

酱醪中耐高温耐盐酵母菌分离鉴定

马荣山,王姗姗

(沈阳农业大学食品学院,辽宁沈阳 110866)

摘要:为了改善工业化生产酱油的风味,从辽宁地区传统工艺发酵的酱醪中分离、筛选耐高温嗜盐酵母菌,对其进行形态、生理生化特性及26S rDNA序列分析确定其分类地位,筛选菌株为鲁氏结合酵母。实验表明,所筛菌株能在NaCl质量浓度17%,发酵温度45℃的环境下生长良好,非常适合工业化生产酱油的发酵过程,又通过香气对比实验证明,添加所筛菌株的酱醪中其全氮含量和氨基态氮含量均有一定提高,并且在第32d时氨基酸生成率达到52.94%。通过顶空固相微萃取,气相色谱-质谱联用分析挥发性成分,分离出七大类共48种挥发性物质,并与安琪酵母进行比较,发现JY-7明显优于安琪酵母。因此所筛菌株可以作为增香酵母添加到生产酱油的后熟过程中,以改善酱油的风味。

关键词:耐高温,耐盐,酵母,分离,鉴定,增香

Isolation, purification and identification of high temperature halophilic yeast from soy sauce Mash

MA Rong-shan, WANG Shan-shan

(College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: In order to improve the flavor of the industrial production of soy sauce, we isolated and screened high temperature halophilic yeast from fermented soy paste of the traditional craft of Liaoning Province. By analyzing morphological, physiological and biochemical characteristics and 26S rDNA sequence to determine its taxonomic status. The screening strain was *Zygosaccharomyces rouxii*. Experiments showed that the screening strain had good growth in the NaCl mass concentration of 17%, and fermentation temperature of 45℃ solution environment and it was very suitable for the industrial production of soy sauce fermentation process. By the aroma of comparative experiments showed that total nitrogen and amino nitrogen content had a certain increased in added screening strain and amino acids generation rate reached to 52.94% in 32nd experiment days. Associated with headspace solid phase micro-extraction (HS-SPME), gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) to analyze volatile constituents in soy paste, about 7 major types of volatile substances, a total of 48 species were isolated from the soy paste. Compared with Angel Yeast, JY-7 was significantly better than Angel Yeast. Therefore the screening strains could be used as flavoring yeast to add to the ripening process of the production of soy sauce, so as to improve the flavor of soy sauce.

Key words: thermostability; salt-tolerant; yeast; separation; appraisal; increase aroma

中图分类号: TS264.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)14-0191-06

酱油最早起源于我国,以其独特的风味,明亮的色泽,咸鲜的口感现如今已经成为中国和东南亚大部分国家日常生活的重要调味品,特别是近几年来一些欧洲国家对酱油的喜爱程度有所增加,因此对提高酱油风味的研究是非常必要的。我国酱油生产行业最普遍使用的低盐固态发酵工艺,其特点是工艺成熟、投资较小、生产周期短、劳动强度低,多少年来一直受到酿造行业人士的欢迎^[1],但其缺点是发酵的酱油风味较差。酵母菌在酱油的发酵过程中具有重要的作用,其作用糖分会产生一定量的乙醇,乙醇是酱油主要风味物质也是酯类的前体,对酱油特有

风味的影响很大,在酱油发酵的后期阶段,可以添加耐盐增香酵母,从而改善酱油的风味及质量^[2]。而低盐固态发酵工艺,控制的温度在(45~50℃)^[3],发酵周期短,不合适发酵过程中耐盐酵母的生长繁殖。本文旨在从传统发酵的酱醪中分离、筛选出耐高温嗜盐酵母菌。通过对其形态、生理生化特性及26S rDNA序列分析以鉴定酵母菌种属,并用气质联用的方法检测酱油中挥发性成分。从而达到改善酱油风味的目的。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

