

梯度升温发酵工艺对不同盐分稀态发酵酱油微生物变化和风味形成的影响

李心智, 刘希, 徐新玉, 周其洋, 吴昌正, 童星, 欧仕益

Effect of Gradient Heating Method on the Microbial Changes and Flavor Formation of Liquid-State Soy Sauce Fermented with Different Salt Concentrations

LI Xinzhi, LIU Xi, XU Xinyu, ZHOU Qiyang, WU Changzheng, TONG Xing, and OU Shiyi

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023080043>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

固形物浓度对高盐稀态酱油滋味物质的影响

Effect of solid concentration on the taste of soy sauce with high salt liquid state fermentation

食品工业科技. 2017(08): 133-138 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.08.018>

不同发酵工艺糙米酵素中游离氨基酸、 γ -氨基丁酸及挥发性香气成分分析

Component Analysis of Free Amino Acids, GABA and Volatile Aroma in Brown Rice Enzymes with Different Fermentation Processes

食品工业科技. 2019, 40(23): 36-41 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.23.006>

以小麦粉为基质的地衣芽孢杆菌与酵母混酵氨基酸代谢特征

Metabolic Characteristics of Amino Acid in Mixed Fermentation of *Bacillus* and Yeast Using Wheat Flour as Substrate

食品工业科技. 2019, 40(23): 88-92,97 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.23.015>

气相色谱-嗅闻/质谱联用分析酵母菌发酵酱油中香气物质

Analysis of Aroma Compounds in Yeast-fermented Soy Sauce by GC-O/MS

食品工业科技. 2020, 41(16): 259-265 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.16.041>

红曲霉菌混合制曲高盐稀态发酵过程挥发性物质的变化

Variation of Volatile Substances in High-salt Dilute Fermentation Process of *Monascus* Mixed Koji Production

食品工业科技. 2021, 42(13): 51-58 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020080316>

安福火腿游离脂肪酸、风味物质及氨基酸分析

Analysis of Free Fatty Acids, Flavor Substances and Amino Acids in Anfu Ham

食品工业科技. 2021, 42(16): 236-242 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020090113>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

李心智, 刘希, 徐新玉, 等. 梯度升温发酵工艺对不同盐分稀态发酵酱油微生物变化和风味形成的影响 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(9): 106–114. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023080043

LI Xinzhi, LIU Xi, XU Xinyu, et al. Effect of Gradient Heating Method on the Microbial Changes and Flavor Formation of Liquid-State Soy Sauce Fermented with Different Salt Concentrations[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(9): 106–114. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023080043

· 研究与探讨 ·

梯度升温发酵工艺对不同盐分稀态发酵酱油微生物变化和风味形成的影响

李心智^{1,2}, 刘希³, 徐新玉⁴, 周其洋^{3,5}, 吴昌正^{4,6}, 童星^{3,5,*}, 欧仕益^{1,*}

(1.暨南大学食品科学与工程系, 广东广州 510632;

2.佛山市海天调味食品股份有限公司, 广东佛山 528000;

3.佛山市海天(高明)调味食品有限公司, 广东佛山 528511;

4.广东海天创新技术有限公司, 广东佛山 528000;

5.广东省调味食品生物发酵先进技术企业重点实验室, 广东佛山 528000;

6.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: 本文以 12% 和 18% (w/v) 两种盐分浓度的稀态发酵酱醪为研究对象, 探究梯度升温 (15 °C-20 °C-25 °C-30 °C) 工艺对发酵酱醪微生物计数和风味形成的影响。结果显示: 采用梯度升温工艺的低盐分酱醪样品 (TC12) 的酵母计数在发酵到期时比恒温 (30 °C) 对照组 (C12) 要高 1.0 log CFU/g 左右, 这表明酵母在梯度升温工艺中维持生长代谢时间较长。这或与发酵前期较低的温度限制了酵母过快的繁殖有关。其中, TC12 的发酵到期原油的氨基酸态氮高达 1.14 g/100 g, 达到我国规定的特级酿造酱油标准。同时, TC12 中的鲜味 (19.03 g/L) 和甜味氨基酸 (19.32 g/L) 含量较高, 共占氨基酸总量约 60%, 呈现较好的鲜甜滋味。挥发性物质检测数据显示, TC12 中的乙醇、苯乙酸乙酯、棕榈酸乙酯、3-甲硫基丙醛和苯甲醛等含量较高, 样品整体呈现“水果甜香和酯香”。另一方面, 高盐组梯度升温样品 (TC18) 则测得更多的愈创木酚和甲基麦芽酚, 呈现“烟熏香和酱香”。感官鉴评数据显示, 低盐分梯度升温发酵样品 TC12 相比恒温发酵组 C12 具有更高的香气和滋味得分, 综合口感更优。综上所述, 梯度升温工艺有利于限制低盐分 (12%) 发酵酱醪中酵母在前期的过快生长, 保持其在发酵后期的活性细胞计数, 使其能持续发酵生成更多风味物质, 提升低盐发酵原油的整体风味。

关键词: 梯度升温, 低盐发酵酱油, 酵母, 氨基酸态氮, 游离氨基酸, 挥发性风味物质

中图分类号: TS210.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)09-0106-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023080043

本文网刊:



Effect of Gradient Heating Method on the Microbial Changes and Flavor Formation of Liquid-State Soy Sauce Fermented with Different Salt Concentrations

LI Xinzhi^{1,2}, LIU Xi³, XU Xinyu⁴, ZHOU Qiyang^{3,5}, WU Changzheng^{4,6}, TONG Xing^{3,5,*}, OU Shi Yi^{1,*}

(1. Department of Food Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. Foshan Haitian Flavoring & Food Co., Ltd., Foshan 528000, China;

3. Foshan Haitian (Gaoming) Flavoring & Food Co., Ltd., Foshan 528511, China;

4. Guangdong Haitian Innovation Technology Co., Ltd., Foshan 528000, China;

收稿日期: 2023-08-06

基金项目: 国家重点研发计划 (2022YFD2101203); 2019 年佛山市核心技术攻关项目 (1920001000824); 广东省调味食品生物发酵先进技术企业重点实验室开放基金 (2017B030302002); 广东省佛山市博士后基金及佛山市禅城区博士后基金。

作者简介: 李心智 (1992-), 女, 博士, 研究方向: 食品生物发酵, E-mail: li.xinzhi@jnu.edu.cn。

* 通信作者: 童星 (1982-), 男, 博士, 正高级工程师, 研究方向: 食品生物发酵, E-mail: tongx@haday.cn。

欧仕益 (1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品化学、食品加工, E-mail: tosy@jnu.edu.cn。

- 5.Key Laboratory of Advanced Technology Enterprise of Guangdong Seasoning Food Biofermentation, Foshan 528000, China;
- 6.Guangdong Provincial Research Centre of Brewing Microbiology Breeding and Fermentation Engineering Technology, Foshan 528000, China)

