

4. 核酸系调味物质的添加

在目前的酿造酱油中确实尚未检出肌苷酸这一类呈味核酸物质, 将来理想的酿造方法确立之后, 必然会产生这些成分的, 目前只好采用添加的方法, 使其与酱油中所含谷氨酸发挥相乘作用。酱油在制曲过程中本来产生了核酸, 但在制醪发酵过程中为酶所分解, 从酱醪中所分离出的嘌呤、嘧啶等碱基就是很好的证明。这些核酸分解物对酱油质量几乎没有直接作用。现在的酱油酿造技术对核酸的利用来讲几乎是等于零。理想的酿造方法应该是将制造过程中所生成的核酸进行转化, 使之成为肌苷酸、鸟苷酸, 这样就可以大大提高酱油的鲜味, 在这技术未得到解决之前, 添加肌苷酸等增强酱油鲜味就是很自然的事。经过实践已有不少酱油是添加核酸系调味品的, 而且博得好评。现在就其有关事项加以介绍, 对生产强化酱油或有所裨益。

目前常用的是: 味精、5'-肌苷酸(5'-IMP)及5'-鸟苷酸(5'-GMP), 后二者在味的性质上基本相同, 均有加成性, 从味的强度来讲, 5'-GMP要强些。其钠盐的阈值, 5'-IMP为0.012%, 5'-GMP为0.0035%, 二者单独也好, 共存也好, 与谷氨酸钠发挥相乘作用。如表3所示, 味精与5'-肌苷酸二钠盐的种种配比混合物的鲜味纯度。如以单位重量表示时, 1:1混合物的鲜味就为单独味精的7.5倍。

如果添加于生酱油或加热不完全的熟酱油, 常常发生鲜味锐减或消失的现象, 这是由于酱油中存在的磷酸酶(Phosphatase)及N-核糖苷酶(N-reboscicase)将其分解的缘故。这两种酶中, 前者的分解作用最强, 也是酱油中分解核酸系调味物质的主要酶。这种酶不是单一的, 由3种不同最适pH的酶所组成, 其混合比例因酱油种类而不同, 其最适pH分

别为pH4、pH5、pH6。这三种磷酸酶的耐热性不同, 最适pH5的较其它两种耐热性强, 在80°C温度下三者就都失活。至于N-核糖苷酶的失活温度较低, 为70°C、是一种切断核糖与碱基部分之间N-核糖苷的酶。其最适pH在4附近。所以一般加热至80~85°C的酱油, 由于这些酶都已失活, 所加核苷酸调味物质就可以保持其助鲜作用, 请参考图16。

表3 味精与5'-肌苷酸混合物的鲜味强度(相对值)

MSG, 5'IMPNa ^a 混合比 (味精)	混合单位重量的鲜味强度
1:0	1
1:2	6.5
1:1	7.5
2:1	5.5
10:1	5.0
20:1	3.4
50:1	2.5
100:1	2.0

a) 干燥减量265%

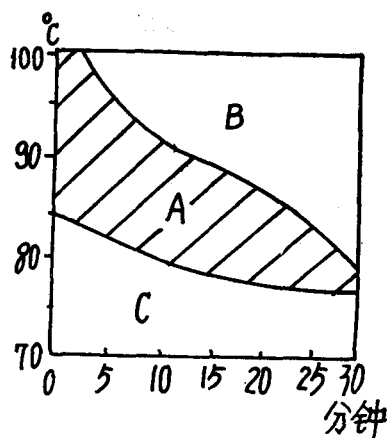


图16 酱油加热条件及质量与核酸分解酶活性的关系

- A, 不损害酱油香气, 而使核酸分解酶失活的条件
- B, 损害酱油香气条件
- C, 仍有核酸分解酶活性条件

IMP、GMP很易溶于水, 但不易溶于酱油。因此需要先将其溶于水, 或作成酱油的饱和溶液。其具体作法是: 作成20%水溶液或0.4%酱油溶液, 然后再补加些酱油, 调整酱油最终浓度至0.003~0.06%即可。

添加量因目的而不同。如为特级酱油可添加0.01~0.03%。全氮1.45%的酱油可将其含量降至1.25%，为了增加其鲜味可添加0.01~0.04%。含氮量再低的次等酱油，为了增加其鲜味以便使咸味柔和些，可加0.003~0.005%。总之，添加量的决定应记住与谷氨酸钠的相乘效果这一原则。

