.2.2 酱醪上罐时只添加外源复合纤维素酶

在酱醪上罐时添加质量分数 0.15% 复合纤维素酶于酱醪中（酶活力，105 EGu/100g 酱醪）。

1.2.3 不同时间同时添加甘氨酸甜菜碱和复合纤维素酶

在酱醪上罐时（0d）或上罐发酵 30d 后添加质量分数 0.20% 的甘氨酸甜菜碱与 0.15% 的复合纤维素酶（酶活力，105 EGu/100g 酱醪）。

1.2.4 甘氨酸甜菜碱不同添加量

在酱醪上罐时（0d）或上罐发酵 30d 后添加不同量的甘氨酸甜菜碱。甘氨酸甜菜碱的添加量分别为 0.20%、0.30%，以及 0.15% 的复合纤维素酶（酶活力，105 EGu/100g 酱醪）。

分别测定以上四组在发酵过程中各品质指标的变化，以及发酵结束后头油总酸、氨基酸态氮、全氮含量，并计算氨基酸态氮生成率与蛋白质转化率。

1.2.5 试验分组

酱醪上罐时（0d）仅添加甘氨酸甜菜碱或外源复合纤维素酶，或同时添加甘氨酸甜菜碱与复合纤维素酶为 ZJ 组。ZJ1 添加质量分数 0.30% 甘氨酸甜菜碱与 0.15% 的外源复合纤维素酶（酶活力，105 EGu/100g 酱醪）；ZJ2 组添加质量分数 0.20% 甘氨酸甜菜碱与 0.15% 的外源复合纤维素酶（酶活力，105 EGu/100g 酱醪）；ZJ3 组只添加质量分数 0.20% 甘氨酸甜菜碱；ZJ4 添加 0.15% 外源复合纤维素酶（酶活力，105 EGu/100g 酱醪）。

发酵 30d 后添加为 GB 组。GB1 添加质量分数 0.30% 甘氨酸甜菜碱与 0.15% 的外源复合纤维素酶（酶活力，105 EGu/100g 酱醪）；GB2 添加质量分数 0.20% 甘氨酸甜菜碱与 0.15% 的外源复合纤维素酶（酶活力，105 EGu/100g 酱醪）。

同时设空白对照组（CK）。每组三个平行。试验分组如表 1。

表 1 试验分组

分组编号	酱醪上罐时 (0d)		分组编号	酱醪发酵 30d	
	甘氨酸甜菜碱 (%)	复合纤维素酶 (%)		甘氨酸甜菜碱 (%)	复合纤维素酶 (%)
ZJ1	0.30	0.15	GB1	0.30	0.15
ZJ2	0.20	0.15	GB2	0.20	0.15
ZJ3	0.20	0			
ZJ4	0	0.15	CK	0	0

1.3 方法

1.3.1 酱醪制备与发酵

煮熟的黄豆经米曲霉发酵制成酱曲，与 18 波美度盐水（约 3.5 mol/L NaCl）按 1:2.3~2.5 的比例混合均匀，转入 20 L 的白色塑料桶制成酱醪^[13]。按试验设计分组处理。发酵初期每隔一定时间进行淋油，10d 后盖透明玻璃放置楼顶晒油，发酵 60-105d 后滤出头油，测定头油中氨基酸态氮、总酸及全氮含量，并计算氨基态氮生成率及蛋白质转化率。