基本培养基 富集培养基;分离纯化培养基 YPD固体培养基,麦芽汁培养基;保藏培养基 麦芽汁琼脂培养基;鉴定培养基 葡萄糖-酵母粉-蛋白

收稿日期:2013-01-08

作者简介:王姗姗(1987-),女,硕士研究生,研究方向:食品生物技术。

陈培养基,产子囊孢子培养基,生成类淀粉化合物培养基;发酵酱醋 辽宁地区。

超净工作台 苏净集团安泰公司;XS-212型生物显微镜 中国,JNOEC;TGL-16G型台式离心机 上海安亭科学仪器厂;PHS-25型pH计 上海雷磁仪器厂;78HW-1型恒温磁力搅拌仪 杭州仪表电机厂;高压灭菌锅 上海博迅实业有限公司医疗设备厂;Coolsafer55-4型冷冻干燥机 美国, Gene Company Limited基因有限公司;DYY-8C型稳流稳压电泳仪 普阳科学仪器研究所;DNA扩增仪 美国, BIO-RAO; CR-21G型冷冻离心机 日本, HITACHI日立。

1.2 实验方法

1.2.1 样品的采集 从各基质中采用随机取样的原则收集样品,装入灭菌袋中,于冰箱中贮藏备用。

1.2.2 酵母菌的分离和纯化 将样品过滤除杂后取适量加入到麦芽汁中,增菌12h后,分别加入到含有10%酒精的麦芽汁培养液中,在30℃下培养24~72h,取镜检后有活菌存在的培养液1mL接入到YPD固体平皿中,在30℃下培养24~72h,待长出菌落后,选择具有典型酵母菌落特征的单菌落进一步划线分离2~3次,经镜检为纯种后分别转入YPD固体斜面,低温保存。

1.2.3 酵母菌的筛选

1.2.3.1 耐高温酵母菌的筛选 得到的各目标菌株接入YPD液体培养基中于45℃下培养24h,比较各菌株生长情况,筛选出在高温条件下能快速生长的菌株。

1.2.3.2 耐盐酵母菌的筛选 配制含有氯化钠浓度为15%,的麦芽汁,灭菌后分别接入酵母菌,接种量为 1×10^7 cfu/mL 30℃下培养24h,筛选出能在此盐度下较好生长的菌种。

1.2.3.3 目标酵母菌选定 利用产酒精能力强的酵母能还原三苯基四氯唑酸盐(TTC)变为深红这一特性,筛选深红色菌落,接入YPD固体培养基中,长出菌落后再接入到附有杜氏小管的麦芽汁试管中,观察杜氏小管的产气情况,确定目标菌种。

1.2.4 酵母菌菌种的鉴定 酵母菌菌种的鉴定参考真菌鉴定方法^[4-6]。

1.2.4.1 酵母菌碳同化实验 鉴定八种同化碳源为葡萄糖、半乳糖、纤维二糖、木糖、乳糖、海藻糖、蔗糖、核糖。将上述糖类分别加入到含杜氏小管的氮源基础培养基(YNB)中,经过滤除菌。以含YNB而不含碳源的试管作对照。将筛选出的酵母菌分别接入到上述培养基中,于25℃下培养三周,以试管浑浊情况,来确定酵母菌碳同化能力。

1.2.4.2 DNA的提取 取3mL早对数生长期酵母培养物,于12000r/min离心30s,吸弃上清,收集菌体。用小量酵母基因组DNA快速提取试剂盒(离心柱型),对收集的菌体进行DNA提取。具体操作步骤,见其说明书。

1.2.4.3 26S rRNA的扩增、序列测定、同源性分析、构建发育树 PCR扩增引物: NLI(5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3')和NIA(5'-GGT CCG

TGT TTC AAG ACG G-3')^[7]。PCR扩增分离得到的酵母菌26S rDNA近5'端的DI/D2区域。PCR扩增体系:总反应体积25μL,10×PCR缓冲液(含20μmol/L的Mg²⁺)2.5μL,引物NLI/NL4(10μmol/L)各2μL,模板DNA 2μL,dNTP(10μmol/L)0.5μL,Taq酶(5U/μL)0.2μL,双蒸水19μL。PCR扩增条件:先于95℃下预变性5min,然后于94℃下变性40s,再于55℃下退火40s,72℃下延伸30s,40个循环后,72℃下延伸10min。然后测序。将测得的序列在GenBank核酸序列数据库中与已知菌种的相应序列进行比较其相似程度。并用ClustalX 1.8软件^[8]。进行同源性分析,构建系统发育树,经Bootstrap法(1000次重复)进行检验^[9]。

