

酱醪葡萄球菌的筛选及其对高盐稀态酱油发酵的影响

张伟¹, 王洁丽¹, 林琛¹, 刘俊良¹, 杨俊文¹, 周慧^{1,2}, 周尚庭^{2,3}, 蒋雪薇^{1,2*}

¹长沙理工大学食品与生物工程学院 长沙 410114

²湖南省调味品发酵工程技术研究中心 长沙 410600

³加加食品集团股份有限公司 长沙 410600

摘要 为了探究酱醪葡萄球菌对高盐稀态酱油发酵的影响,采集高盐稀态酱醪,以产酸为指标分离筛选并获得 3 株产酸性能良好的葡萄球菌 JL04、JL15、JL17,16S rDNA 测序结合生理生化特性分别鉴定为香料葡萄球菌、鱼发酵葡萄球菌和肉葡萄球菌。在高盐稀态酱油发酵第 15 天分别添加 3 株菌进行为期 60 d 的发酵,分析发酵过程中还原糖、总酸及氨态氮的变化,结果发现 3 株菌均能加快酱醪中还原糖的利用,提高总酸及氨态氮含量,其中 JL04 总酸最高,为 15.61 g/L, JL17 氨态氮最高,为 9.31 g/L。HPLC 定量分析添加 JL04、JL15、JL17 的发酵酱油中 6 种有机酸总含量,分别较对照组增加了 37.53%, 24.06% 及 25.90%,主要是乙酸、乳酸、琥珀酸含量增加。气相色谱-质谱联用分析添加 3 株菌发酵酱油的挥发性风味物质,结果发现酯类物质含量明显提高,其中 JL04 比对照组提高了 116.09%,以乙酸酯类和乳酸酯类含量增加为主,与相应的有机酸含量增加呈正相关关系。感官评分显示:3 株菌添加发酵可增进酱油的香气及滋味。高盐稀态酱醪中分离筛选的 3 株葡萄球菌具有代谢积累有机酸,促进相应酯类物质合成的特征,可作为赋予酱油适口酸感、丰富酱油滋味、增进酱油香气的风味菌应用于酱油发酵。

关键词 酱醪葡萄球菌; 筛选; 高盐稀态酱油; 有机酸; 挥发性风味物质

文章编号 1009-7848(2023)11-0125-12 **DOI**: 10.16429/j.1009-7848.2023.11.013

酱油是历史悠久且具备东方特色的传统调味品,也是典型规模化生物制造的食品,主要由大豆、小麦经微生物发酵酿造而成,具有咸鲜适口,醇香饱满的特殊风味^[1-2]。酱油酿造是以微生物生命活动为基础的复杂生物化学反应过程,其中功能性微生物的相互协同作用决定了酱油的风味与品质^[3]。2016 年起,我国规模化酱油企业针对酱油产线开展了大规模的自动化甚至智能化的建设,封闭式、连续化的高盐稀态发酵工艺取代了开放式、间歇化的晒露法和低盐固态工艺^[4]。该工艺虽较好地防控了开放式工艺带来的有害微生物污染的风险,但也减少了环境中功能性微生物的自然接种^[5],使酱香风味形成缓慢,整体发酵周期较长,发酵盐分高,严重影响了优质、健康酱油的产出^[6-7]。因此,要在上述工艺条件下获得风味上乘

的酿造酱油,从酱醪中筛选发酵性能优良的功能性风味菌是提升酱油风味及品质的关键。

优质酱油的主体风味特征表现为酱香浓郁、酯香醇香丰满、滋味鲜美、酸感柔和且适口,其中酸感主要来源于酱油中以乳酸和乙酸为主的有机酸^[8-9],由产酸细菌代谢生成。耐盐葡萄球菌是盐渍发酵食品中常出现的产酸细菌,具有产酸、促进游离氨基酸积累及护色增香等能力^[10-11]。在中国传统腌肉发酵中发现的腐生葡萄球菌 (*S. saprophyticus*) 和木糖葡萄球菌 (*S. xylosus*) 能产生蛋白酶水解肌原蛋白,有助于可溶性蛋白和游离氨基酸的积累^[12]。香肠发酵中分离的肉葡萄球菌 (*S. carnosus*) 可产生适量的硝酸盐还原酶,使香肠拥有更好的色泽^[13]。由此可见,葡萄球菌能直接影响发酵肉制品的风味及品质。酱油发酵中也存在葡萄球菌^[14],而其分离筛选、菌种性能及在酱油发酵中的作用却未见报告,亟待深入研究。本文从高盐稀态酱醪中以产酸为指标筛选发酵性能优良的葡萄球菌,并解析其对酱油的理化指标、有机酸及挥发性风味物质的影响,为酱醪葡萄球菌在酱油酿造中的应用奠定基础。

收稿日期: 2022-11-14

基金项目: 湖南省自然科学基金面上项目(2021JJ30700);
湖南省教育厅重点项目(21A0197);湖南省重点
研发项目(2023NK2035)

第一作者: 张伟,男,硕士生

通信作者: 蒋雪薇 E-mail: jxw_72@sina.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

发酵 15 d 的高盐稀态酱醪,取自湖南某酱油厂,4℃保藏。

溴甲酚紫(分析纯级),上海麦克林生化科技有限公司;草酸、乳酸、苹果酸、乙酸、柠檬酸、琥珀酸、富马酸(均为色谱纯级),国药集团化学试剂有限公司;硫酸锌、亚铁氰化钾(均为分析纯级),国药集团化学试剂有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒,北京索莱宝科技有限公司;细菌 16S rDNA PCR 试剂盒,上海生工生物工程技术有限公司。

1.2 培养基

菌种分离培养基配方如下:牛肉膏 10 g,蛋白胨 10 g,酵母膏 3 g,柠檬酸氢二铵 2 g,葡萄糖 40 g,乙酸钠 5 g,磷酸氢二钾 2 g,硫酸镁 0.58 g,硫酸锰 0.25 g,琼脂粉 20 g,氯化钠 80 g,溴甲酚紫 2 g,吐温-80 1 mL,蒸馏水 1 000 mL,pH 6.5~6.8。

MRS 培养基参考文献[15]配制。

1.3 仪器与设备

E200 显微成像系统,尼康映像仪器(中国)有限公司;VERITI 梯度 PCR 扩增仪,美国应用生物有限公司;DYY-12 电泳仪,北京市六一仪器厂;Champ Gel 5000 Plus 凝胶成像系统,北京赛智创业科技有限公司;ZWY-2102C 恒温振荡培养箱,上海智城分析仪器制造有限公司;PE28 pH 计,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;Waters 2695 型液相色谱仪,美国沃特世有限公司;Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 色谱柱,安捷伦科技(中国)有限公司;436GC/EVOQ TQ/PAL 气质联用仪,美国 Bruker Daltonics 公司;DB-5MS 色谱柱,美国 Agilent 公司;50/30 μm DVB/CAR/PDMS 固相微萃取针,美国 Supelco 公司。

1.4 方法

1.4.1 酱醪葡萄球菌的分离 取发酵 15 d 的高盐稀态酱醪,用生理盐水进行梯度稀释制成菌悬液,吸取 0.1 mL 菌悬液涂布于菌种分离培养基上,37℃培养 2~5 d,挑选菌落周围变黄色的菌落进行革兰氏染色和镜检,挑出革兰氏染色阳性的球菌,在高盐 MRS 培养基(160 g/L NaCl)上多次分离纯化,获得纯种菌株。