1.3.2 测定方法

总酸与氨基酸态氮检测按照 GB/T5009.39-2003 方法进行^[14]。

全氮的检测按照 GB/T5009.5-2003 方法进行^[15]。

2 结果与分析

2.1 酱醪发酵过程各品质指标变化

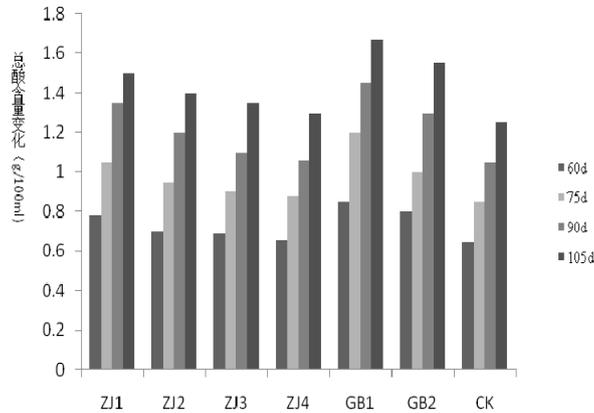


图 1 酱醪发酵过程总酸变化

Fig. 1 Time course of total acids content during soy sauce mash fermentation process

ZJ1, 酱醪上罐时 (0d) 添加质量分数 0.30% 甘氨酸甜菜碱+0.15% 复合纤维素酶; ZJ2, 0d 时添加 0.20% 甘氨酸甜菜碱+0.15% 复合纤维素酶; ZJ3, 0.20% 甘氨酸甜菜碱; ZJ4, 0.15% 复合纤维素酶。GB1, 酱醪发酵 30d 后添加 0.30% 甘氨酸甜菜碱+0.15% 复合纤维素酶; GB2, 30d 后添加 0.20% 甘氨酸甜菜碱+0.15% 复合纤维素酶。CK, 空白对照。

图 1 为酱醪发酵过程总酸变化。由图 1 可以看出, 除只添加复合纤维素酶 (ZJ4) 外, 其他各处理的总酸含量均高于空白对照组。

0d 仅添加甘氨酸甜菜碱 (ZJ3) 其总酸含量较空白对照组提高的幅度并不显著, 发酵周期相近; 同时添加甘氨酸甜菜碱与复合纤维素酶 (ZJ1 和 ZJ2), 发酵至 75d 时测得总酸生成量分别为 1.05 g/100ml 和 0.95 g/100ml, 与空白对照组 90d 时生成量 1.05 g/100ml 相比, 平均提前 15d 左右达到相同水平。

发酵 30d 后同时添加甘氨酸甜菜碱与复合纤维素酶 (GB) 发酵至 75d 时, 总酸含量分别为 1.20 g/100ml 和 1.00 g/100ml, 空白对照 90d 才达到 1.05 g/100ml, 平均提前 20d 左右达到相同水平; 此外, 比 0d 时添加 (ZJ) 提前 10d 左右达到 1.20 g/100ml; 且添加 0.30% 甘氨酸甜菜碱 (ZJ1 和 GB1) 较添加 0.20% 试验组 (ZJ2 和 GB2) 总酸含量更高, 约提前 15d 达到相同水平。

以上试验结果表明, 在酱醪中添加甘氨酸甜菜碱能改善产酸性能, 且随着甘氨酸甜菜碱添加量的提高, 总酸生成水平更高, 产生速度更快。

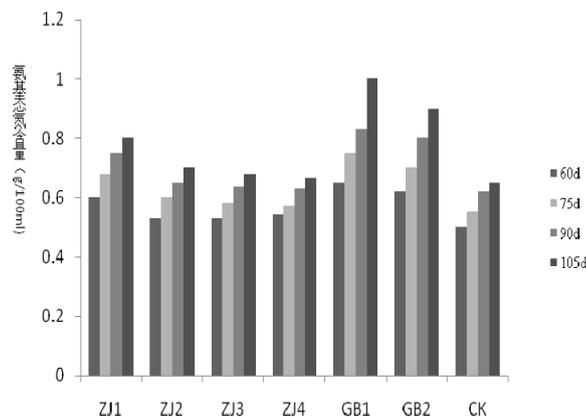


图 2 酱醪发酵过程氨基酸态氮含量变化

Fig. 2 Time course of amino acid nitrogen content during soy sauce mash fermentation process

