

高盐稀态酱醪中魏斯氏菌的筛选、性能及其对酱油风味的贡献

宋璐瑶¹, 张邵森¹, 钟太萍¹, 高佳慧¹, 蒋雪薇^{1,3*}, 唐建立^{1,3}, 宋春香^{3,4}, 罗晓明^{2,3*}

¹长沙理工大学食品与生物工程学院 长沙 410114

²长沙理工大学化学化工学院 长沙 410114

³湖南省调味品发酵工程技术研究中心 长沙 410600

⁴加加食品集团股份有限公司 长沙 410600

摘要 为探究酱醪优势菌属——魏斯氏菌对高盐稀态酱油风味和品质的影响,从高盐稀态酱醪中采样,分离筛选获得5株耐盐产酸菌,经16S rDNA测序结合形态学及生理生化试验,WS09、WS11、WS12被鉴定为泰国魏斯氏菌,WS20、WS23为食窦魏斯氏菌。对其发酵性能进行研究,发现5株菌的最适生长温度均为30℃,盐质量浓度为100 g/L时生长良好。测定其生长曲线,确定其对数生长期为6~16 h。其中食窦魏斯氏菌WS20的产酸能力、耐盐生长能力、抑菌能力和益生特性均最优。将其添加至酱醪中进行为期60 d的发酵,分析发酵过程中酱油的理化指标、有机酸含量、挥发性风味物质种类及含量,并进行感官评分,结果表明:添加WS20可以促进酱油中总酸、氨基酸态氮、可溶性无盐固形物的积累,比对照组分别提升11.71%、5.18%、8.03%。乳酸、乙酸是酱油发酵过程中占比最高的两种有机酸,两者在7种有机酸中总占比达70.24%,比对照组分别提升12.50%和19.69%。挥发性风味物质种类比对照组多8种,含量达(4 211.64±94.06) μg/L,提升38.92%,其中乳酸乙酯、乙酸乙酯、苯乙醇、2,3-丁二醇含量分别为(5.96±0.02), (236.22±7.81), (386.17±4.35), (84.03±1.15) μg/L,较对照样分别提升4 484.62%, 103.39%, 59.14%, 137.64%。感官评定结果表明试验组酱油的香气、滋味、色泽及体态均优于对照组。本研究丰富了酱油酿造风味菌种,为魏斯氏菌在酱油酿造中的应用提供了理论依据。

关键词 酱醪魏斯氏菌; 筛选; 菌种性能; 酱油发酵; 有机酸; 挥发性风味物质

文章编号 1009-7848(2024)10-0180-15 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.10.017

酱油是起源于我国的最具东方特色的传统调味品,也是典型的规模化制造的发酵食品,主要由大豆、小麦经微生物发酵酿制而成,以鲜味为主,具有多种风味的重要调味品^[1]。目前国内酱油酿造主要采用两种工艺:低盐固态工艺(含固稀工艺)和高盐稀态工艺^[2]。低盐固态工艺因开放程度高,微生物污染风险大,所生产的酱油风味较差^[3]而逐步被高盐稀态工艺取代。近些年,国内大型酱油企业多采用圆盘制曲机、发酵罐等封闭式设备替代开放式制曲箱及发酵池,在16%~18%及以上盐含量下进行4~6个月及以上的高盐稀态发酵,连续封闭式工艺较好地防控了开放式工艺带来的微

生物污染风险,然而,也出现因发酵菌种单一而产生的风味单薄的问题^[4]。由此,为了在封闭发酵系统中获得风味上乘的酿造酱油,选育酿造风味菌,研究其应用性能至关重要。

酱油酿造是复杂微生物及其酶系相互作用的过程^[5]。对酱油酿造过程中的微生物菌群进行高通量测序发现,酱醪微生物除制曲的米曲霉外,还有一些与风味形成相关的酵母和细菌^[6-7]。酱醪中的酵母主要有接合酵母^[8]、球拟酵母^[9]、假丝酵母^[10]及柯达酵母^[6]等,与酱油中醇、酯形成相关,赋予酱油醇香和酯香。酱醪中的细菌则复杂的多。有研究发现,魏斯氏菌^[11]、四联球菌^[12]、乳杆菌^[13]等乳酸菌以及葡萄球菌^[14]和芽胞杆菌^[15]等都是酱醪中常见且占比较高的菌种。其中,魏斯氏菌、葡萄球菌、四联球菌等产酸风味细菌能积累乳酸、乙酸等有机酸,赋予酱油圆润绵长及爽口的酸感,这些有机酸与酱油中的醇类相互作用产生相应的有机酸酯,有利于提升酱油酯香及醇厚感、回甜感,丰富酱油的滋味和香气^[12,16]。此外,乳酸、乙酸等在一定范围内

收稿日期: 2023-10-16

基金项目: 湖南省重点研发项目(2023NK2035);湖南省自然科学基金面上项目(2021JJ30700);湖南省教育厅优秀青年项目(23B0306);湖南省大学生创新训练计划项目(S202210536119)

第一作者: 宋璐瑶,女,硕士生

通信作者: 蒋雪薇 E-mail: jxw_72@sina.com

罗晓明 E-mail: xmluo@csust.edu.cn

提高发酵体系的总酸,抑制杂菌污染^[17]。魏斯氏菌作为高盐稀态酱醪中常见的异型乳酸发酵菌,是酱油酿造过程的优势细菌,占比最高可达 85.49%^[18]。除具有上述两种功能外,还具有益生功能^[19]和降解生物胺^[20]的作用,这给魏斯氏菌在酱油酿造中的多重应用带来可能。目前对酱醪中耐盐魏斯氏菌的筛选和基本性能研究还较欠缺,限制了魏斯氏菌作为酿造风味菌的应用。基于此,本研究从高盐稀态酱醪中分离筛选、鉴定具有产酸潜力的魏斯氏菌,研究其与酿造等相关的性能,以及对酱油风味的影响,以期丰富酱油酿造风味菌种,为改善酱油酿造工艺,提升其风味奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

酱醪样品:发酵 15,30,45 d 的高盐稀态酱醪,豆粕与炒麦(m/m)1:1 制作的成品曲,取自湖南某酱油厂,4℃保存。

菌种:生理生化试验用菌:金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、贝莱斯芽胞杆菌(*Bacillus velezensis*)。抑菌试验用菌:巨大芽胞杆菌(*Bacillus megaterium*)、地衣芽胞杆菌(*Bacillus licheniformis*)、蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*),上述菌种均保藏于湖南省调味品发酵工程技术研究中心。

药品及试剂:L-阿拉伯糖、核糖、棉子糖、纤维二糖、万古霉素盐酸盐(均为 BR)、溴甲酚紫(AR),上海麦克林生化科技有限公司;木糖、海藻糖、麦芽糖、半乳糖、蔗糖、猪胆盐(均为 BR),草酸、苹果酸、乳酸、乙酸、柠檬酸、富马酸、琥珀酸(均为 HPLC),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,生工生物工程(上海)股份有限公司。

培养基:MRS 培养基^[21]。

1.2 仪器与设备

显微成像系统(E200),尼康映像仪器(上海)有限公司;梯度 PCR 扩增仪(VERITI),美国应用生物有限公司;电泳仪(DYY-12),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;分光光度计(722 型),上

海精密科学仪器有限公司;Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 色谱柱,安捷伦科技(中国)有限公司;436GC/EVOQ TQ/PAL 气相色谱-质谱联用仪,美国 Bruker Daltonics 公司;50/30 μm DVB/CAR/PDMS 固相微萃取针,美国 Supelco 公司;DB-5MS 色谱柱,美国 Agilent 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 魏斯氏菌的分离纯化 将发酵至 15,30 d 的酱醪样品梯度稀释,涂布于含有 0.2 g/L 万古霉素和 0.2 g/L 纳他霉素的 MRS 培养基中,厌氧罐中 30℃培养 2~3 d,挑选出表面光滑不透明,较亮,中央隆起,有黏性,边缘整齐的乳白色、圆形且生长良好的单菌落,镜检。将镜检结果为革兰氏阳性的短杆状菌株进行多次稀释涂平板,分离纯化获得纯培养菌株,4℃保存备用。

1.3.2 产酸优势菌株的筛选 将纯培养菌株接种至 80 g/L NaCl 的 MRS 液体培养基中,30℃静置培养 48 h,取 8 mL 发酵液离心获得上清液,测量 pH 值,初步筛选出发酵液 pH<4.8 产酸菌株。取初筛菌株的发酵上清液,用《食品中总酸的测定》(GB 12456-2021)^[22]方法测定总酸含量,筛选出发酵液总酸含量≥6 g/L 的产酸优势菌株。

1.3.3 产酸优势菌株的鉴定

1.3.3.1 分子生物学鉴定 用细菌试剂盒提取高产酸优势菌株的总 DNA,扩增 16S rDNA,PCR 体系为:总 DNA 模板 2 μL,细菌通用引物 1492R 和 27F 各 2 μL,dNTP 4 μL,10×PCR Buffer 5 μL, Taq DNA 聚合酶 1 μL, MgCl₂ 溶液 3 μL,用 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℃保存备用。以 1%的琼脂糖凝胶检测 PCR 扩增产物,将 PCR 扩增产物送至生工生物工程(武汉)股份有限公司测序,将该结果在 NCBI 序列数据库的 Blast 程序中比对,使用 MEGA X 软件构建系统发育树。

