



不同制曲工艺对速成永川豆豉后发酵过程和产品品质的影响

周旭^{1,2}, 曾涛^{1,2}, 王洪伟^{1,2}, 梁明^{1,2}, 张玉^{1,2}, 王晨^{1,2}, 索化夷^{1,2*}

1 西南大学食品科学学院, 重庆 400715

2 重庆市农产品加工科技创新平台, 重庆 400715

周旭, 曾涛, 王洪伟, 梁明, 张玉, 王晨, 索化夷. 不同制曲工艺对速成永川豆豉后发酵过程和产品品质的影响[J]. 微生物学报, 2023, 63(6): 2385-2400.

ZHOU Xu, ZENG Tao, WANG Hongwei, LIANG Ming, ZHANG Yu, WANG Chen, SUO Huayi. Effect of different koji-making processes on the post-fermentation process and product quality of rapid Yongchuan Douchi[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(6): 2385-2400.

摘要: 【目的】传统永川豆豉和速成永川豆豉生产工艺不同, 在风味品质上有着显著的差异。【方法】为明确制曲工艺对豆豉品质的影响, 本研究比较了传统自然制曲和米曲霉(*Aspergillus oryzae*)制曲永川豆豉在速成工艺下的理化特性及微生物群落差异。【结果】自然制曲速成永川豆豉氨基酸态氮含量和色泽显著高于米曲霉制曲速成永川豆豉($P < 0.05$), 但还原糖含量显著低于米曲霉制曲速成永川豆豉($P < 0.05$), 2种制曲速成永川豆豉可滴定酸度含量无显著性差异($P > 0.05$)。微生物分析表明, 自然制曲速成永川豆豉微生物丰富度及多样性显著高于米曲霉制曲速成永川豆豉($P < 0.05$)。自然制曲速成永川豆豉的优势菌属为毛霉菌属(*Mucor*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、维克霉属(*Wickerhamomyces*)和青霉属(*Penicillium*)等。米曲霉制曲速成永川豆豉的优势菌属为芽孢杆菌属、棒状杆菌属(*Corynebacterium*)、曲霉属(*Aspergillus*)和念珠菌属(*Candida*)等。此外, 2种制曲速成永川豆豉均有少量的德巴利氏酵母属(*Debaryomyces*)参与。【结论】不同制曲工艺对速成永川豆豉的理化特性和微生物群结构有显著影响, 自然制曲速成永川豆豉的关键

资助项目: 调味品产业技术体系创新团队(2021[6]); 重庆市科技特派员团队项目(cstc2021jscx-tpyzxX0009); 重庆市高校创新研究群体项目(CXQT21007)

This work was supported by the Innovative Team of Condiment Industry Technology System (2021[6]), the Chongqing Science and Technology Commissioner Team Project (cstc2021jscx-tpyzxX0009), and the Chongqing University Innovation Research Group Project (CXQT21007).

*Corresponding author. Tel: +86-23-68251298, E-mail: birget@swu.edu.cn

Received: 2022-09-09; Accepted: 2023-02-07; Published online: 2023-02-13

理化指标显著优于米曲霉制曲速成永川豆豉。

关键词：不同制曲工艺；速成永川豆豉；理化特性；微生物群落

Effect of different koji-making processes on the post-fermentation process and product quality of rapid Yongchuan Douchi

ZHOU Xu^{1,2}, ZENG Tao^{1,2}, WANG Hongwei^{1,2}, LIANG Ming^{1,2}, ZHANG Yu^{1,2},
WANG Chen^{1,2}, SUO Huayi^{1,2*}

1 College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China

2 Chongqing Agricultural Product Processing Technology Innovation Platform, Chongqing 400715, China

Abstract: [Objective] Due to the difference in production process, conventional Yongchuan Douchi (fermented soybean product) and rapid Yongchuan Douchi are remarkably different in flavor quality. We explored the effect of koji-making process on the quality of Douchi. [Methods] Yongchuan Douchi was prepared with the rapid process but different koji-making methods (conventional natural process and artificial inoculation of *Aspergillus oryzae*, respectively). Then we compared the physicochemical properties and microbial community of the products. [Results] The Douchi prepared with the natural koji-making process had higher content of amino acid nitrogen and darker color ($P < 0.05$), lower content of reducing sugar ($P < 0.05$), and higher microbial richness and diversity ($P < 0.05$) than the product prepared with the artificial inoculation of *A. oryzae*. The two products showed no significant difference in the titratable acid content ($P > 0.05$). The dominant bacterial genera of the Douchi prepared with the natural koji-making process were *Mucor*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Wickerhamomyces*, *Penicillium*, and those of the Douchi prepared with the artificial inoculation of *A. oryzae* were *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Aspergillus*, and *Candida*. In addition, a small number of *Debaryomyces* sp. was found on both of the two products. [Conclusion] The koji-making process had significant influence on the physicochemical properties and microbial community structure of rapid Yongchuan Douchi. The key physicochemical indexes of Douchi prepared with the natural koji-making process were significantly better than those of the Douchi prepared with artificial inoculation of *A. oryzae*.

Keywords: different koji-making processes; rapid Yongchuan Douchi; physicochemical properties; microbial community

豆豉是一种起源于中国的传统发酵食品，与酱油、腐乳、豆瓣酱一起被称为四大传统发酵豆制品^[1]，至今已有 3 000 多年的历史^[2]。根

据制曲过程中存在的微生物种类不同，豆豉可分为曲霉型豆豉(如浏阳豆豉、阳江豆豉)、毛霉型豆豉(如永川豆豉、潼川豆豉)、根霉型豆豉(如

印度豆豉)、细菌型豆豉(如八宝豆豉和日本纳豆)和脉孢菌型豆豉(印度尼西亚“昂巧”豆豉) 5 种^[3]。传统发酵永川豆豉是毛霉型豆豉的典型代表,起源于明朝崇祯十七年(1644 年)的家庭作坊,至今已有近 400 年历史^[4]。

目前,永川豆豉根据制曲工艺的不同分为传统发酵永川豆豉和速成永川豆豉。传统永川豆豉采用开放式自然制曲,主要优势菌种为总状毛霉(*Mucor racemosus*),生产出的豆豉色泽黝黑、质地柔软、味美化渣、香气浓郁持久,深受众人喜爱^[5]。但由于毛霉生长温度低(5–18 °C),对制曲环境和温度有特殊要求,每年仅在 11 月至次年 2 月生产。传统永川豆豉采用常温长时后发酵,时间长达 8–10 个月,存在生产季节短、生产周期长等问题,严重阻碍了豆豉的工业化生产。2000 年左右推广应用了速成豆豉生产技术,速成永川豆豉采用人工接种米曲霉,低盐高温后发酵,生产周期仅为 30 d 左右,且可实现全年生产,解决了传统永川豆豉生产季节短、生产周期长的问题,成为目前永川豆豉的主要生产方式^[6]。传统永川豆豉的豉香强度和挥发性风味成分种类均高于速成永川豆豉,其主要挥发性物质是酯类、醛类和醇类,而速成永川则以醛类、杂环类和酸类化合物为主^[7-8]。随着市场

需求变化,速成永川豆豉虽然解决了传统永川豆豉工艺生产周期长、厂房利用率低的问题,但其风味品质远低于传统永川豆豉,已不能满足目前消费者对高品质豆豉的需求。如何提高速成豆豉风味的品质是永川豆豉产业发展的关键问题。

永川豆豉生产工艺对永川豆豉风味品质有关键的影响。传统永川豆豉和速成永川豆豉制曲工艺和微生物区系有较大差异。为明确制曲工艺对速成永川豆豉产品品质的影响,本研究分别采用传统自然制曲和米曲霉制曲,在速成工艺下进行后发酵,测定后发酵过程中 2 种速成永川豆豉的理化指标,同时利用高通量测序技术分析后发酵过程中菌群组成的变化,探索 2 种速成永川豆豉产品品质存在差异的原因。以为优化永川豆豉生产工艺,改善豆豉的品质提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 样品制备和试剂

自然制曲速成永川豆豉和米曲霉制曲速成永川豆豉均采自重庆永川豆豉有限公司,生产流程如图 1 所示。分别在后发酵第 3、7、10、15、20、30 天取样进行理化指标测定,取样时

