

酿造酱油中米曲霉及蛋白酶的研究进展

张霖靖^{1,2}, 侯莎^{2,3}, 高苏娟¹, 屈春云¹, 白卫东¹, 刘功良^{1*}

(1. 仲恺农业工程学院 广东省岭南特色食品科学与技术重点实验室, 农业农村部岭南特色食品绿色加工与智能制造重点实验室, 现代农业工程创新研究院, 轻工食品学院, 广东 广州 510225; 2. 广东海天创新技术有限公司, 广东 佛山 528000; 3. 广东省酿造微生物育种与发酵工程技术研究中心, 广东 佛山 528000)

摘要: 酱油是一种液体调味品, 主要以大豆或豆粕为原料, 辅以小麦或麸皮, 通过微生物的代谢作用发酵而成的。在发酵过程中, 多种微生物群落及分泌的酶系相互作用, 特别是米曲霉及其分泌的蛋白酶系分解原料中的蛋白, 生成氨基酸、小分子肽等, 赋予酱油独特的色、香、味。该文重点对酱油发酵过程中的米曲霉及其分泌的蛋白酶进行综述, 旨在为选育米曲霉菌株、提高原料利用率及酱油品质提供借鉴。

关键词: 酿造酱油; 微生物多样性; 米曲霉; 蛋白酶; 酱油品质

Research Progress on *Aspergillus oryzae* and Protease in Fermented Soy Sauce

ZHANG Linjing^{1,2}, HOU Sha^{2,3}, GAO Sujuan¹, QU Chunyun¹, BAI Weidong¹, LIU Gongliang^{1*}

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Lingnan Specialty Food Science and Technology, Key Laboratory of Green Processing and Intelligent Manufacturing of Lingnan Specialty Food, Ministry of Agriculture, Academy of Contemporary Agricultural Engineering Innovations, College of Food Science and Technology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, Guangdong, China; 2. Guangdong Haitian Innovation Technology Co., Ltd., Foshan 528000, Guangdong, China; 3. Guangdong Provincial Research Center of Brewing Microbiology Breeding and Fermentation Engineering Technology, Foshan 528000, Guangdong, China)

Abstract: Soy sauce is a liquid condiment made of soybean or soybean meal as raw materials, supplemented by wheat or bran, and fermented by the metabolic action of microorganisms. During the fermentation process, a variety of microbial communities interact with secreted enzyme systems. This interaction occurs especially between *Aspergillus oryzae* and its secreted protease systems, leading to the breakdown of proteins in the raw materials and the production of amino acids, small molecular peptides, and other compounds. Ultimately, this process contributes to the unique color, aroma, and taste of soy sauce. This paper reviewed the research on *A. oryzae* and its secreted protease during soy sauce fermentation to provide a reference for breeding *Aspergillus oryzae* strains, improving raw material utilization, and enhancing soy sauce quality.

Key words: fermented soy sauce; microbial diversity; *Aspergillus oryzae*; protease; quality of soy sauce

引文格式:

张霖靖, 侯莎, 高苏娟, 等. 酿造酱油中米曲霉及蛋白酶的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2025, 46(5): 196-203.

ZHANG Linjing, HOU Sha, GAO Sujuan, et al. Research Progress on *Aspergillus oryzae* and Protease in Fermented Soy Sauce[J]. Food Research and Development, 2025, 46(5): 196-203.

酱油是一种由微生物发酵而成的液体调味品, 在 世界各国越来越受到人们的欢迎^[1]。酱油起源于西

基金项目: 广东省重点建设学科科研能力提升项目(2021ZDJS005); 广东省省级农业科技创新及推广项目(2023KJ101); 广东省岭南特色食品科学与技术重点实验室(2021B1212040013)

作者简介: 张霖靖(1999—), 女(汉), 硕士研究生, 研究方向: 食品发酵与酿造。

*通信作者: 刘功良(1980—), 男(汉), 教授, 博士, 研究方向: 食品生物技术。

周,最早被记录于《西周》,至今已有两千多年的历史^[2]。传统酱油多采用自然发酵的方式,酱油中的微生物来源于自然环境,这就容易导致酱油中微生物群落不稳定,酱油的品质较差。同时,开放式接种容易让有害微生物进入到酱油发酵体系,对酱油的品质和食品安全都存在着威胁^[3]。米曲霉是酿造酱油过程中的关键菌,具有繁殖快、遗传稳定性好、不产生黄曲霉毒素等优点,但其分泌的酶系不全面,分泌的中性和碱性蛋白酶活力较高,而酸性蛋白酶的酶活力较低^[4]。酱油发酵主要在酸性和高盐环境下进行,导致米曲霉分泌的蛋白酶容易失活,易引起单菌种发酵原料利用率低、品质不高的问题^[5]。

酱油在发酵过程中,主要靠微生物(米曲霉、酵母菌等)产生的酶系(蛋白酶、淀粉酶等)把原料(大豆或脱脂大豆,小麦或麸皮)分解成为氨基酸、多肽和糊精等,这些小分子物质再经过微生物的生物转化作用形成酱油的滋味物质和香气物质,上述物质与酱醪中食盐、美拉德反应产物等共同形成了酱油的色、香、味^[5]。酱油发酵的本质就是通过微生物的代谢作用所产生相应酶系对原料进行水解,酶的种类及酶活力的高低将直接影响到酱油的风味和品质。

本文对酱油发酵过程中的微生物多样性以及种类进行综述,阐述酱油发酵过程中蛋白酶系的研究进展,介绍酱油中蛋白酶与酱油品质之间的关系,以期为选育米曲霉菌株、提高原料利用率及酱油品质提供借鉴。

1 酱油生产工艺

根据 GB/T 18186—2000《酿造酱油》的相关规定,我国的发酵酱油按生产工艺可分为两大类,一类是高盐稀态发酵(含固稀发酵),一类是低盐固态发酵^[6]。两种生产工艺的发酵流程基本一致,包括原料处理、制曲、发酵、淋油、浸滤、配兑、灭菌、沉淀、包装等步骤,而高盐稀态发酵和低盐固态发酵最大的区别在于发酵时所使用的盐水浓度和用量^[7]。利用高温高压使原料中的蛋白质发生适当变性,淀粉产生糊化;制曲是在曲料上培养微生物,目的是产生大量的酶;发酵是经过一系列复杂的生物化学反应,生成滋味物质和风味物质。

