

传统发酵蔬菜汁中一株酵母菌的鉴定及其凝固豆乳机理的研究

杨佐毅¹, 李 理²

(¹广东工业大学环境科学与工程学院, 广东 广州, 510006; ²华南理工大学食物蛋白工程研究中心, 广东 广州, 510640)

摘 要:对传统发酵蔬菜汁中筛选出的酵母菌 SCY1 进行了豆乳凝固条件与机理的研究, 经生理生化、分子生物学鉴定该菌株为酿酒酵母属, 将其接种于豆乳中可在发酵 7 h 后发生凝固, 最佳凝固温度为 35℃, 最佳初始 pH 值为 6.2。采用 HPLC 对微生物凝乳的测定表明, 凝固的豆乳中乳酸和醋酸含量分别为 0.099% 和 0.098%, 而采用合成底物测得菌株的内肽酶活力不高。研究表明酵母菌 SCY1 凝固豆乳的机理主要为产酸凝乳, 内肽酶对凝固豆乳的风味形成可能起到促进作用。

关键词:发酵蔬菜汁; 酵母菌; 凝固豆乳; 内肽酶

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2008)04-0648-06

Identification of A Yeast in the Traditional Fermented Vegetable Juice and Its Soymilk-Clotting Mechanism

YANG Zuo-yi¹, LI Li²

(¹ Faculty of Environmental Science and Engineering, Guangdong University of Technology, Guangzhou, 510006; ² Research Center of Food Protein Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, Guangdong, China)

Abstract: The soymilk-clotting conditions and mechanism of the strain SCY1, isolated from the traditional fermented vegetable juice, were studied in this research. The strain was identified as *Saccharomyces cerevisiae* according to its biological, biochemical and molecular properties; and it can coagulate soymilk at 7 h after inoculation, the optimum soy-clotting temperature and initial pH value was 35℃ and 6.2. The concentration of lactic acid and acetyl acid in clotting soymilk were 0.099% and 0.098% (detected by HPLC), but little endopeptidase activities of the isolated strain were detected by the method of synthetic substrates. It was showed that the clotting mechanism of the strain SCY1 was mainly the effect of the organic acid, and the endopeptidase could contribute to the flavor of the clotting soymilk.

Key words: Fermented vegetable juice; Yeast; Soymilk clotting; Endopeptidase

在我国四川省北部等地采用萝卜缨、青菜、小油菜等蔬菜, 在密闭条件下进行厌氧发酵制取发酵蔬菜, 利用发酵蔬菜汁液作为凝固剂制得的豆腐酸味柔和、风味独特。大豆蛋白质可分为 2S、7S、11S 和 15S 四个组分^[1-2], 其中 7S 组分占大豆总蛋白质的 30.9%, 11S 组分占 41%。7S 是三聚体, 由 α 、 α' 、 β 三个亚基构成; 11S 为六聚体, 均为 A-B 型, A 和 B 分别是酸性和碱性多肽, 它们通过 S-S 键相连, 疏水氨基酸在其内部形成疏水区域, 外面被亲水外壳所包裹, 这些亚基之间又彼此结合形成复杂的四级结构, 因此豆乳的凝固是一个复杂的物理和化学过程。

豆乳的凝固剂包括盐类、酶类和酸类, 常用的盐

类凝固剂是盐卤(主要成分是氯化镁)、石膏(主要成分为硫酸钙)和氯化钙, 而微生物凝固豆乳主要是由于酶与酸的作用^[3-5]。目前豆乳凝固酶的研究多为从土壤中筛选的芽孢杆菌及其诱变育种, Yang 等^[4]首次从土壤中分离到一株豆乳凝固酶的产生菌 K-95 G 7, Yasuda 等^[5]将短小芽孢杆菌(*B. pumilus*) TYO 67 产生的豆凝乳酶纯化 30 倍后, 检测表明该酶为一单体, 分子量约 30 kD, 等电点 pH 9.75。而 Koo 等采用硫酸铵沉淀、葡聚糖凝胶、G25、G100、CM 凝胶、phenyl Toyopearl 等纯化手段, 证实青霉(*Penicillium sp.*)产生的豆乳凝固酶是由 24 kD 和 40 kD 的亚基组成^[6]。采用从传统发酵蔬菜汁中筛选得到一株酵母菌, 并对其凝固豆乳的条件和机理