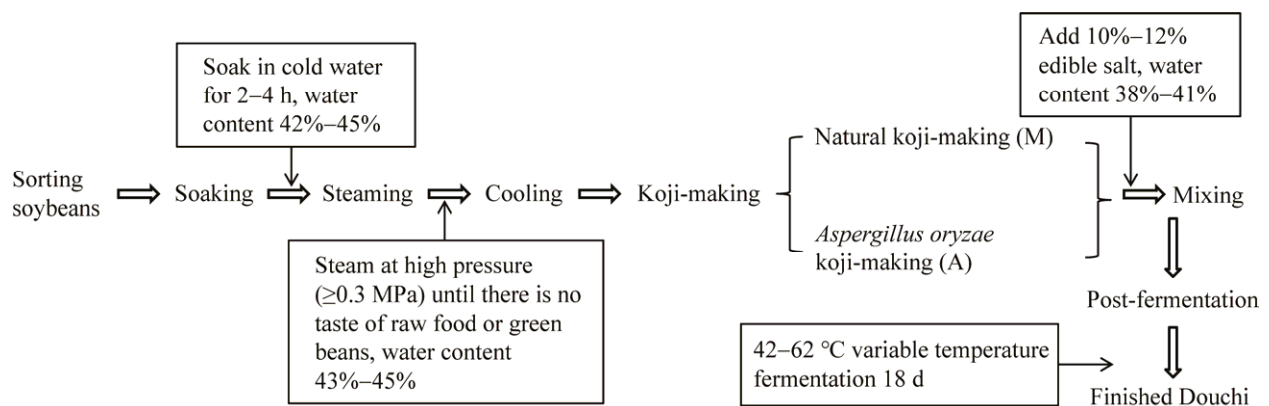


图 1 速成永川豆豉生产流程图

Figure 1 Flowchart of rapid Yongchuan Douchi production.

间点和编号如表 1 所示, 其中“M”代表自然制曲速成永川豆豉, “A”代表米曲霉制曲速成永川豆豉。

试剂: 葡萄糖、酚酞、氢氧化钠、七水硫酸钴、3,5-二硝基水杨酸、硫酸钾、无水乙醇均为分析纯。

1.2 主要仪器设备

色差仪 UltraScan PRO, HunterLab 公司; JYL-A110 食品粉碎机, 九阳股份有限公司; 数显恒温水浴锅, 常州奥华仪器有限公司; 精密万分电子分析天平(FA2004A), 上海舜宇恒平科学仪器有限公司; 美的多功能电磁炉(C21-RH2145), 浙江绍兴苏泊尔生活电器有限公司。

1.3 可滴定酸度的测定

按照 Castro 等^[9]的方法测定可滴定酸度。

1.4 氨基酸态氮的测定

采用 GB 5009.235—2016《食品安全国家标准 食品中氨基酸态氮的测定》中酸度计法进行测定。

1.5 还原糖的测定

采用 GB 5009.7—2016《食品安全国家标准 食品中还原糖的测定》中吸光值法进行测定。

表 1 自然制曲和米曲霉制曲速成永川豆豉后发酵取样时间点及其对应编号

Table 1 Natural koji-making and *Aspergillus oryzae* koji-making rapid Yongchuan Douchi post-fermentation sampling time points and their corresponding numbers

No.	Post-fermentation time (d)
M(A)-3	3
M(A)-7	7
M(A)-10	10
M(A)-15	15
M(A)-20	20
M(A)-30	30

M: Natural koji-making rapid Yongchuan Douchi; A: *Aspergillus oryzae* koji-making rapid Yongchuan Douchi.

1.6 色泽的测定

将样品用研钵磨碎, 混合均匀后按压平整。使用标准色板(白板和黑板)对色差仪进行校正, 将样品放置在色差仪检测口上, 设置用反射模式进行测定。记录各个样品的 L*(亮度)、a*(红绿色)、b*(黄蓝色)。每个样品测定 5 个以上不同位置, 以黄豆的色差值为初色差值计算色差变化, 按照公式(1)计算^[10]。

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta b)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta L)^2} \quad (1)$$

式中: ΔE 为总色差; $\Delta L = L^* - L_0$, $\Delta a = a^* - a_0$, $\Delta b = b^* - b_0$, L^* 、 a^* 、 b^* 为豆豉样品亮度、红绿色和黄蓝色值, L_0 、 a_0 、 b_0 为黄豆的亮度、红绿色和黄蓝色值。

1.7 细菌和真菌多样性分析

按照 OMEGA Soil Kit 试剂盒说明书提取不同时间点不同类型的豆豉样本的 DNA。PCR 扩增为 B 级以上(扩增产物电泳目的条带大小正确)的进行上机分析, 委托上海美吉生物公司采用 Illumina MiSeq 进行测序。

1.8 数据分析

实验结果以平均值±标准偏差表示, 采用 GraphPad Prism 7 绘图, SPSS 2.0 统计软件进行单因素方差分析(one way analysis of variance, one way ANOVA)判断, 多重比较采用 Tukey 法, $P < 0.05$ 表示具有显著性差异。菌群多样性数据以及相关分析均在美吉生物有限公司的 I-Sanger 生信云平台上进行分析处理(<https://www.i-sanger.com/index/about.html>)。

2 结果与分析

2.1 豆豉后发酵过程中可滴定酸度含量变化

可滴定酸度含量不仅影响豆豉的滋味形成, 而且影响微生物的生长和发酵。豆豉后发酵过程中可滴定酸度含量的变化如图 2a 所示。2 种类型速成永川豆豉的可滴定酸度在 30 d 内

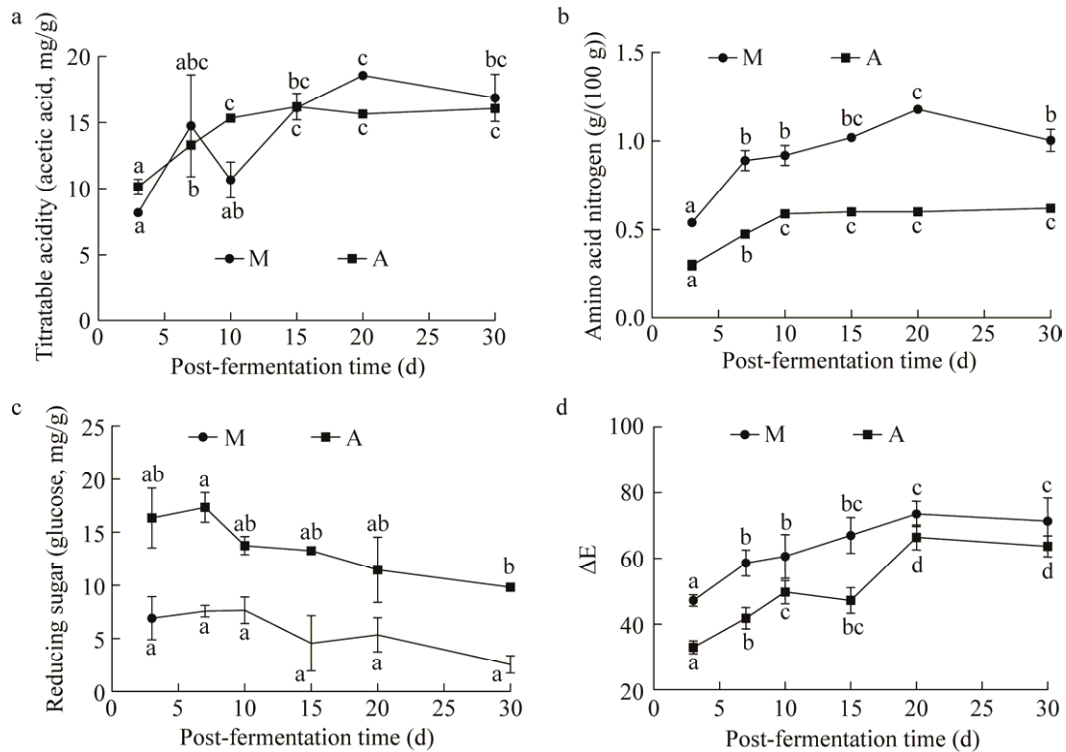


图 2 不同制曲工艺对速成永川豆豉理化指标的影响

Figure 2 Effects of different koji making techniques on physical and chemical indexes of rapid Yongchuan Douchi. a: Changes in titratable acidity concentration. b: Changes in amino acid nitrogen concentration. c: Changes in reducing sugar concentration. d: Color change. Different letters indicate significant differences at the level of $P < 0.05$, the same below.