2 酱油中的微生物多样性

2.1 酱油发酵过程的微生物多样性

在酱油的发酵过程中,微生物之间的协同作用是不容忽视的,这些微生物群落在酱油发酵过程中展现出持续的动态变化。在酱油发酵的过程中,微生物群落逐渐由耐盐性低和耐酸性差的显性菌株,转变为强耐盐性和强耐酸性的菌株。Zhang 等^[8]运用了磷脂脂肪酸分析方法(phospholipid fatty acids, PLFA)和变性梯度凝胶电泳(denaturation gradient gel electrophoresis,

DGGE)技术,对两种不同工艺的发酵酱油中的微生物进行了菌落特征分析。研究表明,革兰氏阳性菌和真菌是酱油发酵过程的主导菌群。Liu 等^[9]通过 16S rRNA 基因通量测序分析对酱油发酵的整个过程进行细菌群落的变化分析,结果表明在酱油发酵过程中,细菌主要由魏氏菌、芽孢杆菌、乳球菌和克雷伯氏菌组成。Wei 等^[10]采用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)-变性梯度凝胶电泳法,也揭示了酱油发酵微生物群落的动态变化。Sulaiman 等^[11]以中国传统发酵的酱油酱醪作为研究对象,在发酵的 6 个月内,在规定时间内对酱醪进行取样,观察微生物的数量和功能特性变化,并首次通过全基因组鸟枪法对其进行分析,发现发酵酱油酱醪中的优势菌主要是魏斯氏菌属,而真菌则以米曲霉、假丝酵母为主导。

2.2 酱油发酵过程的主要微生物

酱油发酵过程中涉及的微生物种类繁多,主要是曲霉菌、酵母菌和乳酸菌这三大类。曲霉菌能将原料中的蛋白质水解生成氨基酸、小分子多肽等呈味化合物;酵母菌可以利用这些呈味化合物合成醇类、酯类、醛类和其他挥发性风味化合物,而这些正是酱油香味的重要前体物质;乳酸菌则可以产生乳酸、乙酸、苹果酸等有机酸,赋予酱油具有令人愉快的酸味,同时这些酸也是合成酯类物质不可缺少的原料。正是由于酱油中存在这些微生物,才使得酱油具有独特的口感和风味。

2.2.1 酵母菌

酵母菌是酱油酿造过程中的重要微生物之一,对酱油的风味有着很大的贡献。目前,从酱油酱醪中分离出 7 个属、32 个种的酵母菌^[12]。酱油中的挥发性芳香化合物可分为醇类、酚类、酯类、醛类、酸类、酮类、吡嗪类、呋喃类等。有相关研究表明,酱醪中酵母菌与这些风味化合物的种类和含量密切相关,其中鲁氏接合酵母(*Zygosaccharomyces rouxii*)和球拟酵母(*Torulopsis versatilis*)是研究最为广泛的两种酵母菌。鲁氏接合酵母是一种能在高渗透压环境下生长的微生物,因此它能在 18% 盐水环境中正常发挥作用。吕变梅等^[13]通过紫外诱导得到一株发酵能力强的鲁氏接合酵母 L6-1,利用该菌株酿造的酱油比空白组多 20 种风味物质。谭戈等^[14]通过外源添加鲁氏接合酵母 JL-02,发现添加鲁氏接合酵母后的酱油所含的风味物质种类得到大幅提高。Wei 等^[15]通过对比鲁氏接合酵母原始菌种 S 和诱导菌株 S3-2 的转录组,发现 S3-2 细胞内甘油含量的升高可能是由 S3-2 HOG1 上调导致的,甘油含量引起渗透压的改变,使得 S3-2 能更好地应用在酱油发酵中。球拟酵母作为一种酯香型酵母,参与酱醪成熟及风味物质生成的过程,将前期生成的醇类物质和有机酸等合成酯类物质,主要产生 4-乙基愈创木酚、4-乙基

苯酚和2-苯乙醇等。另外,球拟酵母能分泌产生酸性蛋白酶,能促进米曲霉对于原料的分解利用^[16]。

2.2.2 乳酸菌

酱油酿造过程中在自然环境的条件下,也会有各式各样的细菌参与其中,其中最主要的细菌便是耐盐性乳酸菌。酱油中的乳酸菌(*lactic acid bacteria*)是一类耐盐性乳酸菌,能够在高盐环境下生长繁殖,并进行乳酸发酵。主要由酱油嗜盐四链球菌和植物乳杆菌组成,其中四链球菌最为重要^[17]。这些耐盐乳酸菌在酱油发酵过程中产生重大影响:乳酸菌通过乳酸发酵生成乳酸、乙酸等小分子有机酸,快速降低酱醪pH值,为鲁氏接合酵母提供合适的生长繁殖条件,也可以抑制腐败菌和致病菌等有害细菌的生长;同时这些有机酸与醇类物质生成酯类物质,对酱油风味的形成起到了至关重要的作用,使酱油味道柔和、芳香绵长;此外乳酸菌也能分泌多种酶系,可作为米曲霉酶系的补充,促进原料进一步水解^[18]。

2.2.3 曲霉菌

曲霉菌对酱油发酵至关重要,其作用贯穿整个发酵过程,目前在酱油发酵中最常用的曲霉菌有两种,分别是米曲霉和酱油曲霉。

米曲霉(*Aspergillus oryzae*)是酱油发酵的关键菌种之一,目前我国绝大多数酱油生产企业均采用米曲霉制曲,目前应用于酱油发酵的米曲霉菌株主要有AS 3.863、AS 3.951(沪酿3.042)、UE 3.28、UE 336、渝 3.811,其中AS 3.951(沪酿3.042)是使用最为广泛的菌种之一^[19]。米曲霉能分泌复杂的酶系,酶系对于曲料制曲时间、原料利用率及酱醪成品的滋味和风味都有着至关重要的作用。米曲霉富含蛋白酶,此外还含有淀粉酶、葡萄糖淀粉酶、纤维素酶、果胶酶和谷氨酰胺酶等。魏泉增等^[20]通过宏基因组学技术跟踪酱油曲的发酵过程,发现在酱油曲发酵过程中占主导地位的真菌微生物为米曲霉。米曲霉的蛋白酶和淀粉酶等具有较高的活性,因而能在制曲过程中通过自身代谢作用对蛋白质和淀粉进行水解,进而在发酵前期积累各种氨基酸和还原糖类^[21]。这些酶解产物不仅是酱油的风味物质的前体,同时也为后期微生物的繁殖创造基础物质条件。伍亚龙等^[22]从四川发酵的高盐稀态酱油中,首次检测出 *Starmarella*, 其作为酱油发酵过程中的主要真菌属,在酿造酱油中的作用有待进一步研究。胡传旺^[23]利用微生物多样性测序法对酱油发酵过程中的微生物多样性进行了动态分析。结果表明在酱油制曲阶段,菌群主要由米曲霉、乳酸菌、葡萄球菌和芽孢杆菌组成;在酱醪醪液中,真菌主要由米曲霉、鲁氏接合酵母和假丝酵母组成。孙张乐^[21]用 Illumina MiSeq 测序系统对中国传统的开放式发酵酱油进行不同发酵时期的微生物菌群分析。赵谋明等^[24]从广东酱油厂生产的