收稿日期: 2008-02-18

基金项目: 广东工业大学博士基金资助项目(073018)。

作者简介: 杨佐毅(1976-), 男, 讲师、博士, 研究方向为环境生物技术。E-mail: yangzy2003@126.com。

进行了研究。

1 材料与仪器

1.1 样品与培养基

发酵蔬菜汁:从四川南充地区采集得到的农家传统制作的发酵蔬菜汁,样品保存于4℃冰箱中。采用的培养基主要有:(1)麦芽汁琼脂培养基:分别添加2%琼脂,8%的食盐制作无菌平板和试管斜面;(2)BUY培养基;(3)PDA培养基;(4)产蛋白酶培养基(1 000 mL):蛋白胨2.5 g,葡萄糖2.0 g,酵母膏1.0 g,豆浆50.0 g,食盐20.0 g,调pH6.2。

1.2 主要药品

Taq聚合酶,dNTPs,大豆,蛋白胨,牛肉膏,干酪素,丙烯酰胺,SDS(十二烷基硫酸钠),N,N'-甲叉双丙烯酰胺,Tris(三羟甲基氨基甲烷),TEMED(四甲基乙二胺),2-巯基乙醇,考马斯亮蓝G-250,pNA(对硝基苯胺),合成底物NBZ-Val-Glu-Ile-Asp-pNA,NBZ-L-Phe-pNA和NBZ-Gly-Pro-Arg-pNA,合成底物购自Sigma公司,其余试剂均为进口或国产的分析纯或生化试剂。

1.3 主要仪器

DC 300型光学显微镜,TC-25/H PCR仪,ECP3000三恒电泳仪,UVP凝胶成像系统,MJ-176NR果蔬榨汁机,JY92-II超声波细胞破碎仪,CR22G冷冻离心机,S22PC分光光度计,YXQ-SG46-280S手提式高压灭菌锅,无菌操作台,PXY-190S-A生化培养箱,Water3 1525高效液相色谱仪。

2 试验方法

2.1 酵母菌株的形态特征与生理生化鉴定

2.1.1 细胞形态学观察 取待鉴定菌株接种于麦芽汁培养基中和平板上,26℃培养3 d后观察结果,用高倍显微镜观察细胞形状和无性繁殖方式。

2.1.2 子囊孢子的形成 取生长旺盛的培养物接种于BUY培养基上,26℃培养3~5 d后开始涂片,显微镜下观察子囊孢子的形状及每个子囊内的孢子数。

2.1.3 假菌丝观察 取新鲜培养基画线接种于PDA培养基上,在其上盖上灭菌盖片,26℃培养3~5 d后,用低倍显微镜观察盖片下画线两边是否形成假菌丝。

2.1.4 葡萄糖发酵 取新鲜培养基接种于葡萄糖发酵管,26℃培养,每天观察结果,如能发酵葡萄糖

时,则在试管里面的杜氏管中有气体产生。

2.1.5 硝酸盐 新鲜培养基接种于硝酸盐同化培养基中,26℃培养1~3 d,每天观察其是否同化硝酸钾。

2.1.6 尿素分解 取新鲜培养基接种于尿素培养基中,26℃培养1 d后观察,培养基如呈红色,则为脲酶阳性;不呈红色则为阴性。

2.1.7 糖发酵 糖(蔗糖、蜜二糖、麦芽糖、乳糖、葡萄糖、半乳糖)发酵培养基。取新鲜培养基接种于糖发酵管,26℃培养,每天观察结果,如能发酵葡萄糖时,则在试管里面的杜氏管中有气体产生。

2.1.8 碳源及醇类同化 碳源(蜜二糖、乳糖、木糖、葡萄糖、蔗糖、海藻糖、半乳糖、麦芽糖、山梨糖、肌醇、乙醇)培养基。取新鲜培养基接种于各碳源培养基中,26℃培养,每天观察是否能利用各碳源。