1.4.2 酱醪葡萄球菌的筛选 将分离纯化后耐盐生长良好的菌株接种至含 160 g/L NaCl 的 MRS 液体培养基中,37℃静置培养 60 h,取 5 mL 发酵液离心取上清测定 pH 值,初步筛选出发酵液 pH<4.5 的菌株。取初筛菌株的发酵液 2 mL,利用 0.22 μm 水系膜进行过滤,液相色谱分析其乳酸含量,筛选出产乳酸含量大于 2 g/L 的菌株用于后续试验。液相色谱条件:流动相为 0.1%磷酸水溶液-甲醇(19:1,体积比),流速 0.6 mL/min,进样量 10 L,检测器为紫外检测器,检测波长为 210 nm,柱温 30℃。

1.4.3 酱醪葡萄球菌的鉴定

1.4.3.1 16S rDNA 序列分析 采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取耐盐葡萄球菌的模板 DNA,并进行 PCR;PCR 体系如下:葡萄球菌 DNA 模板 2 μL ,细菌通用引物 1492R(5'-GGTTACCTTGT-TACGACTT-3')和 27F(5'-AGAGTTTGATCCTG-GCTCAG-3')各 2 μL ,Taq 聚合酶 1 μL ,dNTP 4 μL ,MgCl₂ 溶液 3 μL ,10×PCR Buffer 5 μL ,ddH₂O 补齐至 50 μL 。PCR 条件:95℃预变性 5 min;95℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,循环 30 次;72℃最终延伸 10 min,4℃保存。PCR 扩增产物以 1%的琼脂糖凝胶检测。测序由生工生物工程(上海)股份有限公司长沙分公司完成。测序结果在 NCBI 库进行同源性比对,并通过 MEGA X 软件构建系统发育树。

1.4.3.2 生理生化特性 将筛选得到的菌株参照《常见细菌系统鉴定手册》^[16]进行糖发酵以及精氨酸双水解酶试验。

1.4.4 菌种高盐稀态发酵 将成品曲与 230 g/L 的盐水按料液比 1:2 混合制成盐质量浓度为 160 g/L 的高盐稀态发酵酱醪,28℃下进行为期 60 d 的发酵。将筛得的菌株制成 10⁷ CFU/mL 的菌悬液,于发酵第 15 天添加至高盐稀态发酵酱醪中,添加量为 5%,以不添菌的酱醪为对照组。发酵结束后,利用 300 目滤布压榨酱醪获得酱油。

1.4.5 酱油还原糖、氨态氮及总酸的测定 还原糖含量测定参照 GB 5009.7-2016《食品安全国家标准 食品中的还原糖测定》^[17];总酸、氨态氮含量测定参照 GB 5009.235-2016《食品中氨基酸态氮的测定》^[18]。

1.4.6 酱油有机酸的测定 取 2 mL 发酵液, 5 mL 硫酸锌溶液 (30 g/L), 5 mL 亚铁氰化钾溶液 (10⁶ g/L) 混合定容至 100 mL, 静置 30 min 后离心, 取上清液用 0.22 μm 水系膜过滤, 液相色谱分析其 6 种有机酸含量, 液相色谱条件同 1.4.2 节。

1.4.7 酱油挥发性风味物质测定 参考张伟等^[19]的 GC-MS 方法进行挥发性风味物质的定性和定量检测。

1.4.8 酱油感官评分 参考张伟等^[19]关于酿造酱油感官评价的方法对发酵后的酱油进行感官评分。

1.5 数据处理

利用 SPSS 26 软件进行方差分析和显著性分析 ($P < 0.05$); 利用 Excel 2019 及 Origin 2021 软件进行数据分析及可视化。

2 结果与分析

2.1 酱醪葡萄球菌的筛选

酱醪葡萄球菌是高盐稀态酱醪中可代谢糖类生成有机酸的一类产酸细菌, 其代谢生成的有机酸可赋予酱油酸感, 抑制酱醪发酵污染菌的生长, 还可作为酱油酯类物质的前体物^[20], 影响着酱油

的风味和品质。获得葡萄球菌的纯培养菌株是其应用于高盐发酵食品的基础。对发酵前期的高盐稀态酱醪采样分离酱醪葡萄球菌, 获得了 34 株形态与葡萄球菌属相似的菌株, 将其命名为 JL04~JL37。利用高盐 MRS 培养基 (160 g/L NaCl) 多次传代培养, 获得了 14 株耐盐生长稳定的菌株。

葡萄球菌能利用可发酵糖生成乳酸、乙酸、琥珀酸等有机酸^[21]。有机酸解离出氢离子, 致使发酵液 pH 值降低, 可以通过测定发酵液 pH 值初步判断葡萄球菌的产酸能力。从图 1a 可以看出, 14 株菌发酵 60 h 后发酵液 pH 值降低至 4.5 以下的菌株有 7 株, 其中 pH 值最低的菌株为 JL04, 其发酵液 pH < 4.0; pH 在 4.0~4.5 的菌株有 6 株, 分别为 JL05、JL10、JL11、JL15、JL16、JL17。酱油发酵对氧的需求不高, 产酸细菌在酱醪局部厌氧环境中易积累酸感柔和的乳酸, 能使酱油口感更加爽朗、绵长, 对酱油的风味有增益作用, 因此, 以乳酸积累能力为指标, 对上述 7 株菌进行复筛, 获得 3 株乳酸积累大于 2 g/L 的菌株 JL04、JL15、JL17 进入后续鉴定, 其乳酸含量分别为 2.04、2.02 g/L 和 2.42 g/L (图 1b)。

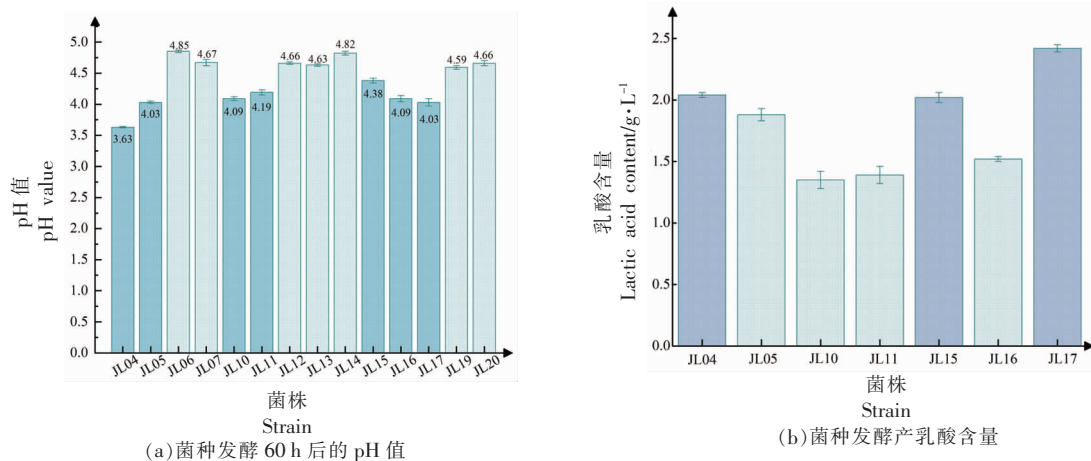


图 1 酱醪葡萄球菌的筛选结果

Fig.1 Screening results of *Staphylococcus* in moromi

2.2 菌种鉴定

3 株菌镜检为革兰氏阳性球菌, 其菌体形态主要呈现葡萄串状聚集 (图 2a)。16S rDNA 序列系统发育树 (图 2b) 显示 3 株菌均属于葡萄球菌属。同时为了更加准确地判断 3 株酱醪葡萄球菌的种属, 以葡萄球菌属模式种金黄色葡萄球菌 (*S.*

aureus) 为对照, 选择特异性的生理生化试验进行补充鉴定, 结果见表 1。从表 1 可以看出, JL04 只能利用果糖、半乳糖和甘露醇; JL15 和 JL17 均可利用蔗糖、果糖、乳糖、半乳糖、海藻糖和甘露醇, 但 JL15 对半乳糖的利用较弱。参考《伯杰细菌鉴定手册》中葡萄球菌属的生理生化特性^[22], 结合