高盐稀态发酵酱油中分离得到了6株中性蛋白酶活力较高的米曲霉。赵莹等^[25]从江苏发酵酱油中也筛选出4株米曲霉,结果表明,米曲霉3号和6号菌株具有较强的耐盐性、耐亚硝酸盐性和较高的蛋白酶活性,更适用于酱油的发酵过程。

米曲霉对酱油发酵起着关键作用,为了提高其对蛋白酶的利用,目前的研究主要围绕以下三个方面进行。一是从分子生物学对米曲霉进行细化。根据比较菌种RD2和TS2的基因组学和转录组学,从分子水平上解释了菌种间发酵性能的差异^[26]。Zhao等^[27]利用蛋白质组学对原始菌株3.042和突变菌株A100-8进行细胞内差异分析,结果发现具有451个差异表达蛋白。二是菌种育种,利用诱变来改变米曲霉的遗传特性,以增强原有特性或弥补不良特性。物理诱变虽然存在诱变效率低、筛选工作量大、诱变不确定性等缺点,但由于其对人体危害小、处理时间短、环境污染少等特点,仍被广泛应用于霉菌的诱变。李鹏等^[28]以米曲霉CICC2066为出发菌株,对其进行多次紫外诱变,得到突变体UY-20的中性蛋白酶活力较原菌株提高了7%。常压室温等离子体(atmospheric room temperature plasma, ARTP)突变技术凭借突变快速、突变高度多样、简单安全等优点,近年来得到迅速发展和应用。Gao等^[29]利用ARTP对米曲霉3.042进行诱变得得到突变体H8,利用H8进行发酵发现中性蛋白酶、碱性蛋白酶和天冬氨酸氨基肽酶活性显著提高。除此之外,原生质体融合诱变也是诱变育种的常用方法之一,该技术可以突破种甚至属的限制,加速微生物菌株的定向进化,获得具有理想表型的工业菌株,是微生物突变的重要手段。唐洁^[30]将菌株AS3.951和菌株CICC2339作为原始亲本菌株,利用原生质体电融合技术得到生长速度快且蛋白酶活高的融合体EF113,EF113酶活高达7680 U/g。Xu等^[31]将黑曲霉和米曲霉进行原生质体融合,与亲本菌株相比,稳定融合体的酸性蛋白酶活性均有不同程度提高。三是改进生产工艺和优化发酵。车莹等^[32]利用数学拟合模型,比较中性蛋白酶活和感官评分,综合气相色谱-离子迁移谱(gas chromatography-ion mobility spectroscopy, GC-IMS)分析确定了鸡蛋生产酱油的最佳发酵条件。Hu等^[33]采用米曲霉和黑曲霉混合制曲,曲中的二肽、不饱和脂肪酸、黄酮类、酚类和吡啶类物质含量较单菌种制曲明显上升。

日本一般选用酱油曲霉(*Aspergillus sojae*)进行酿造酱油。早在20世纪30年代,研究人员便从酱油中分离出酱油曲霉^[34]。酱油曲霉通常产生曲酸,碱性蛋白酶活力较高。除此之外,由酱油曲霉制成的成曲相较于米曲霉曲的pH值更高,且在制曲过程中糖类物质的利用较少,大曲的 α -淀粉酶、酸性蛋白酶、酸性羧肽酶活力相较于米曲霉曲更低一些,但是乙醇和

还原糖含量较多,且氧化褐变能力较强。

3 发酵酱油中的蛋白酶系

酱油发酵过程中蛋白酶主要由米曲霉分泌,根据酶的水解位点的特异性,可将蛋白酶分为内肽酶和外肽酶。内肽酶能水解蛋白质的内部肽键,形成较短的肽,根据最适 pH 值的差异,内肽酶又可分为中性蛋白酶、酸性蛋白酶和碱性蛋白酶^[35]。而外肽酶则是从肽链的游离氨基末端(氨肽酶)或游离羧基末端(羧肽酶)水解肽键,形成游离氨基酸。

3.1 中性蛋白酶

有相关研究表明,在现有的技术条件下,制曲和酱油发酵过程中,中性蛋白酶活力最高^[36]。中性蛋白酶在中性条件下催化蛋白质分子分解生成多肽、小分子肽和氨基酸。

黄留瑶等^[37]通过比较不同大型发酵容器对酱油品质的影响,发现发酵池中中性蛋白酶活力更高。童佳^[38]利用蛋白组学对不同时期发酵酱醪进行分析,认为米曲霉的中性蛋白酶活力更高,能更有效地利用原料,是酱油发酵过程中的关键酶之一。周佳慧等^[39]从高盐稀态酱醪中分离筛选得到 1 株高产中性蛋白酶的菌株,经生理生化特征分析及 16S rDNA 鉴定为解淀粉芽孢杆菌。梁晋维等^[40]通过对 5 株米曲霉进行单因素试验和正交试验,最终确定米曲霉 *Aspergillus oryzae* NCFECO 是一株具有高产蛋白酶能力的菌株,其中性蛋白酶活性为 1 687 U/g。余茜^[41]在自然发酵的霉豆瓣中筛选分离鉴定得到一株产中性蛋白酶的米曲霉,该米曲霉在 55 °C、pH7.0 时活性最高。Ao 等^[42]从自然发酵的蚕豆中分离出一株中性蛋白酶产量较高的米曲霉 Y1,采用硫酸铵沉淀法和二乙氨基(diethylamino-ethyl, DEAE)-琼脂糖凝胶色谱法对该米曲霉的中性蛋白酶进行纯化,比活力提高 10.0 倍(2 264.3 U/mg)。