2.1.9 明胶液化 以新鲜酵母菌穿刺接种于明胶培养基,26℃培养,如酵母菌明胶不起液化作用,则在20℃以下仍保持固态;如液化则在20℃以下不再凝固。

2.2 酵母菌株的分子生物学鉴定

2.2.1 引物设计 采用16S rDNA序列分析法对分离菌株SCY1进行种属分类鉴定。16S rDNA引物序列如下:primer1:5'-TCC,TCC,GCT,TAT,TGA,TAT,GC-3'; primer2:5'-GGA,AGT,AAA,AGT,CGT,AAC,AAG,G-3'

2.2.2 PCR扩增 提取菌株SCY1的总DNA后,融解在适当体积的TE缓冲液中,置冰箱中备用。按以下反应条件扩增并设空白对照,空白对照应含有除模板核酸外的所有组分。每50 μL反应体积所含组分如下:在0.5 mL的离心管中加入下列成分:10×PCR buffer 5 μL,Mg²⁺(25 mmol·L⁻¹) 5 μL,10 mmol·L⁻¹ dNTPs 1 μL,上下游引物(10 pmol·L⁻¹)各1 μL,待检样品10 μL,Taq酶0.5 μL(5 U·μL⁻¹),加入ddH₂O将反应体积补足至50 μL。按下列程序进行PCR反应:Stage 1 94℃,5 min;Stage 2 94℃,1 min;30个循环(56℃,1 min;72℃,5 min);Stage 3 72℃,5 min。凝胶电泳检测:制备一块0.8%的琼脂糖凝胶,取扩增产物5 μL与1 μL Loading Buffer混合,点样后5 V·cm⁻¹电泳45 min,EB染色后于凝胶成像系统分析结果,并回收PCR扩增产物片段。

2.2.3 扩增产物测序 扩增产物送上海英骏生物技术有限公司进行测序。

2.2.4 Genbank 比对 将得到的碱基序列通过因特网在 Genbank 等国际核酸序列数据库内进行同源序列搜索 (blast search), 找出菌株与数据库中同源性最高的模式菌株或保藏于 ATCC 或 DSM 等国际菌种保藏中心的菌株。

2.3 分离菌株的性质

2.3.1 凝乳条件 豆乳制备: 取适量市售大豆淘洗后加两倍水自然浸泡 6~8 h, 再复加 6 倍于大豆干重的水 (豆水比 1:8), 用 MJ-176 NR 型榨汁机磨成糊状, 120 目筛网过滤分装, 121℃ 灭菌 15 min 保存备用, 豆浆终浓度约为 6 度, pH 6.7 左右, 保存于 4℃ 冰箱中备用。在 10 mL 灭菌后的豆浆中分别接入不同菌株, 在 20~60℃ 和初始 pH 6~8.5 的范围内恒温培养, 确定酵母菌株 SCY1 凝固豆乳的最佳温度和最佳初始 pH 值。

2.3.2 豆乳凝固机理 采用 pH 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 的磷酸缓冲液制作豆浆, 在 10 mL 灭菌后的豆浆中分别接入不同菌株, 在 37℃ 条件下恒温培养, 观察是否存在豆浆凝乳酶的作用; 分别在 10 mL 灭菌后的豆浆中加入 0.2%, 0.4%, 0.8%, 2%, 4%, 8%, 10%, 50%, 100% 系列浓度的乙醇 1 mL, 在 37℃ 条件下恒温培养, 观察乙醇对豆乳凝固效果的影响; 分别在 250 mL 的三角瓶中装入灭菌后的豆浆 30 mL, 采用 0.05 mmol·L⁻¹ 的乳酸溶液进行滴定, 观察乳酸对豆浆凝固的作用。