1.3.3.2 生化试验鉴定 参考文献[23],对筛选的产酸优势菌株进行蔗糖、麦芽糖、L-阿拉伯糖、木糖、海藻糖、半乳糖、核糖、棉子糖和纤维二糖等糖发酵试验,以绿色魏斯氏菌(*Weissella viridescens*)为对照菌,糖发酵产酸记为“+”。参照文

献[24],采用甲基红试验和伏-普试验(V-P试验)测试混合酸发酵,以大肠杆菌为甲基红试验阳性对照株,贝莱斯芽胞杆菌为V-P试验阳性对照株。

1.3.4 菌种发酵性能研究

1.3.4.1 最适生长温度 将活化的魏斯氏菌以菌悬浓度 10^8 CFU/mL 按 1%(体积分数)接种量接种至 MRS 培养基中,分别在 25,28,30,32,34,37 °C 下 120 r/min 摇瓶培养 48 h,测定波长 600 nm 处的吸光度,以 0 h 培养基为空白对照。

1.3.4.2 耐盐特性 将活化的魏斯氏菌以菌悬浓度 10^8 CFU/mL 按 1%(体积分数)接种量分别接种于 5,20,40,60,80,100,120,140,160 g/L 盐质量浓度下的 MRS 培养基中,30 °C 120 r/min 摇瓶培养 48 h,测定波长 600 nm 处的吸光度,以 0 h 培养基为空白对照。

1.3.4.3 生长曲线和产酸特性测定 将活化的魏斯氏菌以菌悬浓度 10^8 CFU/mL 按 1%(体积分数)接种量分别转接于 5,80,100 g/L 盐质量浓度的 MRS 培养基中,30 °C 120 r/min 摇瓶培养 48 h,每隔 2 h 取样,测定波长 600 nm 处的吸光度和培养结束时的总酸含量,总酸含量测定方法同 1.3.2 节。

1.3.4.4 抑菌能力测定 采用牛津杯抑菌试验方法测定抑菌圈直径,方法参照文献[25]。

1.3.4.5 益生特性

1) 耐酸特性 参照 Ngampuak 等^[26]的方法并稍作改进:以菌悬浓度 10^8 CFU/mL 按 3%(体积分数)接种量分别接种至 pH 值为 2.5,3.0,3.5,4.5,5.0,5.5,6.0,6.5,6.8 的 MRS 液体培养基中,30 °C 120 r/min 摇瓶培养 3 h,梯度稀释倒平板,30 °C 培养 36 h,计活菌数。以 pH 6.8 的发酵液为对照,按照式(1)计算存活率 X 。

$$X = \frac{N}{N_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中: X 为存活率,%; N 为试验组活菌数,CFU/mL; N_0 为对照组活菌数,CFU/mL。

2) 耐胆盐特性 参照 Zhao 等^[27]的方法,以菌悬浓度 10^8 CFU/mL 按 3%(体积分数)接种量接入含 0.3%(质量分数)胆盐的 MRS 液体培养基中,30 °C 120 r/min 摇瓶培养 3 h,梯度稀释倒平板,30 °C 培养 36 h,计活菌数。以不含胆盐的菌株发酵液为对照,存活率计算公式同式(1)。

1.3.5 魏斯氏菌的高盐稀态发酵 成品曲与 230 g/L 的盐水按 1:2 ($m:V$) 混合制成盐质量浓度为 160 g/L 的酱醪,30 °C 为期 60 d 发酵。将食蜜魏斯氏菌 WS20 调整菌悬浓度至 10^8 CFU/mL,以 5%(体积分数)接种量于发酵第 10 天添加至高盐稀态酱醪中,每 10 d 取酱醪样品。以不加菌的酱醪为对照组,记为 C-0、C-10、C-20、C-30、C-40、C-50 和 C-60,以添加 WS20 为试验组,记为 WS20-0、WS20-10、WS20-20、WS20-30、WS20-40、WS20-50 和 WS20-60,滤布过滤得到酱油,测定理化指标、有机酸含量和挥发性风味物质。

1.3.6 酱油理化指标测定 参照《食品中的还原糖测定》(GB 5009.7-2016)^[28]测定还原糖含量;参照《食品中氨基酸态氮的测定》(GB 5009.235-2016)^[29]测定总酸和氨基酸态氮含量;参照《酿造酱油》(GB 18186-2000)^[30]测定可溶性无盐固形物含量。

1.3.7 酱油有机酸含量测定 样品处理及色谱条件:分别取酱油、30 g/L 硫酸锌和 106 g/L 亚铁氰化钾 5 mL 混合定容 100 mL,静置 0.5 h 后 4 000 r/min 离心 5 min,取上清,0.22 μ m 滤膜过滤后,注入样品瓶。色谱条件为:Agilent Eclipse XDB-C18 色谱柱(4.6 mm \times 150 mm,5 μ m),流动相为 V (0.1%磷酸): V (甲醇)=95:5,流速 0.6 mL/min,进样量 10 μ L,柱温 30 °C,检测波长 210 nm,扫描时间 15 min。

有机酸混合标准曲线:称取乳酸 0.20 g、乙酸 0.20 g、草酸 0.20 g、L-苹果酸 0.075 g、柠檬酸 0.10 g、琥珀酸 0.05 g、富马酸 0.05 g,定容 100 mL 配制混标液。将混标液稀释成浓度梯度液,采用上述液相条件测标准曲线,回归方程分别为:乳酸 $Y = 2.30 \times 10^6 X + 143.6532$ ($R^2 = 0.9992$),乙酸 $Y = 1.81 \times 10^6 X - 3906.279$ ($R^2 = 0.9986$),草酸 $Y = 1.22 \times 10^7 X - 0.1078127$ ($R^2 = 0.9980$),L-苹果酸 $Y = 1.1 \times 10^6 X - 246.7568$ ($R^2 = 0.9954$),柠檬酸 $Y = 9.33 \times 10^7 X + 78759.15$ ($R^2 = 0.9999$),琥珀酸 $Y = 1.69 \times 10^6 X - 0.00461$ ($R^2 = 0.9984$),富马酸 $Y = 1.49 \times 10^8 X - 0.12484$ ($R^2 = 0.9955$)。

1.3.8 酱油挥发性风味物质测定 参照张伟等^[31]的方法测定酱油中挥发性风味物质含量,以 2-甲基-3-庚酮为内标物,按式(2)计算挥发性风味物

质含量 $C_1(\mu\text{g/L})$:

$$C_1 = C_0 \times \frac{A_1}{A_0} \times \frac{V_0}{V_1} \times 10^3 \quad (2)$$

式中: C_1 为挥发性物质质量浓度, $\mu\text{g/L}$; C_0 为内标物 2-甲基-3-庚酮质量浓度, $0.816 \mu\text{g}/\mu\text{L}$; A_1 为挥发性物质峰面积; A_0 为 2-甲基-3-庚酮峰面积; V_1 为酱油的体积, mL ; V_0 为添加 2-甲基-3-庚酮的体积, μL 。

1.3.9 酱油感官评定 将发酵至 60 d 的酱油样品于 65°C 巴氏杀菌 30 min, 挑选 10 位有鉴评经验的感官评定人员 (5 名男性和 5 名女性, 年龄 25~45 岁) 对酱油的滋味、香气、体态和色泽进行感官评定, 满分为 100 分, 评分标准参照文献[31]。

1.4 数据统计

所有试验样品均采用 3 个平行, 采用 Excel 2019 处理数据, 采用 SPSS 进行差异显著性分析, 采用 Origin 2021 进行数据的可视化。

2 结果与分析

2.1 高盐稀态酱醪中魏斯氏菌的筛选与鉴定结果

2.1.1 魏斯氏菌的筛选 魏斯氏菌是酱醪发酵过程中常见的异型乳酸发酵菌, 筛选获得高产酸魏斯氏菌是研究其发酵性能的前提。在 MRS 培养基中添加万古霉素和纳他霉素有利于抑制革兰氏阳性菌和真菌的生长, 而魏斯氏菌对万古霉素具有

抗性, 能在双重抗性平板中存活, 提高筛选效率。通过双重抗性平板, 从酱醪样品中分离纯化得到符合魏斯氏菌菌落特征的 52 个纯培养菌株, 将其命名为 WS01~WS52。通过测定发酵液 pH, 初步筛选出 pH 值 <4.8 的产酸能力较强的菌株 19 株 (见表 1), 其中菌株 WS20 的发酵液 pH 最低, 降至 4.44。进一步摇瓶复筛 19 株菌, 以滴定总酸 $\geq 6.0 \text{ g/L}$ 为指标, 筛选出 5 株产酸性能优良菌株 (见图 1), 分别为 WS09、WS11、WS12、WS20 和 WS23, 其总酸含量分别为 (6.35 ± 0.04) , (6.16 ± 0.07) , (6.18 ± 0.03) , (6.50 ± 0.03) , $(6.23 \pm 0.05) \text{ g/L}$ 。