ZJ1, 酱醪上罐时 (0d) 添加质量分数 0.30% 甘氨酸甜菜碱+ 0.15% 复合纤维素酶; ZJ2, 0d 时添加 0.20% 甘氨酸甜菜碱+ 0.15% 复合纤维素酶; ZJ3, 0.20% 甘氨酸甜菜碱; ZJ4, 0.15% 复合纤维素酶。GB1, 酱醪发酵 30d 后添加 0.30% 甘氨酸甜菜碱+ 0.15% 复合纤维素酶; GB2, 30d 后添加 0.20% 甘氨酸甜菜碱+ 0.15% 复合纤维素酶。CK, 空白对照。

图 2 为酱醪发酵过程氨基酸态氮含量变化。由图 2 可知, 0d 时只添加甘氨酸甜菜碱 (ZJ3) 或外源复合纤维素酶 (ZJ4), 其氨基酸态氮含量较空白对照组提高的幅度并不明显; 同时添加甘氨酸甜菜碱与复合纤维素酶 (ZJ1 和 ZJ2), 发酵至 75d 时氨基酸态氮生成量分别为 0.68 g/100ml 和 0.60 g/100ml, 空白对照组 90d 时为 0.62 g/100ml, 平均提前 15d 左右达到相同水平。

发酵 30d 后同时添加甘氨酸甜菜碱与复合纤维素酶 (GB), 60d 时氨基酸态氮生成量分别为 0.65 g/100ml 和 0.62 g/100ml, 空白对照组 90d 时生成量 0.62 g/100ml, 平均提前 30d 左右达到相同水平; 较 0d 时添加 (ZJ) 提前 15d 左右达到 0.66 g/100ml。以上结果与李丹、赵谋明等人报道相吻合^[16]。此外, 添加 0.30% 甘氨酸甜菜碱 (ZJ1 和 GB1) 较添加 0.20% 试验组 (ZJ2 和 GB2) 氨基酸态氮含量更高, 并提前 15d 左右达到相同水平。

以上试验结果表明, 在酱醪中同时添加甘氨酸甜菜碱与复合纤维素酶有效提高了氨基酸态氮的生成水平和速度。并且, 随着甘氨酸甜菜碱添加量的提高, 氨基酸态氮的生成速度和总量更高。

2.2 甘氨酸甜菜碱对酱油头油各品质指标的影响

2.2.1 头油总酸含量

在酱油酿制过程中由于乳酸菌和其他微生物的共同作用, 酱油中会形成多种有机酸, 主要为乳酸, 其次是醋酸, 另外还会有少量的丙酮酸、琥珀酸、乙酰丙酸等有机酸。多种有机酸在形成酱油酸味及酱油后熟发酵中生成更为复杂的风味物质起到了重要的作用^[17]。