四 酶及酶制剂的应用与酱油的味

由于对酶的研究取得了莫大的进展，不仅知道了曲霉含大量的蛋白酶，其中包括两种碱性蛋白酶，两种中性蛋白酶和三种酸性蛋白酶外，还有大量的肽酶，包括四种羟基肽酶、三种氨基肽酶。谷酰胺酶也是曲霉的一种重要酶，它可以生成大量谷氨酸。这些酶直接影响着酱油的味。因此近年已有很多人从事其理论及追求富于这些酶的微生物的研究工作。

蛋白酶的强弱的确对大豆蛋白水解程度要求很高的酱油来说是非常重要的。近年来国内外都在采用种种方法选育蛋白酶强的菌株，并且取得优异成绩，使原料大豆蛋白水解率有所提高，例如上海所培育的3.042米曲霉就是目前广泛使用着的变异株，它的全氮水解率和氨基酸生成率都是较高的。为了提高酱油的味道，除设法充分发挥曲中这些酶的作用外，现在试图利用酶或其制剂加强大豆蛋白的水解的研究已相当多了。日本曾利用一种放线菌制成的蛋白酶制剂“Fronase”试制豆酱，发现蛋白酶活性很强，而分解成游离氨基酸的能力却很小；从另外一种放线菌所制的蛋白水解酶制剂Prozyme，可增加氨基酸的生成，其蛋白酶活性却不强。从担子菌种(*Basidiomycetes* sp)制成的酸性蛋白酶以及和酱油曲霉的混合蛋白酶就可以分解成大量的氨基酸。70年代我国即使用了1398细菌蛋白酶制剂加强曲霉的水解作用，提高了蛋白水解率，却由于氨基酸分解能力小而降低了氨基酸生成率，对酱油的鲜味并无显著提高，有时有些怪味，这主要是因为这种细菌的酶系中，含有较强的蛋白酶而缺少强的生成氨基酸的肽酶。

著者曾使用1398枯草杆菌中性蛋白酶制剂

先将脱脂大豆进行无盐水解，而后加入酱油曲霉进行发酵30天，可提高全氮水解率至84%，其风味优于低盐固态发酵酱油。总之，不用制曲而单独使用酶制剂生产酱油的工艺至今尚未研究成功。许多研究表明氨基酸生成率低，酱胶粘性大，风味不及曲法，成本较高，是不能取得工业生产的主要原因。

酱油的主要呈味成分是氨基酸及肽。其生成的种类和数量常因原料、原料配比而不同外，更因制曲微生物不同而异，其实质还是由于所生成的酶组成显著地影响了呈味成分。使用曲子以外的酶或酶制剂水解大豆蛋白时常常带有苦味，影响着酶的使用价值。这究竟是什么道理呢？一般地说，用具有强内断肽酶、弱端解肽酶的酶系，其水解产物常常带有苦味。利用日本市场上所销售的番瓜酶胃脘酶，Molsin Tassinase-B、Biopraxe等蛋白酶制剂，水解各种蛋白其水解液具有苦味，这就是由于生成了具有苦味肽的缘故。消除苦味肽的方法就是利用微生物中的羟基肽酶或氨基肽酶，游离其具有苦味的氨基酸，具有较强蛋白酶而不具有氨基肽酶或羧基肽酶或含少量这些肽酶的酶制剂，其水解液必带有味。日本产Pronase及pp-10酶制剂由于具有相当量的羧基肽酶及氨基肽酶，其水解液就具有鲜味。参考表4。因此认为凡端解肽酶活性小于内断肽酶的酶系就会使水解液呈现苦味。

用TassinaseB水解6种蛋白质，产生强烈苦味的肽。用具有强羧基肽酶、氨基肽酶的pp-10进一步水解，苦味的消失情况如表5所示，用TassinaseB水解所生成的肽的平均肽长度(Average peptic length; 以下略称APL)为5~12，主要是由低分子肽所构成，因而具有强苦味。以牛乳酪蛋白最苦，次为大豆蛋白、小麦谷蛋白。牛肉及鲤鱼肉的水解液的苦味就较弱，明胶几乎显不出什么苦味。这种差别可能是由于构成蛋白质氨基酸的种类及排列顺序不同所致。另一方面明胶的主要构成氨基酸为甘氨酸、丙氨酸等，难于生成苦味肽也是一个重要原因。总之，蛋白质水解液生成苦