NCBI 比对结果最终鉴定 JL04 为香料葡萄球菌 (*S. mentans*)、JL17 为肉葡萄球菌 (*S. carnosus*)、JL15 为鱼发酵葡萄球菌 (*S. piscifer-*

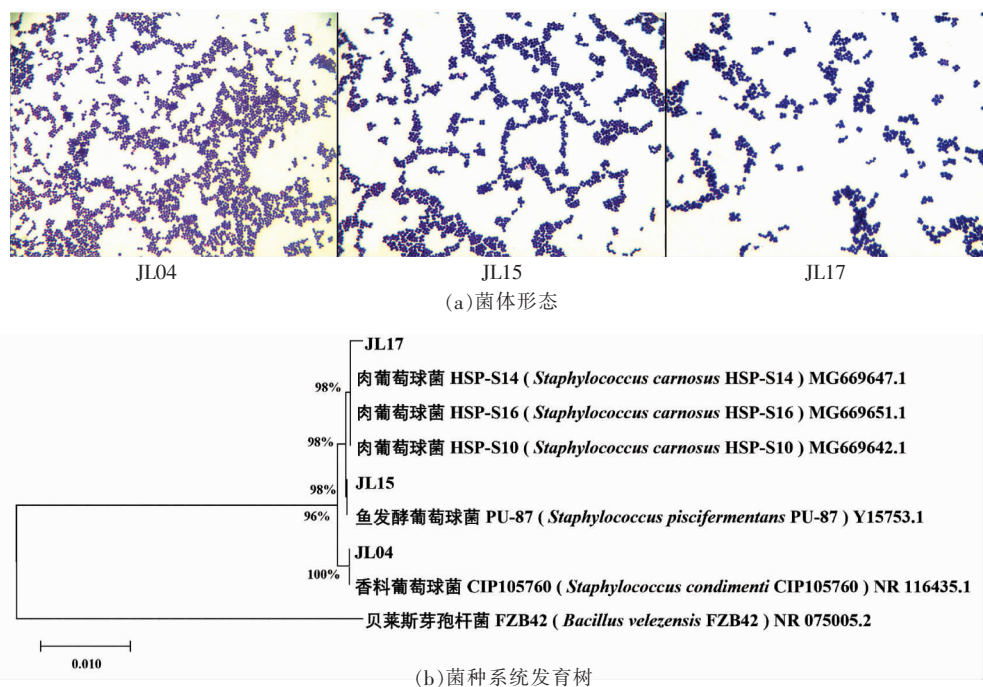


图 2 3 株菌的鉴定结果

Fig.2 Identification results of the three strains

表 1 3 株菌的生理生化特性

Table 1 Biochemical properties of the three strains

试验项目	JL04	JL15	JL17	金黄色葡萄球菌
蔗糖	-	+	+	+
麦芽糖	-	-	-	+
果糖	+	+	+	+
木糖	-	-	-	-
乳糖	-	+	+	+
半乳糖	+(w)	+(w)	+	+
海藻糖	-	+	+	+
甘露醇	+	+	+	+
精氨酸双水解酶	+	+	+	+

注：“+”代表试验阳性；“-”代表试验阴性；“w”代表试验弱反应。

2.3 3 株酱醪葡萄球菌对酱油发酵的影响

2.3.1 3 株酱醪葡萄球菌对酱油理化指标的影响

酱油发酵过程中还原糖、氨态氮和总酸含量的变化反映了酱油基础风味的变化，是酿造酱油重

要的质量指标^[23]。酱油发酵前期米曲霉产生的淀粉酶活力较高，促使淀粉质原料快速水解，此时还原糖的积累速率大于酱醪微生物的消耗速率，使得酱油中还原糖的含量呈现先升高的趋势，较高的还原糖含量有利于酱醪微生物的生长和代谢，庄婉菁等^[24]研究表明酱油酿造过程中还原糖含量在 10~20 d 之间达到峰值，故选择在发酵 15 d 的高盐稀态酱醪中分别添加 3 株葡萄球菌进行为期 60 d 的短周期发酵，考察 3 株葡萄球菌在酱油发酵中的作用，以不加菌发酵的酱油为对照组，测定酱油发酵过程中理化指标，结果见图 3。

由图 3 可知，发酵 0~15 d，由于还未添加葡萄球菌，4 个酱油样品的还原糖、总酸及氨态氮含量与对照组含量相近，变化趋势一致。在发酵第 15 天分别添加了 3 株葡萄球菌后，15~30 d 内添加了 3 株葡萄球菌发酵的酱油还原糖降低速率明显大于对照组，可见添加葡萄球菌发酵加速了酱油中还原糖的利用，同时其总酸积累速率也均大于对照组，说明葡萄球菌的添加有利于促进酱油中还

原糖向有机酸转化;此外,酱油的氨态氮积累速率也明显高于对照组,这是由于葡萄球菌能分泌少量的蛋白酶可促进蛋白质原料水解,进而促进了酱油中氨态氮的积累,此时间段内添加 JL17 发酵的酱油氨态氮积累速率最快,相比另外 2 株葡萄球菌在促进酱油氨态氮积累上更具优势。发酵 30~60 d 内,有机酸的持续积累使得酱醪 pH 值逐渐降低,抑制了米曲霉产生的蛋白酶和淀粉酶的酶活性,使得还原糖的消耗速率大于产生速率,还原糖含量减少呈下降趋势,且总酸和氨态氮的积累速率也逐渐变缓。发酵 60 d 结束时,添加了菌株 JL04、JL15、JL17 发酵的酱油中还原糖含量虽与对照组无显著差异,但总酸和氨态氮的含量均高于对照组,其总酸含量分别为 15.61、15.10、15.42 g/L,相比对照组提升了 8.40%、4.86%、7.08%;氨态氮含量分别为 9.12、9.02 g/L 及 9.31 g/L,较对照组提升了 1.90%、0.78%、4.02%,可见添加 3 株葡萄球菌的添加发酵有助于提升酱油总酸及氨态氮的含量,进而有助于增进酱油酸感和鲜味。

2.3.2 3 株酱醪葡萄球菌对酱油主要有机酸的影响 酱油中主体有机酸的构成为乳酸和乙酸,还存在少量的琥珀酸、富马酸、柠檬酸等,除了赋予酱油爽口的酸感,还是酱油中乳酸乙酯、乙酸乙酯、乙酸高级醇酯、乳酸高级醇酯等酯类物质的前体物,是酱油独特滋味与香气形成的重要组成成分,因此其含量是影响酱油风味及品质的重要因素^[25]。为考察葡萄球菌对酱油重要有机酸的影响,利用高效液相色谱对酱油中的 L-苹果酸、乳酸、乙酸、柠檬酸、琥珀酸和富马酸 6 种常见的有机酸进行分析^[26],其结果见图 4。由图 4 可知,添加 JL04、JL15、JL17 发酵的酱油中 6 种有机酸的总含量分别为 9.78、8.83 g/L 及 8.96 g/L,相比对照组分别提升了 37.53%、24.06%及 25.90%。添加 3 株菌发酵主要影响了酱油中乳酸、乙酸、柠檬酸和琥珀酸的含量。添加 JL04 和 JL15 发酵能显著提升酱油中乳酸、乙酸、琥珀酸含量。添加 JL04 发酵的酱油中乳酸、乙酸和琥珀酸的含量分别比对照组提高了 32.64%、44.70%和 202.99%,而 JL15 对乳酸、乙酸、琥珀酸的提升弱于 JL04,相比对照组分别提高了 22.28%、6.91%及 191.04%。与 JL04 和 JL15