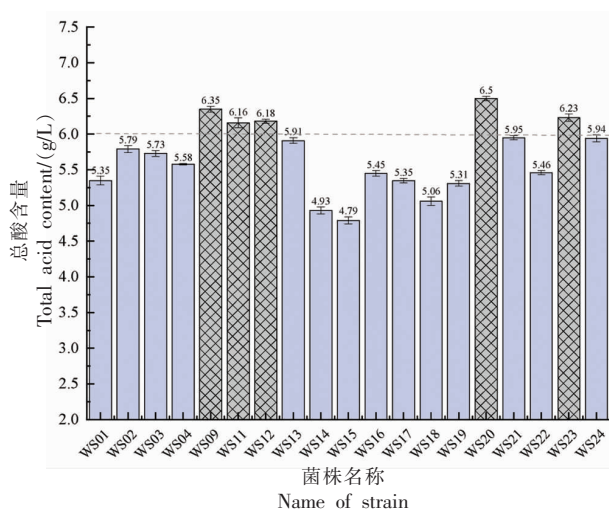


图 1 菌株的产酸能力

Fig.1 Acid production capacity of the strains

表 1 菌株的发酵液 pH 值

Table 1 The pH value of fermentation broth of strains

菌种名	pH 值	菌种名	pH 值	菌种名	pH 值	菌种名	pH 值
WS01	4.70	WS15	4.76	WS27	4.93	WS40	4.91
WS02	4.66	WS15	4.76	WS28	4.92	WS41	4.93
WS03	4.60	WS16	4.70	WS29	4.84	WS42	4.98
WS04	4.72	WS17	4.73	WS30	5.01	WS43	4.85
WS05	4.81	WS18	4.73	WS31	5.09	WS44	4.93
WS06	4.91	WS19	4.72	WS32	4.95	WS45	4.98
WS07	4.85	WS20	4.44	WS33	4.98	WS46	4.86
WS08	4.83	WS21	4.56	WS34	4.85	WS47	4.96
WS09	4.51	WS22	4.72	WS35	4.86	WS48	5.04
WS10	5.00	WS23	4.52	WS36	5.02	WS49	5.01
WS11	4.64	WS24	4.60	WS37	4.92	WS50	5.05
WS12	4.57	WS25	4.90	WS38	4.88	WS51	4.91
WS13	4.59	WS26	4.87	WS39	4.82	WS52	4.85

2.1.2 魏斯氏菌的鉴定 菌落形态观察(图 2a),5株菌在 MRS 平板上的菌落呈光滑,不透明,中央隆起,有黏性,边缘整齐的乳白色圆形,符合魏斯氏菌的菌落形态特征^[32]。革兰氏染色镜检发现,5株菌均为革兰氏阳性,无芽孢,无鞭毛,不运动的短杆状菌株(图 2b),符合魏斯氏菌的菌体形态特征^[33]。从菌落形态及菌体形态初步判断 5 株菌为魏斯氏菌。

提取 5 株菌的总 DNA 并进行 16S rDNA 扩增,得到单一,明亮,长度为 1 600 bp 的条带(图 3a),测序后构建系统发育树(图 3b)。结合糖发酵、甲基红和 V-P 试验辅助鉴定(表 2),发现 5 株菌均能利用 L-阿拉伯糖、木糖、麦芽糖、蔗糖、葡萄糖,均不能利用半乳糖,菌株 WS09、WS11 和

WS12 均能利用海藻糖,WS20 和 WS23 均不能利用海藻糖,5 株菌均呈现甲基红试验阳性,V-P 试验阴性的现象。WS20 和 WS23 与张广峰等^[34]筛选的食窦魏斯氏菌的生理生化结果一致,WS09、WS11 和 WS12 除半乳糖和木糖与张刚^[23]的研究结果相反,麦芽糖未做试验外,其它结果与其保持一致,表明同一个种不同菌株之间表现的性状存在差异。16S rDNA 序列分析结合生理生化特征,最终鉴定 WS09、WS11 和 WS12 为泰国魏斯氏菌(*W. thailandensis*),WS20 和 WS23 为食窦魏斯氏菌(*W. cibaria*)。

2.2 魏斯氏菌的菌种性能

2.2.1 魏斯氏菌的最适生长温度 研究菌株的最适生长温度有利于其培养和应用。设计 25,28,

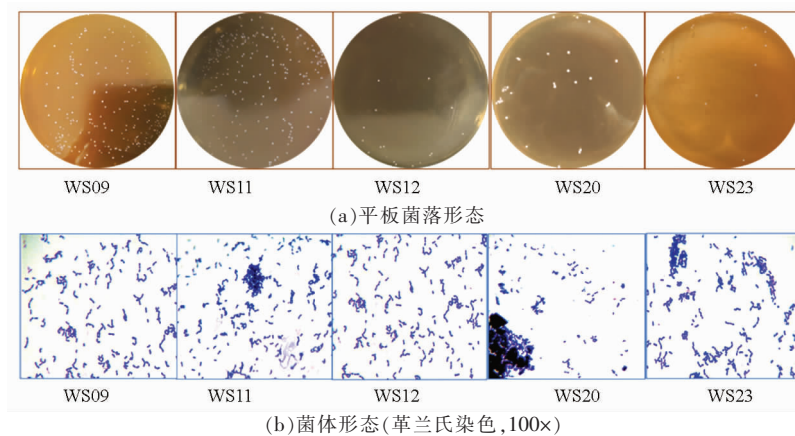


图 2 菌落及菌体形态

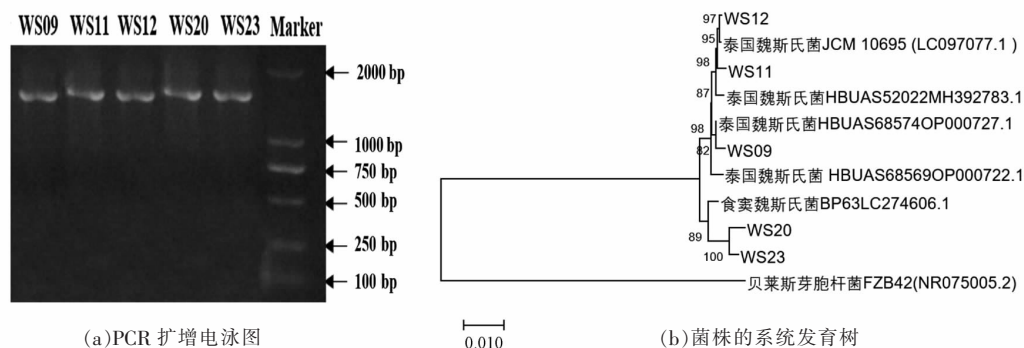
Fig.2 Colony and cell morphology

表 2 生理、生化试验结果

Table 2 Results of physiological and biochemical test

	WS09	WS11	WS12	泰国魏斯氏菌 ^[23]	WS20	WS23	食窦魏斯氏菌 ^[34]	大肠杆菌	贝莱斯芽胞杆菌
葡萄糖	+	+	+	+	+	+	+	\	\
半乳糖	-	-	-	+	-	-	-	\	\
蔗糖	+	+	+	+	+	+	+	\	\
麦芽糖	+	+	+	\	+	+	+	\	\
L-阿拉伯糖	+	+	+	+	+	+	+	\	\
木糖	+	+	+	-	+	+	+	\	\
海藻糖	+	+	+	+	-	-	-	\	\
甲基红	+	+	+	+	+	+	+	+	-
V-P 试验	-	-	-	+	-	-	-	-	+
过氧化氢酶试验	-	-	-	-	-	-	-	-	+

注: +表示菌种阳性, -表示菌种阴性, \表示相关试验未做。



(a)PCR 扩增电泳图

0.010

(b)菌株的系统发育树

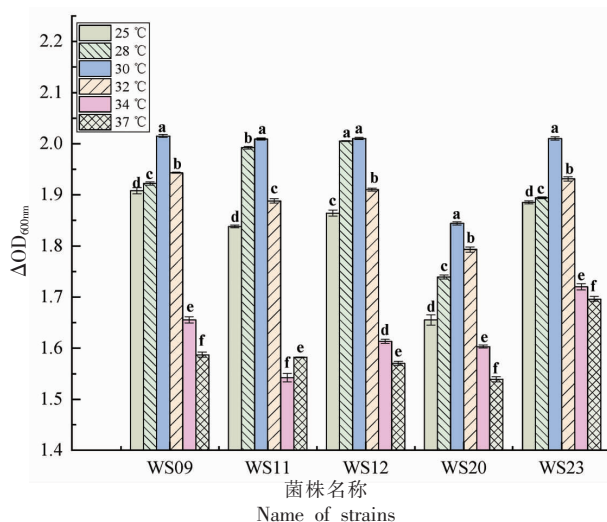
图 3 菌株的分子生物学鉴定

Fig.3 Molecular biological identification of strains

30,32,34,37 °C 的 6 个温度梯度,考察 5 株菌的生长情况,结果见图 4。可以看出,5 株菌在 30 °C 条件下培养的 ΔOD_{600nm} 值均最高,且显著高于其它温度下的 ΔOD 值 ($P < 0.01$),因此魏斯氏菌最适生长温度为 30 °C。同一菌株不同温度下的 ΔOD_{600nm} 值差异显著,其在较低温度 25 °C 和 28 °C 下的生长情况显著优于 34 °C 和 37 °C ($P < 0.05$),说明魏斯氏菌对温度敏感,同时发现其耐高温能力较差,适宜在较低温度条件下生长。