Abstract: In this paper, liquid-state fermented sauce mash with salt concentrations of 12% and 18% (w/v) was used as the research object, to explore the effect of gradient heating (15 °C-20 °C-25 °C-30 °C) on the microbial counting and flavor formation of fermented sauce mash. The results showed that the yeast counts of the low-salt sauce mash sample (TC12) using the gradient heating method was about 1.0 log CFU/g higher than that of the constant temperature (30 °C) control group (C12) at the end of fermentation, which indicated that the yeasts maintained growth and metabolism for a long time in the gradient heating group. This might be related to the fact that the lower temperature in the early stage of fermentation limited the rapid propagation of yeasts. Among them, the amino nitrogen of the fermented soy sauce from TC12 was as high as 1.14 g/100 g, which met the standard of premium-grade brewed soy sauce in China. At the same time, the content of umami (19.03 g/L) and sweet amino acids (19.32 g/L) in TC12 was high, accounting for about 60% of the total amino acids, presenting a better sweet and savory taste. The volatile compound detection data showed that the content of ethanol, ethyl phenylacetate, ethyl palmitate, 3-(methylthiopropionaldehyde) and benzaldehyde in TC12 was relatively high, and the sample showed an overall sweet-fruity aroma and ester-like aroma. On the other hand, the gradient heating sample of the high-salt group (TC18) contained more guaiacol and methyl maltol, showing a smoky incense and saucy aroma. The sensory evaluation results showed that the low-salt gradient heating fermentation samples TC12 had higher aroma and taste scores, as well as better comprehensive tastes than the constant temperature fermentation samples C12. In summary, the gradient heating method is beneficial to limit the excessive growth of yeast in low-salt (12%) fermented sauce mash in the early stage and maintaining a considerable cell count of yeast in the late stage of fermentation, so that the yeast can continuously ferment and generate more flavor substances and improve the overall flavor of low-salt fermented soy sauce.

Key words: gradient heating method; low-salt fermented soy sauce; yeast; amino nitrogen; free amino acids; volatile flavor compounds

酱油是起源于我国的一种传统发酵调味品,具有浓厚的鲜咸口感和独特的香气,广泛流行于中国、日韩及其他亚洲地区^[1]。在酱油传统酿造工艺中,酱油制曲和酱醪发酵都是在非无菌的环境中进行的,因此原生微生物菌落的生长代谢对酱油风味的形成具有重要影响^[2]。酱油作为亚洲消费者日常生活中的必需调味料,已经被广泛应用于人们日常饮食和烹饪中。随着健康饮食意识的提高,人们开始注意限制食物中钠盐的日常摄入。数据显示,在许多亚洲国家和地区,人们日常摄入的钠盐有 80% 来自酱油和酱料等调味品^[3]。因此,开发出风味和品质较好的减盐酱油和酱料成为调味品行业发展的新趋势,且具有巨大的市场潜力。

开发减盐酱油的关键技术问题之一为腐败微生物的防控:因为盐分降低后,发酵酱油中的环境渗透压随之降低,对有害微生物抑制力度降低;问题之二为酱油风味调控:盐分降低后,传统嗜盐发酵微生物的生长代谢受到影响,从而影响了发酵酱油中风味物质的形成^[4]。LIN 等^[5]提出减盐酱油的研发的关键为调控和利用好关键发酵微生物如酵母和乳酸菌的相互作用,在降低有害微生物污染的同时保证酱油风味物质的形成。酱醪微生物的生长规律及代谢作用与体系中的盐分浓度、温度控制关系较大,其中,活性乳酸菌和酵母之间的拮抗作用对酱油的风味形成影响较大^[1]。尹文颖等^[6]探究了不同发酵温度(25 °C、35 °C、自然温度)对高盐稀态酱油原油品质

的影响,发现在 25 °C 下发酵 60 d 获得的原油品质和风味最好,这款原油的总氮、氨基酸态氮、还原糖等理化指标均为最高。于茜雅等^[7]探究 37、30、15 °C 和自然温度对高盐稀态发酵原油的品质的影响,发现在 30 °C 的温度下发酵的原油中检测到的醇类、酯类及酚类挥发性化合物的相对含量最丰富,且该组的感官评分最高,综合品质最佳。HOANG 等^[8]发现,在酱醪发酵的第一个月,把温度控制在 15 °C,后期再逐步升温至 30 °C 的工艺有利于调控前期乳酸菌和酵母的生长,从而影响整体酱油风味形成,并获得品质更优的发酵原油。

然而,目前国内外有关温度对发酵酱油风味影响的研究多采用同一温度的恒温发酵工艺,关于梯度升温发酵工艺的研究少有报道。因此,本文对两种盐分浓度—高盐分(18%, w/v)和低盐分(12%, w/v)的酱醪进行梯度控温发酵,并通过测定酱醪在发酵过程中的微生物计数、理化指标的变化,以及发酵到期原油中游离氨基酸、挥发性风味物质的形成,探究梯度升温工艺对不同盐分下稀态发酵酱油风味形成的影响,为开发出一种高品质的低盐发酵酱油提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

曲料和盐水 佛山市海天(高明)调味食品股份有限公司;PCA、PDA、MRS 培养基 广东环凯生物公司;纳他霉素、氯霉素、游离氨基酸标准样 美国

Sigma-Aldrich 公司; 高浓度甲醛、氢氧化钠溶液等测定试剂 天津市大茂化学试剂厂。

YXQ-70A 型立式压力蒸汽灭菌器 上海东亚压力容器制造有限公司; DL-CJ-2NDI 单面普及型洁净工作台 北京东联哈尔仪器制造有限公司; JC-100-SE 型恒温培养箱 青岛精诚仪器仪表有限公司; PHscan40 笔形 pH 计 上海般特仪器制造有限公司; 905 自动电位滴定仪 瑞士万通中国有限公司; 1290 infinity II 高压液相-质谱联用仪、7890B-5977B 气相色谱-质谱联用仪 美国安捷伦公司; LA8080 高速氨基酸分析仪 日本株式会社日立高新技术科学公司。

1.2 实验方法

1.2.1 酱醪制备与发酵 通过计算调整成曲和盐水的混合比例, 落黄后获得高盐分酱醪和低盐分酱醪的含盐量分别为 18% 和 12%(w/v)。酱醪样品以落黄日开始记为 0 d, 这个发酵周期为 60 d。样品在 2 L 的小型发酵罐中进行静态发酵。梯度升温组的升温调控分为四个阶段: (a) 0~5 d 发酵温度为 15 °C; (b) 5~15 d 发酵温度为 20 °C; (c) 15~30 d 发酵温度为 25 °C; (d) 30~60 d 发酵温度为 30 °C。其中梯度升温实验组根据盐分浓度标记为 TC12(盐分浓度为 12%) 和 TC18(盐分浓度为 18%), 对应的恒温发酵对照组则持续在 30 °C(本项目所在地区进行自然酱油发酵时的实际平均温度)条件下发酵至到期, 样品标记为 C12 和 C18。发酵过程中定期(约每 5 d)对发酵样品进行通气搅拌, 并于第 0、5、15、30、45 和 60 d 进行酱醪取样约 50 g, 随即进行微生物计数和用手持式 pH 计对酱醪进行 pH 测定; 剩余样品冻存留作后续理化分析。