1.2.5 酱油后熟阶段添加酵母增香实验 按照低盐固态淋酱酱油的发酵工艺进行发酵,在后熟阶段(发酵28d)加入酵母菌进行增香。

豆粕、麸皮、水混合蒸料→出锅冷却→接种→制曲→成曲→
加入酵母

↓

拌盐水制醅→低盐固态发酵→淋油→后熟→灭菌→沉淀→成品

1.2.5.1 氨基态氮的测定 采用甲醛滴定法^[10]进行测定。

1.2.5.2 全氮的测定 采用凯氏定氮法。

1.2.5.3 还原糖的含量的测定 采用直接滴定法^[11]。

1.2.5.4 萃取挥发性成分 选用85μm PA萃取头,将萃取头老化的同时,将经过酵母发酵28d的酱醅滤出液精确吸取10mL,加入到15mL的顶空瓶中密封,放置于50℃水浴锅中加热平衡15min。待萃取头老化好后,将萃取头插入到样品瓶的顶空部分,吸附40min,吸附温度为40℃。将吸附好的萃取头取出,插入到气象色谱的进样口,解吸2min,解析温度为250℃。

1.2.5.5 气相色谱-质谱联用分析挥发性成分 DB-5MS毛细管色谱柱(60m×0.25mm×0.25μm);程序升温:色谱柱初始温度为40℃,保持4min,以3℃/min的速率上升到130℃,保持2min,再以8℃/min的速率上升到250℃,保持5min。不分流模式进样,载气为He,流量1.0mL/min。离子化方式EI;电子能量70Ev。将检测谱图经计算机分析处理,并与化合物检索质谱库NIST和WILEY同时进行匹配从而进行定性分析;用面积归一法进行定量分析。

2 结果与分析

2.1 菌落和菌体特征

表1 菌落和菌体特征

Table 1 Colony and bacterial characteristics

编号	菌落形状	菌落颜色	表面	菌株生殖特性	菌体形状
JY-1	椭圆形	乳白色	光滑	两端出芽	圆形
JY-2	圆形	乳白色	光滑	一端出芽	圆形
JY-3	圆形	乳白色	光滑	一端出芽	圆形
JY-4	椭圆形	乳白色	光滑	两端出芽	椭圆形
JY-5	椭圆形	乳白色	光滑	两端出芽	椭圆形
JY-6	圆形	乳白色	光滑	一端出芽	圆形
JY-7	圆形	乳白色	光滑	一端出芽	圆形
JY-8	圆形	乳白色	光滑	一端出芽	椭圆形

如表1所示,从各基质中采集并分离出具有酵母菌特征的菌株共八株。菌落均成呈乳白色且表面光滑;JY-1、JY-4、JY-5菌落成椭圆形,其余五株为圆形菌落;JY-1、JY-4、JY-5两端出芽,其余五株为一端出芽;JY-4、JY-5、JY-8菌体为椭圆形,其余五株为圆形。

2.2 酵母菌的筛选

2.2.1 酵母菌耐高温、耐盐筛选 将分离出的酵母菌在45℃下培养24h,筛选出5株生长较快的菌株,再将这5株菌种于盐浓度15%下培养24h,最终筛选出编号为3,4,7这3株酵母菌种进行下一步筛选。

表2 酵母菌耐高温、耐盐筛选结果

Table 2 The results for screening of yeast of thermostability and salt tolerance

样品编号	温度(45℃)	盐浓度(15%)	筛选结果
1	-	--	-
2	+	-	-
3	+	+	+
4	+	+	+
5	-	--	-
6	+	-	-
7	+	+	+
8	-	--	-

注:“+”表示该菌种在相应的温度或盐浓度下可以较好生长;“-”表示该菌种在相应的温度或盐浓度下无法生长;“-”表示该菌种在45℃下无法较好的生长,便不再做其耐盐性实验。

2.2.2 目标菌种选定 表3显示,在低于42℃时三株酵母菌产气比较好;当温度达到44℃时编号为4的菌株的产气量有明显的减少,前24h没有产气;编号为3、7的菌株在温度达到46℃还有产气。