表4 蛋白水解酶制剂

酶 制 剂	来 源	蛋白酶 v/mg	氨基 肽酶 v/g	羧基 肽酶 v/g
番瓜酶	番木瓜乳胶	130		
胃脘酶	小牛胃	80		
Molsin	高藤曲霉	36		
Tasinase-N	链霉菌属	80	15	0
Tasinase-B	纳豆芽孢杆菌	100	0	0
Biopraxe	枯草芽孢杆菌	10	0	0
pronase	灰色链霉菌	520	750	140
Prozyme	曲霉属	160	315	0
Takadiastase	曲霉	100		
pp-10	链霉菌属	10	540	340

味与蛋白质的种类有关。

肽酶pp-10是具有强端解肽酶，弱内断肽酶的酶制剂，它可以切断肽氮末端的亮氨酸、苯丙氨酸、C末端的亮氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸、赖氨酸、酪氨酸等与苦味有关的氨基酸残基，结果使苦味消失，增大鲜味。其平均氨基酸残基数在2~4，明显地表示出蛋白质都分解为低分子肽或氨基酸了。

用TasinaseB先进行脱脂大豆蛋白水解，可得到全氮3.6 mg/ml（相当于原料全氮的88%），氮氮0.48mg/ml，平均肽长度7.5的水解液；再用pp-10进一步水解，最后得全氮3.7mg/ml（相当于原料全氮的90%），氨基态氮1.54（氨基酸生成率为40%），平均肽长度2.4的水解液，但所生成的氨基酸中，呈味重要成分的谷氨酸、天门冬氨酸、丙氨酸较少，是其缺点。由此也可看出，在判定菌种或制曲的质量，测定端解肽酶的重要性了。

由于很多酶制剂，主要是细菌和放线菌等蛋白水解酶的水解产物风味不佳，或产生一种苦味，这一现象更明显地表现在用蛋白酶制剂的迅速水解。大豆的蛋白酶水解物中具有(丙、精、天冬、甘、缬)-谷-酪-苯丙-亮结构的肽是有苦味的，与羟基肽酶作用之后，生成大量游离苯丙氨酸和亮氨酸，苦味也就消失，这种羧基肽酶存在于宇佐美曲霉、黑曲霉、米曲霉、微紫青霉、绳状青霉、齿孢青霉、草酸青霉等，分布较广。

酱油曲制成酱醪后，可溶性氮的成分增长较快，呈味性氨基酸的生成则缓慢，只有在后期才明显地增长，在这时期借中性蛋白酶I、II以及酸性羧基肽酶、氨基肽酶等类的协同作用，才能形成酱油的鲜味和风味。至于固态发酵，氨基酸的生成则较快，尤其是大水型的酱醪，这主要是由于菌体自溶的结果，这个问题将在下面专项探讨。

表5 水解液及用pp-10肽酶进一步水解后的滋味

原 料	TasinaseB 水解			PP-10 水解**		
	APL	苦味	适口	APL	苦味	适口
酪蛋白	7.7*	5.0	1.0	3.2	0.5	3.5
大豆蛋白	8.9	4.0	1.5	3.8	0.5	3.5
小麦谷蛋白	11.9	4.0	1.5	3.6	0.5	3.0
明胶	7.3	0.5	1.0	4.0	0	3.0
牛肉	5.8	2.0	3.0	2.3	0	4.0
鲤鱼肉	5.5	2.0	3.0	3.0	0	4.0

* T.N/NH₂-N **3.2Apase U/g水解液，pH8.0，45°C，6小时

五 菌体自溶与酱油的呈味

在良好环境生长的微生物利用其生成的各种酶水解其周围的基质，不断地合成新的物质构成新的菌体，进行着正常的繁殖。另一方面遇到营养不足、氧气供应不足，高温、生化学的抑制剂或有机溶媒等不良环境时，生成马上停止，菌体成分就开始为其本身所生成的酶所分解，变成可溶成分而溶于体外，于是菌体就成为空壳，一般称此现象为自溶，也叫作自己消化。

菌体的自溶并不限于霉菌，在酵母、细菌等也是常见的现象，在氧不足的条件下最易发生自溶。酱油醪在熟成过程中必然发生。由于菌体成分溶解出来，对产品的味道上起很大的作用。米曲霉在比较高的温度下自溶很快，在pH6，45°C条件下1~3天就完全地自溶。若在30°C则须5~7天。这时菌体内核酸80~90%，蛋白的75%及20%的糖分就分解溶出菌体外。在10°C七天内也未见有明显的自溶现象。自溶发生后，核酸最后发生脱磷酸、脱氮作用而变