1.2.2 微生物菌落计数 参考 HOANG 等^[8] 微生物菌落计数的方法并进行适当调整, 将取得的酱醪样品先用灭菌的 0.85% 盐水进行梯度稀释至适宜浓度, 取 1.0 mL 稀释液于平板内, 倒入 PCA 培养基(添加 5% 氯化钠), 置于 30 °C 培养箱培养约 48 h, 记录总菌落数; 取 0.1 mL 稀释液涂布于 PDA 培养基(添加 5% 氯化钠和 0.1 g/L 氯霉素), 置于 30 °C 培养箱静置培养 48~72 h, 记录总酵母计数; 取 1.0 mL 稀释液于平板内, 倒入 MRS 培养基(添加 5% 氯化钠 0.5 g/L 纳他霉素), 置于 37 °C 培养箱培养 24~36 h, 记录总乳酸菌计数。

1.2.3 理化指标的测定 各个发酵阶段取样的酱醪样品压榨过滤后获得酱醪清液。还原糖的测定参照 GB 5009.7-2016《食品中还原糖的测定》的直接滴定法^[9]; 氨基酸态氮的测定使用 GB 5009.235-2016《食品中氨基酸态氮的测定》的甲醛滴定法^[10]。游离氨基酸的含量测定根据 GB/T 30987-2020《植物中游离氨基酸的测定》的方法进行^[11]。

1.2.4 挥发性风味物质测定 参考阮志强等^[12] 测定酱油挥发性风味物质的方法并作一定优化后对样品中的挥发性物质进行处理和进样测定。每个样品测定三次平行并根据 NIST 17.0 数据库和内标物进行半定量分析。

样品处理: 吸取 5.0 mL 原油和 25 μL 浓度为 3.30 μg/mL 的 2-辛醇溶液(内标物)于 20 mL 顶空瓶中, 在孵化器中于 40 °C 平衡 15 min, 并在 40 °C 下用 CAR/PDMS 固相微萃取头顶空萃取 30 min。萃取完成后在进样口于 250 °C 中解析 1 min, 完成进样。GC 条件: HP-INNOWax 毛细色谱柱(60 m×250 μm×0.25 μm); 进样口温度为 250 °C, 程序升温条件为 40 °C 保持 5 min, 后以 5 °C/min 升温至 240 °C, 保持 15 min。载气为氦气, 流速为 1.2 mL/min。MS 条件: EI 离子源, 离子源温度为 250 °C, 电子能量为 70 eV, 四级杆和传输线温度分别为 200 °C 和 220 °C, 质量扫描范围为 35~500 amu。

1.2.5 感官评定 参考苏国万等^[13] 使用的酱油感官评价方法及标准(表 1)进行。本实验邀请了 22 位某调味品公司具有两年以上酱油鉴评丰富经验的鉴评员(11 位男性和 11 位女性, 年龄分布在 20~40 岁之间)对梯度升温发酵样品和恒温发酵样品进行感官评价, 并记录其在各项评定标准上的得分, 汇总处理。

1.3 数据处理

本实验重复三次以上, 数据使用 SPSS Statistics 29.0 进行分析, 实验结果以平均值±标准差(SD)表示, 并进行单因素方差分析($P < 0.05$); 采用 Graph Pad Prism 8.0.1 软件对实验数据作图。

2 结果与分析

2.1 不同盐分酱醪在不同发酵温度过程中微生物菌落计数变化

酱油的发酵主要依赖多种耐盐微生物的协同作用, 微生物菌群在酱油发酵过程中会随着营养物质的

表 1 发酵原油感官鉴评评分指导

Table 1 Scoring guidance for the sensory evaluation of fermented soy sauce

酱油感官鉴评标准	4分	3分	2分	1分
色泽	色泽鲜艳, 呈深红色, 具有光泽	红褐色或红棕色, 有光泽	深褐色, 色泽较暗, 无光泽	棕褐色, 色泽黑暗, 无光泽
香气	具有酱香特有的浓郁香气, 无不良风味	具有酱香较浓的芳香味, 无不良异味	酱香味稍平淡, 无不良气味	酱香味很淡, 基本无不良气味
滋味	味道鲜美适口, 醇厚, 柔和绵长, 咸味适度	整体味鲜美适口, 咸味适度	鲜味较淡, 醇味薄, 咸味适度	鲜味非常淡, 醇味薄, 咸味适度
体态	澄清, 无漂浮物, 无杂质	较澄清, 基本无杂质	有少量悬浮物和杂质	悬浮物和杂质较多
综合喜好度	十分喜欢	喜欢	不太喜欢	不喜欢

消耗、环境的改变和微生物间的相互作用而呈现出动态变化^[14]。图 1 汇总了恒温和梯度升温发酵样品过程中两种盐分浓度中的总菌落数、总酵母数和总乳酸菌数的变化过程。

其中, 如图 1(A)、(B)所示, 不同温度和盐分的发酵样品均呈现总菌落数随着发酵时间延长而逐渐降低的趋势, 由落黄时的 6.5 log CFU/g 稍升高后逐渐下降。梯度升温的 TC12 样品总菌落数在发酵至 60 d 时仍维持在 4.5 log CFU/g 水平, 表明在低盐分酱醪中, 发酵前期较低的温度或有利于保留微生物在发酵后期的活性, 防止其在后期因营养不足或环境 pH 大幅降低而大量死亡的情况^[15]。而在高盐分酱醪中, 梯度升温工艺对总微生物的生长繁殖影响并不明显, 表现为 C18 和 TC18 的总菌落变化无显著差异。

在传统高盐稀态酱油的酱醪发酵的体系中, 酵母主要随着曲料自然带入, 对酱油风味的形成至关重要^[16]。如图 1(C~F)所示, 在发酵前期, 乳酸菌对原料中的蛋白质和糖类进行分解代谢的活动较为活跃,

而酵母的增殖主要处于被抑制或较缓慢状态。当体系中有有机酸逐渐积累导致酱醪环境的酸度逐渐增强后, 酵母菌的增殖代谢则有一定提升^[17]。到后期, 由于体系营养中的成分的消耗和某些有害细胞代谢物的积累, 酵母和其他微生物的生长则再次受到抑制^[18]。在本研究中, 平板计数获得的总酵母数量随着酱醪发酵进程的推进, 基本呈现先增殖后下降的规律, 基本符合文献报道的酱油酵母的生长规律。梯度升温发酵样品 TC12 比恒温发酵样品检测到酵母数在发酵后期多 1.0 log CFU/g 左右, 或因梯度升温工艺有效地控制酵母在前期的快速生长繁殖, 后期有较多酵母菌仍保有较高活性^[8]。