在酱醪发酵过程中添加外源物可以显著提高酱油的理化品质,并有效提高酱油中具有特有风味的 4-乙基愈创木酚和 4-乙基苯酚的含量。钟小廷等^[43]在发酵过程中添加鲁氏接合酵母和球拟酵母后,不仅能够显著影响酱油中乙醇、总氮和还原糖含量,而且对酱油中游离氨基酸总量及氨基酸组成产生积极作用。

3.2 酸性蛋白酶

酸性蛋白酶在酸性条件下会催化蛋白质分子分解生成多肽、小分子肽和氨基酸,反应 pH 值为 3.5~5.5 时酶活力达到最高。

蛋白酶在较高盐浓度环境下容易失活,在 18% NaCl 溶液中残留的蛋白酶活力仅为 3%。在酱油发酵过程中添加酸性蛋白酶,可以弥补成曲中米曲霉分泌酸性蛋白酶不足的问题。在蛋白质食品发酵过程中添加酸性蛋白酶,可以有效提高原料中蛋白质的利用

率,缩短发酵周期,提高产品的氨基酸态氮含量和改善最终风味^[44]。

Shu 等^[45]通过 ARTP 系统对米曲霉 3.042 菌株进行诱变得得到突变菌株 B-2,突变体酸性蛋白酶活力增加 54.7%。徐德峰^[46]采用电场诱导原生质体融合技术筛选出一株酸性蛋白酶活力较高的突变体,其较亲本米曲霉 HN3042 酸性蛋白酶活力提高 82.19%,并将其初步应用于酱油发酵,与亲本米曲霉酱油发酵液相比,新菌株酱油发酵液中的总酸、氨基酸态氮和总氮含量均有所提高,同时其风味也有所改善。吕远平等^[47]的研究表明,采用高酸性蛋白酶的活性菌种与米曲霉混合制曲,可以提高酱油曲的酸性蛋白酶活力,有效提高氨基酸态氮含量、全氮利用率、氨基酸生成率以及原料利用率。

3.3 碱性蛋白酶

碱性蛋白酶指的是在 pH9.0~11.5 的条件下能够发挥其最高效酶解能力的蛋白酶,它不仅能够高效水解蛋白质,生成氨基酸、小分子肽等,而且还可以水解酯键和酰胺键,在特定条件下,还具备转肽和转酯能力^[48]。碱性蛋白酶也是米曲霉分泌的最丰富的蛋白酶之一,与其原料的利用率和酱油的品质密切相关^[49-50]。目前,我国对于碱性蛋白酶的研究总体趋势发展较好,主要集中在如何提高其酶活性,对于其生化特征和耐盐机制尚不明确^[51]。

早期,研究人员通常使用各种物理因素或化学反应来处理微生物细胞,从而导致它们发生基因突变,这将会改变微生物菌株的遗传特性,更有利于培养出高产蛋白酶的菌株。Gao 等^[29]采用 ARTP 技术对米曲霉 3.042 进行诱变,得到具有耐盐蛋白酶活性的突变体 H8,突变体中耐盐碱性蛋白酶基因的转录表达分析表明,它的表达量增加了约 30%。王瑾等^[52]对芽孢杆菌 DL12 菌株进行诱变处理,其初始酶活力为 129.7 U/mL,最终筛选出 1 株高产量碱性蛋白酶的菌株,酶活力提高了 1.33 倍。这种诱变改造的方法虽然可以得到性能增强的菌株,但也存在着步骤繁琐、效率低、耗能大等缺点。Ke 等^[53]利用逆转录和聚合酶链式扩增反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)技术从酱油曲霉 GIM3.33 中克隆到了一个碱性蛋白酶(Ap),并使其在毕赤酵母 KM71 菌株中成功表达,通过优化最佳发酵条件,Ap 的碱性蛋白酶活性提高了两倍。

3.4 氨肽酶

氨肽酶是一类选择性去除肽链 N 端氨基酸残基的外切蛋白酶,在酱油发酵过程中,当氨肽酶和蛋白酶结合作用时,可以大大提高蛋白质分子的水解程度,进一步生成更多的小肽和游离氨基酸,从而提高原料利用率,增强和提高酱油的口感和营养价值^[54]。目前的

研究表明,动植物细胞内的氨肽酶含量较少,且提取步骤繁琐,而微生物发酵则可以高效产氨肽酶,能生产氨肽酶的微生物种类有很多,如米曲霉、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、乳酸菌(*lactic acid bacteria*)和嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)等。正是因为氨肽酶能特异性水解肽链末端的疏水性氨基酸,因此其在水解液的脱苦作用上也存在显著影响。黄伟谦等^[55]将不同的蛋白酶分别添加至酪蛋白的水解液中,结果发现添加亮氨酸氨肽酶的水解液的苦味下降最为明显。目前,研究学者们对于氨肽酶在脱苦方面的应用也做了大量的研究,Song等^[56]利用来自黑曲霉CICIM F0215的氨基肽酶(An-APa)对酪蛋白水解物和大豆蛋白分离物水解物进行进一步水解,发现疏水性游离氨基酸含量明显增多,伴随着水解液的苦味明显下降。Nakamura等^[57]从米曲霉的食品级商品化酶试剂Proteax中纯化出一种对酪蛋白水解产物脱苦效果最好的氨肽酶,并将其用于酪蛋白水解液和鳕鱼蛋白水解液的进一步水解,发现亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸和苯丙氨酸等疏水氨基酸的含量明显提高。

3.5 羧肽酶

羧肽酶是指能特异性水解肽链羧基末端氨基酸的一类外肽酶。米曲霉是微生物羧肽酶的主要来源,产生的羧肽酶多以丝氨酸羧肽酶为主,在酱油发酵过程中,主要起到多肽脱苦、生物活性多肽的延长或特异性修饰等作用^[58]。陈平等^[59]根据羧肽酶能水解C端氨基酸这一特性,结合飞行时间质谱测定出C端序列。目前对于米曲霉的研究主要集中在对其中的羧肽酶的分离纯化,羧肽酶I、II、III、IV和O-1是米曲霉中的5种羧肽酶,它们对苦味肽均有不同的脱苦效果^[60]。为了进一步提高羧肽酶活力,吴红艳等^[61]利用紫外线-氯化锂复合诱变,得到5株酶活力提高10%以上的突变体菌株。Zhen等^[62]将米曲霉M30011中的丝氨酸羧肽酶克隆到大肠杆菌,发现三重突变体Y271R/I464R/M517R能明显提高羧肽酶活力。