2.3.3 豆乳发酵中产乳酸和醋酸的检测 采用 HPLC 对豆乳发酵产物中的乳酸和醋酸作进一步检测, 将菌株 SCY1 接种到 10 mL 已灭菌的豆乳中, 在 37℃ 下恒温静置培养 48 h 后, 将发酵得到的稀软凝胶均质离心 (10 000 r·min⁻¹, 20 min), 取发酵产物用 4 mL 的 Eppendorf 管离心 (10 000 r·min⁻¹, 20 min, 4℃), 取上清液作为样品, 以 10 mmol·L⁻¹ 的 H₂SO₄ 溶液作为流动相, 通过 C18 RP 色谱柱 (5 μm, 3.9×150 mm) 洗提, 样品流速 1.0 mL·min⁻¹, 进样量为 10 μL^[7]。采用 HPLC 检测上清液中的乳酸和醋酸, 得到菌株 SCY1 的豆乳发酵产物中乳酸和醋酸的 HPLC 图谱, 对各图谱的峰面积进行积分, 然后查乳酸和醋酸的标准曲线, 得到各积分值对应的乳酸和醋酸浓度。

2.3.4 粗酶液制取 (1) 胞外粗酶液: 将分离菌株接入产酶培养基, 保持 40℃ 静置培养 7 d 后, 将发酵液离心 (4℃, 10 000 r·min⁻¹, 10 min), 取上清液作为粗酶液; (2) 胞内粗酶液: 将离心后的沉淀用 pH

8.0 的 Tris-HCl 缓冲液作用 6 h, 溶解和去除残留的大豆蛋白, 离心 (4℃, 10 000 r·min⁻¹, 30 min) 后悬浮于 pH 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液, 用超声波破碎细胞 (超声处理 10 次, 单次处理时间为 10 s, 间隔时间 15 s), 然后进行离心 (4℃, 10 000 r·min⁻¹, 10 min), 上清液在含有 10% 甘油的缓冲液中 (pH 7.0) 透析, 将得到的粗酶液用 4 mL 的 Eppendorf 管分装, 保存于 4℃ 冰箱中备用。

2.3.5 蛋白酶活力测定 采用福林酚法 (国标蛋白酶活力测定法 ZBX 66030-87)。

2.3.6 内肽酶活力测定 (1) 合成底物配制 NBZ-Val-Glu-Ile-Asp-pNA, NBZ-L-Phe-pNA 和 NBZ-Gly-Pro-Arg-pNA 溶于甲醇中达到终浓度为 16 mmol·L⁻¹。(2) 内肽酶活力测定: 吸取 2.8 mL 磷酸缓冲液 (0.1 mol·L⁻¹, pH 7.0), 1 mL 移液枪吸取 0.1 mL 合成底物溶液和 0.1 mL 细胞抽提液 (浓缩发酵液) 共 3 mL 至 4 mL Eppendorf 管中, 对照样加 0.1 mL 双蒸水; 在 40℃ 条件下恒温反应 6 h, 每隔一定时间测定酶促反应释放出的 pNA 在 410 nm 处的吸光值; 同时作出不同酶液与合成底物在同样条件下反应的空白对照; 根据标准曲线计算释放出的 pNA 浓度; 取两种不同浓度的细胞抽提液 (浓缩发酵液), 测定酶活力求其平均值, 比活力为单位时间 (h) 单位质量 (g) 的酶蛋白水解的合成底物量 (mmol)。(3) 蛋白质含量的测定: 采用 Bradford 方法测定蛋白质, 考马斯亮蓝 G-250 在 2 min 内可与蛋白质结合, 在 595 nm 处具有最大吸收高峰, 其颜色的深浅与蛋白质含量成正比, 用牛血清白蛋白作标准曲线, 通过与标准曲线的比较可检测未知样品的蛋白质含量^[8]。

2.4 数据分析

采用统计分析软件 SPSS10.0 进行数据处理, 数据表示为两个或三个样品的平均值 ± 标准差, 均数的方差分析 (*F* 检验) 显著性为 *P* < 0.05。

3 结果与讨论

3.1 分离菌株的鉴定

3.1.1 生理生化鉴定 采用光学显微镜对传统发酵蔬菜汁中分离出的菌株 SCY1 的形态特征进行观察, 得到的显微照片如图 1 所示。菌株 SCY1 的形态及部分生理生化特征测定结果表明, 细胞为椭圆形至卵圆形, 细胞为芽殖 (一端芽殖), 平板菌落为乳白色, 圆形, 中间突起, 边缘整齐, 子囊孢子为圆形