在本研究的酱醪发酵过程中, 乳酸菌一直是其中的优势群体, 尤其是在发酵前期, 总乳酸菌计数高达 6.0 log CFU/g 以上。在高盐酱油发酵中, 常见的乳酸菌如噬盐四联球菌等在发酵前期生长代谢十分活跃, 参与原料的蛋白质和糖类的分解, 同时通过自身代谢途径降解氨基酸, 生成相应的风味有机酸和香

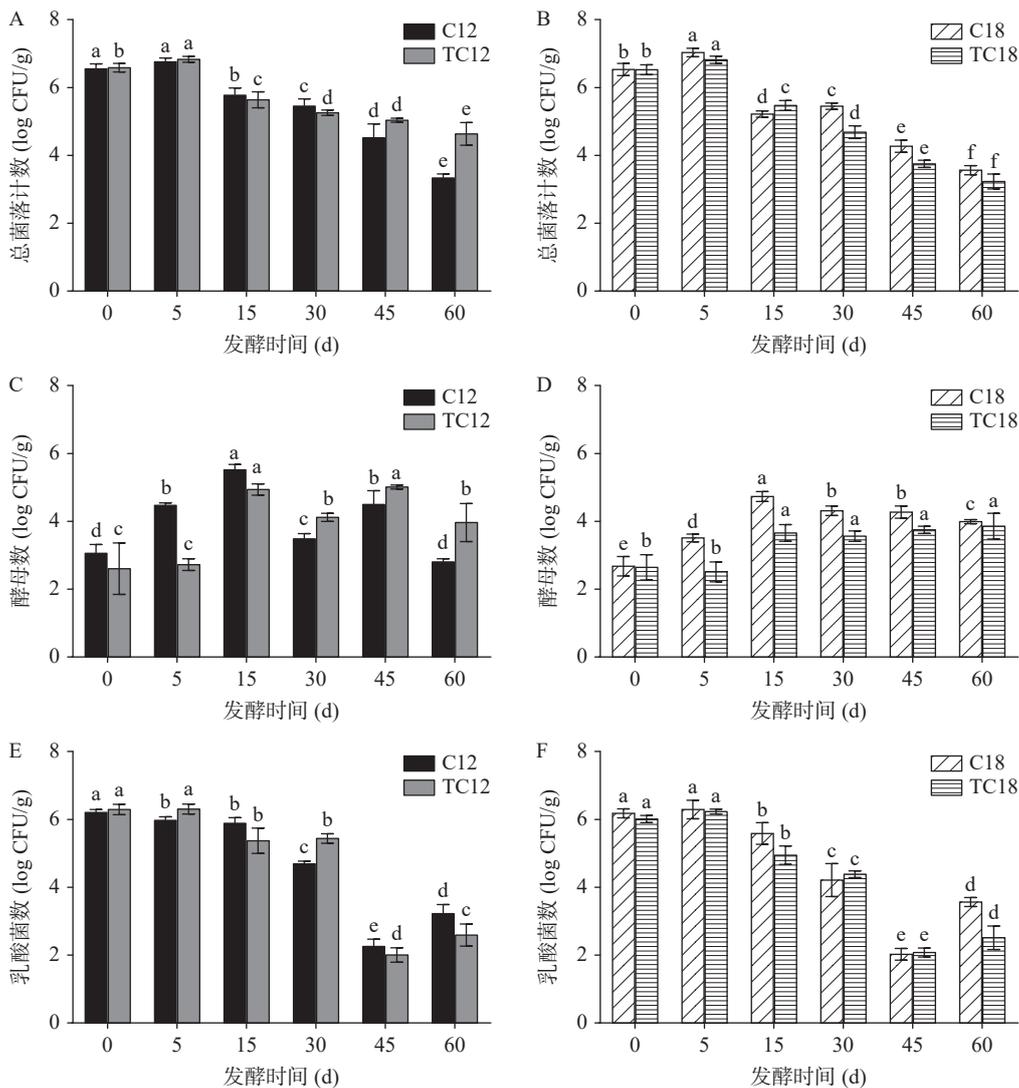


图 1 盐分浓度为 12% 和 18% 的酱醪在不同控温发酵过程中微生物变化

Fig.1 Microbial changes of sauce mash with salt concentrations of 12% and 18% during different temperature-controlled fermentation

注: 同一样品中的不同小写字母表示在 0.05 水平不同发酵时间的样品之间差异显著。

气物质等^[19]。在酱醪发酵后期,由于营养物质的消耗、环境酸度的增加和细胞代谢物的积累,体系中的乳酸菌的生长逐渐受到抑制^[20]。在本实验中,乳酸菌的计数最终降至约 2.5~3.5 log CFU/g 水平。在本研究中,梯度升温 and 恒温发酵酱醪的乳酸菌计数变化规律较为相似,或因梯度升温工艺对酱醪发酵乳酸菌的生长代谢的影响并不显著。

2.2 不同盐分酱醪在不同发酵温度过程中理化指标的变化

不同盐分酱醪在恒温 and 梯度升温工艺下,样品的 pH、还原糖和氨基酸态氮的变化如图 2 所示。可见,酱醪在落黄时的 pH 大致为 5.8,并随着发酵的推进而逐渐下降。高盐分组的 pH 在发酵结束时下降至 5.0 左右,而低盐分组的 pH 则大幅下降至约 4.5。整体来讲,梯度升温发酵的样品 pH 下降速率较恒温发酵样品低,表明在发酵前期的低温调控或有效地抑制了部分产酸微生物的增殖,防止低盐体系中的环境变酸过快。

四组样品的还原糖含量均出现稍升高后下降的情况。在低盐分组中,恒温发酵的 C12 样品还原糖含量由初始的 4.0 g/100 g 左右到第 5 d 先升高至 4.5 g/100 g,然后下降至发酵结束时约 1.3 g/100 g 水平;梯度升温发酵的 TC12 的还原糖含量则在第 15 d 升高至峰值约 5.1 g/100 g,然后下降至发酵结束时的 1.5 g/100 g 水平。在高盐分组中,C18 和 TC18 样品的还原糖含量分别第 5 d 内升高至 4.2 和 4.4 g/100 g 左右,后逐渐下降至发酵结束时的约 1.6 g/100 g。还原糖含量在发酵过程中是一个不断生成和被消耗的动态过程^[21]。还原糖含量在发酵初期的短暂升高可能是由于曲料中的淀粉酶在发酵前期依然具有较高活性,将原料中的淀粉降解成葡萄糖等,导致测定的还原糖含量升高^[22]。同时,微生物在发酵前期也在逐渐开始消耗还原糖,但由于发酵前期还原糖的生成速率比消耗速率更高,于是出现了还原糖含量短暂升高的情况^[21]。因为高浓度盐分对米曲霉的酶活具有一定的抑制作用,因此出现低盐分组样