表4显示,在温度为42℃时,编号为4、7的菌株在盐浓度达到17%后产气量也较多,对盐的适应能力较强;菌株3在盐浓度到达16%时产气量受到一定的影响。

酵母菌可以从不同环境中分离得到,普通酵母随处可见,但是某些可适应特殊环境的酵母只生活在特定环境中。酱醅的发酵环境温度盐度都比较特殊,这为筛选耐盐耐高温酵母提供了有力的条件。

综合表3、表4所示实验结果,菌株7在高温、高盐的培养条件下,生长、产气情况最突出;虽然盐浓度对菌株3产气量有较大影响,但在盐浓度16%仍可以产气,而且耐高温效果较好;因此,将菌株3、7作为初步目标菌种进一步研究,编号JY3和JY7。

2.3 酵母菌碳同化实验

表5 同化实验结果

Table 5 Result of assimilation experiment

编号	葡萄糖	半乳糖	纤维二糖	木糖	乳糖	海藻糖	蔗糖	核糖
JY-3	+	+	-	+	-	+	+	-
JY-7	+	+	-	+	-	-	+	-

注:“+”表示可以同化;“-”表示不可以同化。

表3 不同温度下酵母菌产气结果

Table 3 The result of yeast aerogenesis at different temperatures

菌种编号	时间(h)	温度(℃)			
		40	42	44	46
3	12	++	++	+	-
	24	+++	+++	++	+
	36	+++	+++	++	+
4	12	+	+	-	-
	24	++	++	-	-
	36	+++	++	+	-
7	12	++	++	+	-
	24	+++	+++	++	-
	36	+++	+++	+++	+

注:“+”的多少,表示产气量的多少;“++++”表示杜氏小管充满气体;“+++”表示杜氏小管充满3/4的气体;“++”表示杜氏小管充满1/2的气体;“+”表示杜氏小管充满1/4的气体;“-”表示杜氏小管中没有气体;表4同。

表4 不同盐浓度下酵母菌产气结果

Table 4 The result of yeast aerogenesis at different salt concentrations

菌种编号	时间(h)	盐浓度(%)				
		13	14	15	16	17
3	12	++	++	+	-	-
	24	+++	+++	++	+	-
	36	+++	+++	++	++	+
4	12	++	++	+	+	+
	24	++++	++++	+++	++	+
	36	++++	++++	+++	+++	++
7	12	++	++	+	+	+
	24	+++	+++	+++	++	+
	36	++++	+++	+++	++	++

将得到的两株菌,于产子囊孢子培养基上培养,在油镜下观察,发现均可看见子囊孢子。两株酵母菌对不同碳源利用情况如表5所示。JY-3和JY-7都可以利用葡萄糖、半乳糖、木糖和蔗糖,同时JY-3还可以利用海藻糖。

2.4 发育树构建

由图1可知,筛选出的两株菌与7株相关酵母菌构建的发育树可以得到,两株菌与假鲁氏结合酵母菌(*Zygosaccharomyces pseudorouxii*),鲁氏结合酵母菌(*Zygosaccharomyces rouxii*)共同存在于一个大分支上。JY-7与鲁氏结合酵母的相似度达到100%,有较高的亲缘关系,JY-3与假鲁氏结合酵母亲缘关系

较近。

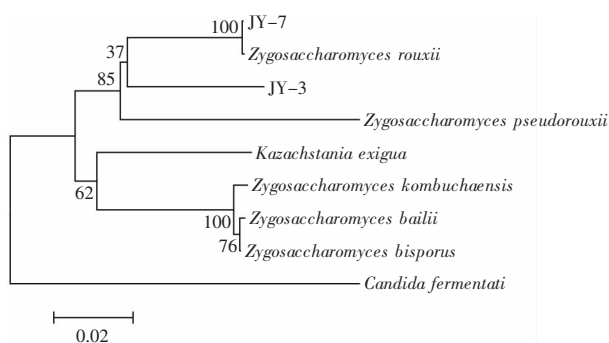


图1 酵母菌基于26S rDNA序列的系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree of the yeasts according to 26S rDNA esquences