4 蛋白酶与酱油品质的关系

米曲霉酶主要活性途径在于关键风味物质的形成。米曲霉是发酵酱油的主要菌种,其蛋白酶活性的水平可以作为评估该菌种品质的一个关键指标。高蛋白酶活性不仅可以更快速和更高效地分解原料,从而提高酱油的原料利用效率,还会让生成的小分子肽、多肽和游离氨基酸在蛋白质原料降解过程中持续增加,使酱油具有更多的鲜味、甜味和浓郁的口感^[63]。在所有分解产生的成分中,谷氨酸(*glutamate*, Glu)的含量是最高的,并且它的鲜味也是最强烈的,因此谷氨酸是酱油中最关键的呈味成分之一。除此之外,天门冬氨

酸(*aspartic acid*, Asp)、丙氨酸(*alanine*, Ala)、丝氨酸(*serine*, Ser)、甘氨酸(*glycine*, Gly)、苯丙氨酸(*phenylalanine*, Phe)和酪氨酸(*tyrosine*, Tyr)也被普遍认为是酱油口感和其他感官特性有显著影响的关键氨基酸,这些物质的生成都离不开米曲霉蛋白酶的作用。蛋白质水解产生的游离氨基酸可以通过微生物氨基酸代谢转化成许多风味化合物,对酱油品质有着重要作用。其中 α -酮酸是氨基酸转化为芳香化合物的第一个重要因素,添加 α -酮戊二酸可以使香气得到增强,谷氨酸脱氢酶可以催化谷氨酸逆氧化脱氨生成 α -酮戊二酸,它是氨基酸转氨途径中的氨基受体^[64]。Chen等^[65]通过外源添加蛋白酶到发酵酱醪中,发现酱醪中总氮和氨基酸肽酶含量均有不同程度的增加,此外美拉德肽及乳酸和醋酸的比例也得以提升,从而提高了酱油的鲜味和丰富度。另外还存在一些低聚肽,例如Glu-Ala-Gly-Ile-Gln(EAGIQ)、Ala-Leu-Pro-Glu-Glu-Val(ALPEEV)和Leu-Pro-Glu-Glu-Val(LPEEV),它们可以增加食物的鲜味^[66]。酱油中的谷氨酰二肽和谷氨酰三肽,以及焦性谷氨酰二肽和焦性谷氨酰三肽,都是鲜味肽的典型代表^[67-69]。其中,分子质量小于500 Da^[70]或在1 000~5 000 Da^[71]范围内的小分子肽能有效地增强酱油的鲜美和浓郁口感。酱油生产中酶促反应、美拉德反应、斯特莱克降解、脂质氧化及酯化等,共同造就酱油特有的口感与色泽。乙酰丙酸、氯丙醇是酸水解酱油中典型的挥发性成分^[72]。阮志强等^[73]采用Illumina MiSeq高通量测序的方法,研究了高盐稀态酱油发酵液中真菌群落的结构变化和优势真菌的分布,对发酵期间挥发性风味物质的变化进行了分析,研究表明在发酵初期曲霉属为优势真菌,曲霉属和1-辛烯-3-醇之间存在明显的正相关关系。Kijima等^[74]向酱油中加入一种产谷氨酰胺转氨酶细菌,发现酱油谷氨酸含量显著增加,酱油鲜味得到改善。

5 展望

米曲霉是酱油制曲与发酵过程中的核心微生物,能够分泌具有功能互补的复杂蛋白酶系,其与酱油的风味和品质存在密不可分的关系。迄今为止,关于酱油曲和酱醪中微生物的研究已经相当丰富,主要从分子生物学、菌种育种和改进生产工艺和优化发酵3个方面对米曲霉及其蛋白酶系进行研究。酱油的发酵过程复杂、环境开放,若使米曲霉菌株能更好地发挥作用则必须对菌种进行更深层次探究,并对整个发酵过程精准调控。

本文对酱油发酵过程中的米曲霉及其分泌的蛋白酶进行综述,将蛋白酶与酱油品质联系起来,期望能为米曲霉蛋白酶研究提供基础,为选育米曲霉菌株、提高原料利用率及酱油品质提供借鉴。

参考文献:

- [1] 于林, 陈义伦, 吴澎, 等. 我国史籍记载的酱及酱油历史起源研究[J]. 山东农业大学学报(社会科学版), 2015, 17(1): 14-17, 22, 113.
YU Lin, CHEN Yilun, WU Peng, et al. The origin of sauce and soy sauce in historical records of China[J]. Journal of Shandong Agricultural University (Social Science Edition), 2015, 17(1): 14-17, 22, 113.
- [2] 张智宏, 陈嘉琳, 黄鑫, 等. 酱油的历史及原酿造酱油发展趋势[J]. 现代食品科技, 2023, 39(12): 302-309.
ZHANG Zhihong, CHEN Jialin, HUANG Xin, et al. The history of soy sauce and developmental trends in naturally-fermented soy sauce[J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(12): 302-309.
- [3] 黄逸. 古法如何酿酱油[J]. 科学大观园, 2022(24): 72-75.
HUANG Yi. How to brew soy sauce by ancient method[J]. Grand Garden of Science, 2022(24): 72-75.
- [4] 谢承佳, 庄琪. 酱油制曲研究进展[J]. 中国调味品, 2017, 42(6): 77-80.
XIE Chengjia, ZHUANG Qi. Research progress of koji making for fermented soy sauce[J]. China Condiment, 2017, 42(6): 77-80.
- [5] GAO X L, ZHAO X, HU F, et al. The latest advances on soy sauce research in the past decade: Emphasis on the advances in China[J]. Food Research International, 2023, 173(Pt 2): 113407.
- [6] LEE S M, SEO B C, KIM Y S. Volatile compounds in fermented and acid-hydrolyzed soy sauces[J]. Journal of Food Science, 2006, 71(3): C146-C156.
- [7] 赵德安. 我国酱油酿造工艺的演变与发展趋势[J]. 中国酿造, 2009, 28(9): 15-17.
ZHAO De'an. Evolution and development of soy sauce production technology in China[J]. China Brewing, 2009, 28(9): 15-17.
- [8] ZHANG L Q, ZHOU R Q, CUI R Y, et al. Characterizing soy sauce moromi manufactured by high-salt dilute-state and low-salt solid-state fermentation using multiphase analyzing methods[J]. Journal of Food Science, 2016, 81(11): C2639-C2646.
- [9] LIU X Y, QIAN M, SHEN Y X, et al. An high-throughput sequencing approach to the preliminary analysis of bacterial communities associated with changes in amino acid nitrogen, organic acid and reducing sugar contents during soy sauce fermentation[J]. Food Chemistry, 2021, 349: 129131.
- [10] WEI Q Z, WANG H B, CHEN Z X, et al. Profiling of dynamic changes in the microbial community during the soy sauce fermentation process[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(20): 9111-9119.
- [11] SULAIMAN J, GAN H M, YIN W F, et al. Microbial succession and the functional potential during the fermentation of Chinese soy sauce brine[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 556.
- [12] 杜雯, 王中伟, 孟凡冰, 等. 酱油酿造用产香酵母的选育研究进展[J]. 中国调味品, 2019, 44(11): 179-182.
DU Wen, WANG Zhongwei, MENG Fanbing, et al. Research progress on breeding of aroma-producing yeast for soy sauce brewing[J]. China Condiment, 2019, 44(11): 179-182.
- [13] 吕变梅, 蒋雪薇, 彭东, 等. 酱油酿造用耐盐产乙醇风味酵母的选育及其应用[J]. 食品科学, 2020, 41(20): 119-126.
LÜ Bianmei, JIANG Xuwei, PENG Dong, et al. Breeding and application of salt-tolerant ethanol-producing yeast for soy sauce brewing[J]. Food Science, 2020, 41(20): 119-126.
- [14] 谭戈, 朱新贵, 李学伟, 等. 强化鲁氏接合酵母对酱油品质的影响[J]. 食品工业科技, 2022, 43(13): 86-93.
TAN Ge, ZHU Xingui, LI Xuwei, et al. Effect of fortified *Zygosaccharomyces rouxii* on the quality of soy sauce[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(13): 86-93.
- [15] WEI Y H, WANG C, WANG M, et al. Comparative analysis of salt-tolerant gene *HOG1* in a *Zygosaccharomyces rouxii* mutant strain and its parent strain[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2013, 93(11): 2765-2770.
- [16] HONG K Q, FU X M, LEI F F, et al. Selection of salt-tolerance and ester-producing mutant *Saccharomyces cerevisiae* to improve flavour formation of soy sauce during co-fermentation with *Torulopsis globosa*[J]. Foods, 2023, 12(18): 3449.
- [17] 王素珍. 乳酸菌与酱油的制造[J]. 中国调味品, 2008, 33(5): 64-65.
WANG Suzhen. Lactic acid bacteria and the manufacture of soy sauce[J]. China Condiment, 2008, 33(5): 64-65.
- [18] ZHANG X L, LIU Z P, KANG B, et al. Effect of *Lactobacillus plantarum* or *Enterococcus faecalis* as co-inoculants with *Aspergillus oryzae* in koji making on the physicochemical properties of soy sauce[J]. Journal of Food Science, 2022, 87(2): 714-727.
- [19] 纪凤娣, 鲁绯, 程永强. 中国传统酱油生产用米曲霉菌种研究进展[J]. 北京工商大学学报(自然科学版), 2012(4): 41-43, 49.
JI Fengdi, LU Fei, CHENG Yongqiang. Study on *Aspergillus oryzae* breeding in production of Chinese traditional soy sauce[J]. Journal of Beijing Technology and Business University (Natural Science Edition), 2012(4): 41-43, 49.
- [20] 魏泉增, 胡广, 王洪彬, 等. 宏基因组技术在鉴定酱油曲真菌优势菌株的应用[J]. 中国酿造, 2012, 31(2): 41-45.
WEI Quanzeng, HU Guang, WANG Hongbin, et al. Application of metagenomics for identification of dominate fungal species in soy sauce koji[J]. China Brewing, 2012, 31(2): 41-45.
- [21] 孙张乐. 传统酱油酿造过程中微生物菌群结构改变及其对风味物质影响研究[D]. 佛山: 佛山科学技术学院, 2020.
SUN Zhangle. Characterization of microflora and their functions on flavor compounds during the traditional soy sauce fermentation process[D]. Foshan: Foshan University, 2020.
- [22] 伍亚龙, 杨恺, 史莓梅, 等. 高通量测序结合传统微生物培养研究酱醪中微生物多样性及群落变化[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(3): 75-82.
WU Yalong, YANG Kai, SHI Meimei, et al. High-throughput sequencing combined with traditional microbial cultural method to study microbial diversity and community changes in soy sauce moromi[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(3): 75-82.
- [23] 胡传旺. 酱油发酵过程微生物群落解析及功能研究[D]. 无锡: 江南大学, 2017.
HU Chuanwang. Dynamics of microbial community during soy sauce fermentation and functional analysis strains isolated from moromi[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017.
- [24] 赵谋明, 林涵玉, 梁卓雄, 等. 传统酿造酱油酱醪中的霉菌筛选及其部分酶系特征分析[J]. 现代食品科技, 2020, 36(6): 114-120.
ZHAO Mouming, LIN Hanyu, LIANG Zhuoxiong, et al. Screening of molds in traditional soy sauce moromi and analysis of some enzymatic characteristics[J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(6): 114-120.
- [25] 赵莹, 朱丹, 石叶帆, 等. 发酵酱油豆豉中优势霉菌的筛选及功能分析[J]. 食品科技, 2018, 43(6): 18-22.
ZHAO Ying, ZHU Dan, SHI Yefan, et al. Screening and functional analysis of dominant mold in fermented soy sauce[J]. Food Science and Technology, 2018, 43(6): 18-22.
- [26] ZHONG Y Y, LU X, XING L, et al. Genomic and transcriptomic comparison of *Aspergillus oryzae* strains: A case study in soy sauce