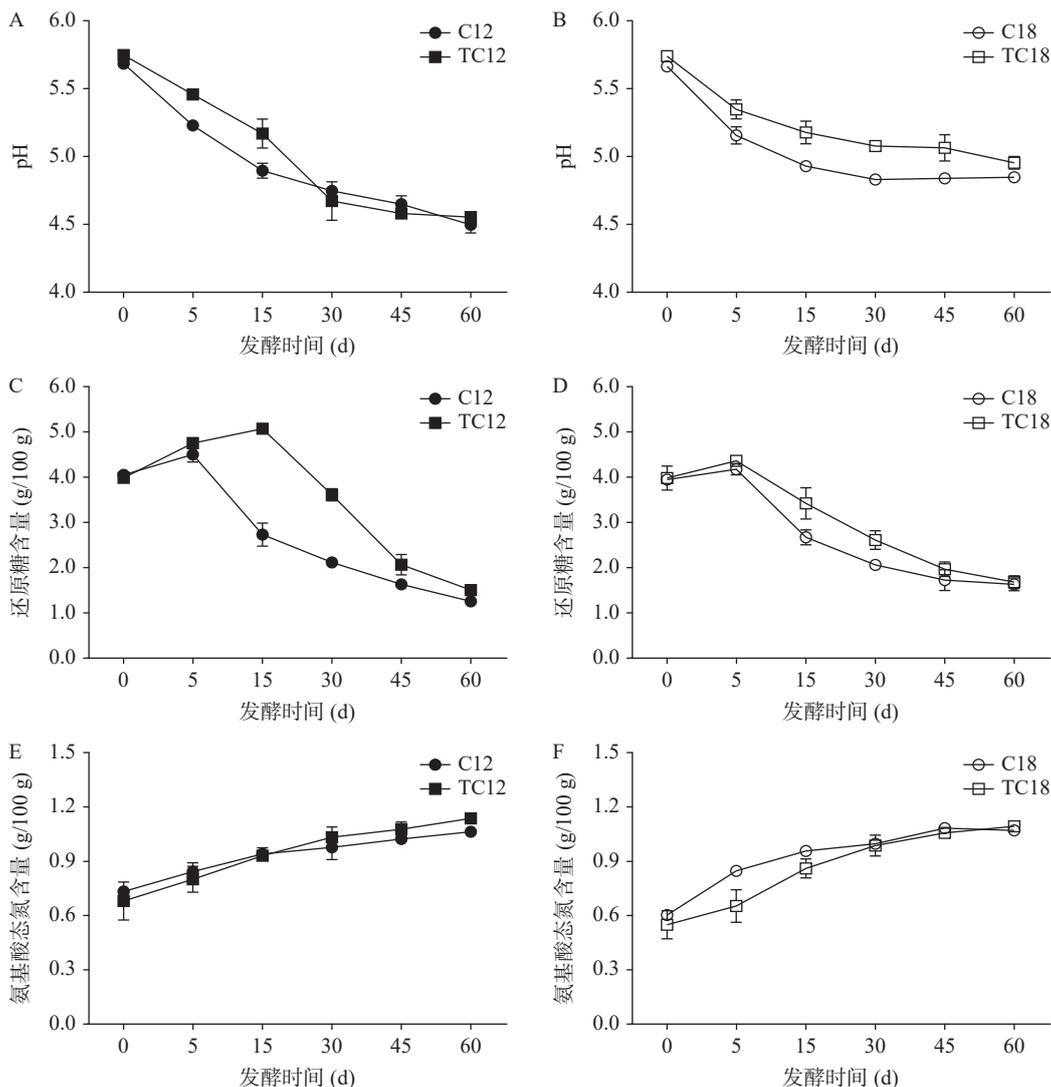


图 2 盐分浓度为 12% 和 18% 的酱醪在不同控温发酵过程中各项理化指标的变化

Fig.2 Changes of physicochemical index of sauce mash with salt concentrations of 12% and 18% during different temperature-controlled fermentation

品在前期的还原糖生成率比高盐分组更高的情况^[1]。

氨基酸态氮的含量是评价发酵酱油质量高低的重要指标之一^[23]。我国酿造酱油标准规定,酱油中氨基酸态氮指标 ≥ 0.8 g/100 mL(对应为 ≥ 1.0 g/100 g)可评价为特级酱油^[24]。如图 2(E)、(F)所示,发酵至 60 d 时,低盐分发酵样品 C12、TC12 和高盐分发酵样品 C18、TC18 的氨基酸态氮含量分别为 1.06、1.14 g/100 g 和 1.07、1.10 g/100 g,均达到特级酱油的等级。氨基酸态氮的升高主要由米曲霉中的酶系对原料中的蛋白质、多肽等进行水解的结果;而另一方面,微生物代谢和体系中的美拉德反应也会消耗掉一部分氨基酸态氮,导致其含量下降^[22]。在低盐分组中,恒温 and 梯度升温样品的氨基酸态氮的含量呈均匀上升趋势,两者在氨氮的生成速率方面并无显著差异。在高盐分组中,梯度升温组 TC18 中的氨基酸态氮在 30 d 前生成速率低于恒温组 C18,但在 30 d 后则开始快速生成甚至速率超过恒温样品。这个现象和 KUANG 等^[25]在他们的研究中提及的情况相似,推测为在高盐分的条件下,米曲霉的酶活受到一定抑制,而生成氨基氮的微生物在恒温条件下发酵初期生长良好;而到后期,营养的缺乏或是造成恒温发酵组氨基酸态氮生成速率降低的原因。

2.3 不同盐分酱醪发酵到期样品中的游离氨基酸含量

恒温 and 梯度升温发酵到期样品(60 d)和未发酵酱醪(0 d)的游离氨基酸对比情况汇总于表 2。如

表 2 所示,经过 60 d 发酵后的四个样品的氨基酸含量都较未发酵样品显著增高($P < 0.05$),其中,梯度升温发酵的 TC12 和 TC18 样品的氨基酸总量比未发酵样品高出 2 倍以上。其中,TC18 的总鲜味氨基酸含量最高,达 20.07 g/L,占该样品总游离氨基酸比例约 32.4%;而 TC12 的总甜味氨基酸最高,为 19.32 g/L,约占 29.7%。可见发酵前期的低温调控能有效地保留了部分水解力较强的微生物在发酵后期的活性,能在发酵后期更充分地生成有利风味的物质^[8]。不同盐分的恒温发酵样品(C12 和 C18)在 60 d 时的各个类别氨基酸含量占总游离氨基酸的比例并无显著差异(其中鲜味、甜味和苦味氨基酸占比分别为 31%、27% 和 42% 左右),推测可能因为酱醪中营养物质有限,在足够长的发酵时间内,不同盐分浓度下的微生物基本都能水解原料生成相似含量的氨基酸^[26]。

游离氨基酸在酱油原油中贡献了鲜、甜、酸等味觉感受,是酱油独特滋味的重要呈现物质之一^[1]。可见,梯度升温发酵的 TC12 和 TC18 在鲜甜这些让人愉悦口感的呈现上或有一定优势。另一方面,游离氨基酸也是后期原油经热处理中发生美拉德反应的重要前提物之一,对最终酱油的风味形成至关重要^[27]。例如,含硫氨基酸半胱氨酸(Cys)和甲硫氨酸(Met),虽然在单体水溶液中呈现苦味,但能在美拉德反应中和还原糖(特别是戊糖类)反应生成各类含硫的“酱香、烧烤和鲜咸香气”的挥发性物质,如 2-糠