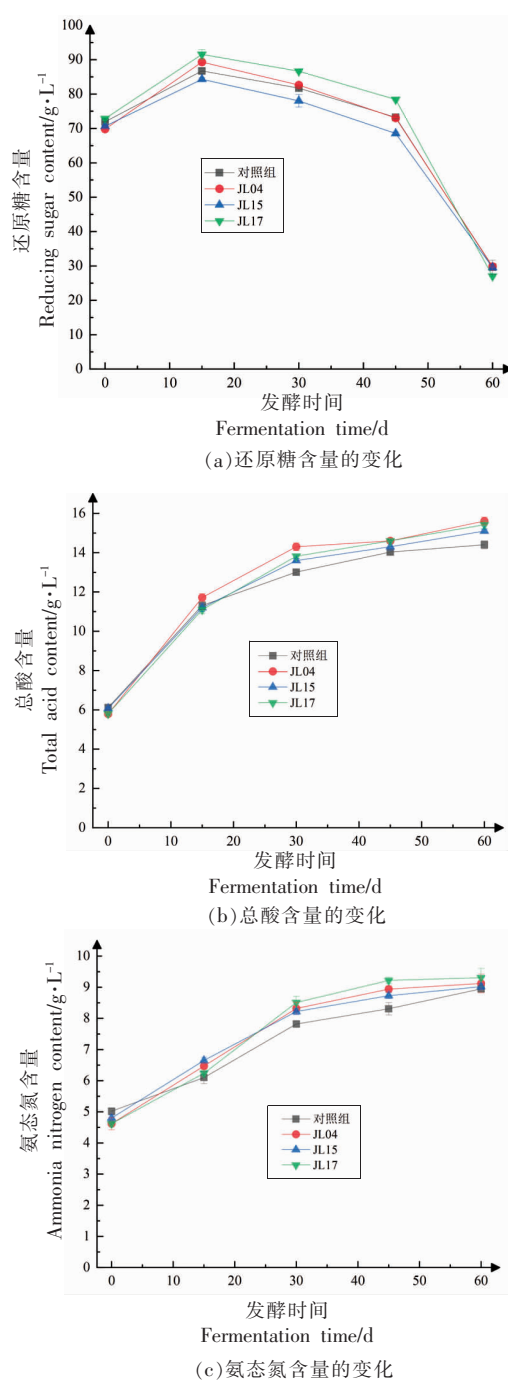
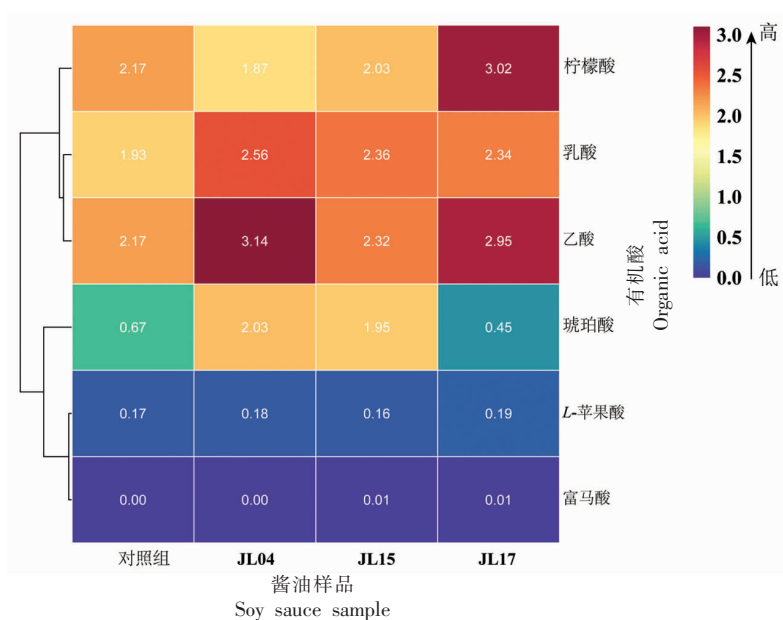


图 3 发酵过程中酱醪理化指标的变化

Fig.3 Changes of physicochemical indicators during the moromi fermentation

相比,JL17 虽不能促进酱油中琥珀酸的积累,但能促进酱油中柠檬酸的积累,其添加发酵的酱油中柠檬酸含量较对照组提升了 39.17%。综合而言,3 株葡萄球菌均有促进酱油中有机酸积累的作用。



注:热图中数据为有机酸质量浓度,单位为 g/L;颜色代表有机酸在 4 组酱油中的相对含量大小,从蓝色渐变为红色代表相对含量由高到低。

图 4 酱油 6 种有机酸含量热图

Fig.4 Heat map of six organic acid content in soy sauce

2.3.3 3 株酱醪葡萄球菌对酱油挥发性风味物质的影响 为了解析酱醪葡萄球菌对酿造酱油香气的影响,利用 GC-MS 分析 3 组添菌发酵 60 d 的酱油中挥发性风味物质的种类及含量,以未添菌酱油为对照组,结果见表 2。所有酱油中共检测出 53 种挥发性风味物质,3 株菌对酱油挥发性风味物质的种类和含量均有一定的提升作用,以酯类和醇类物质提升最为显著。

酯类物质是酱油中关键的主体香气物质。从表 2 可以看出,添加 JL04、JL15 及 JL17 发酵的酱油中检出的酯类物质分别为 15,16 种及 14 种,较对照组分别增加了 3,4 种及 2 种,其酯类物质含量比对照组提升了 116.09%,95.60%及 111.03%,表明 3 株菌的添加能促进酯类物质的生成,增加了酱油酯类风味物质的含量及丰富度。高盐稀态酱油中酯类风味物质的合成主要是微生物利用酱醪中的有机酸和醇类物质酯化作用的结果^[27],3 株菌在高盐稀态发酵中良好的有机酸积累能力是促进酯类风味物质形成的重要因素。3 株菌代谢的有机酸主要为乙酸和乳酸,乳酸和乙酸含量的提升使得酱油中乙酸酯类和乳酸酯类物质均有明显提升,其中乙酸酯类物质为乙酸乙酯(水果香)

和乙酸苯乙酯(花香)。乙酸乙酯的含量相比对照组分别增加了 169.60%,64.12%及 160.17%,而乙酸苯乙酯在对照组中未检出,可见葡萄球菌的加入促进了乙酸和苯乙醇的酯化,进而促进了乙酸苯乙酯的生成;检出的乳酸酯类物质为甜奶油香的乳酸乙酯和乳酸异丙酯,相比对照组均有一定的提升。可见添加葡萄球菌发酵的酱油中小分子酯类物质含量明显增加,有利于提升酱油的酯香,促进酱油形成花果香为特征的前香和主体香。此外,从添加 3 株菌发酵的酱油中还检出了十一酸乙酯、十五酸乙酯等高级脂肪酸乙酯,这些物质并未在对照组中检出,表明葡萄球菌可能存在促进高级脂肪酸生成的能力,进而促进高级脂肪酸酯的形成。