2.2.2 魏斯氏菌的耐盐特性 研究 5 株菌在不同盐浓度下的生长情况,结果见图 5。魏斯氏菌在盐质量浓度 ≤ 100 g/L 的 MRS 液体培养基中生长较好, $\Delta OD_{600nm} > 0.90$ 。其中,WS20 的生长情况优于其它菌株,在盐质量浓度为 100 g/L 的吸光度最高为 1.04;在盐质量浓度为 120 g/L 时,魏斯氏菌生长减弱, ΔOD_{600nm} 降至 0.40 左右;在盐质量浓度为 140~160 g/L 时 ΔOD_{600nm} 下降明显。分析原因是由于高盐稀态酱醪(盐质量浓度 160 g/L)中固形物含量远高于 MRS 液体培养基,对高渗条件下生长的魏斯氏菌等微生物具有保护作用,而采用 MRS 液体培养基研究菌种性能时,固形物含量降低,魏斯氏菌耐盐性能随之下降,在盐质量浓度为 140~160 g/L 的 MRS 液体培养基中,表现为生长微弱。

2.2.3 魏斯氏菌的生长曲线及其产酸特性 生长曲线反映菌株不同生长阶段的特征,为其扩培及应用奠定基础。魏斯氏菌是异型发酵的乳酸菌,在不同的盐质量浓度下,其产酸特性会发生变化。根据魏斯氏菌在不同盐质量浓度下 MRS 培养基中的生长状态,选择 5,80,100 g/L 3 个盐质量浓度



注:图中不同小写字母表示不同温度间具有显著差异 ($P < 0.05$)。

图 4 不同温度下 5 株魏斯氏菌的生长情况

Fig.4 Growth of 5 strains of *Weissella* spp. at different temperatures

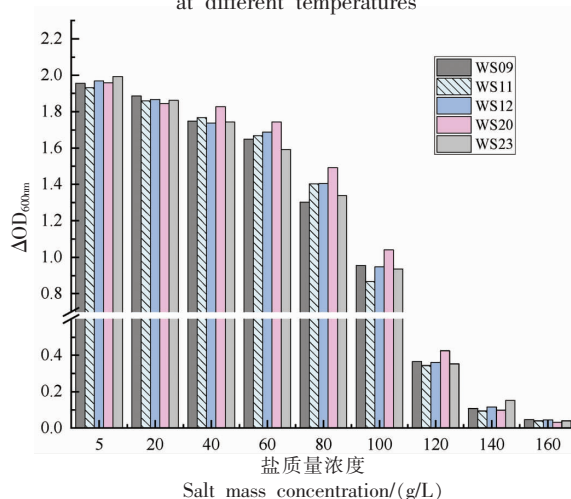


图 5 不同盐质量浓度下 5 株菌的生长情况

Fig.5 Growth of 5 strains of *Weissella* spp. at different salt mass concentrations

的 MRS 培养基培养 5 株魏斯氏菌,测定其生长曲线和总酸含量,结果见图 6。5 株魏斯氏菌在 3 个盐质量浓度下的生长曲线呈典型的 S 型, 由图 6 可观察到菌株生长的延滞期、对数期和稳定期。受

盐胁迫影响, 菌株活性随盐质量浓度的升高而下降, 其中 WS12 受盐胁迫影响最大, 在波长 600 nm 处的吸光度从 2.05 降至 0.69。进入对数期时间延后, 从 2~18 h 延长至 6~32 h。在盐质量浓度

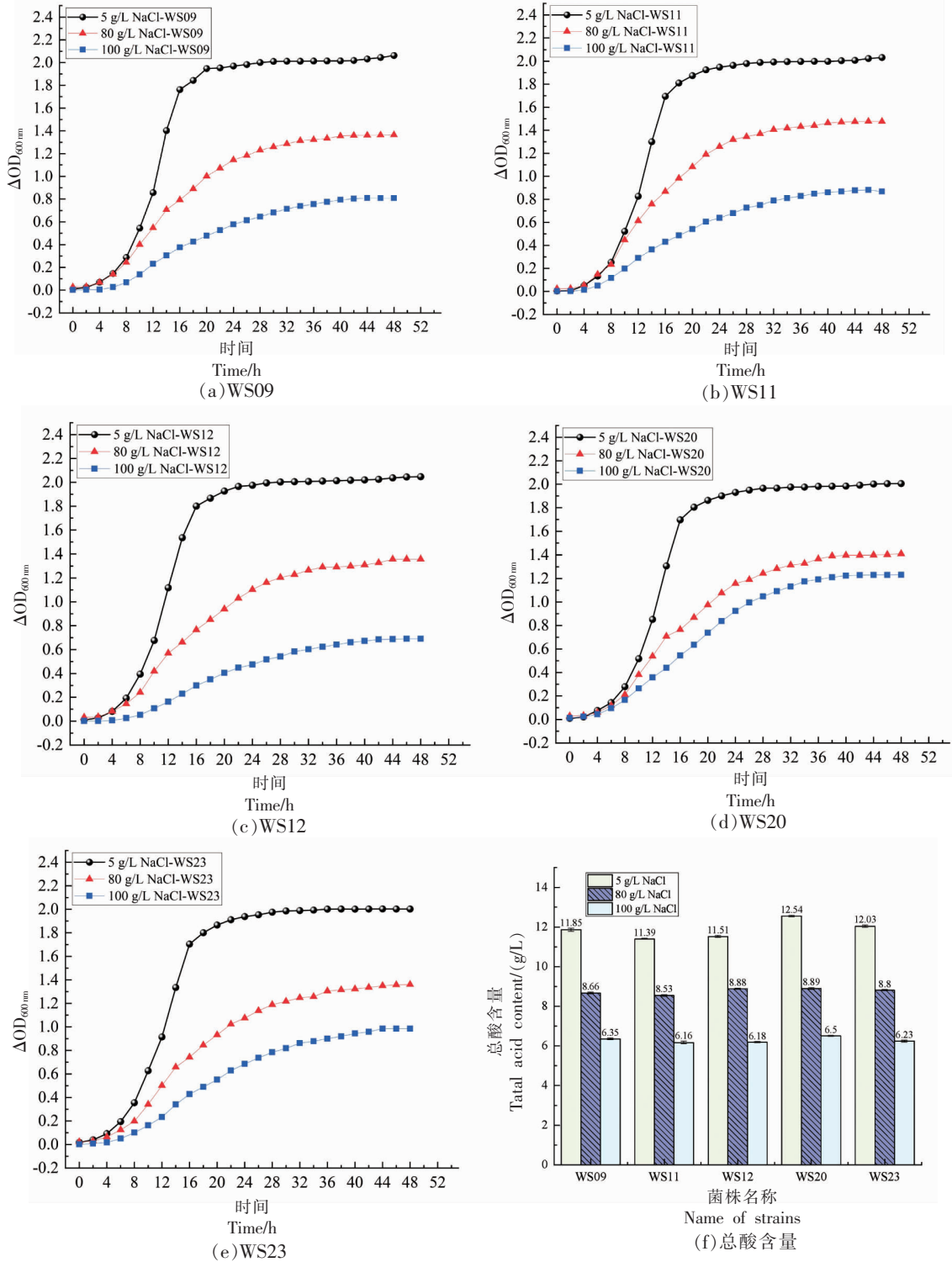


图 6 不同盐质量浓度下 5 株魏斯氏菌的生长曲线

Fig.6 Growth curves of 5 strains of *Weissella* spp. at different salt mass concentrations

为 100 g/L 时,两株食窦魏斯氏菌生长优于泰国魏斯氏菌,食窦魏斯氏菌 WS20 生长最好, ΔOD_{600nm} 值达到 1.23,是泰国魏斯氏菌 WS12 的 1.78 倍。

5 株菌在 3 个盐质量浓度下发酵产生的总酸含量变化与生长曲线相似,随着盐质量浓度的升高,菌株发酵产生的总酸含量减少。盐质量浓度从 5 g/L 升至 100 g/L,其产酸量减少 50%(见图 6f)。食窦魏斯氏菌(WS20、WS23)的产酸及耐盐能力普遍高于泰国魏斯氏菌(WS09、WS11、WS12),在盐质量浓度为 5 g/L 时,WS20 和 WS23 的总酸含量高于其它菌株,分别为(12.54±0.04),(12.03±0.06)g/L,在盐质量浓度 80 g/L 和 100 g/L 时,WS09、