表 2 盐分浓度为 12% 和 18% 的酱醪在不同控温发酵后游离氨基酸的含量(g/L)
Table 2 Free amino acid contents of sauce mash with salt concentrations of 12% and 18% after different temperature-controlled fermentation (g/L)

氨基酸分类	未发酵对照	低盐分组(60 d)		高盐分组(60 d)	
		C12	TC12	C18	TC18
鲜味 Asp	1.78±0.12 ^e	6.50±0.15 ^c	5.56±0.23 ^d	7.09±0.07 ^b	7.43±0.12 ^a
鲜味 Glu	4.25±0.21 ^e	9.97±0.19 ^d	13.48±0.31 ^a	10.57±0.31 ^c	12.63±0.25 ^b
小计	6.03±0.33 ^e	16.47±0.34 ^d	19.03±0.54 ^b	17.66±0.38 ^c	20.07±0.36 ^e
甜味 Thr	1.03±0.04 ^e	2.52±0.05 ^d	3.20±0.10 ^a	2.85±0.13 ^c	3.10±0.12 ^b
甜味 Ser	1.46±0.04 ^e	3.40±0.05 ^d	4.20±0.10 ^a	3.66±0.09 ^c	3.88±0.13 ^b
甜味 Gly	1.62±0.07 ^e	2.42±0.04 ^d	2.99±0.06 ^a	2.62±0.07 ^c	2.82±0.08 ^b
甜味 Ala	2.35±0.04 ^d	3.26±0.05 ^c	5.49±0.11 ^a	3.36±0.15 ^c	3.52±0.07 ^b
甜味 Pro	1.97±0.18 ^d	2.57±0.11 ^c	3.44±0.18 ^a	2.49±0.48 ^c	2.99±0.26 ^b
小计	8.43±0.37 ^e	14.16±0.30 ^d	19.32±0.56 ^a	14.97±0.93 ^c	16.28±0.66 ^b
苦味 Cys	0.61±0.00 ^b	0.66±0.01 ^a	0.56±0.05 ^c	0.49±0.02 ^c	0.53±0.03 ^d
苦味 Val	2.50±0.04 ^d	3.56±0.05 ^c	4.26±0.29 ^a	3.78±0.11 ^b	3.88±0.10 ^b
苦味 Met	0.74±0.00 ^e	0.80±0.01 ^d	1.13±0.17 ^a	1.01±0.02 ^c	1.07±0.03 ^b
苦味 Ile	1.62±0.07 ^d	3.28±0.06 ^c	3.91±0.34 ^a	3.79±0.11 ^b	3.90±0.11 ^a
苦味 Leu	2.52±0.11 ^e	4.94±0.08 ^d	5.89±0.41 ^b	5.70±0.11 ^c	6.08±0.16 ^e
苦味 Tyr	0.77±0.04 ^a	0.60±0.01 ^b	0.45±0.11 ^c	0.29±0.01 ^d	0.26±0.02 ^c
苦味 Phe	2.32±0.04 ^e	3.10±0.04 ^b	3.74±0.03 ^a	3.13±0.05 ^b	3.76±0.32 ^a
苦味 Lys	2.48±0.03 ^d	4.01±0.06 ^c	4.78±0.03 ^a	4.34±0.12 ^b	4.42±0.10 ^b
苦味 His	1.20±0.02 ^d	1.27±0.03 ^c	1.87±0.01 ^a	1.63±0.04 ^b	1.65±0.04 ^b
苦味 Arg	1.10±0.03 ^a	0.14±0.01 ^c	0.16±0.00 ^b	0.10±0.01 ^d	0.13±0.01 ^c
小计	15.86±0.39 ^e	22.37±0.36 ^d	26.76±1.44 ^a	24.25±0.60 ^c	25.69±0.93 ^b
总计	30.32±1.09 ^e	53.00±0.99 ^d	65.10±2.54 ^a	56.88±1.91 ^c	62.04±1.95 ^b

注: 同行不同小写字母表示在 0.05 水平不同样品之间差异显著。

硫醇(2-furfurylthiol)、5-甲基噻吩-2-甲醛(5-methyl-2-thiophenecarboxaldehyde)和甲硫基丙醛(3-(methylthio) propionaldehyde)等,对酱油成品的整体特征风味的构成十分重要^[28]。梯度升温发酵的 TC12 和 TC18 中较多的 Cys 和 Met 含量或有利于原油后期热处理阶段的“酱香、焦香”等风味的进一步生成,对酱油产品的风味品质具有较强的提升作用。

2.4 不同盐分酱醪发酵到期样品中的挥发性风味物质含量

表 3 呈现了在恒温与梯度升温发酵工艺下不同盐分浓度发酵到期原油的挥发性成分的含量。显然,发酵后的酱醪中总挥发性风味物质含量均显著提升,原油风味明显增强。作为酵母最重要的代谢产物之一,挥发性乙醇的含量在发酵后整体增加 2~3 倍。低盐分组中梯度升温的 TC12 样品中乙醇含量最高,达到 491.69 $\mu\text{g/L}$ 左右; C12 样品中乙醇含量约为 403.71 $\mu\text{g/L}$ 。高盐分组的乙醇含量相对较少,均为 330 $\mu\text{g/L}$ 左右。可见,低盐分的稀态酱醪发酵体系中的较低渗透压对体系中的微生物特别是酵母的生长代谢有利,不仅有利于进一步提升原油的“酒香和酱香”,还对低盐分原油的腐败菌防控有一定的帮助^[18]。与乙醇的形成相似的是,低盐分发酵原油中酯类含量比高盐分原油要更高,如苯乙酸乙酯和棕榈酸乙酯,在 TC12 组中含量分别约为 6.15 和 74.84 $\mu\text{g/L}$,而在对应的高盐分组 TC18 中含量约为 1.89 和 51.93 $\mu\text{g/L}$ 。“花香、果香型和奶香”型的酯类的生成成为酵母的代谢的特征性挥发性成分之一,再次验证了本研究中低盐分发酵样品的酵母生长代谢对风味形成的优势^[29]。3-甲硫基丙醛(10.22 $\mu\text{g/L}$)和苯甲醛(19.49 $\mu\text{g/L}$)等与“烧烤、焦香”有关的挥发性化合物同样在低盐分组(TC12)中含量也较高,其中,3-甲硫基丙醛和苯甲醛等的增多推测均为酵母或乳酸菌对苯丙氨酸等相关氨基酸通过 Ehrlich 路径的代谢的产物,是构成酱油香气的重要挥发性物质之一^[19-20,22]。然而,与酱油的“烟熏、酱香”有关的酚类