2.5 酱油后熟阶段添加酵母增香实验

将JY3、JY7和安琪酵母接种到发酵28d的酱醅中,接种量为0.5%,发酵温度为40℃左右,盐浓度为15%^[12-15]。再做一组空白作为对照组。全氮和氨基态氮是评价酱油品质的2个重要指标^[16]。在酱油后熟阶段添加酵母对酱油中全氮和氨基态氮的影响如图2和图3所示。在32d的发酵过程中,添加JY7菌种的酱醅中其全氮含量和氨基态氮含量均有一定提高,并且在第32d时氨基酸生成率达到52.94%。

酱油中的香气主要是由一些挥发性物质组合产生的,虽然含量很少,但是起着至关重要的作用,也是衡量酱油品质的重要指标^[17]。气质联用检测酱油中挥发性物质结果,见表6。

从表6中可以看出,经JY7后熟发酵增香后共检测出挥发性风味物质48种,包括醇(11)、酯(8)、酮

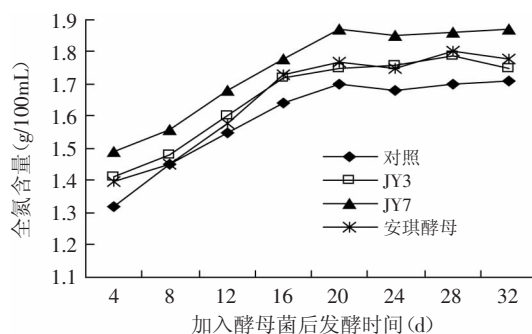


图2 酵母对酱油发酵过程全氮的影响

Fig.2 Effect of yeast on the content of total nitrogen in soy sauce fermentation process

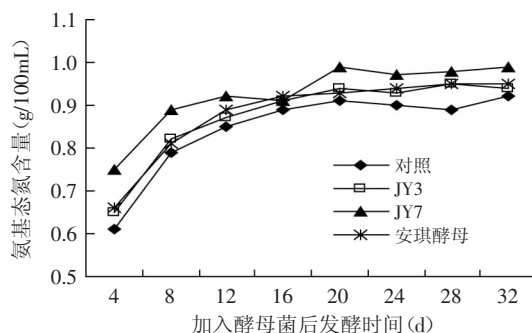


图3 酵母对酱油发酵过程氨基态氮含量的影响

Fig.3 Effects of yeast on amino-n(ammoniacal nitrogen) contents in soy sauce fermentation process

(6)、醛(7)、酸(7)、酚(5)及杂环类(4)共七大类化合物。在经JY3后熟发酵的酱醅中检测出42种;经安琪酵母后熟发酵的酱醅中检测出42种;不添加酵母的酱醅中检测出40种。

表6 酱醅中挥发性成分分析结果

Table 6 The analysis result of the volatile components in the soy sauce mash

挥发性风味化合物名称	峰面积相对含量(%)			
	对照组	JY3	JY7	安琪酵母
醇类	36.12	37.44	38.8	37.19
3-呋喃甲醇	ND	4.98	4.25	5.21
苯乙醇	7.32	3.59	2.87	3.32
1-辛烯-3-醇	ND	1.23	1.44	1.46
2-甲基-1-丁醇	2.19	0.98	0.09	0.87
2-呋喃甲醇	ND	5.71	6.13	5.98
3-氨基-1-丙醇	0.81	ND	ND	ND
3-甲硫基丙醇	0.07	0.41	0.32	0.39
异戊醇	5.02	4.56	4.69	4.23
戊醇	1.98	ND	ND	ND
异丁醇	ND	0.37	0.28	0.35
叔十二烷基硫醇	ND	ND	0.31	ND
正丁醇	1.32	2.13	2.98	2.15
乙醇	17.41	18.46	19.69	18.44
酯类	4.65	6.27	7.14	5.97
乙酸乙酯	ND	0.42	0.51	0.48
乳酸乙酯	ND	0.39	0.41	ND