WS20、WS23 的产酸量高于其它菌株,WS11 的产酸量最低仅(6.16±0.07)g/L。

2.2.4 魏斯氏菌的抑菌特性 菌株发酵液对指示菌的抑菌圈直径越大,表明酱醪发酵过程中魏斯氏菌对其抑制作用越强。5 株魏斯氏菌对大肠杆菌、蜡芽芽胞杆菌,从酱醪中分离的污染菌巨大芽胞杆菌、地衣芽胞杆菌 4 种指示菌均有抑制作用(表 3),抑菌圈直径从大到小依次为大肠杆菌、蜡芽芽胞杆菌、巨大芽胞杆菌、地衣芽胞杆菌。对比 5 株菌,食窦魏斯氏菌 WS20 对 4 种污染菌的总体抑菌效果最优,分别为(15.39±0.27),(13.34±0.14),(9.42±0.16),(16.51±0.14)mm。

表 3 5 株魏斯氏菌的抑菌试验结果(mm)

Table 3 Antibacterial test of 5 strains of *Weissella* spp.(mm)

菌株	大肠杆菌	巨大芽胞杆菌	地衣芽胞杆菌	蜡芽芽胞杆菌
WS09	14.15 ± 0.48	13.87 ± 0.53	8.71 ± 0.33	14.92 ± 0.53
WS11	14.30 ± 0.43	13.30 ± 0.59	8.78 ± 0.24	12.25 ± 0.17
WS12	15.33 ± 0.53	13.19 ± 0.25	7.97 ± 0.38	14.69 ± 0.35
WS20	15.39 ± 0.27	13.34 ± 0.14	9.42 ± 0.16	16.51 ± 0.14
WS23	15.78 ± 0.55	13.49 ± 0.22	8.25 ± 0.17	14.23 ± 0.24

2.2.5 魏斯氏菌的益生特性

2.2.5.1 耐酸特性 菌株耐酸存活率越高,在人体胃肠道消化系统中越能较好地发挥作用。魏斯氏菌在高酸性条件下(pH<3.8)存活率较低,5 株菌存活率均<10%(图 7a),说明魏斯氏菌对强酸环境的耐受能力差。在酸性条件下(3.8≤pH<5.0),菌株存活率随 pH 升高而逐渐增大,不同菌株之间的耐酸性存在显著性差异,其中 WS20 存活率最高可达到 42.40%,WS11 存活率最低仅为 20.94%,表明魏斯氏菌具有一定的耐酸能力。在弱酸性条件下(5.0≤pH<6.8),食窦魏斯氏菌的耐酸特性显著优于泰国魏斯氏菌($P<0.05$)。总体分析,不同菌株对酸的耐受力存在差异,与蹇宇等^[35]的研究结果一致,食窦魏斯氏菌 WS20 的耐酸性能力显著优于其它 4 株菌。

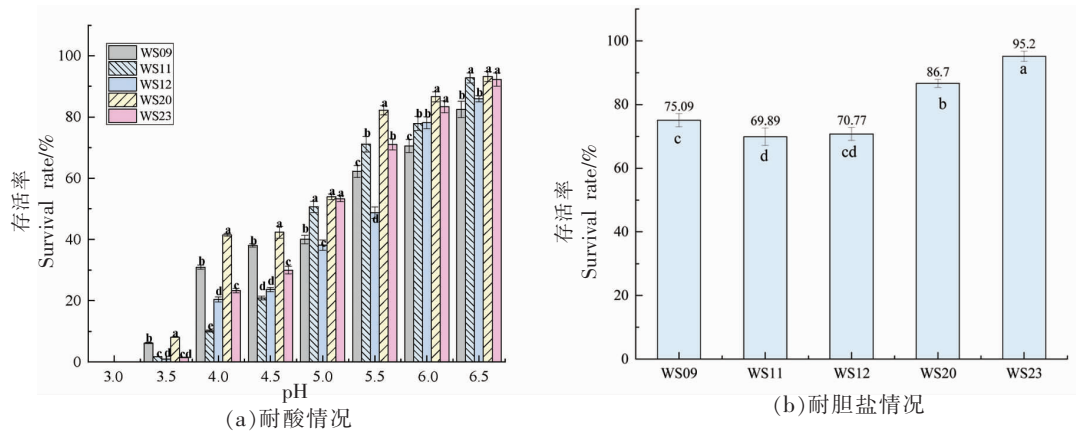
2.2.5.2 耐胆盐特性 魏斯氏菌要在人体肠道中定殖,必须具有一定的胆盐耐受性,适应人体肠道中的胆盐胁迫是益生菌发挥作用的重要前提^[36]。由图 7b 可知,5 株魏斯氏菌的存活率均>65%,具有耐胆盐能力;5 株菌中食窦魏斯氏菌的耐胆盐

能力显著性优于泰国魏斯氏菌($P<0.05$),WS20 和 WS23 两株食窦魏斯氏菌的存活率分别为 86.7%和 95.2%,均大于 85%,而泰国魏斯氏菌 WS11 对 0.3%胆盐的耐受性最低,存活率为 69.87%。

综上,食窦魏斯氏菌 WS20 的产酸、抑菌及益生特性均优于其它菌株,适合进一步在高盐稀态酱醪发酵中添加应用。

2.3 添加 WS20 对酱油发酵的影响

2.3.1 添加 WS20 对酱油理化指标的影响 还原糖、总酸、氨基酸态氮、可溶性无盐固形物是衡量酱油品质,确定其市场价值的 4 个重要的质量指标。酱油发酵过程中还原糖含量呈先升高后下降的趋势(图 8a),与何炯灵等^[37]的研究一致。发酵前期营养物质丰富,淀粉酶分解原料产生还原糖的速率大于微生物消耗还原糖的速率,还原糖含量呈升高的趋势,试验组和对照组均在发酵 20 d 达到峰值,分别为(79.97±0.87)g/L 和(75.28±0.72)g/L。随着原料中营养物质的消耗,微生物生长代谢消耗的还原糖速率高于淀粉酶生成速率,呈现下降趋势。试验组还原糖含量高于对照组,说明魏斯



注:图中不同小写字母表示不同组间差异显著(P<0.05)。

图7 5株魏斯氏菌的益生特性

Fig.7 The probiotic properties of 5 *Weissella* spp.

氏菌生长代谢过程中产生的有机酸、细菌素等物质可以抑制酱油中污染菌的生长,从而导致还原糖消耗速率减缓。

酱醪发酵过程中总酸呈现逐渐积累的趋势,发酵前30d营养物质丰富,食窦魏斯氏菌等产酸细菌代谢旺盛,总酸含量迅速增长,从(1.29±0.01)

g/L增至(10.27±0.08) g/L。发酵结束时,试验组总酸含量比对照组多1.29 g/L,提高11.71%,说明添加WS20促进酱醪中有机酸的产生。Liu等^[7]研究认为魏斯氏菌与酱油中总酸含量呈显著正相关,与本研究结果一致。