整体呈上升趋势。米曲霉制曲速成永川豆豉和自然制曲速成永川豆豉的可滴定酸度分别在前 10 d 和前 15 d 内呈现逐步上升的趋势, 之后趋于稳定。这是由于在后发酵初期, 魏氏菌属 (*Weinella*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、明串珠菌属 (*Leuconostoc*) 和乳酸菌属 (*Lactobacillus*) 等耐盐厌氧菌的相对丰度较高, 这些菌株生长代谢产生大量有机酸, 使得可滴定酸度含量显著性上升 ($P < 0.05$)。随着后发酵的进行, 有机酸的含量不断积累, 乳酸菌等耐盐厌氧菌的生长受到抑制, 相对丰度降低, 产酸能力下降, 酸度不再增加。2 种速成永川豆豉的可滴定酸度含量在第 15–30 天趋于稳定。后发酵结束时, 自然制曲速成永川豆豉的可滴定酸度含量为

(16.87 ± 1.27) mg/g, 高于米曲霉制曲速成永川豆豉的 (16.08 ± 0.09) mg/g, 但无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.2 豆豉后发酵过程中氨基酸态氮含量变化

氨基酸态氮含量水平是衡量豆豉风味和营养价值高低的重要指标, 也是豆豉后发酵成熟的主要标志^[11]。氨基酸态氮的变化趋势如图 2b, 在后发酵过程中, 2 种速成永川豆豉的氨基酸态氮含量先上升, 之后趋于稳定。这是因为在后发酵初期, 微生物相对丰度较高, 能分泌大量酶, 且后发酵初期代谢产生的有机酸含量较低, 对酶活性抑制较少。随着后发酵的进行, 产生的有机酸含量增加 (图 2a), 酶活性受到抑制^[12], 导致氨基酸态氮的生成速率降低, 其含量不再增加。在整个后发酵过程中, 自然制曲速成永

川豆豉的氨基酸态氮含量显著高于米曲霉制曲速成永川豆豉($P<0.05$), 在第 20 天时, 自然制曲速成永川豆豉的氨基酸态氮浓度最高, 达到 (1.18 ± 0.01) g/100 g。

2.3 豆豉后发酵过程中还原糖含量变化

还原糖是微生物生长代谢的必需碳源, 在后发酵初期由于糖化酶活性高, 还原糖的生成量略高于消耗量, 所以还原糖含量在后发酵初期略上升, 如图 2c 所示。随着后发酵进行, 还原糖的生成量低于消耗量, 还原糖被微生物利用而逐渐下降, 但 2 种速成永川豆豉后发酵过程中还原糖含量变化不显著($P>0.05$)。根据制曲工艺的不同, 可以看出米曲霉制曲速成永川豆豉可以获得更高的还原糖含量, 这是因为米曲霉是米曲霉制曲速成永川豆豉后发酵过程中的优势菌属, 最高丰度可达 96.86%。后发酵结束后, 米曲霉制曲速成永川豆豉还原糖含量显著高于自然制曲速成永川豆豉($P<0.05$)。

2.4 豆豉后发酵过程中色泽变化

颜色是发酵食品质量相关的参数之一, 一

般以颜色的变化作为判断后发酵是否完成的基准^[13]。后发酵初期自然制曲速成永川豆豉可以获得更深的色泽, 如图 2d 所示。随着后发酵的进行, 2 种速成永川豆豉的颜色逐渐加深, 自然制曲速成永川豆豉和米曲霉制曲速成永川豆豉分别第 15 天和第 20 天后颜色无显著性变化($P>0.05$)。色泽结果表明, 米曲霉制曲速成永川豆豉比自然制曲速成永川豆豉变色速度快。随着后发酵的推进, 米曲霉制曲速成永川豆豉色泽慢慢趋近自然制曲速成永川豆豉, 但是成品豆豉依旧是自然制曲速成永川豆豉色泽更深($P<0.05$)。自然制曲速成永川豆豉拥有比米曲霉制曲速成永川豆豉更“黝黑”的特征, 说明制曲工艺对豆豉成色的影响极为关键。自然制曲速成永川豆豉色泽变化主要集中在制曲阶段, 而米曲霉制曲速成永川豆豉则在后发酵阶段。

2.5 两种速成永川豆豉后发酵微生物群落结构多样性比较

图 3 显示了 α 多样性分析, Ace 指数和 Chao 指数用于评价微生物群落结构的丰富度, Shannon

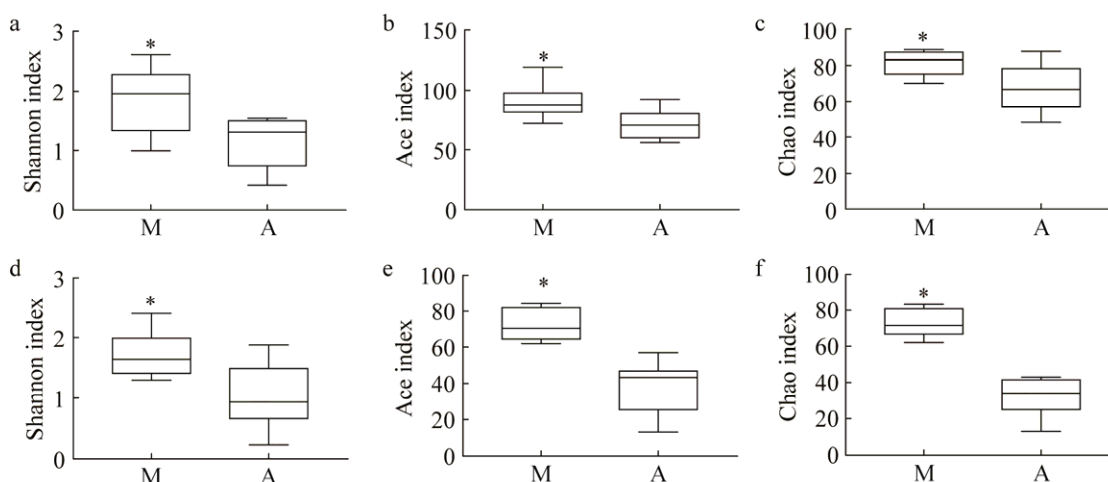


图 3 两种速成永川豆豉微生物群落结构多样性比较

Figure 3 Comparison of diversity of microbial community structure of two types of rapid Yongchuan Douchi. a: Bacterial Shannon index. b: Bacterial Ace index. c: Bacterial Chao index. d: Fungal Shannon index. e: Fungal Ace index. f: Fungal Chao index. *: $P < 0.05$.

指数用于评价微生物群落结构的多样性^[14]。 α 多样性分析可知,无论是在细菌群落水平上还是真菌群落水平上,自然制曲速成永川豆豉比米曲霉制曲速成永川豆豉丰富度更大,多样性更高。结果表明,自然制曲对豆豉微生物多样性和丰富度具有积极作用。

主成分分析(principal component analysis, PCA)显示采用不同制曲工艺,豆豉微生物组成具有明显的聚类性。在操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)水平上,每个组的微生物群落组成分类不同(图 4A–4B),同一组中的样本

聚在一起。细菌水平上 PC1 轴和 PC2 轴对结果的解释度分别为 80.34%和 12.29%;真菌水平上 PC1 轴和 PC2 轴对结果的解释度分别为 69.75%和 18.81%。此外,偏最小二乘法判别分析(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)结果表明,自然制曲速成永川豆豉与米曲霉制曲速成永川豆豉明显区分并聚成 2 个类群,说明自然制曲速成永川豆豉与米曲霉制曲速成永川豆豉菌群组成具有显著差异。另外,通过 PLS-DA 分析中的样本点分布的离散情况也可以看出,后发酵不同时间点菌群组成具有差异(图 4C–4D)。

