

外源酶对高盐稀态发酵酱油氨基酸积累及香气特性的影响

谢祖龙¹, 林礼钊², 苏国万¹, 吴惠贞², 孙为正¹, 林伟锋^{1*}

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

(2. 鹤山市东古调味食品有限公司, 广东江门 529738)

摘要: 传统酱油发酵过程中, 内源酶系对原料的分解效率在一定程度上限制了风味物质的释放。为进一步提高原料利用率并促进风味物质积累, 本文以高盐稀态发酵酱油为对象, 在发酵中分别添加植酸酶 (PHY)、酸性羧肽酶 (ACP) 及谷氨酰胺酶 (GLN), 分析其对理化指标、氨基酸积累及挥发性香气的影响。结果表明, 不同外源酶处理下, 各组总酸含量和 pH 变化趋势基本一致。发酵初期, PHY 组还原糖含量相对较高; 60 d 时, ACP 组总游离氨基酸含量达 61.96 g kg^{-1} , 较对照组 (53.28 g kg^{-1}) 提升 16.20%, 显著提高了发酵中后期蛋白水解效率, 且滋味活性值 (TAV) 较高; GLN 组谷氨酸含量达 8.11 g kg^{-1} , 较对照组 (6.15 g kg^{-1}) 提升 31.80%, 提高了鲜味相关氨基酸的积累。香气方面, ACP 组通过提升甲硫氨酸和苯丙氨酸等含量, 促进了 3-甲基丙醛 (相对含量 7.87%, 对照组为 3.68%) 及吡嗪类化合物的生成; GLN 组热处理后 3-甲基丁醛和苯乙醛相对含量较高。本研究为外源酶在酱油酿造中的应用提供理论基础。

关键词: 高盐稀态发酵酱油; 外源酶; 氨基酸; 香气特性

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2027.5.0304

Effects of Exogenous Enzymes on Amino Acid Accumulation and Aroma Characteristics of High-Salt Liquid-State Fermented Soy Sauce

XIE Zulong¹, LIN Lizhao², SU Guowan¹, WU Huizhen², SUN Weizheng¹, LIN Weifeng^{1*}

(1. School of Food Sciences and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Heshan Donggu Flavoring Food Co. Ltd, Jiangmen 529738, China)

Abstract: In traditional soy sauce fermentation, the efficiency of raw material degradation by endogenous enzyme systems may, to some extent, limit the release of flavor substances. To further improve raw material utilization and promote the accumulation of flavor substances, phytase (PHY), acid carboxypeptidase (ACP) and glutaminase (GLN) were added to high-salt liquid-state fermented soy sauce to analyze their effects on physicochemical indexes, amino acid accumulation and volatile aroma. The results showed that, under different exogenous enzyme treatments, the trends of total acid content and pH were generally similar among all groups. In the early stage of fermentation, the PHY group showed relatively higher reducing sugar content. At 60 d, the total free amino acid content in the ACP group reached 61.96 g kg^{-1} , which was 16.20% higher than that of the control group (53.28 g kg^{-1}), significantly improving the proteolysis efficiency in the middle and late stages of fermentation, and the taste activity value (TAV) was also relatively high. The content of glutamic acid in the GLN group reached 8.11 g kg^{-1} , which was 31.80 % higher than that in the control group (6.15 g kg^{-1}), improving the accumulation of umami-related amino acids. In terms of aroma, the ACP group promoted the formation of 3-methylthiopropional (relative content 7.87%, compared with 3.68% in the control group) and pyrazine compounds by increasing the contents of methionine and phenylalanine. The GLN group showed relatively higher contents of 3-methylbutanal and phenylacetaldehyde after heat treatment. This study provides a theoretical basis for the application of exogenous enzymes in soy sauce brewing.

Key words: high-salt liquid-state fermented soy sauce; enzymes; amino acids; aroma characteristics

收稿日期: 2026-03-03; 修回日期: 2026-04-21; 接受日期: 2026-04-21

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (32172329); 中央高校基本科研业务费专项资金资助 (2024ZYGXZR089)

作者简介: 谢祖龙 (2001-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: Xie_Zu_Long@163.com

通讯作者: 林伟锋 (1970-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: linwf@scut.edu.cn

酱油作为传统发酵豆制品,凭借独特的鲜味和复杂的香气体系,在饮食文化中占据重要地位^[1]。高盐稀态酱油是以大豆或脱脂大豆、小麦或小麦粉为原料,经蒸煮、曲霉菌制曲后与盐水混合成稀醪,再经发酵制成的酱油。在酿造过程中,米曲霉分泌的内源生物酶系主导了大分子物质的降解,生成氨基酸、小分子肽、还原糖及有机酸等关键呈味物质,这些物质的含量与组成是酱油独特风味的物质基础^[2]。然而,传统高盐稀态发酵仅依赖内源酶系往往存在局限:原料大豆中天然含有较高浓度的植酸盐($9.2\sim 16.7\text{ mg g}^{-1}$),其易与可溶性蛋白质结合形成难溶复合物,阻碍了蛋白酶与蛋白质底物的有效接触与反应,导致原料利用率下降,进而造成呈味物质释放不足^[3,4];同时,内源蛋白酶系的酶切位点有限,往往难以充分释放呈味氨基酸,易残留苦味肽。更重要的是,酱油特征性酱香和焦糖香的形成高度依赖于热处理阶段的美拉德反应(Maillard reaction),而该反应的底物浓度与种类直接受限于发酵阶段的酶解效率^[5]。因此,优化发酵酶系从而提高原料利用率,是目前酱油酿造领域关注的重点。

添加外源性酶制剂进行辅助发酵是常见的方法。外源酶辅助酱油发酵可在一定程度上改善发酵过程中物质转化,并影响酱油品质形成。谷氨酰胺酶能将L-谷氨酰胺特异性转化为L-谷氨酸,是直接提升酱油鲜味特征的关键^[6];植酸酶通过降解植酸解除其对蛋白质的螯合,有助于释放更多可利用的氮源;而酸性羧肽酶作为外切型肽酶,可从多肽C端持续释放游离氨基酸,有望与米曲霉内源蛋白酶系形成协同互补,促进发酵后期多肽的进一步降解^[7],并为后续热处理阶段相关香气物质的形成提供基础^[8]。关于这些外源酶对酱油滋味成分和挥发性香气的具体影响,目前尚需进一步明确。

本研究以高盐稀态发酵酱油为对象,在发酵过程中分别添加植酸酶、酸性羧肽酶和谷氨酰胺酶进行辅助发酵。通过监测发酵理化指标(pH值、总酸、还原糖及氨基酸态氮),分析游离氨基酸含量的变化,对比热处理前后挥发性风味的演变,探究外源酶添加对酱油发酵的影响,为工业化精准酿造提供技术支撑和参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