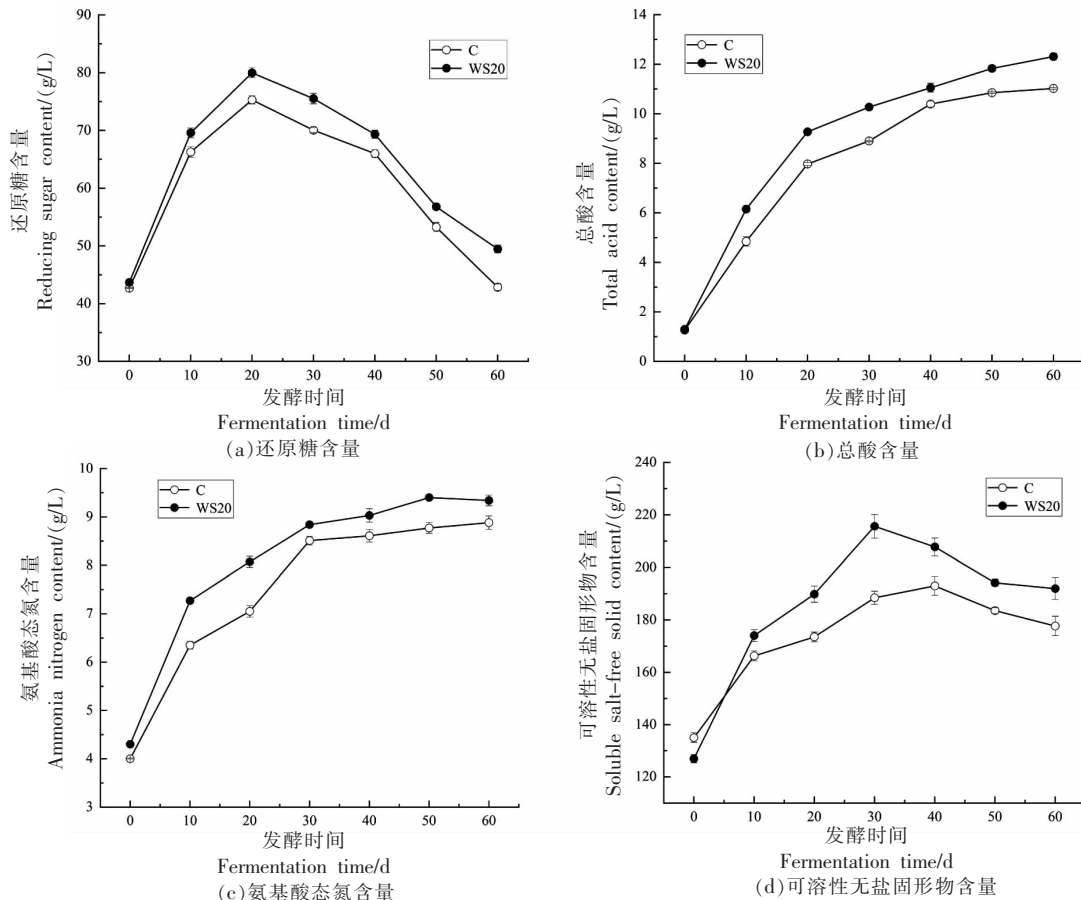


图8 酱醪发酵过程中理化指标的变化

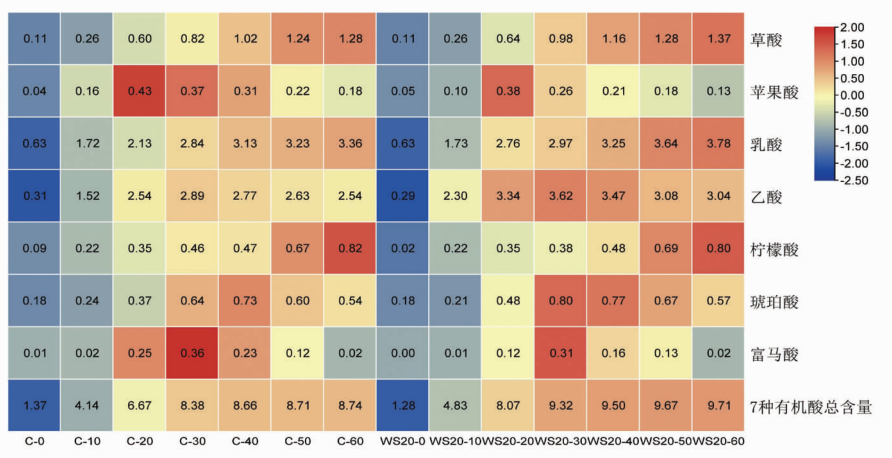
Fig.8 Changes of physicochemical indicators during the moromi fermentation of soy sauce

氨基酸态氮含量随着发酵的进行逐渐积累,细菌与真菌共同作用为氨基酸态氮提升发挥重要作用。添加 WS20 发酵的酱油氨基酸态氮含量始终高于对照组,说明添加魏斯氏菌可促进蛋白质的降解,有利于氨基酸态氮的积累。李巧玉^[38]研究发现食窦魏斯氏菌的二肽、三肽酶活高于短乳杆菌、嗜盐四联球菌等细菌,与本研究结果一致。前 30 d 试验组氨基酸态氮含量从(4.30±0.02)g/L 增至(8.84±0.05)g/L,60 d 试验组的氨基酸态氮含量显著高于对照组,提升 5.18%。

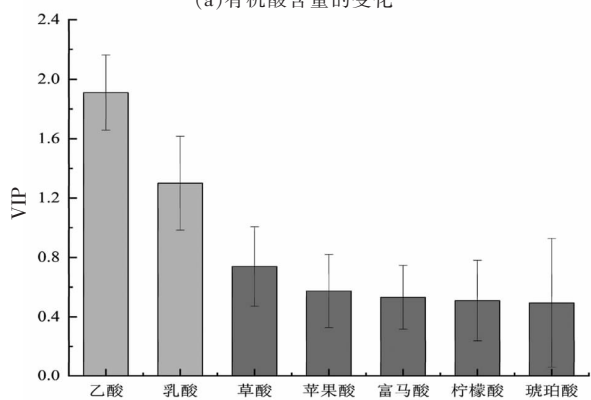
可溶性无盐固形物含量呈现先积累后消耗的趋势,发酵前 30 d 在蛋白酶和淀粉酶的共同作用下,酱油中可溶性小分子物质快速积累,试验组可溶性无盐固形物含量在 30 d 达到峰值 (215.60±4.51)g/L。由于酱醪中有机酸和可溶性无盐固形物的快速增长,pH 和自由水含量的下降,导致发酵 30 d 以后,米曲霉等微生物分泌的淀粉酶、蛋白酶

分解原料产生的可溶性小分子物质低于微生物消耗的物质,可溶性无盐固形物含量随之减少,而发酵 60 d 的试验组可溶性无盐固形物含量仍然比对照组高 14.26 g/L,提高了 8.03%。

2.3.2 添加 WS20 对酱油主要有机酸的影响 酱油酿造是多种复杂微生物共同作用的过程,微生物发酵糖产生乳酸、乙酸、草酸、柠檬酸、琥珀酸等有机酸,不仅为酱油提供独特的酸感滋味,还有利于形成酱油中的有机酸酯,增进酱油的香气。魏斯氏菌作为酱醪发酵过程中典型的异型乳酸发酵菌,除了能积累乳酸,还能积累乙酸等其它有机酸。为了研究食窦魏斯氏菌 WS20 对酱油中有机酸的影响,采用 HPLC 分析酱油酿造过程中的乳酸、乙酸、草酸、琥珀酸、富马酸、苹果酸、柠檬酸等 7 种常见有机酸含量的变化,结果见图 9a。酱油酿造过程中,试验组和对照组草酸、乳酸和柠檬酸含量均呈逐渐积累的趋势,苹果酸、乙酸、琥珀酸和



(a)有机酸含量的变化



(b)VIP 图

注:图 a 中标尺表示经标准化后的有机酸含量,图中数值为有机酸在不同时间下的质量浓度,其单位为 g/L。

图 9 酱油中有机酸分析

Fig.9 Analysis of organic acids in soy sauce

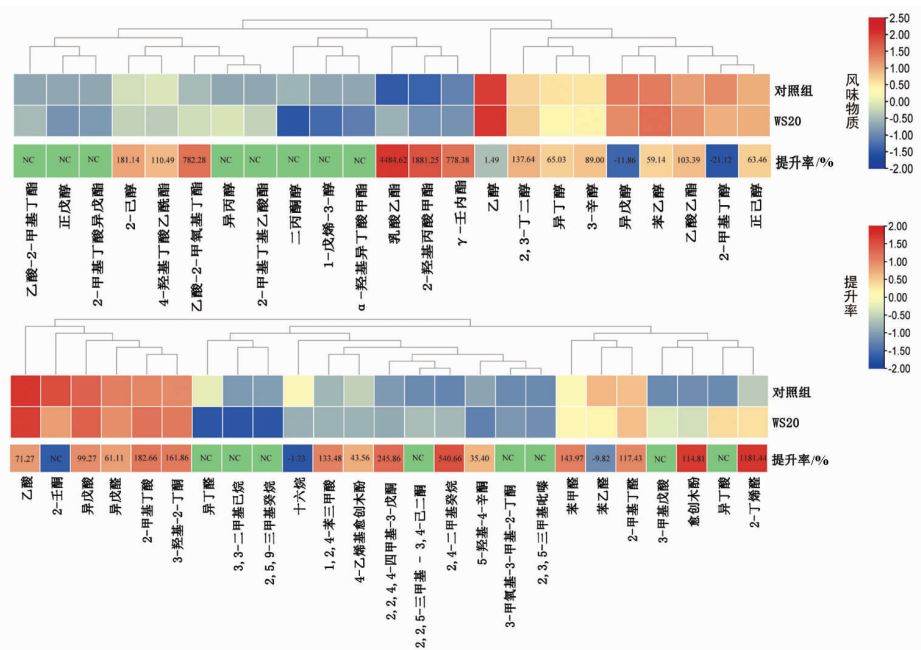
富马酸则均呈先积累后消耗的趋势,发酵 30 d 达到最高值。添加 WS20 发酵的酱油 60 d 时有机酸总含量为 9.71 g/L,相比对照组提升 11.10%,其中乳酸、乙酸是占比最高的两种有机酸,相比对照组分别提升 12.50%和 19.69%,试验组乳酸和乙酸含量在 7 种有机酸总含量中占比高达 70.24%。添加 WS20 发酵主要对酱油中乳酸、乙酸、草酸和琥珀酸含量有一定的提升,依次比对照组提高 12.50%, 19.69%, 7.03%和 5.56%。利用偏最小二乘法分析试验组和对照组的差异有机酸含量(图 9b),VIP 值越大,试验组与对照组的有机酸差异越显著,其中 VIP>1 的有机酸为乙酸和乳酸,说明添加魏斯氏菌与酱油中乳酸和乙酸含量呈正相关,与 Liu 等^[7]的研究结果相一致。可以说,食窦魏斯氏菌 WS20 促进酱醪中有机酸的积累。

2.3.3 添加 WS20 对酱油挥发性风味物质的影响

采用固相微萃气-质谱联用技术分析发酵酱醪样品中挥发性风味物质,结果见图 10。添加魏斯氏菌 WS20 试验组和对照组中共检出挥发性风味物质 48 种,其中醇类 13 种,酸类 6 种,酯类 10 种,醛类 6 种,酮类 6 种,酚类 2 种,其它 5 种。在添加 WS20 发酵的酱油中共检出 44 种挥发性风味物质,与对照组的 36 种物质相比,挥发性风味