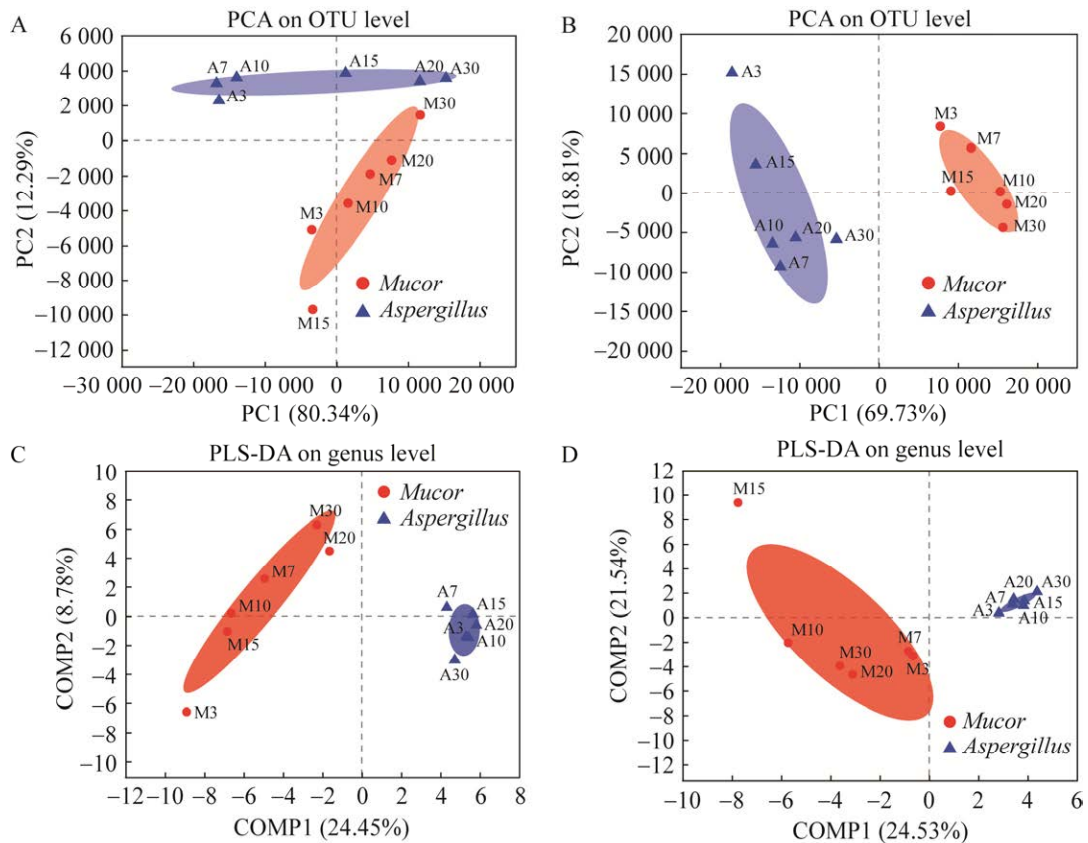


图 4 两种速成永川豆豉后发酵期间微生物组成的 β 多样性 PCA 和 PLS-DA 微生物群落评分分析

Figure 4 Analysis of beta diversity PCA and PLS-DA microbial community scores of microbial composition during post-fermentation of two types of rapid Yongchuan Douchi. A: Beta diversity PCA of microbial composition at the bacterial level during post-fermentation. B: Beta diversity PCA of microbial composition at the fungal level during post-fermentation. C: PLS-DA microbial community score map at the bacterial level during post-fermentation. D: PLS-DA microbial community score map at the fungal level during post-fermentation.

2.6 两种速成永川豆豉后发酵过程微生物群落动态变化

在细菌水平上(图 5A), 自然制曲速成永川豆豉在后发酵初期主要由芽孢杆菌属、假单胞菌属、肠杆菌属、肠球菌属、葡萄球菌属占据主导地位, 其丰度分别为 26.19%、11.83%、9.23%、7.83%和 7.57%。随着后发酵的进行, 肠杆菌属和假单胞菌属丰度先下降再上升, 肠杆菌属第 20 天最大丰度为 12.75%, 假单胞菌属第 15 天最大丰度为 40.43%。后发酵后期以芽孢杆菌属为主, 最大丰度值达到 80.21%。其次是假单胞菌属, 丰度为 5.10%。米曲霉制曲速成永川豆豉在后发酵初期主要由魏斯氏菌属、棒状杆菌属和葡萄球菌属占据主导地位, 丰度分别为 38.35%、15.62%和 33.99%。随着后发酵的进行, 葡萄球菌属和魏斯氏菌属丰度逐渐下降, 棒状杆菌属丰度先上升后逐渐下降, 第 10 天时最高丰度值为 43.80%。后发酵后期主要由芽孢杆菌属绝对主导, 其丰度值高达 93.56%, 芽孢杆菌属是米曲霉制曲速成永川豆豉后发酵后期占据绝对优势的菌株, 其次是棒状杆菌属。米曲霉速成永川豆豉细菌菌群结构和阳江米曲霉型豆豉的后发酵细菌菌群结构具有一定相似性^[15]。从细菌菌群丰度变化可知, 2 种速成永川豆豉后发酵初期产酸乳酸菌种类较多, 丰度较高。但随着后发酵的进行, 有机酸的不断积累, 其丰度逐渐降低。自然制曲速成永川豆豉中魏氏菌属、葡萄球菌属、肠球菌属、明串珠菌属和肠杆菌属等的相对丰度分别从 6.27%、7.57%、7.83%、4.91%和 3.72%下降到 0.56%、1.19%、0.74%、1.52%和 0.52%。米曲霉制曲速成永川豆豉中魏氏菌属、葡萄球菌属和乳酸菌属等的相对丰度分别从 38.35%、33.99%和 4.39%下降到 0.38%、0.60%和 0.10%。这也解释了为什么后发酵后期 2 种速成永川豆

豉的可滴定酸度趋于稳定, 不再增加。

在真菌水平上(图 5B), 自然制曲速成永川豆豉在后发酵前期主要由青霉属、曲霉属、毛霉菌属和维克霉属(*Wickerhamomyces*)占据主导地位, 丰度分别为 57.39%、30.23%、4.80%和 3.93%。随着后发酵的进行, 曲霉属和青霉属丰度值逐渐下降, 曲霉属丰度下降到 2.16%, 青霉属丰度下降到 25.71%。维克霉属和德巴利酵母属(*Debaryomyces*)丰度值逐渐上升, 第 30 天最大丰度分别上升到 54.51%和 9.20%。后发酵后期主要由维克霉属和青霉属占据主导地位, 其丰度值分别为 54.51%和 25.71%。米曲霉制曲速成永川豆豉在后发酵过程主要由曲霉属和念珠菌属占据绝对主导地位, 曲霉属和念珠菌属最大丰度值分别可达 96.85%和 53.29%。后发酵后期青霉属丰度开始逐渐升高, 第 30 天时最高丰度值达到 12.94%。米曲霉制曲速成永川豆豉后发酵过程中也有少量的德巴利酵母属参与。因此, 曲霉属是曲霉型豆豉后发酵过程中占绝对优势的真菌菌株, 其次是念珠菌属(*Candida*)。

2.7 两种速成永川豆豉微生物群差异性分析

采用组间差异检验分析不同制曲工艺条件下速成永川豆豉后发酵过程中细菌和真菌群落丰度的变化。分析结果显示, 在后发酵的初始和最后阶段, 2 种速成永川豆豉之间的细菌和真菌群落存在显著差异(图 6)。在后发酵初期, 自然制曲速成永川豆豉中的细菌比例比米曲霉制曲速成永川速成豆豉中的细菌比例分布更为显著。米曲霉制曲速成永川豆豉中魏氏菌属、葡萄球菌属、棒状杆菌-1 (*Corynebacterium_1*)、片球菌属、乳酸菌属的比例显著高于自然制曲速成永川豆豉($P<0.001$) (图 6A), 而其他群落显著低于自然制曲速成永川豆豉($P<0.001$) (图 6A)。就真菌而言, 具有显著差异的属中, 米曲霉制