米曲霉(*Aspergillus oryzae*) T89(保藏号:GDMCC No. 66894),以课题组前期工作选育的U2^[9]为出发菌株,经进一步紫外-硫酸二乙酯复合诱变筛选获得,具有较高的中性蛋白酶活力和较好的遗传稳定性;麸皮、面粉、黄豆,取自鹤山市东古调味食品有限公司;植酸酶(酶活 $5\ 750\text{ FTU g}^{-1}$),美国帝斯曼公司;酸性羧肽酶(酶活 $1\ 000\text{ u g}^{-1}$)、谷氨酰胺酶(酶活 100 u g^{-1}),日本天野公司。

甲醛、冰乙酸、盐酸、硫酸、硫酸钠、甲磺酸(均为分析纯),广州化学试剂厂;乳酸、乳酸钠(均为分析纯),广州市利胜化工有限公司;酪氨酸、干酪素,天津市大茂化学试剂厂;酒石酸钾钠、亚铁氰化钾、乙酸锌、三氯乙酸、福林酚试剂、DNS试剂(均为分析纯),国药集团化学试剂有限公司;硫酸铜、碳酸钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、葡萄糖、可溶性淀粉(均为分析纯),广东广试试剂科技有限公司;17种氨基酸混合标准品(浓度为 $2.50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$),美国西格玛公司;衍生化试剂FMOC、衍生化试剂OPA,安捷伦科技贸易(上海)有限公司;甲醇、乙腈(均为色谱纯),北京迪马科技有限公司。

1.2 主要仪器设备

PHS-3C pH计,上海雷磁仪器有限公司;HH-4数显恒温水浴锅,常州澳华仪器有限公司;GF-6100电子天平,日本AND公司;TU-1901双光束紫外可见分光光度计,上海澳普斯有限责任公司;Metrohm 905 Titrando自动电位滴定仪,瑞士万通(中国)有限公司;Agilent 1260 Infinity II高效液相色谱仪(配置荧光检测器和蒸发光检测器)、Agilent 8860 GC-5977B GC/MSD气相色谱质谱联用仪,美国安捷伦科技有限公司;50/30 μm DVB/CAR/PDMS固相萃取头,美国西格玛公司。

1.3 试验方法

1.3.1 高盐稀态酱油的制备

成曲发酵:黄豆常温浸泡8 h,蒸30 min后,干豆:面粉:米曲霉菌粉质量比为1:0.35:0.003, $32\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、90% $\pm 2\%$ 湿度下培养44 h,其中分别在4、16和24 h进行翻曲。

酱醪晒制:成曲:盐水质量比为3:5,盐水浓度为18% (m/m),曲料搅拌均匀后进行为期60 d的户外天然晒制

发酵。共分4组,以不加酶组为对照,其余三组分别于发酵0 d添加0.25%植酸酶,于发酵20 d分别添加0.5%酸性羧肽酶和1%谷氨酰胺酶,各酶添加量均以黄豆质量为基准,按质量百分比(m/m)计算。

1.3.2 样品采集与处理

在第4、8、12、20、30、45和60天取样,经快速滤纸过滤后进行各项指标测定。将第60天的生酱油置于密封耐热玻璃瓶中,85±1℃水浴加热12 h,用于挥发性风味物质的测定。样品简称:空白(CTL)、添加植酸酶(PHY)、添加酸性羧肽酶(ACP)、添加谷氨酰胺酶(GLN)。

1.3.3 pH值测定

使用pH计测定。

1.3.4 总酸含量测定

参照GB 12456-2021^[10],使用自动滴定仪进行测定。

1.3.5 氨基酸态氮含量测定

参照GB 5009.235-2016^[11],使用自动滴定仪进行测定。

1.3.6 还原糖含量测定

参照GB 5009.7-2016^[12],使用直接滴定法进行还原糖含量测定。

1.3.7 蛋白酶活力测定

采用福林酚法,参照GB/T 23527-2023^[13]。蛋白酶活力定义:1 g样品在pH值为3.0/7.5、40℃下,1 min水解酪蛋白产生1 μg酪氨酸为一个酶活力单位,以U g⁻¹表示。

1.3.8 淀粉酶活力测定

采用DNS法,参照徐欢欢^[14]的方法。淀粉酶活力定义:1 g样品在pH值为6.0、40℃下,1 min水解可溶性淀粉产生1 mg葡萄糖为一个酶活力单位,以U g⁻¹表示。

1.3.9 还原糖组成测定

使用高效液相色谱法分析酱油样品中还原糖组成^[15]。色谱柱:ValueLab LC GP-NH₂(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相:乙腈:水(70:30, V/V);流量1.0 mL min⁻¹;进样量10.0 μL;柱温35℃;蒸发管温度70~80℃;载气流速2.5 mL min⁻¹。

1.3.10 游离氨基酸测定

使用高效液相色谱法分析酱油样品中游离氨基酸,参考余洁瑜等^[16]的方法。色谱柱:AdvanceBio AAA C18(4.6 mm×100 mm, 2.7 μm);流动相A:10 mmol L⁻¹ Na₂HPO₄:10 mmol L⁻¹ Na₂B₄O₇(50:50, V/V);流动相B:甲醇:乙腈:水(45:45:10, V/V);流量1.5 mL min⁻¹;进样量1.00 μL;柱温40℃。

1.3.11 挥发性香气成分测定

使用顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用法分析酱油样品中的挥发性有机化合物,参考万博恺等^[17]的方法。取6.40 mL样品加入16 mL顶空瓶中,在45℃下平衡20 min后,并在55℃下振荡萃取40 min,250℃下解吸3 min。He作为载气,进样量1.00 μL,流速为1 mL min⁻¹,采用不分流模式。气相色谱柱温程序为:40℃保持10 min,以5℃ min⁻¹的速率升温至100℃并保持2 min,再以15℃ min⁻¹的速率升温至230℃并保持5 min。质谱条件为:70 eV电子电离模式,扫描范围35~350 m/z,离子源230℃,接口250℃。

1.3.12 数据处理与图片绘制

所有实验均进行3次平行测定,图中结果以平均值±标准差表示。采用IBM SPSS Statistics进行单因素方差分析(One-way ANOVA),并采用Tukey多重比较进行事后检验, $P<0.05$ 表示差异显著。使用Origin 2022和TBTools-II绘制图片。