物质如愈创木酚和甲基麦芽酚等,在高盐分组含量更多(在 TC18 中含量分别约为 2.47 和 7.96 $\mu\text{g/L}$)。这或和其中嗜盐微生物如鲁氏接合酵母、嗜盐四联球菌等在高盐分体系中占据主导发酵地位有关^[1,14]。LIU 等^[22]曾在高盐稀态酱醪发酵初期接入鲁氏接合酵母,发现发酵到期的原油中愈创木酚含量显著增高,酱油的风味明显提升。本研究中其他常见的挥发性化合物如苯乙醛、苯乙醇、异戊醛和 2-甲基丁醛等,在不同盐分条件下生成的含量无显著差异。可见,降低酱醪发酵环境中的盐分浓度或能导致发酵到期原油的风味从原来的更具“焦香、烟熏和酱香”的风味型转变为偏“花香、蜜香和酯香”更浓郁的风味型。

2.5 感官鉴评

本研究根据不同发酵工艺获得的四款发酵原油在经过短时间热处理灭菌后,共邀请 22 名对酱油产品感官鉴评有丰富经验的从业者,采取评分法对样品进行感官鉴评。其中酱油原油的评分标准参考表 1 所示指导表进行^[13]。本次评分鉴评结果汇总于图 3。结果显示,在高盐分发酵条件下,梯度升温发酵(TC18)和恒温发酵组(C18)样品在色泽、香气、滋味、体态及综合喜爱度的得分都十分接近,其中香气的得分最高约为 3.6,而滋味的得分最低只有 2.45 水平。表明高盐分发酵原油在“酱香”的生成方面较好,而滋味方面或由于样品过咸、口感偏苦涩而抑制了其鲜甜醇厚味的呈现,导致评分降低^[30]。另一方面,梯度升温发酵的样品 TC12 样品的滋味、香气、色泽和综合喜好得分均高于恒温发酵样品。其中,TC12 中更高的色泽评分或由于发酵过程中微生物并未过度消耗还原糖,使得部分还原糖能参与到后期热反应的美拉德反应中,形成更深的酱油色^[31]。TC12 中更好的香气和滋味得分或得益于梯度升温发酵工艺下,酵母和乳酸菌等功能性微生物在后期仍保有较高活性,继而持续生成和积累更多的香气和滋味物质,形成更好的原油风味^[8]。综上,梯度升温发酵工艺有效地改善了低盐分发酵原油的风味不足的问题。

表 3 盐分浓度为 12% 和 18% 的酱醪在不同控温发酵后挥发性化合物的含量($\mu\text{g/L}$)

Table 3 Contents of volatile compounds in sauce mash with salt concentrations of 12% and 18% after different temperature-controlled fermentation ($\mu\text{g/L}$)

挥发性化合物	气味描述 ^[22]	未发酵对照	低盐分组(60 d)		高盐分组(60 d)	
			C12	TC12	C18	TC18
乙醇	酒精香	159.17±5.41	403.71±13.1	491.69±13.51	326.43±11.29	331.69±10.61
苯乙醛	花香、蜜香	5.67±1.44	30.81±0.93	28.98±0.18	26.46±0.85	30.41±1.92
苯乙醇	甜香	0.63±0.08	20.76±0.25	22.12±0.16	20.76±1.34	21.23±3.66
苯乙酸乙酯	花香、蜜糖香	1.37±0.17	5.95±0.54	6.15±0.42	2.09±0.49	1.89±0.22
棕榈酸乙酯	奶油香气	20.98±3.10	75.8±9.53	74.84±1.57	54.81±3.58	51.93±5.16
异戊醛	水果甜香	11.5±2.54	10.04±0.38	9.62±0.88	10.32±0.84	9.48±6.97
2-甲基丁醛	麦芽香	6.02±1.73	4.99±0.43	5.37±0.46	5.41±0.62	5.28±0.42
3-甲硫基丙醛	烤土豆香	4.26±0.57	10.22±1.68	9.13±0.09	5.76±0.46	6.33±0.30
苯甲醛	焦糖香	7.18±0.70	19.49±1.52	18.03±0.89	15.08±0.36	15.45±2.20
愈创木酚	烟熏、香料	0.98±0.31	1.54±0.02	1.74±0.09	1.95±0.08	2.47±0.27
甲基麦芽酚	水果型芳香	2.91±0.52	3.27±0.73	3.11±0.86	5.99±1.68	7.96±2.64

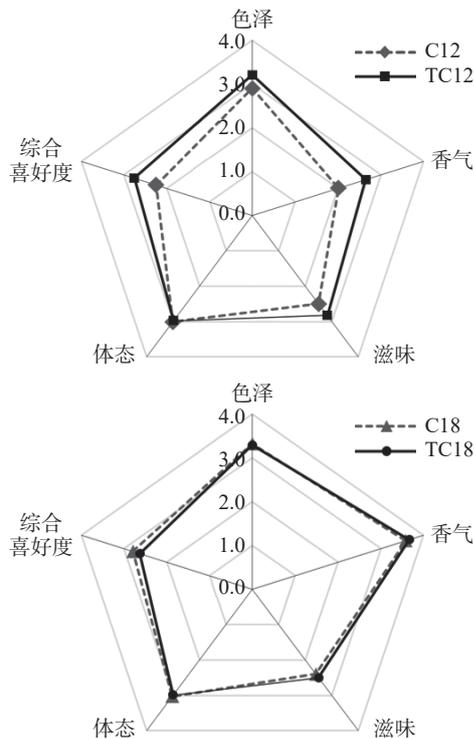


图3 盐分浓度分别为12%和18%的发酵原油感官鉴评得分

Fig.3 Sensory scores of fermented soy sauce with salt concentrations of 12% and 18%

3 结论

本研究结果表明,采用梯度升温工艺的低盐分酱醪样品(TC12)的酵母计数在发酵到期时比恒温对照组(C12)要高 1.0 log CFU/g 左右,且该组发酵原油中检测氨基酸态氮高达 1.14 g/100 g,酱油品质较高;其中,TC12 中的鲜味(19.03 g/L)和甜味氨基酸(19.32 g/L)含量较高,呈现较好的鲜甜滋味。挥发性物质检测同样指出 TC12 中的乙醇、苯乙酸乙酯、棕榈酸乙酯、3-甲硫基丙醛和苯甲醛等含量较高,其中 TC12 中的苯乙酸乙酯和棕榈酸乙酯含量较 TC18 组高出 1.5~3 倍,整体呈现强烈的“水果甜香和酯香”。但该低盐升温发酵工艺产出的原油与传统高盐稀态发酵酱油中的“焦香、酱香”型风味特征仍有一定差距。因此,在将来的研究中,可考虑在梯度升温工艺的基础上,向低盐酱醪中添加部分耐盐酵母(如鲁氏接合酵母等)和耐盐乳酸菌(如嗜盐四联球菌等),增加低盐酱醪中呈“焦香、酱香”等挥发性风味物质的形成,进一步缩小低盐发酵原油与传统高盐发酵原油的风味差距。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

[1] DEVANTHI P V P, GKATZIONIS K. Soy sauce fermentation: Microorganisms, aroma formation, and process modification [J]. *Food Research International*, 2019, 120: 364–374.