续表

挥发性风味化合物名称	峰面积相对含量(%)			
	对照组	JY3	JY7	安琪酵母
乙酸异丙酯	0.78	ND	ND	ND
己酸甲酯	ND	0.13	0.16	0.14
棕榈酸乙酯	0.22	0.24	0.26	ND
安息香酸乙酯	0.72	0.66	0.51	0.62
苯乙酸乙酯	2.31	3.45	4.36	3.78
2-乙基丁酸烯丙酯	ND	0.57	0.61	0.59
2-羟基肉桂酸乙酯	0.62	ND	ND	ND
3-苯丙酸乙酯	ND	0.41	0.32	0.36
酮类	6.09	3.81	4.71	4.59
HEMF	2.12	2.36	2.42	2.38
2,3-辛二酮	ND	ND	0.46	0.41
3-羟基-2-丁酮	0.26	ND	ND	ND
1-羟基-2-丙酮	0.61	0.43	0.52	0.45
苯乙酮	0.98	0.45	0.39	0.42
4-羟基-苯乙酮	ND	ND	0.28	0.32
4-辛稀-3-酮	2.12	0.57	0.64	0.61
醛类	9.83	7.16	7.92	7.37
己醛	0.63	ND	ND	ND
2-甲基丙醛	0.21	1.69	1.71	1.72
苯甲醛	0.82	1.53	1.61	1.56
2-苯基-2-丁烯醛	0.1	ND	ND	ND
苯乙醛	0.54	0.84	0.89	0.83
2-甲基丁醛	0.63	1.58	1.93	1.72
2,6-二甲基苯甲醛	3.89	ND	ND	ND
5-甲基-2-苯基-2-己烯醛	0.16	0.63	0.71	0.69
3-(2-呋喃)-2-丙烯醛	0.42	ND	ND	ND
糠醛	0.28	ND	0.16	ND
3-甲硫基丙醛	2.15	0.89	0.91	0.85
酸类	27.11	32.9	32.79	33.28
乙酸	14.35	17.32	18.09	17.72
丙酮酸	1.82	2.45	2.98	2.66
异丁酸	ND	4.01	3.87	3.99
2-甲基丙酸	1.02	ND	0.51	0.48
3-甲基丁醇酸	ND	1.88	1.76	1.86
2-甲基丁酸	2.98	3.96	2.76	3.94
丁酸	6.94	3.28	2.82	2.63
酚类	14.94	10.81	6.5	10.06
4-EG	2.38	3.45	3.56	3.48
4-乙基苯酚	1.93	2.06	2.12	2.09
苯酚	ND	0.49	0.52	0.45
1-萘酚	1.31	0.68	ND	0.83
丁香酚	ND	ND	0.21	ND
4-乙基-2-甲氧基苯酚	9.32	4.13	0.09	3.21
杂环类	1.26	1.61	2.14	1.54
2-乙酰吡咯	0.84	ND	0.31	ND
2-甲基吡嗪	ND	0.36	0.39	ND
2,6-二甲基吡嗪	0.42	0.59	0.61	0.58
7-乙氧-8-甲氧基-2,2-二甲基-2-氢-1-苯基吡喃	ND	0.66	0.83	0.96

醇类物质的气味使人感觉愉快,1-辛烯-3-醇具有浓郁的草药香气,可以使酱油的头香浓郁^[18]。3-甲基硫基丙醇含量虽低,但是在低浓度时便可以产生浓郁的肉汤香味,丰富了酱油的风味特征^[19]。这些物质在JY7发酵酱醪中含量较高,再加上苯乙醇本身就具有花草和水果的香气,各种醇类物质相互协调,使酱油的风味浓郁独特。酯类是由醇与酸发生酯化反应形成的物质,酯类香味柔和。扩散较快,容易使人发觉。如乙酸乙酯和乳酸乙酯,这使得酱油的香气浓郁而醇厚。酯类还有增强其他化合物香气的作用。酚类中的4-乙基愈创木酚(4-EG),这种物质特有的烟熏和酱香风味,香气活性强,对丰满酱油的特殊风味有较大作用,是提高香风味的关键物质。各种不同类型的化合物共同作用,相互协调,从而构成了独特醇厚的酱油香气。

3 结论

本实验针对酱油发酵的主要菌种酵母菌进行分离,筛选出耐盐耐高温的菌种,并结合其生理生化特性和26S rDNA对筛选出的酵母菌经行鉴定,JY-7为鲁氏结合酵母,JY-3与假鲁氏结合酵母亲缘关系较近。