2 结果与分析

2.1 总酸含量和pH值的变化

总酸含量和pH值是反映酱油发酵过程中有机酸积累及体系酸碱环境变化的重要指标。由图1a可知,在发酵前期(0~12 d),各组总酸含量呈现快速增加的趋势。这主要归因于发酵初期耐盐微生物的旺盛代谢,较快积累了乳酸、乙酸等有机酸;当发酵进行到12 d时,总酸含量升至1.50 g/100 g左右。随着发酵时间在12~60 d范围内

的延长,总酸含量进入波动平衡期。发酵结束时(60 d),CTL组、PHY组、ACP组及GLN组的总酸含量均稳定在1.45~1.55 g/100 g之间,各组间无显著差异($F=3.534$, $P=0.084>0.05$)。由图1b,伴随着有机酸的积累,各组pH值均呈下降趋势。在发酵起始阶段(0~4 d),pH值下降最为剧烈,由初始的6.38迅速降至5.32左右;随着发酵时间(4~60 d)的延长,pH值下降趋于平缓。发酵结束时,各组pH值均稳定在4.90左右。

在整个高盐稀态发酵过程中,各实验组酱醪的总酸含量及pH值变化趋势基本一致。结果表明,在发酵0 d添加植酸酶及20 d添加酸性羧肽酶和谷氨酰胺酶,对酱醪发酵过程中的总酸生成及pH环境的变化无显著影响。

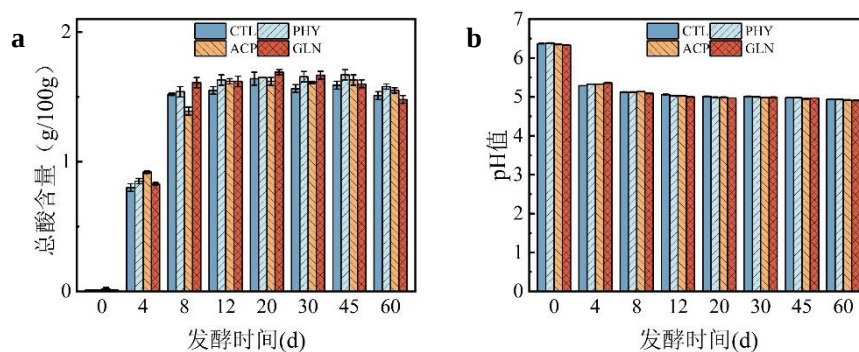


图1 酱油发酵过程中总酸含量及pH值的变化

Fig.1 Changes in total acid content and pH value during soy sauce fermentation

注: a-总酸含量; b-pH值。

2.2 蛋白酶活力和氨基酸态氮含量的变化

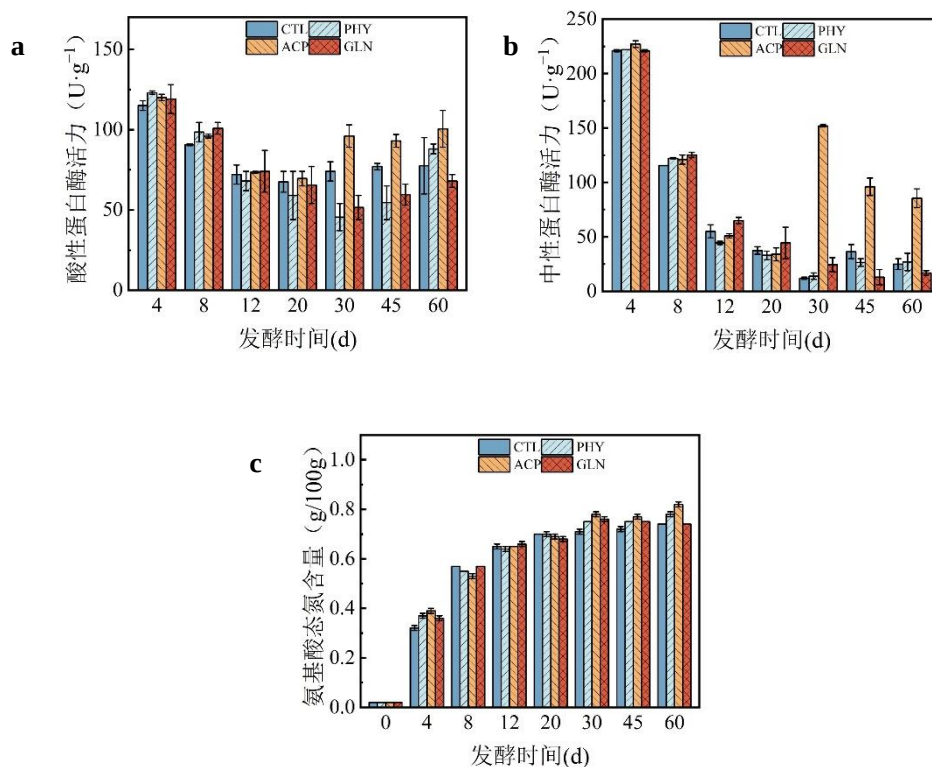


图2 酱油发酵过程中酸性、中性蛋白酶活力和氨基酸态氮含量的变化

Fig.2 Changes in acid protease activity, neutral protease activity, and amino acid nitrogen content during soy sauce fermentation

注: a-酸性蛋白酶活力; b-中性蛋白酶活力; c-氨基酸态氮含量。

蛋白酶系是驱动酱油发酵成熟、风味前体转化的核心动力。由图2a、2b可知,发酵初期(0~12 d),来源于

米曲霉自身的蛋白酶活力占据主导, 各组中性蛋白酶与酸性蛋白酶活力均处于较高水平, 随后受高盐环境胁迫呈自然衰退趋势。在中性蛋白酶活力方面, 发酵 20 d 前各组间无显著差异, 均由初始的 220 U g^{-1} 左右降至 50 U g^{-1} 以下。在发酵 20 d 添加酸性羧肽酶后, 其中性蛋白酶活力在 30 d 出现显著提升, 达到 152.30 U g^{-1} , 显著高于同期 CTL 组 (11.50 U g^{-1})、PHY 组 (14.00 U g^{-1}) 和 GLN 组 (24.50 U g^{-1}) ($F=1\ 176.125$, $P<0.01$); 即便在发酵后期 (45~60 d), ACP 组仍维持着较高的蛋白酶活性; 酸性蛋白酶活力呈现出相似规律, ACP 组在发酵中后期的酶活水平显著优于对照组, 在 60 d 时仍保持在 100.50 U g^{-1} 左右。说明添加酸性羧肽酶后该组在发酵中后期仍维持较高的蛋白水解相关活力。