或卵圆形,每一子囊内有 1~8 个子囊孢子,观察未发现假菌丝形成,可发酵葡萄糖,硝酸盐和尿素分解实验结果为阴性,根据这些形态特征和生化实验结果查《真菌鉴定手册》和《酵母菌的特征与鉴定手册》可知菌株 SCY1 与酵母属中的酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)最符合。

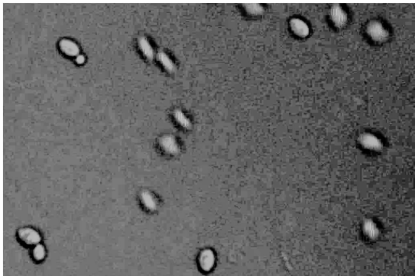
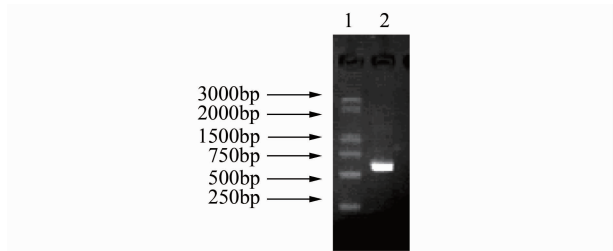


图1 分离菌株 SCY1 的照片
Fig.1 Micrograph of the isolated strain SCY1



1. DNA Ladder;2. 16S rDNA 的电泳产物
1. DNA Ladder;2. PCR product of 16S rDNA

图2 菌株 SCY1 的 16S rDNA 的 PCR 扩增电泳图
Fig.2 The agarase gel electrophoresis of the PCR product of 16S rDNA from the strain SCY1

3.1.2 16S rDNA 分子鉴定 将菌株 SCY1 进行 PCR 扩增与测序,将菌株的 16S rDNA 序列用 blast 软件与 Genbank 中已报道的 16S rDNA 序列进行同源性比较,找出与数据库中同源性最高的模式菌株或保藏于 ATCC 或 DSM 等国际菌种保藏中心的菌株。菌株 SCY1 的 16S rDNA 的 PCR 扩增电泳图如图 2 所示。将菌株的 16S rDNA 序列与 Genbank 中已报道菌株的同源性比较,结果表明菌株 SCY1 与 *Saccharomyces cerevisiae* (Genbank: AY130313.1) 具有最高同源性达 100%。根据分子鉴定及形态观察和生理生化鉴定结果得出菌株 SCY1 为酿酒酵母属,命名为 *Saccharomyces cerevisiae* SCY1。

3.2 菌株凝乳条件

温度和 pH 值不但能影响微生物的生长,而且影响微生物产生代谢物质,设计确定菌株凝固豆乳

的最佳温度和 pH 范围。酵母菌 SCY 接种到豆乳中,在最佳温度 35℃、最佳初始 pH 6.2 条件下,在 7 h 时豆乳发生凝固。在低于 20℃ 和高于 50℃ 的培养温度下,菌株 SCY1 在 24 h 内无凝乳产生,说明该温度范围不适合微生物生长或产酸。

表1 温度和初始 pH 对菌株 SCY1 凝固豆乳的影响
Table 1 Effects of temperature and initial pH value to the clotting of soymilk

温度 Temperature/℃	凝乳时间 Soy-clotting temperature/h	初始 pH Initial pH value	凝乳时间 Soy-clotting time/h
20	10.0	6.2	7.0
25	9.5	6.7	8.0
30	9.0	7.0	8.5
35	7.0	7.2	8.0
40	8.0	7.5	8.0
50	-	8.0	9.5
60	-	8.5	11.0

3.3 凝乳机理

3.3.1 豆浆凝固酶活力检测 配制 pH 值分别为 7.0,8.0,9.0,10.0 的磷酸缓冲液,利用不同 pH 的缓冲液制作豆浆,分装于 10 mL 试管中 120℃ 灭菌 20 min,将各分离菌株分别接种于不同 pH 的试管中,在 37℃ 下培养 7 d,观察发现各试管中均未出现凝乳现象,表明豆浆凝乳酶的活力很低。