- koji fermentation[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2018, 45(9): 839-853.
- [27] ZHAO G Z, HOU L H, YAO Y P, et al. Comparative proteome analysis of *Aspergillus oryzae* 3.042 and A. oryzae 100-8 strains: Towards the production of different soy sauce flavors[J]. Journal of Proteomics, 2012, 75(13): 3914-3924.
- [28] 李鹏, 张艳芳, 王军, 等. 紫外诱变选育米曲霉氨肽酶高产菌株[J]. 中国调味品, 2017, 42(1): 61-64.
LI Peng, ZHANG Yanfang, WANG Jun, et al. Breeding of *Aspergillus oryzae* aminopeptidase-producing strains by ultraviolet induced mutation[J]. China Condiment, 2017, 42(1): 61-64.
- [29] GAO X L, LIU E M, YIN Y Y, et al. Enhancing activities of salt-tolerant proteases secreted by *Aspergillus oryzae* using atmospheric and room-temperature plasma mutagenesis[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(9): 2757-2764.
- [30] 唐洁. 利用原生质体融合技术进行米曲霉新菌株的选育[D]. 成都: 西华大学, 2007.
TANG Jie. A research on screening new strain of *Aspergillus oryzae* with protoplast fusion[D]. Chengdu: Xihua University, 2007.
- [31] XU D F, PAN L, ZHAO H F, et al. Breeding and identification of novel koji molds with high activity of acid protease by genome recombination between *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2011, 38(9): 1255-1265.
- [32] 车莹, 褚彦钧, 田笑, 等. 鸡蛋酱油原料熟制和制曲条件优化及挥发性成分分析[J]. 中国食品学报, 2023, 23(7): 289-306.
CHE Ying, CHU Yanjun, TIAN Xiao, et al. Optimization of steaming and koji-making conditions and analysis of volatile components in egg soy sauce[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2023, 23(7): 289-306.
- [33] HU W K, LIU Z P, FU B, et al. Metabolites of the soy sauce *Koji* making with *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2022, 57(1): 301-309.
- [34] 田子薇. 固稀发酵法酱油酿造工艺的优化研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2019.
TIAN Ziwei. Study on optimization of soy sauce brewing process by solid-dilute fermentation[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2019.
- [35] SONG P, ZHANG X, WANG S H, et al. Microbial proteases and their applications[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1236368.
- [36] 刘志伟, 谭兴和, 周红丽, 等. 米曲霉产中性蛋白酶条件的优化[J]. 中国酿造, 2011, 30(11): 103-107.
LIU Zhiwei, TAN Xinghe, ZHOU Hongli, et al. Optimization of neutrase production conditions by *Aspergillus oryzae*[J]. China Brewing, 2011, 30(11): 103-107.
- [37] 黄留瑶, 林礼钊, 吴惠贞, 等. 酱油的罐式与池式发酵过程中关键呈味物质对比分析[J]. 现代食品科技, 2023, 39(6): 240-245.
HUANG Liuyao, LIN Lizhao, WU Huizhen, et al. Comparative analysis of the key flavoring substances during the tank-type or pool-type fermentation of soy sauce[J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(6): 240-245.
- [38] 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]. 无锡: 江南大学, 2017.
TONG Jia. Volatile flavor compounds and protease of high-salt liquid-state soy sauce fermented by *Aspergillus oryzae*[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017.
- [39] 周佳慧, 林礼钊, 吴惠贞, 等. 酱醪中耐盐高产酶菌株的筛选、分离和鉴定及其生化特性分析[J]. 中国调味品, 2022, 47(12): 1-6, 12.
ZHOU Jiahui, LIN Lizhao, WU Huizhen, et al. Screening, isolation and identification of a salt-tolerant and efficient enzyme-producing strain in sauce mash and analysis of its biochemical characteristics[J]. China Condiment, 2022, 47(12): 1-6, 12.
- [40] 梁晋维, 李斌, 俞东阳, 等. 制固态曲参数对酱油曲中 *Aspergillus oryzae* NCFEC03 产蛋白酶活力的影响[J]. 中国调味品, 2017, 42(6): 29-33, 46.
LIANG Jinwei, LI Bin, YU Dongyang, et al. Effect of solid-state fermentation parameters on protease activity of *Aspergillus oryzae* NCFEC03 in soy sauce koji[J]. China Condiment, 2017, 42(6): 29-33, 46.
- [41] 余茜. 米曲霉中性蛋白酶的分离纯化及 Cu²⁺对其酶学性质的影响[D]. 雅安: 四川农业大学, 2018.
YU Qian. Isolation and purification of neutral protease from *Aspergillus oryzae* Y1 and the effect of Cu²⁺ on its characterization[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2018.
- [42] AO X L, YU X, WU D T, et al. Purification and characterization of neutral protease from *Aspergillus oryzae* Y1 isolated from naturally fermented broad beans[J]. AMB Express, 2018, 8(1): 96.
- [43] 钟小廷, 吕杰, 易谦武, 等. 外源添加酵母对黑豆酱油品质的影响[J]. 中国调味品, 2020, 45(11): 70-73.
ZHONG Xiaoting, LV Jie, YI Qianwu, et al. Effect of exogenous yeast on the quality of black bean soy sauce[J]. China Condiment, 2020, 45(11): 70-73.
- [44] 惠继星, 岳军, 宁艳春, 等. 酸性蛋白酶在玉米燃料乙醇浓醪发酵中的应用[J]. 化工科技, 2020, 28(4): 68-72.
HUI Jixing, YUE Jun, NING Yanchun, et al. Application of acid protease in high-concentration mash fermentation of corn fuel ethanol[J]. Science & Technology in Chemical Industry, 2020, 28(4): 68-72.
- [45] SHU L, SI X G, YANG X D, et al. Enhancement of acid protease activity of *Aspergillus oryzae* using atmospheric and room temperature plasma[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1418.
- [46] 徐德峰. 高活力酸性蛋白酶曲霉融合子的选育及其在酱油发酵中的初步应用[D]. 广州: 华南理工大学, 2010.
XU Defeng. Breeding of novel fusant with higher activity of acid protease from *Aspergillus* and its preliminary application in soy sauce fermentation[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2010.
- [47] 吕远平, 姚开, 贾冬英, 等. 高活力酸性蛋白酶菌株在酱油酿造中的应用[J]. 中国酿造, 2002, 21(3): 10-11.
LÜ Yuanping, YAO Kai, JIA Dongying, et al. The application of high-activity acidic protease strain in soy sauce brewing[J]. China Brewing, 2002, 21(3): 10-11.
- [48] SHANKAR S, LAXMAN R S. Biophysicochemical characterization of an alkaline protease from *Beauveria* sp. MTCC 5184 with multiple applications[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, 175(1): 589-602.
- [49] LIANG Y C, 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.
- [50] TATSUMI H, OGAWA Y, MURAKAMI S, et al. A full length cDNA clone for the alkaline protease from *Aspergillus oryzae*: Structural analysis and expression in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Molecular & General Genetics: MGG, 1989, 219(1/2): 33-38.
- [51] GAO X L, YIN Y Y, YAN J K, et al. Separation, biochemical characterization and salt-tolerant mechanisms of alkaline protease from *Aspergillus oryzae*[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2019, 99(7): 3359-3366.
- [52] 王瑾, 马金龙. 一株海洋细菌诱变筛选[J]. 现代园艺, 2017(7): 19-20.