氨基酸态氮是衡量酱油品质及鲜味强度的核心指标, 其积累趋势与蛋白酶活力的变化高度正相关。由图 2c, 发酵前期随着体系蛋白酶的快速作用, 各组氨基酸态氮含量急剧上升, 由 $0.01 \text{ g}/100 \text{ g}$ 增至 $0.69 \text{ g}/100 \text{ g}$ 左右, 组间差异不显著。20 d 后, 随着外源酶的加入, CTL 组由于内源酶活力的衰减, 氨基酸态氮增长趋于平缓; PHY 组的氨基酸态氮含量在发酵中后期 (30~60 d) 逐渐显现出略高于 CTL 组的趋势。这可能是因为在发酵后期易水解蛋白耗尽时, 前期植酸酶解除植酸和蛋白复合物所释放出的底物发挥了作用, 维持了体系缓慢但持续的氨基酸释放; 而 ACP 组的氨基酸态氮含量继续保持稳步增长态势, 至发酵结束 (60 d) 时, ACP 组的氨基酸态氮含量达到峰值, 为 $0.82 \text{ g}/100 \text{ g}$, 较 CTL 组提高了约 15%。相比之下, GLN 组因特征性催化谷氨酰胺脱酰胺反应, 对总氨基酸态氮含量的贡献并不明显, 其终点值与 CTL 组持平。

结果表明, 在发酵中期 (20 d) 补充酸性羧肽酶, 有效弥补了后期内源蛋白酶活力不足的缺陷, 通过持续水解多肽链末端, 显著促进了游离氨基酸的释放与积累, 从而为酱油风味的形成奠定了物质基础。

2.3 淀粉酶活力和还原糖含量的变化

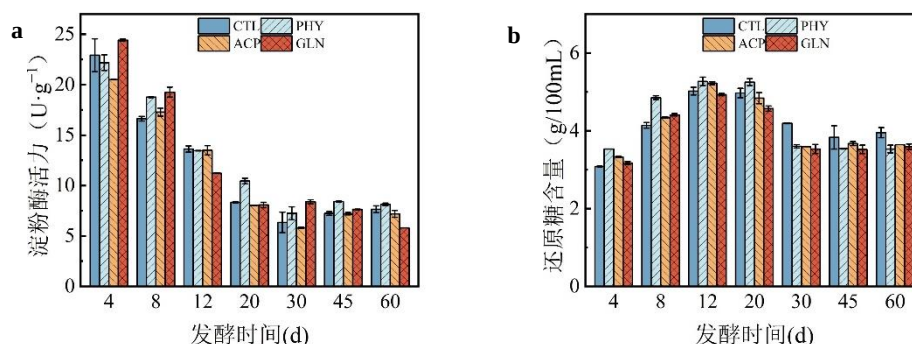


图3 酱油发酵过程中淀粉酶活力和还原糖含量的变化

Fig.3 Changes in amylase activity and reducing sugar content during soy sauce fermentation

注: a-淀粉酶活力; b-还原糖含量。

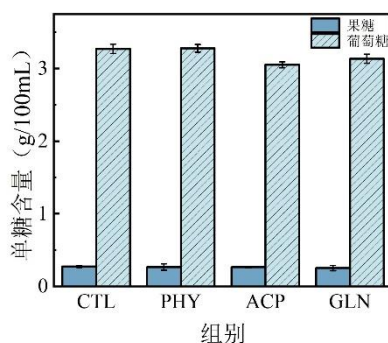


图4 发酵终点酱油样品的还原糖组成

Fig.4 Composition of reducing sugars at the end of fermentation (60 d)

淀粉酶系将酱醪中的淀粉质原料转化为还原糖, 为发酵微生物提供碳源, 同时也为后期的美拉德反应提供羰

基供体。由图 3a 可知, 淀粉酶活力在整个发酵周期内呈现持续下降的趋势。在发酵初期 (0~8 d), 来源于成曲的淀粉酶活性较高, 维持在 $15\sim 25\text{ U g}^{-1}$ 之间。随着发酵时间的延长, 受高盐环境抑制及酸性代谢产物积累的影响, 酶蛋白逐渐变性失活。至发酵 20 d 时, 各组淀粉酶活力降至 10 U g^{-1} 左右。发酵后期 (30~60 d), 各组淀粉酶活力均维持在较低水平 ($5\sim 8\text{ U g}^{-1}$)。

由图 3b, 伴随着淀粉酶的作用, 还原糖含量呈现出先积累后消耗的变化规律。在发酵前期 (0~12 d), 还原糖生成速率大于消耗速率, 还原糖含量快速积累并在 12 d 达到峰值。PHY 组在此期间的还原糖含量略高于其他组, 这可能是因为植酸酶降解了体系中的植酸, 减少了植酸与淀粉的结合, 释放出了更多的游离淀粉, 使其更易被淀粉酶接触和水解^[18]。发酵中后期 (20~60 d), 还原糖含量开始显著下降, 这主要是因为还原糖与体系中的氨基酸发生了美拉德反应。

图 4 展示了发酵终点 (60 d) 各组样品的单糖组成。结果显示, 各组样品中仅检出葡萄糖和果糖两种单糖。其中, 葡萄糖是主导组分 (约 $3.20\text{ g}/100\text{ mL}$), 而果糖含量较低 (约 $0.25\text{ g}/100\text{ mL}$), 不同处理组间两种单糖含量存在一定波动, 但整体变化幅度较小, 表明外源酶处理对发酵终点单糖组成的影响较为有限。