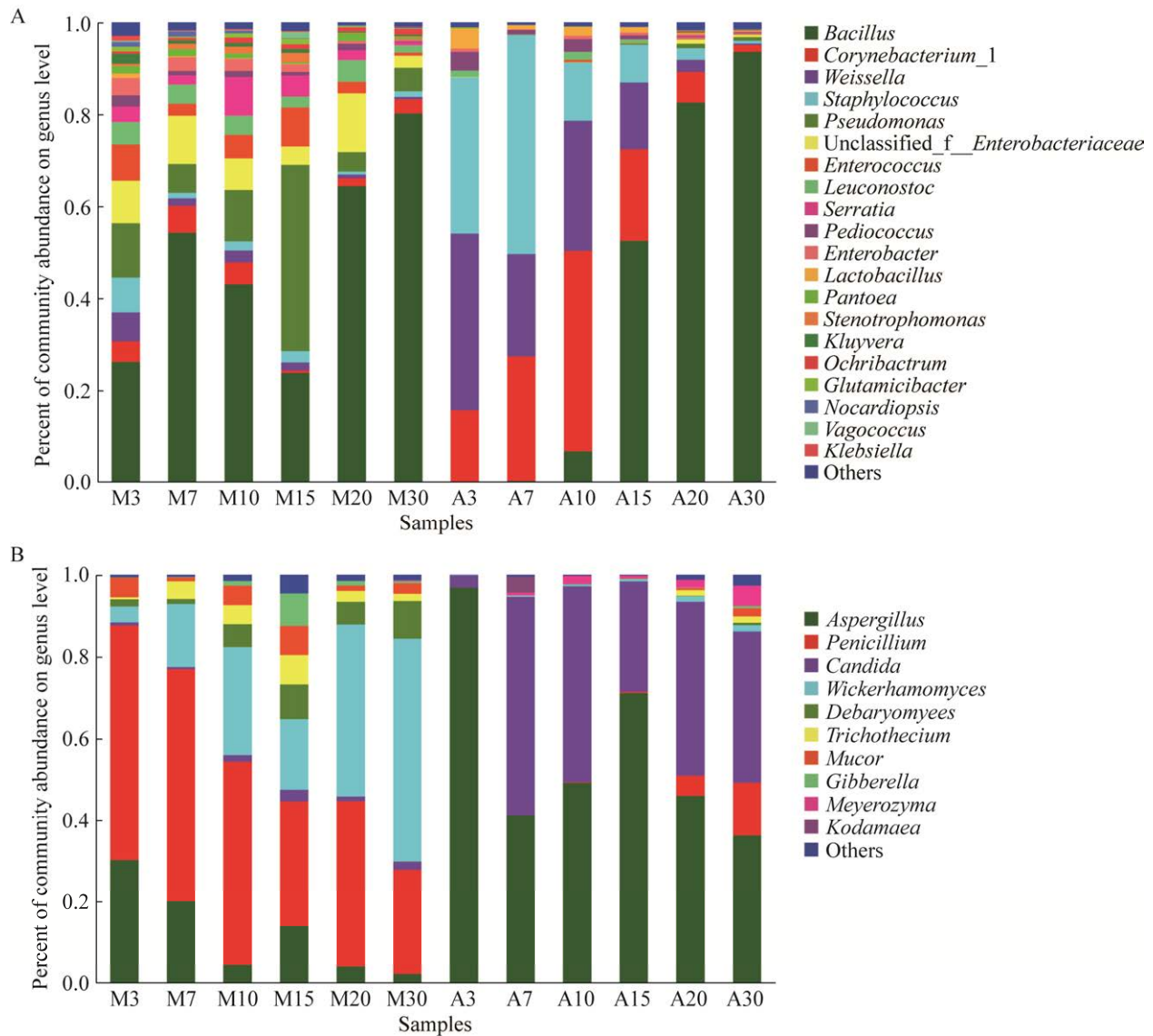


图 5 两种速成永川豆豉后发酵第 3–30 天属水平上的微生物组成

Figure 5 Microbial composition at the genus level from the 3rd to the 30th day of post-fermentation of two rapid Yongchuan Douchi. A: Bacteria. B: Fungi.

曲速成永川豆豉中曲霉属、念珠菌属和季也蒙酵母(*Meyerozyma*)的比例显著高于自然制曲速成永川豆豉($P < 0.001$) (图 6B), 其他微生物数量均显著低于自然制曲速成永川豆豉($P < 0.001$) (图 6B)。

在后发酵最后阶段, 细菌水平上, 米曲霉制曲速成永川豆豉中芽孢杆菌属、鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium*)的比例显著高于自然制曲

速成永川豆豉($P < 0.001$) (图 6C), 其他菌属均显著低于自然制曲速成永川豆豉($P < 0.001$) (图 6C)。后发酵后期真菌的差异分析表明, 自然制曲速成永川豆豉中的威克汉姆酵母(*Wickerhamomyces*)、青霉属、德巴利氏酵母属、毛霉菌属、枝顶孢霉属(*Acremonium*)明显高于米曲霉制曲速成永川豆豉, 其他具有显著差异的属在米曲霉制曲

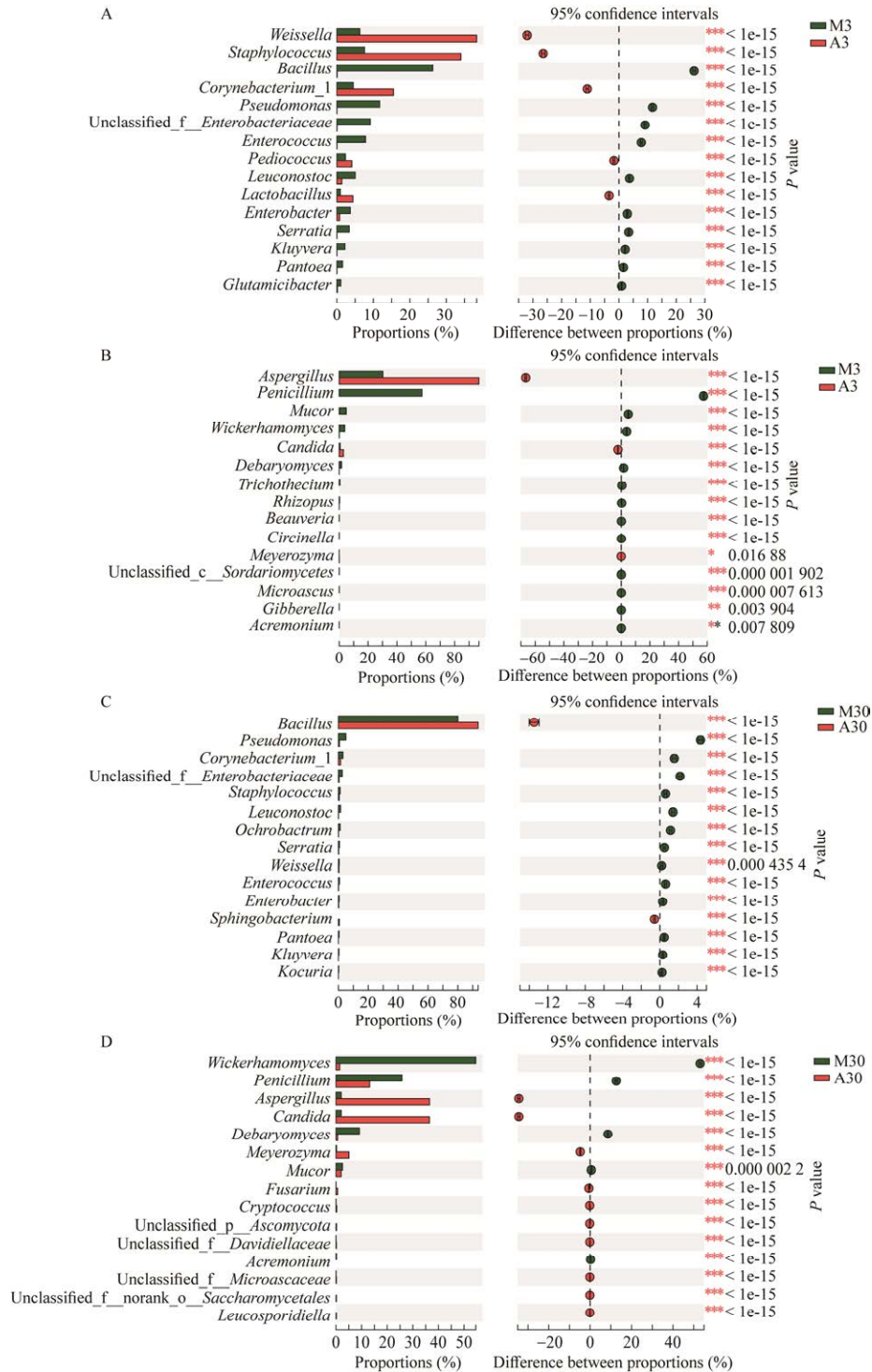


图 6 两种速成永川豆豉后发酵微生物群落差异分析

Figure 6 Analysis on the difference of microbial communities in post-fermentation of two kinds of rapid Yongchuan Douchi. A: Analysis of bacterial community differences in the initial stage of post-fermentation (day 3). B: Analysis of fungal community differences in the initial stage of post-fermentation (day 3). C: Analysis of bacterial community differences at the end of post-fermentation (day 30). D: Analysis of bacterial community differences at the end of post-fermentation (day 30).