添加 3 株葡萄球菌的发酵酱油中检出的醇类物质种类分别为 12,11 种和 10 种,含量分别为 2 126.84,2 011.91,1 988.20 $\mu\text{g/L}$,相比对照组在种类(10 种)和总含量(2 064.58 $\mu\text{g/L}$)上并无明显差异,而不同的醇类物质间存在显著差异。检出的醇类物质主要为乙醇和苯乙醇,其含量相比对照组有明显的减少,且与乙酸乙酯和乙酸苯乙酯的生成呈负相关关系,说明添加葡萄球菌发酵促进了

表 2 酱 油 中 挥 发 性 风 味 物 质 含 量

Table 2 Contents of volatile flavor compounds in soy sauce

化合物名称	CAS 号	香味描述 ^[26-32]	挥发性物质含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$				提升率*/%		提升率*/%	
			对照组	JL04	JL15	JL17	JL15	JL17		
乙酸乙酯	141-78-6	果香	60.96 ± 2.44 ^d	164.35 ± 4.93 ^a	100.05 ± 8.12 ^c	158.60 ± 14.27 ^b	64.12	158.60 ± 14.27 ^b	160.17	
乙酸苯乙酯	103-45-7	花香	ND	37.00 ± 1.48 ^a	22.54 ± 0.68 ^a	30.39 ± 1.52 ^b	NC	30.39 ± 1.52 ^b	NC	
乳酸乙酯	97-64-3	甜奶油香	0.09 ± 0.01 ^d	6.61 ± 0.40 ^a	5.84 ± 0.23 ^b	2.03 ± 0.14 ^c	6 388.89	2.03 ± 0.14 ^c	2 155.56	
琥珀酸二乙酯	123-25-1	UO	ND	3.47 ± 0.17 ^b	4.07 ± 0.24 ^a	ND	NC	ND	NC	
苯甲酸乙酯	93-89-0	芳香气味	27.18 ± 1.36 ^b	28.34 ± 2.27 ^a	22.88 ± 1.14 ^c	21.06 ± 1.05 ^c	-15.82	21.06 ± 1.05 ^c	-22.52	
辛酸乙酯	106-32-1	酒香味	35.12 ± 1.05 ^a	29.28 ± 1.76 ^b	23.84 ± 1.19 ^a	24.84 ± 1.99 ^a	-32.12	24.84 ± 1.99 ^a	-29.27	
癸酸乙酯	110-38-3	果香	21.75 ± 1.52 ^a	18.35 ± 0.92 ^b	11.16 ± 0.33 ^c	20.06 ± 0.8 ^{ab}	-48.69	20.06 ± 0.8 ^{ab}	-7.77	
十一酸乙酯	627-90-7	椰子香	ND	4.14 ± 0.21 ^c	4.84 ± 0.24 ^b	7.59 ± 0.53 ^a	NC	7.59 ± 0.53 ^a	NC	
月桂酸乙酯	106-33-2	花果香	10.18 ± 0.92 ^c	38.93 ± 2.34 ^a	16.22 ± 1.14 ^b	1.45 ± 0.04 ^d	59.33	1.45 ± 0.04 ^d	-85.76	
十五酸乙酯	41114-00-5	UO	ND	292.92 ± 8.79 ^a	216.73 ± 19.51 ^b	208.65 ± 10.43 ^b	NC	208.65 ± 10.43 ^b	NC	
花生酸乙酯	18281-05-5	UO	122.14 ± 10.99 ^a	16.31 ± 1.47 ^d	133.53 ± 9.35 ^a	127.37 ± 3.82 ^b	9.33	127.37 ± 3.82 ^b	4.28	
甲基亚油酸甲酯	2566-97-4	UO	22.83 ± 1.60 ^b	ND	19.06 ± 1.33 ^c	49.84 ± 3.49 ^a	-16.51	49.84 ± 3.49 ^a	118.31	
2-羟基丙酸甲酯	2155-30-8	UO	ND	23.19 ± 1.39 ^a	22.42 ± 1.79 ^b	3.01 ± 0.27 ^b	NC	3.01 ± 0.27 ^b	NC	
2-甲基辛酸甲酯	2177-86-8	果香	1.17 ± 0.11 ^d	1.63 ± 0.08 ^b	2.08 ± 0.08 ^a	1.46 ± 0.13 ^c	77.78	1.46 ± 0.13 ^c	24.79	
2,4-二甲基壬酸甲酯	54889-61-1	UO	2.53 ± 0.08 ^b	ND	3.07 ± 0.09 ^a	ND	21.34	ND	-100.00	
乳酸异丙酯	63697-00-7	UO	0.38 ± 0.01 ^c	0.61 ± 0.06 ^a	0.42 ± 0.03 ^b	0.40 ± 0.02 ^{bc}	10.53	0.40 ± 0.02 ^{bc}	5.26	
γ -壬内酯	104-61-0	椰子香	6.89 ± 0.41 ^b	7.38 ± 0.66 ^a	7.11	ND	-100.00	ND	-100.00	
酯类含量			311.22 ± 20.49 ^a	672.51 ± 26.91 ^a	608.74 ± 45.51 ^c	656.77 ± 38.52 ^b	95.60	656.77 ± 38.52 ^b	111.03	
乙醇	64-17-5	醇香	579.21 ± 40.54 ^a	473.32 ± 28.40 ^a	506.53 ± 15.20 ^b	500.37 ± 15.01 ^b	-12.55	500.37 ± 15.01 ^b	-13.61	
异丁醇	78-83-1	果香	206.85 ± 6.21 ^c	253.76 ± 10.15 ^a	215.24 ± 19.37 ^b	192.11 ± 7.68 ^c	4.06	192.11 ± 7.68 ^c	-7.13	
正丁醇	71-36-3	酒香	136.67 ± 8.20 ^b	131.68 ± 11.85 ^b	110.38 ± 9.93 ^c	110.90 ± 3.33 ^c	-19.24	110.90 ± 3.33 ^c	-18.86	
3-甲基-1-丁醇	123-51-3	麦芽香	280.91 ± 11.24 ^c	334.64 ± 23.42 ^a	305.31 ± 12.21 ^b	306.77 ± 21.47 ^b	8.69	306.77 ± 21.47 ^b	9.21	
2-甲基丁醇	137-32-6	果香	225.74 ± 9.03 ^c	236.78 ± 18.94 ^b	251.17 ± 22.61 ^a	255.36 ± 17.88 ^a	11.27	255.36 ± 17.88 ^a	13.12	
2,3-丁二醇	19132-06-0	果香	123.85 ± 7.43 ^c	132.70 ± 9.29 ^b	143.92 ± 12.95 ^a	141.87 ± 9.93 ^a	16.21	141.87 ± 9.93 ^a	14.55	
3-甲硫基丙醇	505-10-2	酱香	15.22 ± 0.61 ^d	21.48 ± 0.86 ^c	24.64 ± 2.22 ^b	22.86 ± 0.91 ^b	61.89	22.86 ± 0.91 ^b	50.20	
1-辛烯-3-醇	3391-86-4	蘑菇香	43.47 ± 1.30 ^a	40.49 ± 2.83 ^b	29.52 ± 1.48 ^c	27.79 ± 1.11 ^c	-32.09	27.79 ± 1.11 ^c	-36.07	
3-辛醇	589-98-0	UO	15.65 ± 1.41 ^a	7.13 ± 0.57 ^b	5.77 ± 0.35 ^c	4.95 ± 0.40 ^d	-63.13	4.95 ± 0.40 ^d	-68.37	
苯乙醇	60-12-8	玫瑰香	437.00 ± 26.22 ^a	416.83 ± 25.01 ^c	410.91 ± 28.76 ^d	425.22 ± 25.51 ^b	-5.97	425.22 ± 25.51 ^b	-2.70	
丙醇	71-23-8	果香	ND	12.64 ± 1.14 ^a	8.54 ± 0.43 ^b	ND	NC	ND	NC	
亚麻醇	506-43-4	坚果香	ND	65.39 ± 3.92	ND	ND	NC	ND	NC	