2.4 游离氨基酸含量的变化

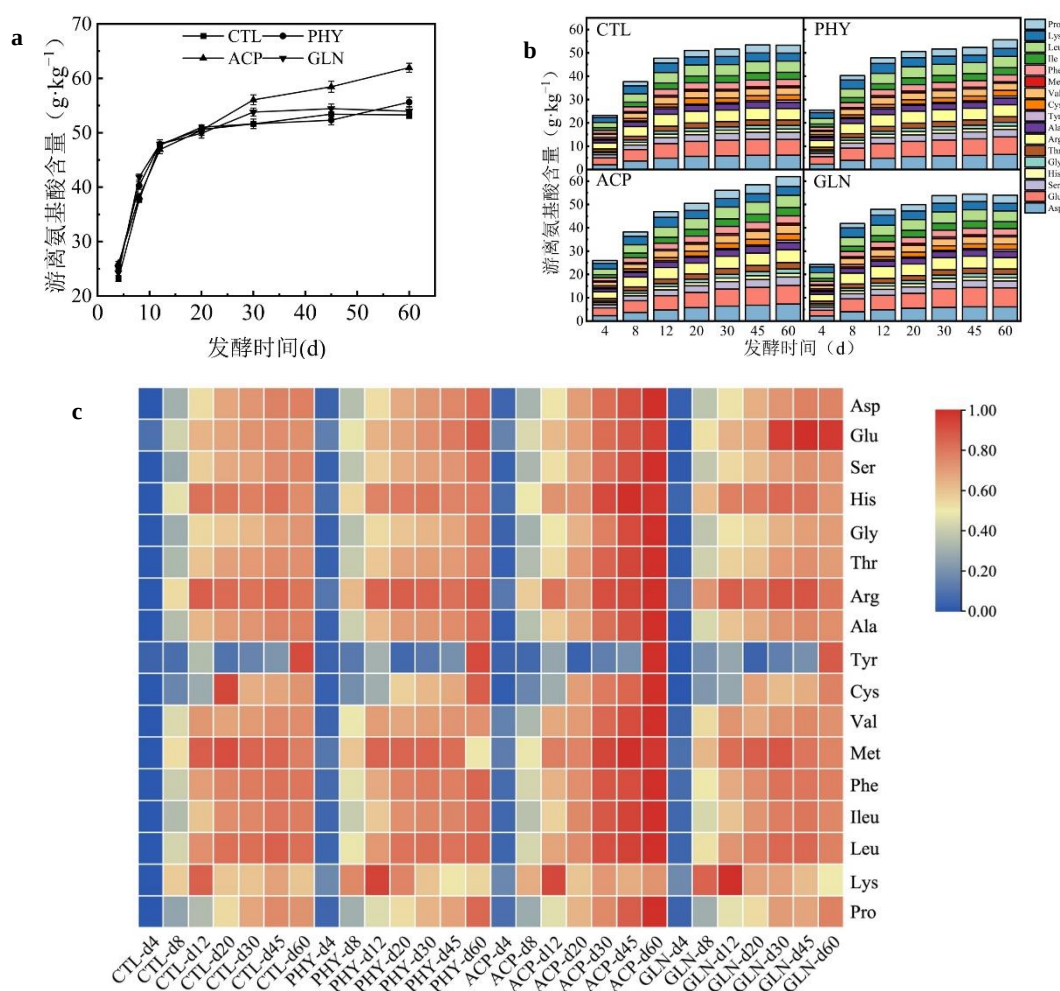


图 5 酱油发酵过程中游离氨基酸的变化

Fig.5 Changes in free amino acids during soy sauce fermentation

注: a-折线图; b-堆积柱状图; c-热图。Asp 为天冬氨酸, Glu 为谷氨酸, Ser 为丝氨酸, His 为组氨酸, Gly 为甘氨酸, Thr 为苏氨酸, Arg 为精氨酸, Ala 为丙氨酸, Tyr 为酪氨酸, Cys 为胱氨酸, Val 为缬氨酸, Met 为甲硫氨酸, Phe 为苯丙氨酸, Ile 为异亮氨酸, Leu 为亮氨酸, Lys 为赖氨酸, Pro 为脯氨酸。

游离氨基酸不仅是酱油风味的核心物质基础, 也是衡量蛋白质水解程度的关键因素。对不同处理组游离氨基

酸变化进行分析,有助于评价外源酶添加对发酵过程中蛋白质降解和氨基酸积累的影响。图 5a 和图 5b 展示了四组酱油在发酵过程(4~60 d)中游离氨基酸的积累,图 5c 则通过热图直观体现游离氨基酸的变化情况。由图 5a 可知,随着发酵时间的延长,四组样品的总游离氨基酸含量均呈上升趋势。在发酵前期(0~20 d),曲料中米曲霉分泌的蛋白酶系发挥作用,迅速将原料中的蛋白质降解为小分子肽和氨基酸,游离氨基酸含量快速增加。PHY 组游离氨基酸含量比 CTL 稍有提升,这说明植酸酶在发酵初期一定程度上水解了植酸盐,解除了其对大豆蛋白的限制,但在发酵后期与 CTL 逐渐一致,这可能是由于植酸酶被内源蛋白酶水解失活,进而限制了其解离植酸及促进蛋白水解的能力。进入发酵中后期(30~60 d),游离氨基酸的增长趋于平稳,这是由于底物浓度降低以及部分氨基酸参与了美拉德反应消耗。在发酵 20 d 添加酸性羧肽酶和谷氨酰胺酶后,ACP 组酱醪中的蛋白酶得到补足,总氨基酸含量出现二次提升,至发酵终点达到最高值(61.96 g kg^{-1}),分别较 CTL 组(53.28 g kg^{-1})、PHY 组(55.63 g kg^{-1})和 GLN 组(53.97 g kg^{-1})提升了 16.29%、11.38%和 14.80%($F=73.187, P<0.01$)。图 5c 清晰地体现了这一趋势,ACP 组在 30~60 d 阶段,绝大多数氨基酸均转为深红色,均显著高于其他组。特别是疏水性氨基酸(如 Leu、Phe、Val、Ile 含量分别达到 5.31 、 3.20 、 3.77 、 3.71 g kg^{-1})积累尤为突出,提示酸性羧肽酶在酱油发酵后期仍具有高效外切活性,实现蛋白质的深度水解,增强了酱油的风味^[19]。叶茂等^[20]通过优化黑曲霉固态发酵产羧肽酶条件,并将其应用于酱油发酵,有效提升酱油中氨基酸态氮含量至 $1.38 \text{ g}/100 \text{ mL}$ 。发酵结束(60 d)时,GLN 组的 Glu 含量达到最高,为 8.11 g kg^{-1} ,较 CTL 组(6.15 g kg^{-1})提升了 31.80%,同时也高于 PHY 组(7.57 g kg^{-1})和 ACP 组(8.00 g kg^{-1})($F=67.340, P<0.05$)。该结果表明,谷氨酰胺酶可显著提升谷氨酸含量,成功将酱醪中积累的谷氨酰胺转化为谷氨酸^[21]。

2.5 游离氨基酸滋味分析

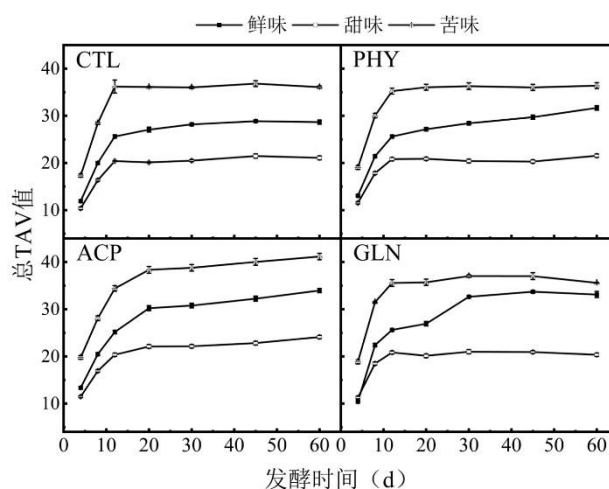


图 6 酱油发酵过程中滋味活性值(TAV)的变化

Fig.6 Changes in Taste Activity Values (TAV) during soy sauce fermentation

为了更真实地评估游离氨基酸对酱油感官风味的实际贡献,本研究引入滋味活性值(Taste Activity Value, TAV)进行评价。TAV 计算公式为氨基酸浓度与其呈味阈值的比值,各氨基酸呈味阈值参考 Kato 等^[22]的研究。当 $TAV>1$ 时,表明该物质对滋味有直接贡献;TAV 值越大,呈味强度越高。图 6 展示了四组样品在发酵过程中鲜味、甜味和苦味总 TAV 的增长趋势。