速成永川豆豉中显著高于自然制曲速成永川豆豉($P<0.001$) (图 6D)。显著性差异分析结果表明, 自然制曲速成永川豆豉的微生物种类显著高于米曲霉制曲速成永川豆豉。这说明自然制曲速成永川豆豉的微生物群落较为丰富, 与图 3 的分析结果一致。

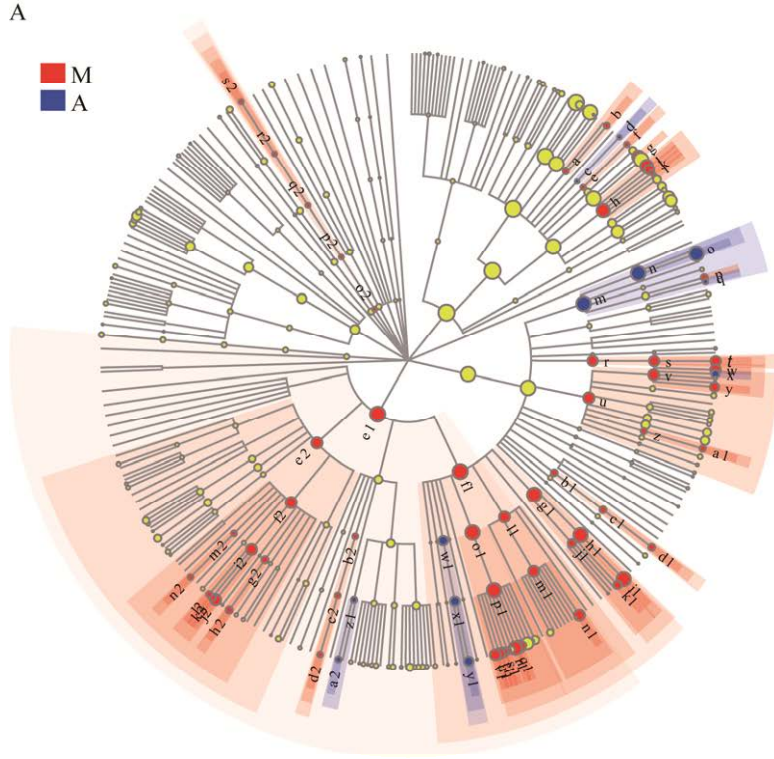
采用线性判别分析[line discriminant analysis (LDA) effect size, LEfSe]分析以确定自然制曲速成永川豆豉和米曲霉制曲速成永川豆豉中具有统计学意义的微生物群(图 7)。显著富集的细菌类群用对应的节点表示, 共有 36 个细菌和 36 个真菌进化枝存在显著性差异, LDA 得分为 3.0 (图 7A-7B)。在自然制曲速成永川豆豉和米曲霉制曲速成永川豆豉中分别有 29 个和 7 个优势细菌属, 30 个和 6 个优势真菌属。总体水平分析表明, 自然制曲速成永川豆豉和米曲霉制曲速成永川豆豉之间细菌水平上共有 71 个 OTU 存在显著性差异(图 7C), 其中, 米曲霉制曲速成永川豆豉中有 12 个 OTU 相对于对自然制曲速成永川豆豉显示出明显的差异, 包括棒状杆菌、微小杆菌(*Exiguobacterium*)、芽孢杆菌、微球菌(*Micrococcaceae*)等。真菌水平上共有 36 个 OTU 存在显著性差异(图 7D), 米曲霉制曲速成永川豆豉中有 6 个 OTU 相对于自然制曲速成永川豆豉显示出明显的差异, 包括曲霉属、假丝酵母属、未分类的酵母菌、季也蒙酵母和德巴酵母科(*Debaryomycetaceae*)。LEfSe 分析表明, 在细菌和真菌水平上, 自然制曲速成永川豆豉优势菌属高于米曲霉制曲速成永川豆豉。

3 讨论

豆豉生产过程中, 制曲工艺对后发酵过程有着显著性的影响, 后发酵是豆豉品质形成的一个重要过程。可滴定酸度是豆豉的一个重要理化指标, 对产品质量有显著影响。后发酵前

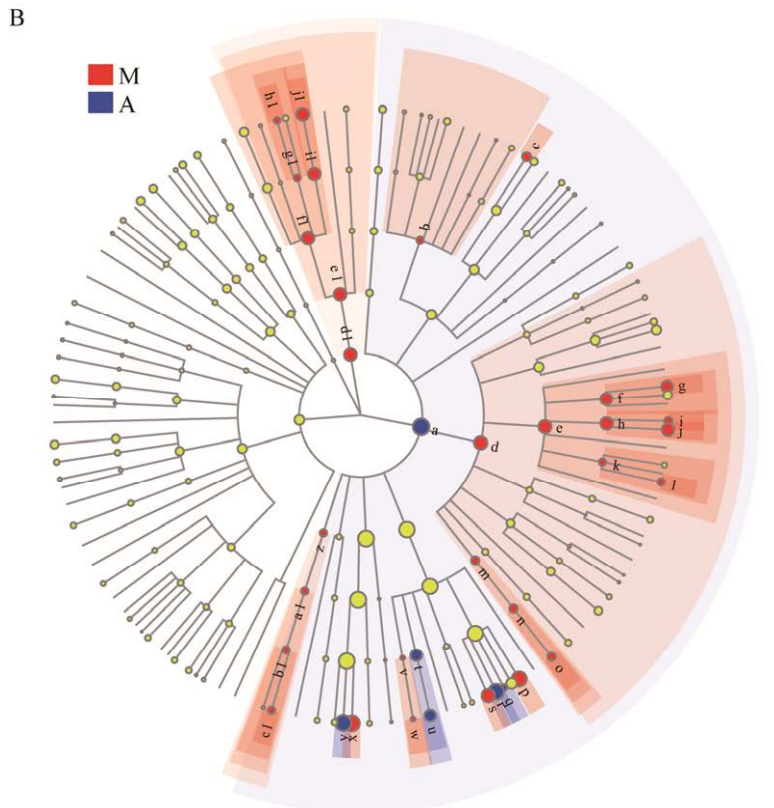
期, 微生物分泌大量的脂肪酶和淀粉酶, 将大豆中的脂肪和碳水化合物分解成脂肪酸和有机酸, 使得豆豉中的可滴定酸度迅速增加^[16]。但随着发酵酸度的不断积累, 乳酸菌等厌氧菌的生长受到抑制, 酸度增加缓慢。成品豆豉中自然制曲和米曲霉制曲的可滴定酸度含量分别为(16.87±1.27) mg/g 和(16.08±0.09) mg/g, 大于 15.00 mg/g, 小于 25.00 mg/g, 符合国家标准。氨基酸态氮的含量变化与可滴定酸度相似, 后发酵前期, 在蛋白酶等多种微生物分泌酶的作用下, 蛋白质被分解成氨基酸、多肽等小分子物质, 因此氨基酸态氮含量不断增加。随后, 氨基酸态氮浓度的增加速度减慢, 这是因为蛋白酶等酶的活性受到总酸积累的抑制。后发酵结束后, 成品豆豉中自然制曲速成永川豆豉的氨基酸态氮含量显著高于米曲霉制曲速成永川豆豉, 这是因为自然制曲中毛霉与其他微生物能分泌大量高活性蛋白酶将大豆蛋白分解, 有利于氨基酸态氮的形成。因此, 氨基酸态氮含量的增加与原料中蛋白质降解有关^[17]。还原糖是发酵过程中微生物生长的能源, 微生物生长不断消耗还原糖, 含量逐渐降低。由于米曲霉是米曲霉制曲速成永川豆豉的优势真菌属, 糖化能力优于米根霉和总状毛霉^[18], 后发酵结束后, 米曲霉制曲速成永川豆豉的还原糖含量显著高于自然制曲速成永川豆豉。此外, 由于米曲霉具有较强的糖化能力, 后发酵过程中米曲霉制曲速成永川豆豉色泽变化比自然制曲速成永川豆豉快(图 2d), 这也解释了为什么很多公司采用曲霉发酵来缩短永川豆豉的生产时间。但由于自然制曲微生物种类繁多以总状毛霉为主, 具有较强的蛋白酶活力, 能生成更高水平的游离氨基酸, 为豆豉中美拉德反应提供原料, 促进类黑精的生成和积累^[19-20]。因此, 后发酵结束后, 米曲霉制曲速成永川豆豉的色泽不如

A



- a: f *Listeriaceae*
- b: g *Brochothrix*
- c: f Family XII o *Bacillales*
- d: g *Exiguobacterium*
- e: f *Aerococcaceae*
- f: g *Aerococcus*
- g: g *Leuconostoc*
- h: f *Enterococcaceae*
- i: g *Enterococcus*
- j: g *Vagococcus*
- k: g *Bavariococcus*
- l: g unclassified f *Enterococcaceae*
- m: o *Corynebacteriales*
- n: f *Corynebacteriaceae*
- o: g *Corynebacterium_1*
- p: g *Rhodococcus*
- q: g *Gordonia*
- r: o *Streptosporangiales*
- s: f *Nocardiopsaceae*
- t: g *Nocardiopsis*
- u: o *Micrococcales*
- v: f *Micrococcaceae*
- w: g *Glutamicibacter*
- x: g unclassified f *Micrococcaceae*
- y: g *Kocuria*
- z: f *Cellulomonadaceae*
- a1: g *Oerskovia*
- b1: o *Streptomycetales*
- c1: f *Streptomycetaceae*
- d1: g *Streptomyces*
- e1: p *Proteobacteria*
- fl: c *Gammaproteobacteria*
- g1: o *Pseudomonadales*
- h1: f *Pseudomonadaceae*
- il: g *Pseudomonas*
- jl: f *Moraxellaceae*