成尿核甙(28%)、6-羟基嘌呤(17%)，黄嘌呤(24%)。蛋白质60%变成游离氨基酸，15%变成肽。糖分的分解产物的平均重合度为1.1~1.4，单体则有葡萄糖、葡糖胺、核糖等。酱油是采取全部制曲酿造方法的。而且一般制成菌丝生长非常旺盛，制醪后这些菌丝及孢子的自溶产物就必然进入成品中，另外还有些未知成分可能影响更大。减曲所制成的酱油，在一般组成成分上与全曲酱油无差别，但在风味上却不如全曲酱油那样浓厚。这与菌体自溶产物在量上有显著差别所致可能性是很大的。古桥等人曾仿制酱醪的情况进行了菌丝及孢子的自溶典型试验，结果菌体的主要成分能溶出70~100%，干物量67.20%、氮成分74.80%、碳水化合物81.70%、核酸97.50%。孢子也同样自溶，只是溶出物较菌体要少些，其主要成分的溶出率如下：干物量55.38%、氮成分66.32%、碳水化合物53.29%、核酸89.80%。其胞外酶的消化很弱，只不过是胞内酶的1/5~1/10而已。

酱油曲霉菌体的含氮成分如表6所示，全氮相当于脱脂大豆，脱脂大豆含谷氨酸较高，但经过自溶后的溶出成分如表7。从所得数据可知，脱脂大豆被酶作用之后，全氮的溶出率很好、为80~90%，而全谷氨酸的溶出只不过35%而已。与此相反，菌体内含氮成分中，全氮相当高，溶出者占65%左右，游离出的谷氨酸较脱脂大豆要多，绝大多数成游离谷氨酸溶解出来。由此可看出菌体自溶后含氮成分的优越性在于高含量的游离谷氨酸，对酱油的风味起着非常重要作用是不容怀疑的。

以上试验是在食盐水中进行的。食盐水的渗透压对菌体的自溶是否有促进作用，蒸馏水作对照，结果是二者几乎无差别，因而认为菌体的自溶成分多少与食盐无关。

有盐固态发酵温度一般在40~45℃，这一温度正好是菌体自溶的最适温度，而且是在缺氧条件下进行，更促进了自溶，酱油醪的pH在6附近，就更适合于核酸的分解而生成大量呈味性很强的5'-核苷酸及氨基酸，无盐固态

表 6 酱油曲霉菌体与酱油原料含氮成分

试 样		全氮 (%)	全谷氨酸 (%)	游离谷氨酸 (%)
干燥菌体 (静置培养五天)	K.S	7.688	3.63	1.30
	R96V	8.363	4.49	1.20
酱油原料	脱脂大豆	7.493	7.06	0
	小 麦	2.088	3.08	0
	麦 麸	3.444	3.18	0

表 7 溶 出 成 分 比 较

		全氮 溶出率 (%)	游离谷氨 酸生成率 (%)	氮 氮	谷	谷
				全氮	全氮	氮氮
干菌体(K.S)		67.4	86.9	55.9	9.77	17.5
干菌体(R96V)		—	—	56.4	7.47	13.2
脱脂大豆	液体曲滤液	90.2	35.5	48.5	4.08	8.4
	固态曲浸出液	81.7	23.4	35.8	3.00	8.4
酱油醪汁(对照)		77.8	52.1	40.6	6.08	15.0

发酵的温度虽高些，一般在50~60℃之间，随着蛋白水解的进行，菌体及孢子的自溶也在进行，并且释放出胞内酶与胞外酶共同促进了介质及菌体的水解，起到相乘作用。固态发酵的温度虽高，酵母及乳酸菌的生长是很难的，因此基本上没有酒精发酵及乳酸菌发酵，所以也就缺少由于这些发酵所产生的香气，实际上固态发酵掌握得好时仍有一种酱香气味，认为这与微生物菌体的自溶是有密切关系的。

六 恶化酱油风味的非正常工艺

1. 追求色素的非正常工艺

以前焦糖色是普遍应用于酱油及食醋工业的，并且有固体焦糖色在市场销售，1975年商业部在全国调味品产销会议上决定酱油不得加用焦糖色之后，为了满足消费者对色泽的要求，有些厂采取了较高制曲温度，减少制醪用水量、提高发酵温度、延长发酵时间、翻倒酱醪，供给氧气，这些措施的任何一项都可以促进褐变反应的进行。措施的并用就会使褐变反应加速进行，不单是色素在量上的增加，而且是褐变色素继续缩合生成色调发黑的高分子化合物，亦即向褐变深度进行。从感官上讲色调发黑，缺乏红色感，甚至于带有苦味，这就是