(续表 2)

化合物名称	CAS号	香味描述 ^[28-32]	对照组	挥发性物质含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$				提升率*/%	
				JL04	JL15	JL17	提升率*/%	提升率*/%	
醇类含量			2 064.58 ± 112.19 ^b	2 126.84 ± 136.39 ^a	3.02	2 011.91 ± 125.50 ^e	1 988.20 ± 103.24 ^d	-2.55	-3.70
3-甲基丙醛	3268-49-3	烤土豆香	ND	1.08 ± 0.10 ^a	NC	ND	ND	NC	NC
4-异丙氧基苯甲醛	18962-05-5	UO	ND	2.49 ± 0.17 ^a	NC	ND	ND	NC	NC
3-甲基丁醛	590-86-3	果香	9.68 ± 0.29 ^b	12.16 ± 0.97 ^a	25.62	7.48 ± 0.30 ^d	8.97 ± 0.36 ^c	-22.73	-7.33
苯甲醛	100-52-7	杏仁香	2.42 ± 0.10 ^c	ND	-100.00	8.38 ± 0.75 ^a	7.70 ± 0.23 ^b	246.28	218.18
苯乙醛	122-78-1	果香	31.98 ± 0.96 ^b	33.19 ± 1.99 ^a	3.78	28.96 ± 1.45 ^c	27.75 ± 1.67 ^d	-9.44	-13.23
2-苯基巴豆醛	4411-89-6	UO	4.28 ± 0.13 ^b	ND	-100.00	ND	4.60 ± 0.18 ^a	-100.00	7.48
醛类含量			48.36 ± 1.48 ^b	48.92 ± 3.24 ^b	1.16	44.82 ± 2.50 ^c	49.02 ± 2.44 ^a	-7.32	1.36
2,9-癸二酮	16538-91-3	UO	ND	ND	NC	ND	3.40 ± 0.17 ^a	NC	NC
2,2,4,4-四甲基-3-戊酮	815-24-7	UO	ND	19.59 ± 1.37 ^a	NC	11.18 ± 0.67 ^b	5.05 ± 0.45 ^c	NC	NC
4-羟基-3-甲氧基苯乙酮	498-02-2	烟熏味	ND	65.27 ± 2.61 ^a	NC	ND	ND	NC	NC
5-羟基-4-辛酮	496-77-5	豆蔻香	ND	0.37 ± 0.01 ^a	NC	ND	ND	NC	NC
3-羟基-2-丁酮	513-86-0	奶油香	0.72 ± 0.04 ^c	2.08 ± 0.10 ^a	188.89	1.13 ± 0.06 ^b	ND	56.94	-100.00
2-甲基-3-辛酮	923-28-4	UO	3.50 ± 0.17 ^c	5.13 ± 0.41 ^b	46.57	13.81 ± 0.97 ^a	ND	294.57	-100.00
3-庚酮	106-35-4	油脂香	21.79 ± 1.53 ^b	94.83 ± 7.59 ^a	335.20	ND	ND	-100.00	-100.00
2,2,5-三甲基-3,4-己二酮	20633-03-8	UO	2.92 ± 0.12 ^{ab}	ND	-100.00	2.86 ± 0.17 ^b	2.94 ± 0.18 ^a	-2.05	0.68
2-羟基-5-甲基苯乙酮	1450-72-2	UO	7.25 ± 0.29 ^b	ND	-100.00	9.43 ± 0.28 ^a	7.07 ± 0.35 ^b	30.07	-2.48
酮类含量			36.18 ± 2.14 ^b	187.27 ± 12.09 ^a	417.61	38.41 ± 2.15 ^b	18.46 ± 1.15 ^c	6.16	-48.98
乙酸	64-19-7	醋香	19.65 ± 1.38 ^c	78.03 ± 4.68 ^a	297.10	61.38 ± 1.84 ^b	77.44 ± 5.42 ^a	212.37	294.10
异戊酸	503-74-2	UO	ND	0.11 ± 0.01 ^a	-	1.01 ± 0.04 ^a	ND	NC	NC
2-乙基庚酸	3274-29-1	UO	4.12 ± 0.12 ^b	ND	-100.00	7.32 ± 0.51 ^a	3.58 ± 0.32 ^c	77.67	-13.11
酸类含量			23.77 ± 1.50 ^d	78.15 ± 4.69 ^b	228.78	69.71 ± 2.39 ^c	81.02 ± 5.74 ^a	193.27	240.85
4-乙基愈创木酚	2785-89-9	烟熏香	ND	7.40 ± 0.59 ^c	NC	24.04 ± 0.96 ^a	13.91 ± 1.11 ^b	NC	NC
愈创木酚	90-05-1	烟熏香	3.21 ± 0.16 ^c	ND	-100.00	1.09 ± 0.08 ^c	1.28 ± 0.09 ^b	-66.04	-60.12
酚类含量			3.21 ± 0.16 ^d	7.40 ± 0.59 ^c	130.53	25.13 ± 1.04 ^a	15.19 ± 1.20 ^b	682.87	373.21
2,5-二甲基吡嗪	123-32-0	坚果香	2.37 ± 0.14 ^c	7.60 ± 0.53 ^a	220.68	7.61 ± 0.53 ^a	5.27 ± 0.42 ^b	221.10	122.36
2-乙基-3,6-二甲基吡嗪	13360-65-1	坚果香	4.56 ± 0.14 ^b	6.38 ± 0.32 ^a	39.91	4.86 ± 0.15 ^b	3.86 ± 0.19 ^c	6.58	-15.35
2,3,5-三甲基吡嗪	14667-55-1	焦香	ND	3.41 ± 0.24 ^a	NC	0.93 ± 0.08 ^c	3.03 ± 0.12 ^b	NC	NC
2-甲基吡嗪	109-08-0	坚果香	ND	0.12 ± 0.01 ^b	NC	0.69 ± 0.03 ^a	ND	NC	NC
杂环类含量			6.93 ± 0.28 ^d	17.52 ± 1.10 ^a	152.81	14.09 ± 0.79 ^b	12.16 ± 0.74 ^c	103.32	75.47
总计含量			2 494.26 ± 138.24 ^e	3 138.61 ± 185.01 ^a	25.83	2 812.82 ± 179.88 ^b	2 820.84 ± 153.04 ^b	12.77	13.09

注：“对照组”为不加葡萄酒发酵的酱油；“UO”：未知香气；“ND”：未检测到；同一行不同字母表示显著性差异 ($P < 0.05$)；“NC”：无法计算；“*”：提升率为正代表该项物质相比对照组提升的比例，提升率为负代表该项物质相比对照组降低的比例。