鲜味是高盐稀态酱油最核心的感官属性。如图 6 所示,发酵初期(4~20 d)四组样品的鲜味 TAV 均随发酵进行快速上升。进入发酵中后期(30~60 d),CTL 组鲜味 TAV 趋于平缓,而各外源酶添加组则继续保持增长态势。其中,ACP 组在发酵终点达到最高值(33.96),这归因于酸性羧肽酶外切能力,其在水解过程中高效释放了天冬氨酸和谷氨酸,通过总量的积累实现了显著的增鲜效果。GLN 组则展现出不同的增长模式,在 20 d 添加谷氨酰胺酶后,其鲜味 TAV 出现提升(20~30 d 期间从 25.61 增至 32.65),最终达到 33.12,高于 CTL 组(28.67)。这是由于谷氨酰胺酶通过特异性的脱酰胺作用,定向提升了谷氨酸含量。与 ACP 组不同,该过程在大幅增鲜的同时,未引入过多的苦味氨基酸,从而赋予了酱油更纯正的鲜味特征。

甜味氨基酸在酱油中主要起缓冲咸味、赋予回甘的作用^[23]。ACP 组的甜味 TAV 在发酵终点达到 24.11，高于其他三组。甜味氨基酸能有效柔和酱油的口感，产生绵长而细腻的余味。

各组的苦味总 TAV 值均呈现较高水平（35~41）。ACP 组的苦味 TAV 达到 41.16，高于 CTL 组的 36.09，这与其高含量的疏水性氨基酸数据一致。尽管计算所得的 TAV 较高，但其在实际感官中的苦味表现受到显著抑制。Ogawa 等^[24]通过人体感官实验证实，在高盐与精氨酸共存的体系下，苦味氨基酸产生的感官苦味信号可被抑制至原始强度的 19.40%，这种生理屏蔽效应有效缓解了高浓度疏水性氨基酸带来的负面苦味，使得风味中心依然聚焦于咸鲜。事实上，疏水性氨基酸对发酵食品的贡献不应该仅局限于对其苦味属性的探讨。近年来的研究表明，它们在复杂的风味基质中发挥着至关重要的作用。Zhu 等^[25]指出，酱油中富含疏水性氨基酸的肽段不仅能调节鲜味，还能显著提升产品的醇厚感（Kokumi）和整体口感的厚度（Thickness）。此外，含有疏水性侧链的 γ -谷氨酰胺已被证实能赋予发酵食品特征性的厚味和延绵感^[26]，这种由疏水性组分贡献的厚实口感在高盐环境下依然保持稳定^[27]。

2.6 热反应前后酱油挥发性风味化合物的变化

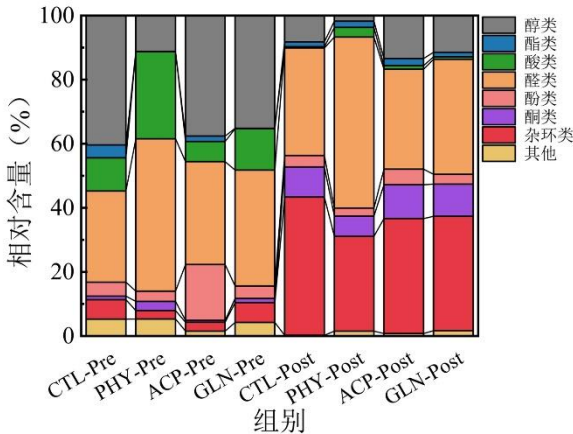


图 7 热处理前后各组酱油挥发性风味物质类别的相对含量变化

Fig.7 Changes in relative content of volatile flavor compound categories in soy sauce before and after heat treatment.

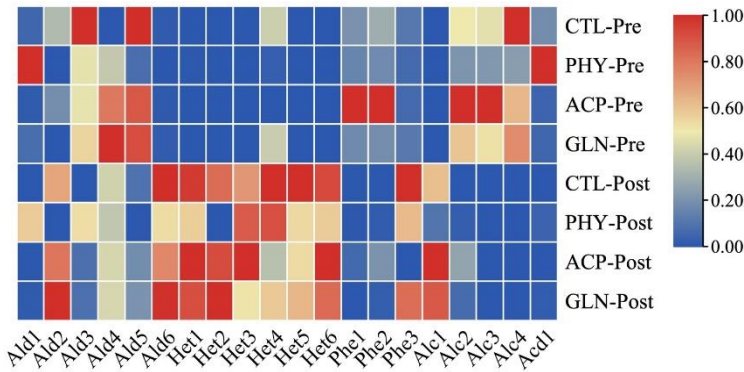


图 8 热反应前后酱油中关键挥发性风味物质的热图分析

Fig.8 Heatmap analysis of the distribution of volatile flavor compounds in soy sauce before and after heat treatment.

注：图中颜色代表挥发性化合物的归一化相对含量，红色代表含量较高，蓝色代表含量较低。横坐标中 Pre/Post 分别代表热处理前/后。纵坐标化合物缩写对应如下：Ald（醛类）：Ald1 为 3-甲基丁醛；Ald2 为 2-甲基丁醛；Ald3 为 3-甲基丙醛；Ald4 为 2-甲基丙醛；Ald5 为 2-甲基丙醛；Ald6 为 2,4-二甲基苯甲醛。Het（杂环类）：Het1 为 2-乙酰基吡咯；Het2 为 2-乙酰基呋喃；Het3 为 2-乙基-6-甲基吡嗪；Het4 为 糠醛；Het5 为 5-甲基糠醛；Het6 为 3-苯基呋喃。Phe（酚类）：Phe1 为 4-乙基-2-甲氧基苯酚（4-乙基愈创木酚）；Phe2 为 4-乙基苯酚；Phe3 为 愈创木酚。Alc（醇类）：Alc1 为 2-辛基-1-丙醇；Alc2 为 2-辛基-1-丙醇；Alc3 为 1-辛基-3-醇；Alc4 为 2-丙基-1-戊醇。Acd（酸类）：Acd1 为 乙酸。