过度变褐,结果损耗了大量氨基酸,降低了鲜味成分,并使产品带有焦糊味道,这就是追求色素的不正常工艺,恶化酱油风味的例证。无盐固态发酵法目前在我国广大县级或公社级酱油厂普遍采用,最严重存在的问题是为了生成浓厚色素,采取小水型拌水量,发酵温度甚至提高到70°C,将营养价值大而价昂的氨基酸变成毫无营养价值的色素,不惜破坏酶活,严重过度褐变;产品毫无鲜味可言,且有焦糊气味,至为可叹!著者迫切希望采用中水或大水型的拌水量,发酵温度宜控制在不发生酸败的最低限,前期40°C、12小时,中期45°C、20小时,后期50°C、24~36小时。这样鲜味很大,色泽虽浅些,根据情况可加些焦糖色,还是合算的。

我们仔细观察和分析发酵过程中的色、香、味三者之间的变性情况,可以发现它们之间是有一定矛盾的,但是可以统一起来的,统一之后的工艺就是合理的、科学的,所得产品就是优质的。在制醅后的初期,由于曲子中酶——蛋白酶、肽酶、谷酰胺酶的作用,大豆蛋白变成肽及各种氨基酸,在无盐发酵大约是36小时(也可能因制醅条件而时间不同),滋味最鲜,也是在整个发酵期内最高的时候。但是色泽非常浅,而且没有酱油的香气、而带有曲香气味。与用酶制剂水解大豆蛋白的风味非常相似以后则色泽变浓,也具有了酱油香气,但鲜味却有所降低,所以色的形成是要损失一部分氨基酸的这点请参考载于食品科学 No1.81 年拙著《酱油色泽的生成与工艺》一文。但为了酱油香气及适当的色的生成,这部分氨基酸的损失也是不可避免的。酱油的质量虽然说是色、香、味三方面,但毕竟是调味品,而不是着色剂或香料,如果过多地强调色,采取上述加强色泽的措施,损失了大量氨基酸,甚至发生苦味,实际是扩大了色与味之间的矛盾,从经济 and 合理使用资源来讲,添加些使用淀粉制成的焦糖色的作法是合理的,这样也就解决了色和味之间的矛盾,因此著者主张用中水量、低限发酵温度的发酵法,以取得最佳味及香气的产品,至于色可以添加适量焦糖色加以解决。

2. 恶化酱油风味的微生物

当酱油醪盐度低于15%以下时,就有产膜酵母增殖的可能性,虽然不一定使谷氨酸及天门冬氨酸减少,但要消耗酱油中的糖分以及酒精。产膜酵母增殖迅速,常常由于菌体自溶而产生恶臭,破坏了酱油的正常香气,味道变坏。恶性产膜酵母系嗜氧性微生物,可进行翻拌,遮断空气以抑制其繁殖。这里必须注意新制成的酱油在夏季放置4~5天后有时表面发白,严重时会长成薄膜。但这不一定是恶性产膜酵母,即过去所说的沙拉沙结合酵母(*Zygosaccharomyces salisus*)或日本接合酵母(*Zygosaccharomyces japonicus*),有时是鲁氏酵母,它不仅进行底面发酵,有时根据酱油情况出现于表面;因此它的增殖,并不产生恶臭、有时还产生香气,可以取样进行培养鉴定。不可误认为是恶性产膜酵母,不断打耙,断绝空气进行抑制,这样会导致搅拌过度停止发酵。至于固态发酵由于在发酵时酱油表面有一层盖面盐,而且发酵温度较高,是不会污染恶性产膜酵母的。

谷氨酸可被含脱羧酶的微生物,如大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)、威氏梭菌(*Clostridium welchii*)、红酵母(*Rhodotorula glutinis*)、乳酸杆菌(*Lactobacillus*)等将L-谷氨酸变成L-氨基丁酸,脱羧酶的最适pH为5.0,当酱油生产环境不好、卫生管理失当时,会被大肠杆菌或某些梭菌等所污染,引起谷氨酸及天门冬氨酸的脱羧而减少。因此搞好环境卫生、预防杂菌的污染也是保证酱油香气或呈味成分的重要因素。

参 考 文 献

- [1] 加藤等,《味噌技术》113(1963)
- [2] 江口,《酿协》72(4)250(1977)
- [3] 杉本,《滋味》,第6号(昭和49年)
- [4] 包启安,《调味副食品科技》12.3(1981)
- [5] 坂口,《野田酱油(株)研究报告》第七辑1963.
- [6] 今井等,《调味科学》,13(6)7(1966)
- [7] Yamamoto, S, et al, J.《Ferment. Technol.》,52, 564(1974)