发酵酱油头油总酸含量如图 3 所示。

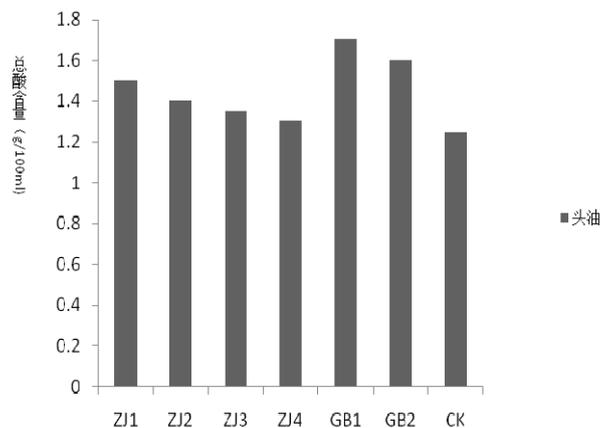


图 3 各试验组头油总酸含量

Fig. 3 Total acid content of the first sauce of each group

ZJ1, 酱醪上罐时 (0d) 添加质量分数 0.30% 甘氨酸甜菜碱+ 0.15% 复合纤维素酶; ZJ2, 0d 时添加 0.20% 甘氨酸甜菜碱+ 0.15% 复合纤维素酶; ZJ3, 0.20% 甘氨酸甜菜碱; ZJ4, 0.15% 复合纤维素酶。GB1, 酱醪发酵 30d 后添加 0.30% 甘氨酸甜菜碱+ 0.15% 复合纤维素酶; GB2, 30d 后添加 0.20% 甘氨酸甜菜碱+ 0.15% 复合纤维素酶。CK, 空白对照。

由图 3 可以看出, 各试验组头油总酸含量均高于空白对照组, 各试验组 ZJ1、ZJ2、ZJ3、ZJ4、GB1 与 GB2 头油总酸含量分别为 1.50 g/100ml、1.40 g/100ml、1.35 g/100ml、1.30 g/100ml、1.70 g/100ml 和 1.60 g/100ml, 较空白对照组 1.25 g/100ml 提高了 4.00%-36.00%。

酱醪上罐时(0d)同时添加甘氨酸甜菜碱与外源复合纤维素酶(ZJ2),较单独添加甘氨酸甜菜碱或外源复合纤维素酶(ZJ3或ZJ4)头油总酸含量分别提高3.70%和7.69%;另外,添加0.30%甘氨酸甜菜碱(ZJ1与GB1)与添加0.20%(ZJ2与GB2)相比,总酸含量平均提高6.70%。

发酵30d后同时添加甘氨酸甜菜碱与复合纤维素酶(GB),较0d添加(ZJ1与ZJ2),头油总酸含量平均提高13.81%,效果更显著。

正常情况下,高盐稀态酱油中有机酸的含量不高,除微生物的转化活性不高外,有机酸与酱油中所含的醇类等发生酯化反应生成香味物质有关,所以酱油的酸味并不明显。而且,有机酸过多会严重影响酱油的风味,研究表明,发酵过程中总酸含量超过2%时会抑制酵母菌生长繁殖,产生拮抗作用;也会引起酱油体态变薄口味变酸等问题^[18];因此,在发酵过程中,应控制发酵工艺,使其适度^[19]。以上试验数据显示,试验组比对照组产酸速度大大提高,但总酸含量并没有超过普遍认可的上限2%,所以不会对酱油的品质和风味造成负面影响。

2.2.2 头油氨基酸态氮及全氮含量

氨基酸态氮含量的高低可以反映出酱油鲜味的程度,也是评价酱油质量的标准之一。按照我国酿造酱油配兑要求,酱油头油中氨基酸态氮含量不低于0.40 g/100ml^[20]。图4为酱油头油氨基酸态氮含量。

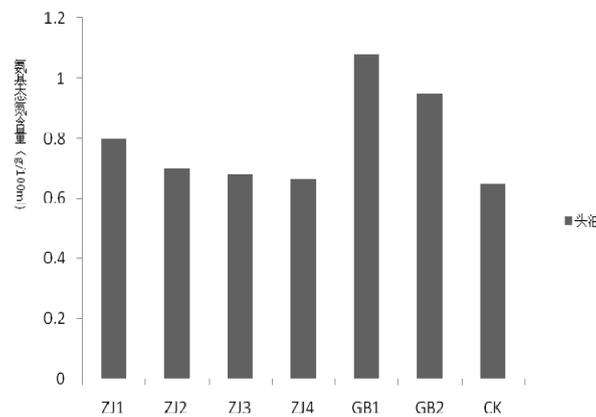


图4 各试验组头油氨基酸态氮含量

Fig. 4 The amino acid nitrogen content of the first sauce of each group

ZJ1, 酱醪上罐时(0d)添加质量分数0.30%甘氨酸甜菜碱+0.15%复合纤维素酶; ZJ2, 0d时添加0.20%甘氨酸甜菜碱+0.15%复合纤维素酶; ZJ3, 0.20%甘氨酸甜菜碱; ZJ4, 0.15%复合纤维素酶。GB1, 酱醪发酵30d后添加0.30%甘氨酸甜菜碱+0.15%复合纤维素酶; GB2, 30d后添加0.20%甘氨酸甜菜碱+0.15%复合纤维素酶。CK, 空白对照。