乙酸与乙醇及苯乙醇的酯化。此外,异丁醇、3-甲基-1-丁醇、2-甲基丁醇、2,3-丁二醇、3-甲硫基丙醇相比对照组有明显增加,这些醇类具备果香、麦芽香等香气特性,弥补了乙醇和苯乙醇含量减少而损失的香气。添加 3 株菌发酵的酱油虽在酮类物质种类上均无明显差异,但添加 JL04 发酵的酱油酮类物质含量较对照组提升了 5.18 倍,其主体的酮类物质为烟熏香的 4-羟基-3-甲氧基苯乙酮(香草酮)和油脂香的 3-庚酮。4 种发酵酱油中检出的挥发性酸类物质较少,含量最高的挥发性酸为乙酸,相比对照组虽有一定程度地提升,但检出的含量为微克每升级别,这是由于检测方式造成的差异,乙酸含量应以上述液相色谱定量为准。醛类、酚类及杂环类物质在添菌酱油中检出的种类和含量与对照无明显差异,表明 3 株葡萄球菌对这几类挥发性物质的影响较小。

2.3.4 感官评分 为了进一步明确 3 株葡萄球菌对酱油风味及品质的影响,对其添加发酵后的酱油进行感官评分,结果见图 5。添加 3 株菌发酵的酱油在香气和滋味较对照组均有明显提升,添加 JL04 发酵的作用最明显,其发酵的酱油香气和滋味评分相比对照组分别提升了 19.19%和 26.92%,酱油的感官特征为酯香浓郁、酸鲜适口、口感清爽。4 组酱油在颜色和体态方面没有明显差异。感官评价的结果表明 3 株葡萄球菌对酱油的香气、滋味及整体风味有着明显的增益效果。

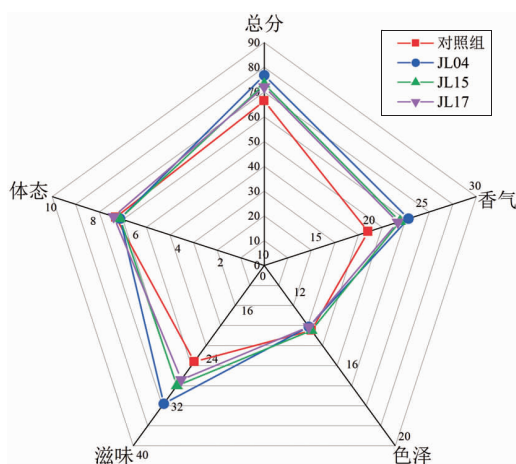


图 5 添加 3 株葡萄球菌发酵酱油的感官评分
Fig.5 Sensory evaluation of soy sauce added with the three *Staphylococcus*

3 结论

本研究从高盐稀态酱醪中筛选获得了 3 株产酸性能优良葡萄球菌 JL04 (*S. condimenti*)、JL15 (*S. piscifermentans*)、JL17 (*S. carnosus*)。将 3 株葡萄球菌添加至高盐稀态酱醪中进行发酵研究,与未添加葡萄球菌对照组进行对比分析,发现添加葡萄球菌发酵可明显提高高盐稀态发酵酱油的氨态氮、总酸,对酱油的鲜味及酸感有良好的贡献;酱油中常见的 6 种有机酸定量分析结果显示添加 JL04、JL15、JL17 发酵的酱油中其总含量分别为 9.78、8.83 g/L 及 8.96 g/L,相比对照组分别提高了 37.53%、24.06% 及 25.90%;含量增加的有机酸主要是乳酸、乙酸、柠檬酸和琥珀酸,其与酱油中乙醇、苯乙醇等醇类物质成酯,进而促进了酱油酯类风味物质的形成,其含量相比对照组分别提高了 116.09%、95.60% 及 111.03%,其中乙酸酯类、乳酸酯类及琥珀酸酯类的提升较为明显,与相应的有机酸含量增加呈正相关;此外,感官评分的结果也显示 3 株葡萄球菌对酱油的香气、滋味有明显的增益作用。综上,酱醪中筛选的 3 株葡萄球菌可以通过增加酱油发酵中有机酸的积累而增加酯类等挥发性风味物质,具有作为风味菌在酱油酿造中应用的良好潜力。

参 考 文 献

- [1] ZHOU T, FENG Y Z, THOMAS-DANGUIN T, et al. Enhancement of saltiness perception by odorants selected from Chinese soy sauce: A gas chromatography/olfactometry-associated taste study [J]. Food Chemistry, 2021, 335(1): 127664.
- [2] ZHAO G Z, DING L L, HADIATULLAH H, et al. Characterization of the typical fragrant compounds in traditional Chinese-type soy sauce [J]. Food Chemistry, 2020, 312(9): 126054.
- [3] 牛丽丽, 何琳琳. 高盐稀态酱油中微生物的协同作用 [J]. 食品安全导刊, 2018, 24(3): 155-156.
NIU L L, HE L L. Synergistic effects of microorganisms in high-salt diluted soy sauce [J]. China Food Safety Magazine, 2018, 24(3): 155-156.
- [4] 张灵芬. 酱油发酵工艺及改善酱油风味的方法探讨 [J]. 食品安全导刊, 2021, 22(3): 137-139.
ZHANG L F. Discussion on the fermentation process