3.3.2 乙醇添加 分别在 10 mL 灭菌后的豆浆中加入 0.2%,0.4%,0.8%,2%,4%,8%,10%,50%,100% 系列浓度的乙醇各 1 mL,在 37℃ 保温,在 24 h 内并未观察到凝乳现象,说明酵母菌凝固豆乳并非由于其发酵产生乙醇的作用。

3.3.3 乳酸滴定 采用 0.05 mol·L⁻¹ 的乳酸溶液滴定豆乳,在 pH 达到 5.8 左右时豆浆即开始凝固,菌株 SCY1 凝固豆乳后检测到的 pH 范围在 3.52~5.82 之间。

实际上豆浆凝乳过程中蛋白质的絮凝变化相当复杂,生豆浆中水化膜和双电层的存在,使蛋白质粒子均匀稳定的分散在水里,形成以水为分散介质、以大豆蛋白质为主要分散相的乳状液,具有相对的稳定性。豆乳的凝固剂包括盐类、酶类和酸类凝固剂,传统豆腐的生产主要是在中高温下利用盐键的作用形成凝胶,在酶类凝固剂中,研究最多而且已进入实用阶段的是转谷酰胺酶。此外利用酸类凝固剂,例

如葡萄糖酸内酯(GDL)、醋酸、乳酸、柠檬酸、苹果酸等,也可使豆浆凝固,其作用主要是通过疏水键、二硫键的结合而形成凝胶态豆乳。在研究中利用微生物在较低温度下的产酸形成凝乳,主要是氢键和疏水相互作用起作用,结果表明菌株 SCY1 凝固豆乳主要由于发酵产酸的影响,因此凝胶的形成较为缓慢。

3.4 发酵豆乳中的乳酸和醋酸含量检测(HPLC)

菌株 SCY1 发酵产物的 HPLC 图谱见图 4,在保留时间 6.2 min 和 7.2 min 时,出现乳酸和醋酸的

OD₂₁₀吸收峰,其中 4.3 min 时出现的峰为流动相所致。对 GDL 的研究表明,当豆腐凝胶的 pH 值高于大豆蛋白的等电点(pH 4.5 ~ 5.0)时,在 GDL 产生葡萄糖酸的作用下,随着 GDL 浓度的增加使得大豆蛋白之间结合力加强,豆腐凝胶强度提高。HPLC 实验测定表明,菌株 SCY1 的豆乳发酵产物中,乳酸和醋酸的 OD₂₁₀积分值分别为 5.9 和 6.7 左右,SCY1 凝固的豆乳中乳酸和醋酸含量分别为 0.099% 和 0.098%,表明在发酵产物中有少量的乳酸和醋酸存在,它们对促进豆乳凝固和风味形成有着重要意义。

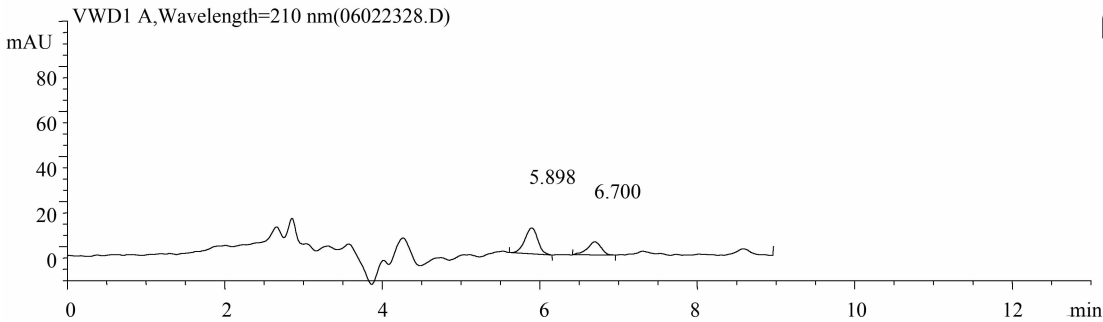


图3 菌株 SCY1 发酵产物的 HPLC 图谱
Fig.3 HPLC of lactic acid and acetic acid in soymilk curd