B



- a: p *Ascomycota*
- b: o *Pleosporales*
- c: g *Cladosporium*
- d: c *Sordariomycetes*
- e: o *Hypocreales*
- f: f *Nectriaceae*
- g: g *Gibberella*
- h: f norank o *Hypocreales*
- i: g *Acremonium*
- j: g *Trichothecium*
- k: f *Cordycipitaceae*
- l: g *Beauveria*
- m: o unclassified c *Sordariomycetes*
- n: f unclassified c *Sordariomycetes*
- o: g unclassified c *Sordariomycetes*
- p: g *Wickerhamomyces*
- q: g unclassified f norank o *Saccharomyzo*
- r: g *Candida*
- s: g *Debaryomyces*
- t: f *Debaryomycetaceae*
- u: g *Meyerozyma*
- v: f *Trichomonascaceae*
- w: g *Trichomonascus*
- x: g *Penicillium*
- y: g *Aspergillus*
- z: c norank p *Ascomycota*
- a1: o norank p *Ascomycota*
- b1: f norank p *Ascomycota*
- c1: g *Yunnania*
- d1: p *Zygomycota*
- e1: c norank p *Zygomycota*
- fl: o *Mucorales*
- gl: f *Syncephalastraceae*
- hl: g *Circinella*
- il: f *Mucoraceae*
- jl: g *Mucor*

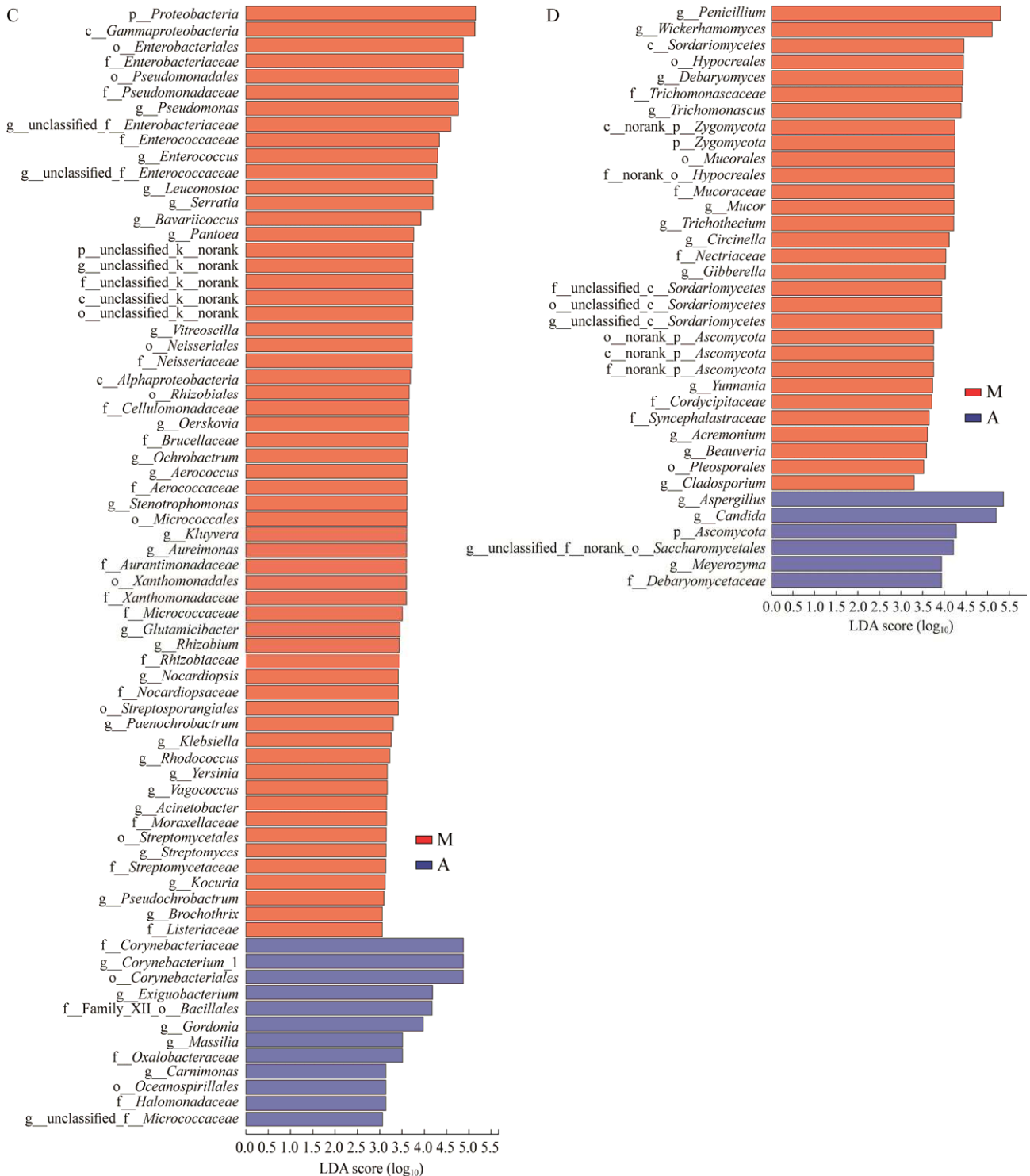


图 7 两种速成永川豆豉从门到属水平的微生物群落 LefSe 分析(LDA 评分>3.0)

Figure 7 LefSe analysis of microbial communities of two types of rapid Yongchuan Douchi from phylum to genera level (LDA score>3.0). A: Bacterial LDA fraction distribution cladogram. B: Fungal LDA fraction distribution cladogram. C: Bacterial LDA score distribution histogram. D: Fungal LDA score distribution histogram.

自然制曲速成永川豆豉黝黑。在类似的研究中也得出同样的结论，天然型永川豆豉和人工型永川豆豉在传统发酵条件下后发酵，发酵结束后，与人工型永川豆豉相比，天然型永川豆豉的颜色较深，香气更浓，风味更好，符合消费者偏好^[12]。

豆豉产品的独特特性与微生物结构和活性有关，微生物对豆豉发酵过程中的理化性质和生物学变化起着重要作用。微生物分析表明，芽孢杆菌属是 2 种速成永川豆豉后发酵过程中的优势菌属，其丰度呈增长趋势，这是因为芽孢杆菌不受环境的限制，能在高温和盐环境中生存^[21]。芽孢杆菌可以加速豆豉发酵，为其他细菌提供所需的原料^[22]。同时，芽孢杆菌还能分泌高活性的蛋白酶、豆豉纤溶酶等，促进发酵大豆制品的营养物质生成，被广泛地应用于豆豉、豆瓣酱和腐乳中^[23-24]。乳杆菌属、魏氏菌属、葡萄球菌属以及其他微生物参与豆豉的风味形成^[25]。乳杆菌可将碳水化合物转变为乙酸，有利于豆豉特殊风味的形成。魏氏菌属和葡萄球菌属是豆豉后发酵前期的优势菌，可促进豆豉风味前体物质的生成，同时为葡萄球菌属的后续生长提高能量^[21]。葡萄球菌是自然制曲速成永川豆豉的优势菌，具有水解蛋白的能力，在发酵过程中可提供多种氨基酸或肽^[15]。这也解释了自然制曲速成永川豆豉氨基酸态氮含量显著高于米曲霉制曲速成永川豆豉的原因。此外，念珠菌和季也蒙毕赤酵母在提高豆豉口感和质量方面也发挥重要作用。有研究发现，在曲霉型豆豉中添加季也蒙毕赤酵母和念珠菌，可显著提高氨基酸、有机酸，以及不饱和脂肪酸的百分比^[26]。以上结果表明，微生物对豆豉品质的贡献各不相同。自然制曲速成永川豆豉的微生物多样性及丰富度显著高于米曲霉制曲速成永川豆豉，这种微生物群落的差异

使得自然制曲速成永川豆豉的理化特性优于米曲霉制曲速成永川豆豉。

4 结论

本研究测定了不同制曲速成永川豆豉的理化指标，并采用高通量测序技术分析传统自然制曲和米曲霉制曲速成永川豆豉的菌群组成及差异，得到以下结论：

(1) 在理化指标方面，自然制曲速成永川豆豉黝黑发亮，关键理化指标氨基酸态氮含量显著高于米曲霉制曲速成永川豆豉，其含量为 (1.01 ± 0.05) g/100 g。

(2) 在微生物组成方面，不同制曲工艺速成永川豆豉的微生物群结构组成差异显著，与米曲霉制曲速成永川豆豉相比，自然制曲速成永川豆豉菌群结构复杂，具有较高的物种多样性及群落丰富度。