挥发性风味物质的组成变化与酱油的香气特征密切相关。图 7 与图 8 展示了热反应前后酱油挥发性组分的变

化情况。在热处理前（生酱油），挥发性物质种类较少，主要以醇类、酸类及醛类等发酵代谢产物为主；经热处理（85℃，12h）后，组分发生显著变化，以乙酸、丁酸、戊酸为主的挥发性酸类物质受长时高温影响大量挥发，其相对含量大幅度降低，这有效减弱了酱油的刺激性酸气，醛类化合物仍维持着高香气组分，杂环类化合物的种类和相对含量增加，提示美拉德反应及斯特雷克降解（Strecker Degradation）可能是影响酱油特征香气形成的重要过程。

醛类化合物是美拉德反应的核心产物。3-甲硫基丙醛与煮土豆味和酱香味相关，热处理后，ACP 组的 3-甲硫基丙醛相对含量为 7.87%，约为 CTL 组（3.68%）的 2.1 倍，高于 GLN 组（4.12%）。结合前文游离氨基酸数据，这可能与 ACP 组中甲硫氨酸积累较高、并在热反应过程中发生斯特雷克降解有关；苯乙醛与花香特征相关，ACP 组（11.25%）与 GLN 组（11.55%）在热处理后均维持在较高水平，这与其前体苯丙氨酸的积累密切相关；3-甲基丁醛与麦芽样香气相关，GLN 组在热处理后含量达到 3.58%，高于其他组，表明谷氨酰胺酶处理可能间接优化了亮氨酸相关的转化路径。吡嗪类及部分杂环类化合物与烘烤香、坚果香等特征相关，这些物质主要来源于氨基酸与还原糖在热反应中的复杂缩合反应。四甲基吡嗪与纳豆样及烘烤香特征相关，ACP 组热处理后的占比高达 11.96%，高于 CTL 组的 2.53%。这表明，酸性羧肽酶释放的丰富游离氨基酸和短肽，可能为吡嗪类化合物的形成提供了充足的氮源；2,5-二甲基吡嗪与清淡的坚果香特征相关，CTL 组（5.92%）与 GLN 组（5.85%）的相对含量较高，说明添加不同外源酶可能导致热反应后香气组成呈现不同特征。苯乙醇与柔和的花香、蜂蜜样香气特征相关，ACP 组的苯乙醇含量较高（热处理后为 2.74%），这可能与苯丙氨酸前体积累较高有关；ACP 组检测出 4-乙基愈创木酚（0.05%）和较高的 4-乙基苯酚（0.92%），这些成分与烟熏样、药香样气味相关。

2.7 基于 Pearson 相关性热图的风味前体转化解析

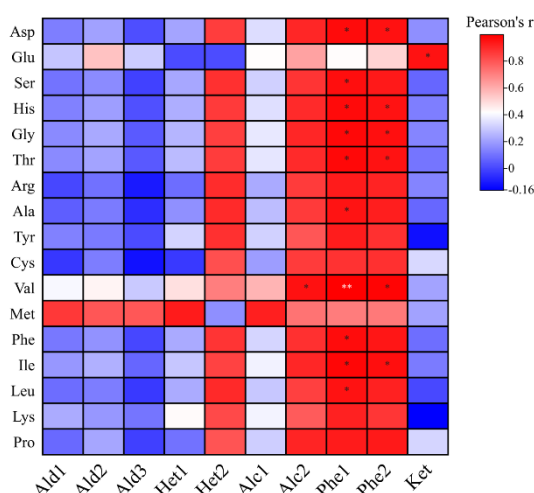


图9 酱油发酵终点游离氨基酸与关键香气物质的相关性分析

Fig.9 Correlation analysis between free amino acids and key aroma compounds in soy sauce at the fermentation endpoint

注：Ald1 为苯乙醛、Ald2 为苯甲醛、Ald3 为 2-甲基丁醛、Het1 为 2-乙酰基吡咯、Het2 为 2-乙基-6-甲基吡嗪、Alc1 为 2-呋喃甲醇、Alc2 为苯乙醇、Phe1 为 4-乙基-2-甲氧基苯酚、Phe2 为 4-乙基苯酚、Ket 为 2,6-二甲基-3-庚酮、Asp 为天冬氨酸、Glu 为谷氨酸、Ser 为丝氨酸、His 为组氨酸、Gly 为甘氨酸、Thr 为苏氨酸、Arg 为精氨酸、Ala 为丙氨酸、Tyr 为酪氨酸、Cys 为胱氨酸、Val 为缬氨酸、Met 为甲硫氨酸、Phe 为苯丙氨酸、Ile 为异亮氨酸、Leu 为亮氨酸、Lys 为赖氨酸、Pro 为脯氨酸。图中颜色代表 Pearson 相关系数（红色为正相关，蓝色为负相关），“*”表示统计学显著（ $P < 0.05$ ），“**”表示极显著（ $P < 0.01$ ）。

为了探究游离氨基酸对酱油特征香气的贡献，本研究选取发酵终点（60 d）的 17 种游离氨基酸与热处理后的 10 种关键香气化合物，构建了 Pearson 相关性热图。

如图 9 所示，4-乙基-2-甲氧基苯酚与除脯氨酸、胱氨酸以外的绝大多数氨基酸均呈显著正相关（ $P < 0.05$ ），其中与缬氨酸的相关性达到极显著水平（ $P < 0.01$ ）。同样的趋势也出现在 4-乙基苯酚和苯乙醇中。这一结果表明，酸性羧肽酶处理后发酵体系中氨基酸底物整体丰度有所提高，并可能进一步影响部分香气相关化合物的形成。Feng 等^[28]指出，酱油特征香气在较大程度上与氨基酸分解代谢产物有关，其中 3-甲基丁醛和 3-甲硫基丙醛等化合物被

认为是重要香气活性成分。

苯丙氨酸与苯乙醇之间表现出显著的正相关性 ($r>0.95$, $P<0.05$)。结合理化指标分析, ACP 组中高浓度的苯丙氨酸 (3.20 g kg^{-1}) 可能与后续微生物代谢过程中苯乙醇的形成有关。Bernardino 等^[29]指出, L-苯丙氨酸可经 Ehrlich 途径转化生成 2-苯乙醇, 该化合物具有典型的玫瑰样香气。此外, 谷氨酸与 2-甲基-3-庚酮呈现显著正相关 ($P<0.05$), 表明鲜味氨基酸的积累可能通过复杂的氨基-羰基反应网络, 间接影响了特定酮类香气的形成。