3.5 内肽酶活力测定

将酵母菌 SCY1 接入产酶培养基,保持 40℃ 静置培养 7 d 后,采用福林酚法测得酵母菌 SCY1 的蛋白酶活力仅为 11 U · mL⁻¹。采用合成底物 NBZ-Val- Glu- Ile- Asp- pNA, NBZ- L- Phe- pNA 和 NBZ- Gly- Pro- Arg- pNA 对酵母菌 SCY1 的发酵上清液与细胞抽提液中的内肽酶比活力进行了测定,结果见表 2。在酵母菌 SCY1 的细胞提取液中检测到微弱的内肽酶活力;测得豆乳发酵上清液对底物 NBZ- Gly- Pro- Arg- pNA 的内肽酶活力达到 0.0624 mmol · h⁻¹ · g⁻¹,而未检测到对合成底物 NBZ- Val- Glu- Ile- Asp- pNA 和 NBZ- Phe- pNA 的内肽酶活力。测定结果表明酵母菌 SCY1 的蛋白酶和内肽酶活力小,对大豆蛋白质的分解能力较弱。

表2 酵母菌 SCY1 的肽酶比活力测定

Table 2 Peptidase specific activities (mmol · h⁻¹ · g⁻¹) of *Saccharomyces cerevisiae* SCY1

合成底物 Synthetic substrates	细胞提取液 Cell-free extract	发酵上清液 Fermented supernatant
NBZ- Val- Glu- Ile- Asp- pNA	0.0202 ± 0.0023	未检测到 Not detected
NBZ- Phe- pNA	0.0183 ± 0.0015	未检测到 Not detected
NBZ- Gly- Pro- Arg- pNA	0.0228 ± 0.0017	0.0624 ± 0.0004

Baankreis 等^[9]报道了一种中性的寡肽酶在 β-酪蛋白的 193-209 片断(奶酪中的一种重要的苦肽)的降解中起着重要作用,而另一种碱性的内肽酶由于这种中性寡肽酶的酶活较高而受到抑制。内肽酶在大豆蛋白水解中同样扮演着重要的角色,它们对具有生理活性(例如抗氧化、降血压作用)的短肽的形成有重要作用。Macedo 等^[10]对 Serra da Estrela 奶酪中筛选出的乳酸菌的胞内肽酶水解系统进行测定,将酵母菌 SCY1 的内肽酶测定结果与上述测定结果比较,发现酵母菌 SCY1 对合成底物的内肽酶活力与乳酸菌相当。胞内酶尤其是肽酶释放之后对蛋白质的水解起到重要作用,它们的水解不但能使游离氨基酸的含量增加,而且疏水性多肽的水解能够使苦味值下降^[11]。因此尽管酵母菌 SCY1 的内肽酶活力不高,但其可对凝固豆乳的风味能起到促进作用。

4 结论

对传统发酵蔬菜汁中的一株酵母菌进行了分离和鉴定,生理生化与分子鉴定结果表明其为酿酒酵母属。酵母菌 SCY1 凝固豆乳的最佳温度为 35℃,最佳初始 pH 值为 6.2,采用 HPLC 对微生物凝固豆

乳的测定表明,酵母菌 SCY1 凝固的豆乳中乳酸和醋酸含量分别为 0.099% 和 0.098%。内肽酶测定结果表明酵母菌 SCY1 的蛋白酶活力不高,表明酵母菌 SCY1 凝固豆乳的机理主要是产酸凝乳,但内肽酶对促进豆乳风味形成可能起到促进作用。