- WANG Jin, MA Jinlong. Mutation screening of a marine bacterium[J]. *Xiandai Horticulture*, 2017(7): 19-20.
- [53] KE Y, YUAN X M, LI J S, et al. High-level expression, purification, and enzymatic characterization of a recombinant *Aspergillus sojae* alkaline protease in *Pichia pastoris*[J]. *Protein Expression and Purification*, 2018, 148: 24-29.
- [54] LEI F F, ZHAO Q Z, SUN-WATERHOUSE D, et al. Characterization of a salt-tolerant aminopeptidase from marine *Bacillus licheniformis* SWJS33 that improves hydrolysis and debittering efficiency for soy protein isolate[J]. *Food Chemistry*, 2017, 214: 347-353.
- [55] 黄伟谦. 酱油曲霉亮氨酸氨肽酶 sLAP1 在毕赤酵母中表达及其酶学性质研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2014.
- HUANG Weiqian. Research on the characteristics of a recombinant *Aspergillus sojae* leucine aminopeptidase I(sLAP1) expressed in *Pichia pastoris*[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2014.
- [56] SONG P, CHENG L, TIAN K M, et al. A novel aminopeptidase with potential debittering properties in casein and soybean protein hydrolysates[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2020, 29(11): 1491-1499.
- [57] NAKAMURA R, SAITO M, MARUYAMA M, et al. Reduction in the bitterness of protein hydrolysates by an aminopeptidase from *Aspergillus oryzae*[J]. *Food Science and Technology Research*, 2023, 29(1): 71-77.
- [58] 陈丹. 米曲霉羧肽酶 O 在毕赤酵母中的表达鉴定及其脱苦效应的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2014.
- CHEN Dan. Expression and identification of a recombinant carboxypeptidase O from *Aspergillus oryzae* Expressed in *Pichia pastoris* and application in debittering[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2014.
- [59] 陈平, 梁宋平. 利用飞行时间质谱进行蛋白质和多肽 C 端序测定[J]. *湖南师范大学自然科学学报*, 2001, 24(1): 58-61.
- CHEN Ping, LIANG Songping. C-terminal sequencing of protein and peptide by MALDI TOF mass spectrometry[J]. *Journal of Natural Science of Hunan Normal University*, 2001, 24(1): 58-61.
- [60] 冯红霞. 羧肽酶菌株的筛选及其酶的分离纯化、酶学性质的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2002.
- FENG Hongxia. Screening of a strain producing carboxypeptidase, purification and properties of the enzyme[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2002.
- [61] 吴红艳, 郑喜群, 姚蕤. 紫外线-氯化锂复合诱变选育羧肽酶高产菌株[J]. *中国调味品*, 2004, 29(6): 15-17.
- WU Hongyan, ZHENG Xiqun, YAO Rui. Mutagenized with UV-LiCl to screen carboxypeptidase high yield strain[J]. *Chinese Condi-ment*, 2004, 29(6): 15-17.
- [62] ZHEN H M, LIU J L, XIONG K, et al. Engineering a carboxypeptidase from *Aspergillus oryzae* M30011 to improve the terminal-specific enzymatic hydrolysis of aromatic amino acids[J]. *Process Biochemistry*, 2023, 126: 186-199.
- [63] LIN W M, SONG J J, HU W F, et al. Relationship between extracellular cellulase, pectinase and xylanase activity of Isolated *Aspergillus oryzae* Strains grown on koji and the umami-tasting amino acid content of soy sauce[J]. *Food Biotechnology*, 2016, 30(4): 278-291.
- [64] 张颖超. 酱油酿造功能微生物分离及强化发酵对酱油品质的影响[D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2023.
- ZHANG Yingchao. Effects of isolation of functional microbes for soy sauce brewing and enhanced fermentation on soy sauce quality[D]. Jinan: Qilu University of Technology, 2023.
- [65] CHEN C F, HOU S, WU C Z, et al. Improving protein utilization and fermentation quality of soy sauce by adding protease[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2023, 121: 105399.
- [66] ZHUANG M Z, LIN L Z, ZHAO M M, et al. Sequence, taste and umami-enhancing effect of the peptides separated from soy sauce[J]. *Food Chemistry*, 2016, 206: 174-181.
- [67] SHIGA K, YAMAMOTO S, NAKAJIMA A, et al. Metabolic profiling approach to explore compounds related to the umami intensity of soy sauce[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(29): 7317-7322.
- [68] ZHAO C J, SCHIEBER A, GÄNZLE M G. Formation of taste-active amino acids, amino acid derivatives and peptides in food fermentations-A review[J]. *Food Research International*, 2016, 89(Pt 1): 39-47.
- [69] FREROT E, CHEN T. Identification and quantitation of new glutamic acid derivatives in soy sauce by UPLC/MS/MS[J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2013, 10(10): 1842-1850.
- [70] ZHU X P, SUN-WATERHOUSE D, CHEN J H, et al. Comparative study on the novel umami-active peptides of the whole soybeans and the defatted soybeans fermented soy sauce[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2021, 101(1): 158-166.
- [71] 李莹, 黄开红, 周剑忠, 等. 水产蛋白酶解制备鲜味肽[J]. *食品科学*, 2012, 33(13): 248-253.
- LI Ying, HUANG Kaihong, ZHOU Jianzhong, et al. Preparation of umami peptides by enzymatic hydrolysis of proteins from aquatic products[J]. *Food Science*, 2012, 33(13): 248-253.
- [72] DIEZ-SIMON C, EICHELSHEIM C, MUMM R, et al. Chemical and sensory characteristics of soy sauce: A review[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(42): 11612-11630.
- [73] 阮志强, 董玺梅, 蒋雪薇, 等. 高盐稀态酱油发酵优势真菌与风味物质相关性分析[J]. *食品科学*, 2022, 43(10): 172-179.
- RUAN Zhiqiang, DONG Ximei, JIANG Xuwei, et al. Correlation between dominant fungi and variation of flavor compounds during high-salt liquid-state soy sauce fermentation[J]. *Food Science*, 2022, 43(10): 172-179.
- [74] KIJIMA K, SUZUKI H. Improving the umami taste of soy sauce by the addition of bacterial γ -glutamyltranspeptidase as a glutaminase to the fermentation mixture[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 41(1/2): 80-84.

加工编辑: 张昱

收稿日期: 2023-12-18