综上所述，自然制曲速成永川豆豉产品品质优于米曲霉制曲速成永川豆豉，自然制曲能提高速成永川豆豉产品的风味品质。

参考文献

- [1] 牛天娇, 马莺. 中国传统发酵豆制品中微生物的发掘与利用[J]. 中国酿造, 2005, 24(2): 1-5.
NIU TJ, MA Y. Exploitation and utilization of microbial resources in Chinese traditional fermented soybean products[J]. *China Brewing*, 2005, 24(2): 1-5 (in Chinese).
- [2] LIU LB, CHEN XQ, HAO LL, ZHANG GF, JIN Z, LI C, YANG YZ, RAO JJ, CHEN BC. Traditional fermented soybean products: processing, flavor formation, nutritional and biological activities[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022, 62(7): 1971-1989.
- [3] 谢艳华, 谢靓, 李跑, 陈森芬, 蒋立文, 陈力力. GC-MS 分析毛霉型、细菌型、曲霉型豆豉中脂肪酸组成[J]. 中国油脂, 2017, 42(7): 115-119, 123.
XIE YH, XIE J, LI P, CHEN MF, JIANG LW, CHEN LL. GC-MS analysis of fatty acid composition in

- mucor-type, bacterial-type and *Aspergillus*-type Douchi[J]. *China Oils and Fats*, 2017, 42(7): 115-119, 123 (in Chinese).
- [4] 吴永夏. 毛霉永川豆豉的特点与原产地保护的探讨[J]. *中国酿造*, 2006, 25(8): 55-57.
WU YX. Character of *Mucor*-fermented Yongchuang Douchi and protection of original production area[J]. *China Brewing*, 2006, 25(8): 55-57 (in Chinese).
- [5] TAN Y, ZHANG RF, CHEN GJ, WANG SS, LI CF, XU Y, KAN JQ. Effect of different starter cultures on the control of biogenic amines and quality change of Douchi by rapid fermentation[J]. *LWT*, 2019, 109: 395-405.
- [6] 周柬, 王洪伟, 张玉, 宋佳佳, 黄业传, 索化夷. 基于感官评价和 GC-MS 分析嗜盐芳香酵母对速成永川豆豉香气的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(9): 59-64.
ZHOU J, WANG HW, ZHANG Y, SONG JJ, HUANG YC, SUO HY. Effects of halophilic aromatic yeasts on the aroma of rapid Yongchuan Douchi by sensory evaluation and GC-MS analysis[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2022, 48(9): 59-64 (in Chinese).
- [7] 李薇. 传统发酵永川豆豉和速成豆豉增香发酵关键香气物质基础比较研究[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2022.
LI W. Comparative study on the key aroma compounds basis of traditional fermented Yongchuan Douchi and the fast-fermented Yongchuan Douchi after aroma enhancement fermentation[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2022 (in Chinese).
- [8] 汤启成, 曾凡玉, 汪学荣, 周玲. 毛霉型豆豉与曲霉型豆豉挥发性成分的 GC-MS 分析[J]. *食品工业*, 2016, 37(10): 274-278.
TANG QC, ZENG FY, WANG XR, ZHOU L. GC-MS analysis of volatile components in *Mucor*-fermented soybean and *Aspergillus*-fermented soybean[J]. *The Food Industry*, 2016, 37(10): 274-278 (in Chinese).
- [9] CASTRO RD, OLIVEIRA LG, Sant'ANNA FM, LUIZ LMP, SANDES SHC, SILVA CIF, SILVA AM, NUNES AC, PENNA CFAM, SOUZA MR. Lactic acid microbiota identification in water, raw milk, endogenous starter culture, and fresh Minas artisanal cheese from the Campo das Vertentes region of Brazil during the dry and rainy seasons[J]. *Journal of Dairy Science*, 2016, 99(8): 6086-6096.
- [10] ZHANG YH, MA L, WANG XM. Correlation between protein hydrolysates and color during fermentation of *Mucor*-type Douchi[J]. *International Journal of Food Properties*, 2015, 18(12): 2800-2812.
- [11] 索化夷, 卢露, 吴佳敏, 阚健全. 永川豆豉在传统发酵过程中基本成分及蛋白酶活性变化[J]. *食品科学*, 2011, 32(1): 177-180.
SUO HY, LU L, WU JM, KAN JQ. Changes in basal components and protease activity at different stages of the traditional processing of Yongchuan Douchi[J]. *Food Science*, 2011, 32(1): 177-180 (in Chinese).
- [12] ZHANG Y, ZENG T, WANG HW, SONG JJ, SUO HY. Correlation between the quality and microbial community of natural-type and artificial-type Yongchuan Douchi[J]. *LWT*, 2021, 140: 110788.
- [13] LI FJ, LIU WL, YAMAKI K, LIU YH, FANG YY, LI ZJ, CHEN MH, WANG CL. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory effect of Chinese soypaste along fermentation and ripening: contribution of early soybean protein borne peptides and late Maillard reaction products[J]. *International Journal of Food Properties*, 2016, 19(12): 2805-2816.
- [14] DING Y, YAN YM, PENG YJ, CHEN D, MI J, LU L, LUO Q, LI XY, ZENG XX, CAO YL. *In vitro* digestion under simulated saliva, gastric and small intestinal conditions and fermentation by human gut microbiota of polysaccharides from the fruits of *Lycium barbarum*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 125: 751-760.
- [15] YANG L, YANG HL, TU ZC, WANG XL. High-throughput sequencing of microbial community diversity and dynamics during Douchi fermentation[J]. *PLoS One*, 2016, 11(12): e0168166.
- [16] 张仁凤. 霉菌纯种制曲豆豉在发酵过程中生物胺的变化研究[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2018.
ZHANG RF. Study on the changes of biogenic amines in Douchi by pure starter-making with mould during the fermentation process[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2018 (in Chinese).
- [17] LI Q, YANG FL, ZHENG GX, GUAN ZJ. Effects of urea ammonia pretreatment on the batch anaerobic fermentation efficiency of corn stovers[J]. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 2019, 12(4): 169-173.
- [18] ZHAO GZ, HOU LH, YAO YP, WANG CL, CAO XH. Comparative proteome analysis of *Aspergillus oryzae* 3.042 and *A. oryzae* 100-8 strains: towards the production of different soy sauce flavors[J]. *Journal of*

- Proteomics, 2012, 75(13): 3914-3924.
- [19] 索化夷, 赵欣, 蹇宇, 陈娟, 李键, 张玉, 阚建全. 永川毛霉型豆豉在发酵过程中微生物总量与区系变化规律[J]. 食品科学, 2015, 36(19): 124-131.
SUO HY, ZHAO X, QIAN Y, CHEN J, LI J, ZHANG Y, KAN JQ. Changes in microbial load and flora during fermentation Yongchuan *Mucor*-type Douchi[J]. Food Science, 2015, 36(19): 124-131 (in Chinese).
- [20] 李薇, 罗沈斌, 邱泽瑞, 赖登磊, 王洪伟, 索化夷. 永川毛霉型豆豉传统发酵过程中微生物群落结构及动态演替规律[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(23): 60-67.
LI W, LUO SB, QIU ZR, LAI DL, WANG HW, SUO HY. Microbial community structure and dynamic succession in traditional fermentation of *Mucor*-type Yongchuan Douchi[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(23): 60-67 (in Chinese).
- [21] ZHANG PW, LI H, ZHAO WP, XIONG K, WEN H, YANG HL, WANG XL. Dynamic analysis of physicochemical characteristics and microbial communities of *Aspergillus*-type Douchi during fermentation[J]. Food Research International, 2022, 153: 110932.
- [22] LI ZH, RUI JP, LI XZ, LI JB, DONG L, HUANG QL, HUANG C, WANG ZP, LI L, XUAN P, TANG YM, CHEN FS. Bacterial community succession and metabolite changes during doubanjiang-meju fermentation, a Chinese traditional fermented broad bean (*Vicia faba* L.) paste[J]. Food Chemistry, 2017, 218: 534-542.
- [23] LIU ZY, GUAN XF, ZHONG XX, ZHOU XR, YANG FY. *Bacillus velezensis* DP-2 isolated from Douchi and its application in soybean meal fermentation[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2021, 101(5): 1861-1868.
- [24] CHEN TT, JIANG SY, XIONG SQ, WANG MJ, ZHU DC, WEI H. Application of denaturing gradient gel electrophoresis to microbial diversity analysis in Chinese Douchi[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2012, 92(10): 2171-2176.
- [25] WANG YR, XIANG FS, ZHANG ZD, HOU QC, GUO Z. Characterization of bacterial community and flavor differences of different types of Douchi[J]. Food Science & Nutrition, 2021, 9(7): 3460-3469.
- [26] HE B, LI HR, HU ZH, ZHANG YH, SUN M, QIU SK, ZENG B. Difference in microbial community and taste compounds between *Mucor*-type and *Aspergillus*-type Douchi during koji-making[J]. Food Research International, 2019, 121: 136-143.