由图4可知,与空白对照相比,各处理组头油中氨基酸态氮含量均有所提高;各试验组ZJ1、ZJ2、ZJ3、ZJ4、GB1与GB2头油氨基酸态氮含量分别为0.80 g/100ml、0.70 g/100ml、0.68 g/100ml、0.66 g/100ml、1.08 g/100ml和0.95 g/100ml,较空白对照组0.65 g/100ml提高了2.31%-66.15%;

酱醪上罐时(0d)同时添加0.20%甘氨酸甜菜碱与0.15%外源复合纤维素酶(ZJ2),较单独添加甘氨酸甜菜碱或外源复合纤维素酶(ZJ3或ZJ4)头油氨基酸态氮生成量分别提高2.94%和5.26%;另外,添加0.30%甘氨酸甜菜碱(ZJ1与GB1)与添加0.20%(ZJ2与GB2)相比,氨基酸态氮生成量平均提高13.99%。发酵30d后同时添加甘氨酸甜菜碱与复合纤维素酶(GB),较0d添加(ZJ1与ZJ2)更能提高头油中氨基酸态氮含量,平均提高35.36%。

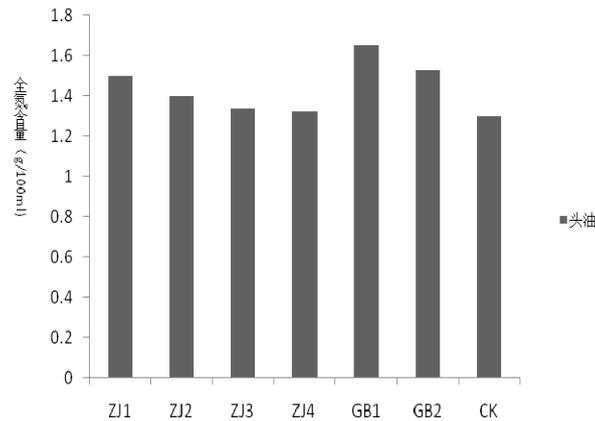


图 5 各试验组头油全氮含量

Fig. 5 The total nitrogen content of the first sauce in each group

ZJ1, 酱醪上罐时 (0d) 添加质量分数 0.30% 甘氨酸甜菜碱+ 0.15% 复合纤维素酶; ZJ2, 0d 时添加 0.20% 甘氨酸甜菜碱+ 0.15% 复合纤维素酶; ZJ3, 0.20% 甘氨酸甜菜碱; ZJ4, 0.15% 复合纤维素酶。GB1, 酱醪发酵 30d 后添加 0.30% 甘氨酸甜菜碱+ 0.15% 复合纤维素酶; GB2, 30d 后添加 0.20% 甘氨酸甜菜碱+ 0.15% 复合纤维素酶。CK, 空白对照。

头油的全氮含量间接反映了发酵原料中蛋白质的利用水平。由图 5 可知, 各试验组头油中全氮含量均高于空白对照组; 各试验组 ZJ1、ZJ2、ZJ3、ZJ4、GB1 与 GB2 头油全氮含量分别为 1.50 g/100ml、1.40 g/100ml、1.34 g/100ml、1.33 g/100ml、1.65 g/100ml 和 1.53 g/100ml, 较空白对照组 1.30 g/100ml 提高了 2.31%~26.92%;