[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] 刘贺, 章启鹏, 徐婧婷, 等. 减盐相关产品研究进展及开发现状 [J]. *中国调味品*, 2017, 42(11): 175–180. [LIU H, HE Q Z, XU Q T, et al. Research progress and development status of low-salt products [J]. *China Condiment*, 2017, 42(11): 175–180.]

[4] SHAO S, HUA Y, YANG Y, et al. Salt reduction in China: A state-of-the-art review [J]. *Risk Management and Healthcare Policy*, 2017: 17–28.

[5] LIN X, TANG Y, HU Y, et al. Sodium reduction in traditional fermented foods: Challenges, strategies, and perspectives [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(29): 8065–8080.

[6] 尹文颖, 崔春, 陈玲, 等. 发酵温度对高盐稀态酱油原油品质的影响 [J]. *食品工业科技*, 2014, 35(2): 154–157. [YIN W Y, CUI C, CHEN L, et al. Effects of fermentation temperature on the quality of soy sauce [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, 35(2): 154–157.]

[7] 于茜雅, 鲁骞, 吴昌正, 等. 温度对广式高盐稀态酱油原油品质的影响 [J]. *食品科学*, 2023, 44(22): 55–63. [YU X Y, LU Q, WU C Z, et al. Effect of ambient temperature on the quality of high-salt liquid Cantonese raw soy sauce [J]. *Food Science*, 2023, 44(22): 55–63.]

[8] HOANG N X, FERNG S, TING C H, et al. Optimizing the initial moromi fermentation conditions to improve the quality of soy sauce [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2016, 74: 242–250.

[9] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 酱油中还原糖的测定: GB 5009.7-2016 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.

[National Health and Family Planning Commission. National Standard of Food Safety-Determination of reducing sugar in soy sauce: GB 5009.7-2016 [S]. Beijing: China Standards Press, 2016.]

[10] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品中氨基酸态氮的测定: GB 5009.235-2016 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [National Health and Family Planning Commission. National Standard of Food Safety-Determination of amino nitrogen in foods: GB 5009.235-2016 [S]. Beijing: China Standards Press, 2016.]

[11] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 植物中游离氨基酸的测定: GB/T 30987-2020 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2020. [National Health and Family Planning Commission. National Standard of Food Safety-Determination of free amino acids in plants: GB/T 30987-2020 [S]. Beijing: China Standards Press, 2020.]

[12] 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 Z Q, DONG X M, JIANG X W, et al. Study on the correlation between dominant fungi and the variation of flavor compounds in high-salt liquid-state soy sauce fermentation [J]. *Food Science*, 2022, 43(10): 172–179.]

[13] 苏国万, 赵炫, 张佳男, 等. 酱油中鲜味二肽的分离鉴定及其呈味特性研究 [J]. *现代食品科技*, 2019, 35(5): 7–15. [SU G W, ZHAO X, ZHANG J N, et al. Isolation, identification and taste characteristics of umami dipeptides from soy sauce [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2019, 35(5): 7–15.]

[14] ELHALIS H, CHIN X H, CHOW Y. Soybean fermentation: Microbial ecology and starter culture technology [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2023: 1–23.

- [15] WEI C L, CHAO S H, TSAI W B, 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.
- [16] WANG J, ZHAO M, XIE N, et al. Community structure of yeast in fermented soy sauce and screening of functional yeast with potential to enhance the soy sauce flavor[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2022, 370: 109652.
- [17] HARADA R, YUZUKI M, ITO K, et al. Influence of yeast and lactic acid bacterium on the constituent profile of soy sauce during fermentation[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2017, 123(2): 203–208.
- [18] SONG Y R, JEONG D Y, BAIK S H. Effects of indigenous yeasts on physicochemical and microbial properties of Korean soy sauce prepared by low-salt fermentation[J]. *Food Microbiology*, 2015, 51: 171–178.
- [19] SINGRACHA P, NIAMSIRI N, VISESSANGUAN W, et al. Application of lactic acid bacteria and yeasts as starter cultures for reduced-salt soy sauce (moromi) fermentation[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2017, 78: 181–188.
- [20] ZHANG L, XIONG S, DU T, et al. Effect of microbiota succession on the dynamics of characteristic flavors and physicochemical properties during the soy sauce fermentation[J]. *Food Bioscience*, 2023: 102883.
- [21] LIU X, QIAN M, SHEN Y, 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.
- [22] LIU B, LI Y, CAO Z, et al. Effect of *Tetragenococcus halophilus*, *Zygosaccharomyces rouxii*, and *Torulopsis versatilis* addition sequence on soy sauce fermentation[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2021, 69: 102662.
- [23] 梁寒峭, 陈建国, 刘伟, 等. 酿造酱油中特征氨基酸含量检测及对氨基酸态氮贡献的分析[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(4): 198–203. [LIANG H Q, CHEN J G, LIU W, et al. Analysis of amino acids content and contribution to amino nitrogen in fermented soy sauce[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2018, 44(4): 198–203.]
- [24] 国家质量技术监督局. 食品安全国家标准: GB/T 18186-2000 酿造酱油[S]. 北京: 中国标准出版社, 2000. [State Bureau of Quality and Technical Supervision. National Standard of Food Safety: GB/T 18186-2000 Brewed soy sauce[S]. Beijing: China Standards Press, 2000.]
- [25] KUANG X, SU H, LI W, et al. Effects of microbial community structure and its co-occurrence on the dynamic changes of physicochemical properties and free amino acids in the Cantonese soy sauce fermentation process[J]. *Food Research International*, 2022, 156: 111347.
- [26] HAN D M, CHUN B H, FENG T, et al. Dynamics of microbial communities and metabolites in Ganjang, a traditional Korean fermented soy sauce, during fermentation[J]. *Food Microbiology*, 2020, 92: 103591.
- [27] ZHOU T, FENG Y, CHEN Y, et al. Quantitative studies, taste recombination, and omission experiments on the key taste compounds in Chinese and Japanese soy sauce[J]. *Food Chemistry*, 2023, 403: 134215.
- [28] ZHANG W, HAN Y, SHI K, et al. Effect of different sulfur-containing compounds on the structure, sensory properties and antioxidant activities of Maillard reaction products obtained from *Pleurotus citrinopileatus* hydrolysates[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2022, 171: 114144.
- [29] HU G, CHEN J, DU G, et al. Moromi mash dysbiosis triggered by salt reduction is relevant to quality and aroma changes of soy sauce[J]. *Food Chemistry*, 2023, 406: 135064.
- [30] ZHANG L, ZHANG L, XU Y. Effects of *Tetragenococcus halophilus* and *Candida versatilis* on the production of aroma-active and umami-taste compounds during soy sauce fermentation[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2020, 100(6): 2782–2790.
- [31] LIU D, HE Y, XIAO J, et al. The occurrence and stability of Maillard reaction products in various traditional Chinese sauces[J]. *Food Chemistry*, 2021, 342: 128319.