- of soy sauce and methods to improve the flavor of soy sauce[J]. *China Food Safety Magazine*, 2021, 22(3): 137-139.
- [5] 符姜燕. 酱油酿造技术分析[J]. *现代食品*, 2018, 48(7): 146-148.
- FU J Y. Soy sauce brewing technology analysis[J]. *Modern Food*, 2018, 48(7): 146-148.
- [6] LIANG R, HUANG J, WU X M, et al. Effect of raw material and starters on the metabolite constituents and microbial community diversity of fermented soy sauce[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2019, 99(13): 5687-5695.
- [7] 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): 2639-2646.
- [8] KONG Y, ZHANG L L, ZHANG Y Y, et al. Evaluation of non-volatile taste components in commercial soy sauces[J]. *International Journal of Food Properties*, 2018, 21(1): 1854-1866.
- [9] 张露, 梁寒峭, 陈建国, 等. 酿造酱油中有机酸种类与含量的检测分析[J]. *食品科技*, 2019, 44(3): 295-299.
- ZHANG L, LIANG H Q, CHEN J G, et al. Analysis of 10 kinds of organic acid composition in fermented soy sauce[J]. *Food Science and Technology*, 2019, 44(3): 295-299.
- [10] BOSSE R, WIRTH M, WEISS J, et al. Effect of storage temperature on volatile marker compounds in cured loins fermented with *Staphylococcus carnosus* by brine injection[J]. *European Food Research and Technology*, 2021, 247(1): 233-244.
- [11] 周慧敏, 张顺亮, 赵冰, 等. 木糖葡萄糖菌和肉葡萄球菌混合发酵剂对腊肉品质的影响[J]. *食品科学*, 2018, 39(22): 32-38.
- ZHOU H M, ZHANG S L, ZHAO B, et al. Effect of starter culture mixture of *Staphylococcus xylosus* and *S. carnosus* on the quality of dry-cured meat[J]. *Food Science*, 2018, 39(22): 32-38.
- [12] 李宗军. 中国传统酸肉中葡萄球菌的分离鉴定与应用研究[J]. *生物技术通报*, 2006, 21(3): 77-80, 92.
- LI Z J. Isolation, identification and application of *Staphylococcus* spp. in traditional Chinese sour meat [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2006, 21(3): 77-80, 92.
- [13] 黄俊逸, 王凤娜, 吴香, 等. 复合发酵剂的筛选及其对发酵香肠加工过程中品质的影响[J]. *食品科学*, 2020, 41(24): 95-101.
- HUANG J Y, WANG F N, WU X, et al. Effect of mixed starter cultures on the quality of fermented sausage[J]. *Food Science*, 2020, 41(24): 95-101.
- [14] 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.
- [15] 张耀广, 李兴佳, 屈雅莉, 等. 乳制品中选择性分离与计数植物乳杆菌的方法[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(9): 125-129.
- ZHANG G Y, LI X J, QU Y L, et al. Method for selective isolation and enumeration of *Lactobacillus plantarum* in dairy products[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2018, 44(9): 125-129.
- [16] 蔡妙英, 东秀珠. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 250-254.
- CAI M Y, DONG X Z. Manual for the systematic identification of common bacteria[M]. Beijing: Science Press, 2001: 250-254.
- [17] 国家卫生和计划生育委员会. 食品中还原糖的测定: GB 5009.7-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 1-4.
- National Health and Family Planning Commission. Determination of reducing sugars in foods: GB 5009.7-2016[S]. Beijing: China Quality and Standards Press, 2016: 1-4.
- [18] 国家卫生和计划生育委员会. 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: 1-3.
- National Health and Family Planning Commission. Determination of ammonia nitrogen in foods: GB 5009.235-2016[S]. Beijing: China Quality and Standards Press, 2016: 1-3.
- [19] 张伟, 杨俊文, 余冰艳, 等. 耐盐植物乳杆菌的选育及其对高盐稀态发酵酱油品质的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2023, 49(1): 86-94.
- ZHANG W, YANG J W, YU B Y, et al. Breeding of salt-tolerant *Lactobacillus plantarum* and their effect on the quality of high-salt liquid-state fermented soy sauce[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2023, 49(1): 86-94.
- [20] 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(12): 129131.
- [21] YANG P, ZHONG G X, YANG J C, et al. Metagenomic and metabolomic profiling reveals the correlation between the microbiota and flavor compounds and nutrients in fermented sausages[J]. *Food Chemistry*, 2022, 375(8): 131645.
- [22] 布坎南. 伯杰氏细菌鉴定手册 (第8版)[M]. 北京: 科学出版社, 1984: 667.
BUCHANAN. *Bergey's manual of determinative bacteriology*[M]. 8th ed. Beijing: Science Press, 1984: 667.
- [23] HOANG N X, FERNG S, TING C, et al. Optimizing the initial moromi fermentation conditions to improve the quality of soy sauce[J]. *LWT*, 2016, 74(12): 242–250.
- [24] 庄婉菁, 覃旋, 刘晓艳, 等. 高盐稀态酱油酿造过程中理化指标的动态变化研究[J]. *农产品加工*, 2019(17): 66–68.
ZHUANG W J, QIN X, LIU X Y, et al. The dynamic changes of physicochemical indexes in brewing process of high-salt liquid-state fermentation soy sauce[J]. *Farm Products Processing*, 2019(17): 66–68.
- [25] 国家质量监督技术局. 酿造酱油: GB 18186–2000[S]. 北京: 中国标准出版社, 2000: 5.
The State Bureau of Quality and Technical Supervision. *Brewing soy sauce: GB 18186–2000*[S]. Beijing: Standards Press of China, 2000: 5.
- [26] PENG M Y, LIU J Y, LIU Z J, et al. Effect of citrus peel on phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of soy sauce [J]. *LWT*, 2018, 90(4): 627–635.
- [27] JIANG X W, PENG D, ZHANG W, et al. Effect of aroma-producing yeasts in high-salt liquid-state fermentation soy sauce and the biosynthesis pathways of the dominant esters[J]. *Food Chemistry*, 2021, 344(9): 128681.
- [28] XU J N, QI Y M, ZHANG J, et al. Effect of reduced glutathione on the quality characteristics of apple wine during alcoholic fermentation [J]. *Food Chemistry*, 2019, 300(12): 125130.
- [29] CONDE -BÁEZ L, CASTRO -ROSAS J, VILLAGÓMEZ-IBARRA J R, et al. Evaluation of waste of the cheese industry for the production of aroma of roses (phenylethyl alcohol)[J]. *Waste and Biomass Valorization*, 2017, 8(4): 1343–1350.
- [30] MENG Q, IMAMURA M, KATAYAMA H, et al. Key compounds contributing to the fruity aroma characterization in Japanese raw soy sauce[J]. *Bio-science, Biotechnology, and Biochemistry*, 2017, 81(10): 1984–1989.
- [31] STEINHAUS P, SCHIEBERLE P. Characterization of the key aroma compounds in soy sauce using approaches of molecular sensory science[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(15): 6262–6269.
- [32] 牛云蔚, 朱全, 肖作兵. 茅台酒香气组成及关键香气成分间的协同作用[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(10): 215–226.
NIU Y W, ZHU Q, XIAO Z B. The aroma composition and synergistic effect among key aroma compounds in Moutai Baijiu[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(10): 215–226.

Screening of *Staphylococcus* spp. in Moromi and Their Effects on the Fermentation of High-salt Liquid-state Soy Sauce

Zhang Wei¹, Wang Jieli¹, Lin Chen¹, Liu Junliang¹, Yang Junwen¹,
Zhou Hui^{1,2}, Zhou Shangting^{2,3}, Jiang Xuewei^{1,2*}

¹School of Food Science and Bioengineering, Changsha University of Science & Technology, Changsha 410114

²Hunan Provincial Engineering Technology Research Center for Condiment Fermentation, Changsha 410600

³Jiajia Food Group Co. Ltd., Changsha 410600)

Abstract In order to investigate the effects of moromi *Staphylococcus* spp. on the fermentation of high-salt liquid-state

soy sauce, three *Staphylococcus* spp. (JL04, JL15, and JL17) with good acid-producing performance were screened from high-salt liquid-state moromi using acid-production as an index, which were identified as *S. condimenti*, *S. piscifermens* and *S. carnosus*, respectively. The three strains were added to the 15th day high-salt liquid-state moromi for a 60 days fermentation, and analysis of the changes for reducing sugar, total acid and ammonia nitrogen during the fermentation process showed that all three strains could accelerate the utilization of reducing sugar in moromi and increase the content of total acid and ammonia nitrogen. Among them, the total acid of fermented soy sauce added with JL04 was the highest, which was 15.61 g/L; and the ammonia nitrogen of fermented soy sauce added with JL17 was the highest, which was 9.31 g/L. HPLC quantitative analysis for 6 organic acids in the fermented soy sauce added with JL04, JL15 and JL17 increased by 37.53%, 24.06% and 25.90%, respectively, compared with the control group, and the main organic acids were acetic acid, lactic acid and succinic acid. GC-MS analysis for the volatile flavor compounds of soy sauce fermented by three strains showed that the content of esters was significantly increased, among which JL04 increased by 116.09%, mainly acetates and lactates, and it was positively correlated with the increase of corresponding organic acids. Sensory scores showed that the addition of three strains could enhance the aroma and taste of soy sauce. The three strains screened from high-salt liquid-state moromi had the characteristics of accumulating organic acids and promoting the synthesis of corresponding esters. They could be used in soy sauce fermentation as flavor bacteria to impart suitable sour taste, enrich taste, and enhance aroma.

Keywords moromi *Staphylococcus* spp.; screening; high-salt liquid-state soy sauce; organic acid; volatile flavor compounds