在与醛类化合物(如苯乙醛、苯甲醛)的关联分析中, 甲硫氨酸呈现出与大多数氨基酸截然不同的正相关趋势。这表明在 ACP 组中, 甲硫氨酸的富集模式与斯特雷克醛类的生成具有更高的同步性^[30], 可能在修饰酱油整体香气轮廓中扮演了独特的协同角色。

3 结论

外源酶的添加未对酱油发酵体系中 pH 值及总酸含量变化趋势产生明显影响, 各组 pH 值及总酸含量变化趋势与对照组基本一致。植酸酶在发酵初期通过降解植酸, 减少了植酸与淀粉的结合, 有效促进了还原糖的生成。酸性羧肽酶处理组在发酵中后期(20~60 d)表现出较高的蛋白水解相关活性。酸性羧肽酶添加后, 发酵终点 ACP 组总游离氨基酸含量较对照组提高了 16.20%, 氨基酸积累较为明显; TAV 分析表明, ACP 组鲜味、甜味及苦味相关滋味活性值均处于较高水平。GLN 组谷氨酸含量较对照组提高了 31.80%, 提高了鲜味相关氨基酸的积累水平。热反应前后的风味演变及相关性分析表明, 外源酶处理与部分香气相关化合物的形成存在一定关联。ACP 组中较高含量的甲硫氨酸和苯丙氨酸可能与 3-甲硫基丙醛、苯乙醇以及 2-乙基-6-甲基吡嗪等化合物的形成有关; GLN 组热处理后 3-甲基丁醛和苯乙醛相对含量较高。研究结果较系统地分析了植酸酶、酸性羧肽酶和谷氨酰胺酶辅助发酵对高盐稀态酱油氨基酸积累及挥发性香气特性的影响, 为外源酶在酱油酿造中的应用提供了参考。今后可进一步结合多酶复配、挥发性成分定量、感官评价及微生物群落变化等研究, 深入阐明不同外源酶对高盐稀态发酵酱油品质形成的影响机制。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 冯云子,周婷,吴伟宇,等.酱油风味与功能性成分研究进展[J].食品科学技术学报,2021,39(4):14-28.
- [3] GREINER R, KONIETZNY U. Phytase for food application [J]. Food Technol Biotechnol, 2006, 44(2): 125-140.
- [4] KIES A K, DE J L H, KEMME P A, et al. Interaction between protein, phytate, and microbial phytase. In vitro studies [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(5): 1753-1758.
- [5] 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.
- [6] CHEN S, HUANG J, LIU H, et al. Isolation, characterization, and biotechnological application of novel glutaminase-producing *Bacillus* strain for quality enhancement in soy sauce [J]. Food Bioscience, 2025, 71: 107114.
- [7] ZHEN H, LIU J, 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.
- [8] SMIT B A, ENGELS W J M, SMIT G. Branched chain aldehydes: production and breakdown pathways and relevance for flavour in foods [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 81(6): 987-999.
- [9] 孙思城,李浩然,苏国万,等.ART-P-UV 复合诱变结合含盐平板选育产耐盐高活性蛋白酶的米曲霉[J].食品科学,2025,46(15):120-127.
- [10] GB 12456-2021,食品安全国家标准 食品中总酸的测定[S].
- [11] GB 5009.235-2016,食品安全国家标准 食品中氨基酸态氮的测定[S].
- [12] GB 5009.7-2016,食品安全国家标准 食品中还原糖的测定[S].
- [13] GB/T 23527.1-2023,酶制剂质量要求 第 1 部分: 蛋白酶制剂[S].
- [14] 徐欢欢. α -淀粉酶在酱油制曲与发酵工艺中的应用研究[D].广州:华南理工大学,2012.
- [15] GB 5009.8-2023,食品安全国家标准 食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的测定[S].
- [16] 余洁瑜,林礼钊,李维新,等.酸性蛋白酶对高盐稀态酱油发酵的影响[J].中国酿造,2022,41(7):185-190.
- [17] 万博恺,李丹丹,倪辉,等.顶空固相微萃取结合 GC-MS 测定酱油中的羟甲基糠醛衍生物[J].现代食品科技,2018,34(9):208-214.

- [18] KUMAR V, SINHA A K, MAKKAR H P S, et al. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review [J]. Food Chemistry, 2010, 120(4): 945-959.
- [19] SONG P, XU W, ZHANG Y, et al. A new carboxypeptidase from *Aspergillus niger* with good thermostability, pH stability and broad substrate specificity [J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 18745.
- [20] 叶茂,邓毛程,林凯旋,等.黑曲霉固态发酵产羧肽酶条件优化及在酱油酿造中的应用[J].中国酿造,2021,40(7):83-88.
- [21] 吴世宇,任晓旭,林心萍,等.微生物与谷氨酰胺酶耦合发酵对高盐稀态酱油生物胺和风味特性的影响[J].食品与发酵工业,2026,52(4):92-100.
- [22] KATO H, RHUE M R, NISHIMURA T. Role of free amino acids and peptides in food taste [M]. ACS Symposium Series, 1989.
- [23] LI S, YIN J, LI L, et al. Multivariate analysis of key taste compounds in soy sauce and model construction for its saltiness intensity [J]. Foods, 2025, 14(24): 4182.
- [24] OGAWA T, NAKAMURA T, TSUJI E, et al. The combination effect of L-arginine and NaCl on bitterness suppression of amino acid solutions [J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2004, 52(2): 172-177.
- [25] ZHU X, SUN D, CHEN J, et al. Bitter-tasting hydrophobic peptides prepared from soy sauce using aqueous ethanol solutions influence taste sensation [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2020, 55(1): 146-156.
- [26] VALERÓN R N, MAK T, JAHN L J, et al. Derivation of kokumi γ -glutamyl peptides and volatile aroma compounds from fermented cereal processing by-products for reducing bitterness of plant-based ingredients [J]. Foods, 2023, 12(23): 4297.
- [27] KIM Y, PARK T, KIM M K. Salinity-dependent changes in retronasal detection and dose-over-threshold of kokumi peptides in fermented soybean paste [J]. Food Chemistry, 2025, 499: 147324.
- [28] FENG Y, SU G, ZHAO H, et al. Characterisation of aroma profiles of commercial soy sauce by odour activity value and omission test [J]. Food Chemistry, 2015, 167: 220-228.
- [29] BERNARDINO A R S, TORRES C A V, CRESPO J G, et al. Biotechnological 2-phenylethanol production: Recent developments [J]. Molecules, 2024, 29(23): 5761.
- [30] 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.