酱醪上罐时 (0d) 同时添加甘氨酸甜菜碱与外源复合纤维素酶 (ZJ2), 较单独添加甘氨酸甜菜碱或外源复合纤维素酶 (ZJ3 或 ZJ4) 头油全氮含量分别提高 4.48 % 和 5.66 %; 另外, 添加 0.30% 甘氨酸甜菜碱 (ZJ1 与 GB1) 与添加 0.20% (ZJ2 与 GB2) 相比, 全氮含量平均提高 7.64%。发酵 30d 后同时添加甘氨酸甜菜碱与复合纤维素酶 (GB), 较 0d 添加 (ZJ1 与 ZJ2) 头油中全氮含量更高, 平均提高 9.64%。

上述结果表明, 各处理组均能提高头油中各品质指标, 并有效缩短发酵周期。说明在高渗条件下, 甘氨酸甜菜碱能保护微生物以及酶活性。

2.3 头油氨基酸态氮生成率

人们普遍认为, 酱油氨基酸态氮含量越高, 说明分解越好, 味道越鲜, 酱油的品质越佳。

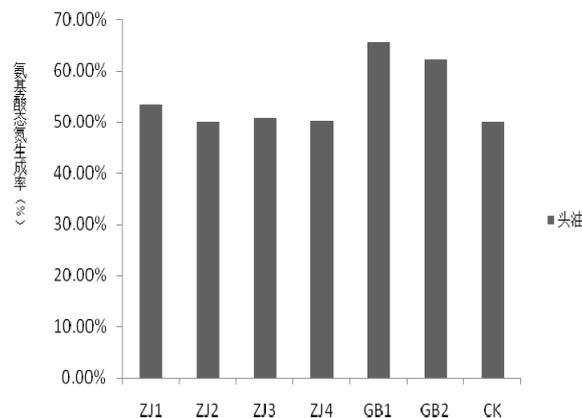


图 6 各试验组头油中氨基酸态氮生成率

Fig. 6 The amino nitrogen producing ratio of the first sauce in each group

ZJ1, 酱醪上罐时 (0d) 添加质量分数 0.30% 甘氨酸甜菜碱+ 0.15% 复合纤维素酶; ZJ2, 0d 时添加 0.20% 甘氨酸甜菜碱+ 0.15% 复合纤维素酶; ZJ3,

0.20%甘氨酸甜菜碱；ZJ4，0.15%复合纤维素酶。GB1，酱醪发酵30d后添加0.30%甘氨酸甜菜碱+0.15%复合纤维素酶；GB2，30d后添加0.20%甘氨酸甜菜碱+0.15%复合纤维素酶。CK，空白对照。

由图6可知，与空白对照组50%的氨基酸态氮生成率相比，0d时单独添加甘氨酸甜菜碱（ZJ3）或复合纤维素酶（ZJ4）头油氨基酸态氮生成率较空白对照组分别提高0.74%和0.19%，差异不明显；同时添加甘氨酸甜菜碱与外源复合纤维素酶（ZJ1、ZJ2与GB）较空白对照组分别提高了1.67%和13.77%。史龙君^[5]研究结果显示，与空白对照组相比，于酱油发酵过程中添加0.125%纤维素酶，氨基酸态氮生成率仅提高0.78%；当纤维素酶量增至1.25%，酱油氨基酸态氮转化率提高近5.78%。本试验的单独添加纤维素酶或甘氨酸甜菜碱，影响皆不显著，与他们的结果相符；但同时添加甘氨酸甜菜碱与外源纤维素酶试验组显著优于先前报道，说明外源添加相容性溶质能有效保护纤维素酶活力。

另外，添加0.30%甘氨酸甜菜碱（ZJ1与GB1）与添加0.20%（ZJ2与GB2）相比，氨基酸态氮生成率平均提高3.35%；发酵30d后同时添加甘氨酸甜菜碱与复合纤维素酶（GB），较0d添加（ZJ1与ZJ2）更能有效提高氨基酸态氮生成率，平均提高12.10%。