物质丰度提高 22.22%,提高的风味物质主要分布在醇类、酸类、酯类和酮类中,其中酯类物质比对照组多 4 种。对照组和试验组的挥发性风味物质含量分别为(3 018.02±69.74), (4 192.64±94.06)μg/L,添加 WS20 让酱油风味物质含量提高 38.92%,其中醇类、酸类、酯类、醛类、酮类、酚类物质含量均有提高,分别提高 13.65%,106.85%,141.54%, 77.30%,14.21%,661.83%。

醇类、酸类、酯类是酱油酿造过程中重要的挥发性风味物质,而醇类和酸类是酯类物质合成的前体物。试验组苯乙醇和 2,3-丁二醇含量分别为(386.17±4.35)μg/L 和(84.03±1.15)μg/L,比对照组分别提升了 59.14%和 137.64%,赋予了酱油浓郁的花果香和麦芽香;而乙醇含量仅增长 1.49%,异戊醇、2-甲基丁醇含量也分别降低 11.86%和 21.12%,其主要原因是,这些醇与乙酸、乳酸、2-甲基丁酸等酸类物质,在微生物的作用下生成了乙酸乙酯、乳酸乙酯、2-甲基丁酸异戊酯、乙酸-2-甲基丁酯等酯类物质。由图 10 可知,以上 4 种酯类含量在添加 WS20 发酵的酱油中均有提升,分别为(236.22±7.81), (5.96±0.02), (3.83±0.09), (7.20±0.08)μg/L,其中乙酸乙酯和乳酸乙酯含量比对照组提升了 103.39%和 4 484.62%,而 2-甲基丁酸



注:绿色(NC)表示提升率无法计算。

图 10 挥发性风味物质热图

Fig.10 Heat map of volatile flavor compounds

异戊酯和乙酸-2-甲基丁酯则为试验组新增物质,具有浓郁的果香。试验组乙醇、异戊醇、2-甲基丁醇被消耗,而苯乙醇、2,3-丁二醇、异丁醇和 2-己醇等多种具有果香和麦芽香的醇类物质含量明显提升,弥补乙醇等物质减少引起香气损失,反而获得更丰富和愉悦的醇香。图 9a 显示,试验组乳酸、乙酸含量相比对照组有一定的提升,而挥发性风味物质中乳酸乙酯、乙酸乙酯含量相比对照组大幅提升,说明添加魏斯氏菌发酵酱油除促进有机酸的积累外,还促进相应的有机酸酯形成,既增加了酱油适口的酸感,又提升了酱油的香气。

2.3.4 食窦魏斯氏菌对酱油感官评分的影响 感官评分是评价酱油品质的重要指标,由图 11 可知,添加魏斯氏菌发酵酱油的色泽、体态、香气、滋味 4 个方面的感官评分均高于对照组,其中添加魏斯氏菌的酱油色泽提升 5.41%,颜色更为鲜亮,体态评分提升 5.22%,这主要是由于魏斯氏菌促进酱油可溶性无盐固形物的形成,可溶无盐固形物含量高的酱油体态更为黏稠,挂壁更持久。试验组发酵酱油香气提升 15.71%,醇香酯香更浓郁,与酱油挥发性风味物质的分析结果相一致。感官滋味提升 8.66%,其中酸味更加柔和适口,口感更为丰富,这主要是酱油中适口的有机酸积累所贡献。对感官评分进行分析,添加食窦魏斯氏菌发酵对酱油的体态、色泽、香气、滋味均有提升,可有效提升酱油风味和品质。

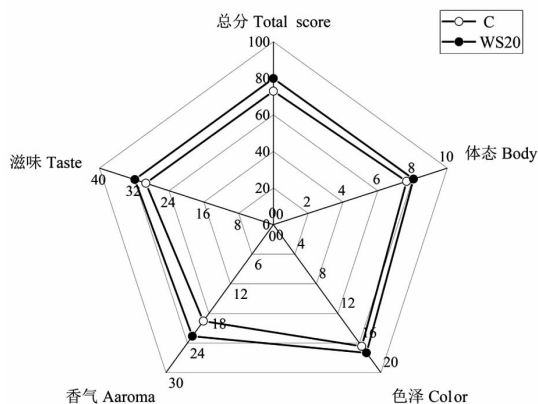


图 11 添加 WS20 发酵酱油感官评分

Fig.11 Sensory evaluation of fermented soy sauce added with WS20

3 结论

从发酵前期的高盐稀态酱醪中筛选获得 5 株高产酸魏斯氏菌,其中 WS09、WS11、WS12 为泰国魏斯氏菌 (*W. thailandensis*), WS20、WS23 为食窦魏斯氏菌 (*W. cibaria*)。对筛得 5 株菌的发酵性能进行研究,发现魏斯氏菌最适生长温度为 30℃,最高可耐受盐质量浓度为 100 g/L,对数生长期为 6~16 h,食窦魏斯氏菌 WS20 的产酸能力、耐盐生长能力、抑菌能力和益生能力均优于其它菌株。将 WS20 添加至高盐稀态酱醪中进行发酵,与对照组相比,添加 WS20 可以促进酱油中总酸、氨基酸态氮、可溶性无盐固形物的积累,提升酱油的滋味和体态。乳酸、乙酸、草酸和琥珀酸含量得到提升,分别提高 12.50%, 19.69%, 7.03% 和 5.56%。试验组挥发性风味物质种类比对照组多 8 种,含量达 $(4\ 211.64 \pm 94.06) \mu\text{g/L}$, 提升 38.92%, 醇类、酸类、酯类、醛类、酮类、酚类物质均有所提高,其中酱油酿造过程中重要的有机酸酯——乳酸乙酯、乙酸乙酯含量增加显著,分别提升 4 484.62%, 103.39%, 对酱油的香气有明显的增益效果。感官评分方面,添加食窦魏斯氏菌发酵酱油总分明显增加,其中香气、滋味提升显著,与挥发性风味物质及有机酸分析结果一致。综上,高盐稀态酱醪中筛得的食窦魏斯氏菌 WS20,能有效促进有机酸和挥发性风味物质的积累,可作为酱油酿造风味菌,具有提升酱油品质的潜力。

参 考 文 献

- [1] 王阿利, 王子谦, 魏梓晴, 等. 酱油酿造中微生物群落演替及其空间异质性研究[J]. 中国食品学报, 2022, 22(12): 257-266.
WANG A L, WANG Z Q, WEI Z Q, et al. Studies on succession and spatial heterogeneity of microbial community during the soy sauce fermentation process [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(12): 257-266.
- [2] ZHANG L, ZHOU R, CUI R, et al. Characterizing soy sauce moromi manufactured by high-salt dilute-state and low-salt solid-state fermentation using multiphase analyzing methods[J]. J Food Sci, 2016, 81(11): C2639-C2646.

- [3] 马辉明. 低盐固态酱油亦能与高盐稀醪酱油媲美质疑[J]. 中国调味品, 1998(2): 30-32.
MA H M. Low-salt solid soy sauce is also comparable to high-salt diluted-state moromi[J]. China Condiment, 1998(2): 30-32.
- [4] ZHENG J, WU C, HUANG J, et al. Analysis of volatile compounds in Chinese soy sauces moromi cultured by different fermentation processes[J]. Food Science and Biotechnology, 2013, 22(3): 605-612.
- [5] ZHAO G Z, LI J J, ZHENG F P, et al. The fermentation properties and microbial diversity of soy sauce fermented by germinated soybean[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2021, 101(7): 2920-2929.
- [6] 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. 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.
- [7] 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.
- [8] 续丹丹, 王文平, 张欣, 等. 一株耐盐产香鲁氏接合酵母 FA-1 的鉴定及其在酱油酿造中的应用[J]. 中国酿造, 2022, 41(12): 31-39.
XU D D, WANG W P, ZHANG X, et al. Identification of a salt-tolerant and aroma-producing *Zygosaccharomyces rouxii* FA-1 and its application in soy sauce fermentation[J]. China Brewing, 2022, 41(12): 31-39.
- [9] LIU B, LI Y, CAO Z N, 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(9): 102662.
- [10] 王靖雯, 赵谋明, 陈涛, 等. 高盐稀态酱醪中功能性酵母菌的筛选、鉴定及发酵特性[J]. 食品科学, 2021, 42(22): 91-97.
WANG J W, ZHAO M M, CHEN T, et al. Screening, identification and fermentation characteristics of functional yeasts from high-salt liquid-state moromi[J]. Food Science, 2021, 42(22): 91-97.
- [11] DEVANTHI P V P, GKATZIONIS K. Soy sauce fermentation: Microorganisms, aroma formation, and process modification[J]. Food Research International, 2019, 120: 364-374.
- [12] LI J, WANG B, CHEN J, et al. Heme dependent catalase conditionally contributes to oxygen tolerance of *Tetragenococcus halophilus* strains isolated from soy sauce moromi[J]. Applied Sciences, 2022, 12(16): 8039.
- [13] LIU X, BAI W, ZHAO W, et al. Correlation analysis of microbial communities and precursor substances of ethyl carbamate (EC) during soy sauce fermentation[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 152: 112288.
- [14] DONG H, CHEN J, HASTINGS A K, et al. Complete genome sequence and comparative analysis of *Staphylococcus condimentii* DSM 11674, a potential starter culture isolated from soy sauce moromi[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2017, 5: 56.
- [15] 曹月, 邓岳, 徐小芳, 等. 自然发酵酱油酱醪中产香芽孢杆菌的筛选及其产酶性能研究[J]. 中国测试, 2021, 47(8): 58-64.
CAO Y, DENG Y, XU X F, et al. Screening of flavor-producing *Bacillus* from naturally fermented soy sauce moromi and its enzyme production capacity [J]. China Measurement & Test, 2021, 47(8): 58-64.
- [16] MONIKA S, VIOLA S, MIROSLAVA M, et al. Characterization of *Staphylococcus xylosum* and *Staphylococcus carnosus* isolated from Slovak meat products[J]. Meat Science, 2006, 73(4): 559-564.
- [17] NING Y, FU Y, HOU L, et al. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of synergistic antibacterial mechanism of phenyllactic acid and lactic acid against *Bacillus cereus*[J]. Food Research International, 2021, 139: 109562.
- [18] 宋璐瑶, 王洁丽, 刘俊良, 等. 高盐稀态酱醪发酵过程中细菌群落结构演替的研究[C]//中国食品科学技术学会第十八届年会论文摘要集. 北京: 中国食品科学技术学会. 2022: 278-280.
SONG L Y, WANG J L, LIU J L, et al. Study on the structural succession of bacterial community during the fermentation of high-salt dilute-state moromi