参考文献

- [1] Silvana P, Anon M C. Soy protein isolation components and their interactions[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995, 43:1762-1767.
- [2] Fukushima D. Internal structure of 7S & 11S globulin molecules in soy protein[J]. Cereal Chemistry, 1968, 45:203-244.
- [3] Li L, Yang Z Y, Yang X Q, et al. Debittering effect of *Actinomucor elegans* peptidases on soybean protein hydrolysates[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2008, 35(1), 41-47.
- [4] Park Y W, Kusakabe I, Kobayashi H, et al. Production and properties of a soymilk - clotting enzyme system from a microorganism [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1985, 49 (11) : 3215-3219.
- [5] Yasuda M, Aoyama M, Sakaguchi M, et al. Purification and characterization of a soybean- milk- coagulating enzyme from *Bacillus pumilus* TYO- 67 [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 51 (4): 474-479.
- [6] 蒋咏梅, 章文贤. 豆乳凝固酶的研究概况[J]. 微生物学通报, 2003, 30(2): 78-81. (Jiang Y M, Zhang W X. The survey on the research of soymilk- clotting enzyme [J]. Microbiology, 2003, 30 (2): 78-81.)
- [7] Enikő T, Victor G M, Boglárka K, et al. Determination of organic acids and their role in nickel transport within cucumber plants[J]. Microchemical Journal, 2000, 67: 73-81.
- [8] Bradford M M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye-binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254.
- [9] Baankreis R, Schalkwijk S, Altling A C, et al. The occurrence of two intracellular oligoendopeptidases in *Lactococcus lactis* and their significance for peptide conversion in cheese[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1995, 44 (3): 386-392.
- [10] Macedo A C, Vieira M, Poças R, et al. Peptide hydrolase system of lactic acid bacteria isolated from Serra da Estrela cheese[J]. International Dairy Journal, 2000, 10: 769-774.
- [11] Lortal S, Chapot- Chartier M P. Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese[J]. International Dairy Journal, 2005, 15: 857-871.

(上接第 647 页)

综合各生理指标及产量结果,对高油大豆来说,氮磷钾肥的适宜用量分别为 0.34, 0.80, 0.18 g · kg⁻¹ 土。

参考文献

- [1] 任红玉, 付薇, 崔振才, 等. 大豆品质与水分动态变化的关系 [J]. 东北农业大学学报, 2008, 39(1): 1-5 (Ren H Y, Fu W, Cui Z C, et al. Study on the relationship between quality and water at growth stages of soybean [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2008, 39(1): 1-5.)
- [2] 李合生, 孙群, 赵世杰. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000. (Li H S, Sun Q, Zhao S J. Experiment theory and technology of plant physiology and biochemistry [M]. Beijing: Higher Education Press, 2000.)
- [3] 陈煜, 朱保葛, 张敬, 等. 不同氮源对大豆硝酸还原酶和谷氨酰胺合成酶活性及蛋白质含量的影响 [J], 大豆科学, 2004, 23 (2): 143-146. (Chen Y, Zhu B G, Zhang J, et al. Effects of different nitrogens on activities of nitrate reductase, glutamine synthetase and seed protein contents in soybean cultivars [J]. Soybean Science, 2004, 23(2): 143-146.)
- [4] 刘鹏, 杨玉爱. 氮、磷、钾配施及其与钼硼配施对大豆产量的影响 [J]. 安徽农业大学学报, 2003, 30(2): 117-122. (Liu B, Yang Y A. Effect of N, P, K combined application and N, P, K, Bor Mo combined application on yield of soybean [J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2003, 30(2): 117-122.)
- [5] 许海涛, 王友华, 许波, 等. 氮磷钾优化施肥对高蛋白大豆籽粒及蛋白质产量的影响 [J]. 土壤通报, 2008, 39(1): 195-196. (Xu H T, Wang Y H, Xu B, et al. Effects of optimum N, P and K combination fertilization on grain yield and grain protein of a high protein content soybean [J]. Chinese Journal of Soil Science, 39 (1): 195-196.)
- [6] 曲建东, 高玉红, 牛俊义, 等. 施氮时期对地膜春小麦叶片衰老的影响 [J]. 麦类作物学报, 2007, 27(2): 323-326. (Qu J D, Gao Y H, Niu J Y, et al. Effect of nitrogen application stage on the index of leave senescence for spring wheat mulched with plastic films [J]. Journal of Triticeae Crops, 27(2): 323-326.)