通过顶空固相微萃取,气相色谱-质谱联用分析JY-7发酵酱油的挥发性成分。分离出七大类共48种挥发性物质。并与安琪酵母进行比较,发现JY-7明显优于安琪酵母。

参考文献

- [1] 谢韩,丁洪波. 添加耐盐酵母改善低盐固态酱油风味[J]. 江苏调味副食品, 2002(4):6-7.
- [2] 王春玲,刘卓,曹小红. 耐盐酱油酵母产香气成分的动态分析[J]. 中国酿造, 2008(5):16-19.
- [3] 程建华,李世杰. 低盐固态发酵添加酵母提高酱油乙醇含量的探讨[J]. 中国调味品, 1989(4):14-17.
- [4] Kreger-van Rij, Groningen N Y W. The yeasts: a taxonomic study. Third revised and enlarged edition[M]. The Netherlands: Elsevier science publishers B.V, 1984.

- [5] 巴尼特,佩恩,亚罗. 酵母菌的特征与鉴定手册[M]. 山东: 青岛海洋出版社, 1991.
- [6] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [7] 白逢彦,贾建华,梁慧燕. 假丝酵母属疑难菌株大亚基rDNA D1/D2区域序列分析及其分类学意义[J]. 菌物系统, 2002, 21(1): 27-32.
- [8] THOMPSON J D, HIGGINS D G, GIBSON T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position, specific gap penalties and weight matrix-choice[J]. Nucleic Acid Res, 1994, 22(22):4673-4680.
- [9] 张阳德. 生物信息学[M]. 北京: 科学出版社, 2004.
- [10] 中华人民共和国卫生部. 中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.7-2008 中国标准书号[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [11] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB 18186-2000 酿造酱油中检测方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2001.
- [12] 上海酿造科学研究所. 发酵调味品生产技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- [13] 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(2):1-5.
- [14] 李大锦,王汝珍. 提高低盐固态发酵酱油风味的使用技术[J]. 中国酿造, 2006(8):26-30.
- [15] 王金英,孙瑾方. 酱油发酵酵母和后熟酵母原生质体电融合的研究[J]. 中国酿造, 1994(7):17-18.
- [16] 李丹,崔春,王娅琴,等. 高盐稀态酱油酿造过程中蛋白质降解规律的研究[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(9):24-28.
- [17] 大连轻工业大学等合编. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994.
- [18] 王林祥,刘杨岷,王建新. 酱油风味成分的分离与鉴定[J]. 中国调味品, 2005(1):45-48.
- [19] 冯杰,詹晓北,周朝晖,等. 两种膜过滤产生的纯生酱油风味物质比较[J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29(1):33-39.

(上接第181页)

- [26] 柴秋儿,张中义,刘萍,等. 植物乳杆菌转化生成CLA的研究[J]. 食品科技, 2005, 31(4):9-12.
- [27] 要萍,张伟,周珊,等. 运用顶空固相微萃取技术分析宣威火腿中的挥发性化合物[J]. 食品科学, 2003, 29(10):1-5.
- [28] Forss D A. Odor and flavour compounds from lipids[J]. Prog Chemistry Fats and Other Lipids, 1972(3):181-258.
- [29] Olivares A, Navarro J L, Flores M. Establishment of the contribution of volatile compounds to the aroma of fermented sausages at different stages of processing and storage[J]. Food Chemistry, 2009, 115:1464-1472.
- [30] Casaburi A, Blaiotta G, Mauriello G, et al. Technological activities of Staphylococcus carnosus and Staphylococcus simulans

- strains isolated from fermented sausages[J]. Meat Science, 2005, 75(5):643-650.
- [31] Stahnke L H. Dried sausages fermented with Staphylococcus xylosus at different temperatures and with different ingredient levels-Part II Volatile components[J]. Meat Science, 1995, 41(2):211-223.
- [32] Perez M, Flores M, Toldra F. Effect of pork meat proteins on the binding of volatile compounds[J]. Food Chemistry, 2007, 108: 1226-1233.
- [33] Berdague J L, Montel P, Montel M C, et al. Effects of starter cultures on the formation of flavour compounds in dry sausage[J]. Meat Science, 1993, 35(3):275-287.