- [C]//Abstracts of the 18th Annual Meeting of CIFST. Beijing: Chinese Society of Food Science and Technology, 2022: 278–280.
- [19] LEE Y J, LEE A, YOO H J, et al. Supplementation with the probiotic strain *Weissella cibaria* JW15 enhances natural killer cell activity in nondiabetic subjects[J]. *Journal of Functional Foods*, 2018, 48: 153–158.
- [20] SADIA A, SARGUN S, VAIDHVI S, et al. The *Weissella* genus: Clinically treatable bacteria with antimicrobial/probiotic effects on inflammation and cancer[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(12): 2427.
- [21] 靳志强, 王延祥, 李平兰, 等. 植物乳杆菌耐酸耐胆盐的体外试验及其降胆固醇作用[J]. *中国食品学报*, 2009, 9(5): 24–28.
- JIN Z Q, WANG Y X, LI P L, et al. Studies on the acid and bile salt resistant ability of *Lactobacillus plantarum* and its effect of cholesterol reducing *in vitro*[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2009, 9(5): 24–28.
- [22] 中华人民共和国国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. 食品中总酸的测定 GB 12456–2021[S]. 北京: 中国标准出版社, 2021: 3–5.
- National Health Commission of the People's Republic of China, State Administration of Market Supervision and Administration. Determination of total acid in food: GB 12456–2021[S]. Beijing: China Standards Press, 2021: 3–5.
- [23] 张刚. 乳酸细菌——基础, 技术和应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 46–48.
- ZHANG G. Lactic acid bacteria—basics, technology and applications[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2006: 46–48.
- [24] 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.
- [25] NIE Z, LI Y, LI L, et al. Characterization and transcriptomic analysis of *Streptococcus thermophilus* strain EU01 promoted by *Eucommia ulmoides* Oliv. extract[J]. *Scienceasia*, 2021, 47(1): 19–29.
- [26] VONGSATHORN N, ACHARAWAN T, NAPAPAN P, et al. Probiotic properties of exopolysaccharide-producing bacteria from Natto[J]. *International Journal of Food Science*, 2023, 2023: 3298723.
- [27] ZHAO L, ZHANG Y, LIU Y, et al. Assessing the safety and probiotic characteristics of *Lactocaseibacillus rhamnosus* X253 via complete genome and phenotype analysis[J]. *Microorganisms*, 2023, 11: 140.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] 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 effects on the quality of high-salt liquid-state fermented soy sauce [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2023, 49(1): 86–94.
- [32] 商婷婷, 张日俊. 乳酸乳球菌和魏斯氏菌的分离及鉴定[J]. *饲料工业*, 2013, 34(16): 31–34.
- SHANG T T, ZHANG R J. Isolation and identification of *Lactococcus lactis* and *Weissella* [J]. *Feed Industry*, 2013, 34(16): 31–34.
- [33] LEE J Y, SONG H S, PARK J H, et al. Isolation and identification of *Weissella kimchii* from green onion by cell protein pattern analysis[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2004, 14(1): 105–109.
- [34] 张广峰, 张楠笛, 赵婷婷, 等. 一株食蜜魏斯氏菌的分离鉴定及其质粒的序列分析[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(8): 100–105.
- ZHANG G F, ZHANG N D, ZHAO T T, et al. Isolation and identification of *Weissella cibaria* and

- sequence analysis of its plasmid[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(8): 100-105.
- [35] 蹇宇, 陈孝勇, 易若琨, 等. 环境胁迫下食窦魏斯氏菌的耐受性评价[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(24): 128-133.
- QIAN Y, CHEN X Y, YI R K, et al. Tolerability of *Weissella cibaria* under different environmental stresses[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(24): 128-133.
- [36] FAN S, XUE T, BAI B, et al. Probiotic properties including the antioxidant and hypoglycemic ability of lactic acid bacteria from fermented grains of Chinese Baijiu[J]. *Foods*, 2022, 11(21): 3476
- [37] 何炯灵, 张鉴平, 姜佳丽, 等. 盐水浓度对酱油发酵过程中理化指标的影响[J]. *中国酿造*, 2016, 35(4): 34-37.
- HE J L, ZHANG J P, JIANG J L, et al. Effects of brine concentration on physicochemical indexes during soy sauce fermentation[J]. *China Brewing*, 2016, 35(4): 34-37.
- [38] 李巧玉. 魏斯氏菌在酱油发酵过程的含量变化及特性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2018.
- LI Q Y. Detection of characteristics of *Weissella* strains and their contents in soy sauce moromi mash during soy sauce fermentation [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018.

Screening and Performance of *Weissella* spp. in High-Salt Liquid-State Moromi and Its Contribution to the Flavor of Soy Sauce

Song Luyao¹, Zhang Shaosen¹, Zhong Taiping¹, Gao Jiahui¹, Jiang Xuewei^{1,3*},
Tang Jianli^{1,3}, Song Chunxiang^{3,4}, Luo Xiaoming^{2,3*}

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

²School of Chemistry and Chemical Engineering, Changsha University of Science & Technology, Changsha 410114

³Hunan Provincial Engineering Technology Research Center for Condiment Fermentation, Changsha 410600

⁴Jijia Food Group Co. Ltd., Changsha 410600

Abstract In order to investigate the effects of the dominant genus *Weissella* on the flavor and quality of high-salt liquid-state soy sauce, five salt-tolerant acid-producing bacteria were isolated and screened from high-salt liquid-state moromi, and identified with 16S rDNA sequencing, morphology and physiological and biochemical tests. Strains WS09, WS11 and WS12 were identified as *Weissella thailandensis*, while strains WS20 and WS23 were identified as *Weissella cibaria*. The fermentation performance of the strains were investigated, and it was found that the optimal growth temperature of all five strains was 30 °C, and the strains grew well with a salt concentration of 100 g/L. Among them, the acid-producing capacity, salt-tolerant growth capacity, antibacterial capacity and probiotic properties of *Weissella cibaria* WS20 were optimal and could be used for soy sauce fermentation. It was added to the moromi and a 60-day fermentation study was conducted. The physicochemical indicators, organic acid content, the quantity and content of volatile flavor compounds of the soy sauce during fermentation were analyzed, and the sensory evaluation was performed. The fermentation of WS20 addition could promote the accumulation of total acid, ammonia-nitrogen and soluble salt-free solid in soy sauce, which were enhanced by 11.71%, 5.18% and 8.03%, respectively, compared with the control group. Lactic acid and acetic acid were the two organic acids that accounted for the highest percentage in the fermentation of soy sauce, both of which accounted for 70.24% of the total content of seven organic acids, which were 12.50% and 19.69% higher than the control group, respectively. The quantity of volatile flavor compounds was 8 more than the control group, with the content reaching (4 211.64±94.06) μg/L and an increase of 38.92%. The contents of ethyl lactate, ethyl acetate, phenylethanol and 2,3-butanediol were (5.96±0.02), (236.22±7.81), (386.17±4.35), (84.03±1.15) μg/L, which were increased by 4 484.62%, 103.39%, 59.14% and 137.64% compared with those of the control sample, respectively. The aroma, taste, color and body of soy sauce in the test group were better than the control group in sensory evaluation. The screening of *Weissella* spp. in moromi and its fermentation study in soy sauce laid the foundation for the application of *Weissella* spp. in soy sauce brewing, and enriched the resources of flavored strains for soy sauce brewing.

Keywords moromi *Weissella* spp.; screening; performance of the strain; soy sauce fermentation; organic acid; volatile flavor compound