2.4 头油蛋白质转化率

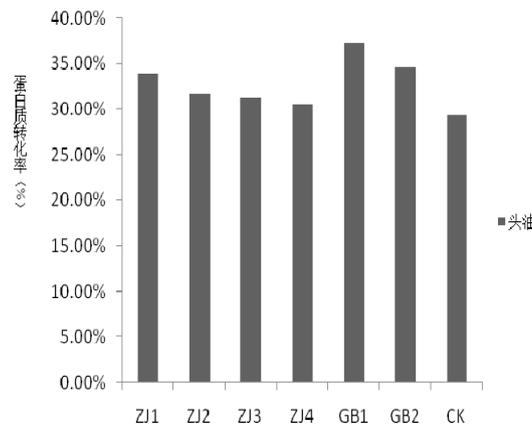


图7 各试验组头油蛋白质转化率

Fig. 7 The protein conversion ratio of the first sauce in each group

ZJ1，酱醪上罐时（0d）添加质量分数0.30%甘氨酸甜菜碱+0.15%复合纤维素酶；ZJ2，0d时添加0.20%甘氨酸甜菜碱+0.15%复合纤维素酶；ZJ3，0.20%甘氨酸甜菜碱；ZJ4，0.15%复合纤维素酶。GB1，酱醪发酵30d后添加0.30%甘氨酸甜菜碱+0.15%复合纤维素酶；GB2，30d后添加0.20%甘氨酸甜菜碱+0.15%复合纤维素酶。CK，空白对照。

由图7可知，各试验组ZJ1、ZJ2、ZJ3、ZJ4、GB1和GB2头油蛋白质转化率均高于空白对照组，分别为33.93%、31.66%、31.21%、30.57%、37.32%和34.60%，较空白对照组29.40%提高了1.17%~7.92%。云秀芳等人^[6]研究了不同阶段添加不同量纤维素酶对酱油发酵的影响，结果显示，不同阶段添加不同量纤维素酶可有效提高酱油头油中蛋白质转化率，幅度达1.55%~9.53%；史龙君^[5]研究结果显示，添加不同量纤维素酶均能有效提高蛋白质转化率，最高达8.1%。本试验研究结果与史龙君、云秀芳等人前期研究结果基本相符，但在纤维素酶添加量一定的情况下，外源添加相容性溶质能有效保护添加酶活力，从而改善原料利用水平，提高转化率。

0d时同时添加甘氨酸甜菜碱与复合纤维素酶（ZJ2）较单独添加甘氨酸甜菜碱或复合纤维素酶（ZJ3、ZJ4），其蛋白质转化率分别提高0.45%和1.09%；且添加0.30%甘氨酸甜菜碱与复合纤维素酶（ZJ1与GB1）较添加0.20%试验组（ZJ2与GB2）蛋白质转化率平均提高2.50%；酱醪发酵30d后添加甘氨酸甜菜碱（GB1、GB2）其蛋白质转化率较0d时添加（ZJ1、ZJ2）平均提高3.17%。

3 结论

在酱醪上罐(0d)时仅添加甘氨酸甜菜碱或外源纤维素酶于高盐稀态酱醪中,较空白对照组酿造酱油头油中各品质指标含量、氨基酸态氮生成率、蛋白质转化率提高幅度较小,发酵周期缩短亦不明显。

同空白对照相比,酱醪上罐时(0d)或发酵30d后同时添加甘氨酸甜菜碱与外源复合纤维素酶,能提高酿造酱油中各品质指标含量,缩短发酵周期,有效提高氨基酸态氮生成率与蛋白质转化率。且随着甘氨酸甜菜碱添加量的增加,作用效果更显著;同时,在酱醪上罐30d后添加较0d时添加效果更佳。

于高盐稀态酱醪发酵中,添加一定量生物相容性溶质能有效保护外源酶活力,改善发酵原料利用率,从而提高酱醪发酵各指标含量,缩短酿造周期;另外,随着发酵时间的延长,酶活力显著降低,于酱醪发酵后期添加甘氨酸甜菜碱等相容性溶质对酱醪发酵影响更为明显。

本文对甘氨酸甜菜碱等相容性溶质对高盐稀态酱油发酵的影响做了初步的研究,对发酵微生物的作用及酶的保护机制,以及对酱油风味物质的影响等需要进一步深入研究,本课题组将相继报道。

参考文献:

- [1] LIOE HN, SELAMAT J, YASUDA M. Soy Sauce and Its Umami Taste: a Link from the Past to Current Situation [J]. The society for food science and technology,2010,75(3): 71-75.
- [2] 郑剑明. 酱油发酵工艺条件的探讨[J]. 中国调味品,2002,8(03): 11-13.
- [3] 赵德安.应用固定化细胞改善酱油风味的探讨[J]. 江苏调味副食品,2006, 23(3): 7-8.
- [4] SLUIS CVD, TRAMPER J, WIJFFELS RH. Enhancing and accelerating flavour formation by salttolerant yeasts in Japanese soy-sauce processes[J].Journal of biotechnology,2001, (12): 322-327.
- [5] 史龙君. 纤维素酶在酱油那酿造上的应用研究[J]. 2008,(9): 61-64.
- [6] 云秀芳. 纤维素酶在酱油生产中的应用研究[J]. 2001,(3): 15-19.
- [7] LIU Jia, WISNIEWSKI M, DROBY S, et al. Glycine betaine improves oxidative stress tolerance and biocontrol efficacy of the antagonistic yeast *Cystofilobasidium infirmominium*[J]. International Journal of food microbiology,2011,146: 76-83.
- [8] CHEN THH, MURATA N. Glycine betaine protects plants against abiotic stress mechanisms and biotechnological application[J]. Plant, Cell and Environment,2011,34: 1-20.
- [9] 赵百锁, 杨礼富, 王磊, 等. 中度嗜盐菌相容性溶质机制的研究进展[J]. 微生物学报, 2007,47(5): 937-941.
- [10] KLAHN S, HAGEMANN M. Compatible solute biosynthesis in cyanobacteria[J]. Environmental microbiology,2011,13(3): 551-562.
- [11] 徐保红, 杨洁. 甘氨酸甜菜碱与植物抗胁迫能力[J]. 新疆大学学报, 2008, 25(3): 349-352.
- [12] PONTIS HG, VARGAS WA, SALEMO GL. Structural characterization of the members of a polymer series, compatible solutes in *Anabaena* cells exposed to salt stress[J]. Plant science,2007,(172): 29-35.
- [13] 行业标准: SB/T 10312-1999,高盐稀态发酵酱油酿造工艺规程[S].
- [14] 国家标准: GB/T 5009.39 -2003,酱油卫生标准的分析方法[S].
- [15] 国家标准: GB 18186-2000,中华人民共和国国家标准-酿造酱油[S].
- [16] 李丹, 崔春, 王娅琴, 等. 高盐稀态酱油酿造过程中蛋白质降解规律的研究[J]. 食品与发酵工业,2010,36(9): 24-28.
- [17] 杨汝德, 潘力, 郭迪. 耐高渗压乳酸菌在酱油酿造中的应用研究[J]. 现代食品科技, 2008,21(4): 37-40.
- [18] 林祖申.提高低盐固态发酵酱油质量风味的研究与探讨[J]. 中国酿造,2001,(6): 1-16.
- [19] 贾爱娟, 李志西. 提高高盐稀态法酿造酱油原料蛋白质利用率及氨基酸出品率的研究[D]. 西北农林科技大学学报, 2006: 5-6.
- [20] 高士昌, 刘士民. 准确检验头油氨基酸态氮含量的重要作用[J]. 中国调味品, 2004, (8): 44-48.