

传统农家酱产蛋白酶菌株的分离及其在豆浆的应用

鲍捷, 任晓蕾, 郭宝松, 梁会朋, 林心萍, 张素芳^{*}

(1. 大连工业大学国家海洋食品工程技术研究中心, 大连 116034; 2. 大连工业大学食品学院, 大连 116034)

摘要: 豆浆富含植物蛋白, 但由于植物蛋白相较动物蛋白不易被人体吸收。利用产蛋白酶菌株发酵豆浆, 可将植物蛋白降解成多肽和氨基酸, 提高其消化吸收率。传统农家酱是以大豆为主要原料的传统发酵食品, 含有大量能够水解大豆蛋白的优良菌株。该研究从传统农家酱中分离到 8 株产蛋白酶的芽孢杆菌并用于豆浆处理, 处理后豆浆的可溶性肽含量显著提高, 其中菌株 BJ-20 处理效果最显著; 氨基态氮含量和水解度也有显著变化, 其中 BJ-6 处理后的豆浆最佳, 氨基态氮含量提高了 10.87%, 水解度为 23.49%。同时, 处理后豆浆的组织状态得到了明显改善。该研究丰富了豆类发酵菌种库, 提高了大豆蛋白利用率, 丰富了大豆产品种类, 为大豆保健产品开发提供参考及理论支持。

关键词: 农产品; 酶; 传统农家酱; 产蛋白酶菌株; 可溶性肽

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.202303161

中图分类号: Q939.9

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2023)-11-0266-08

鲍捷, 任晓蕾, 郭宝松, 等. 传统农家酱产蛋白酶菌株的分离及其在豆浆的应用[J]. 农业工程学报, 2023, 39(11): 266-273. doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.202303161 <http://www.tcsae.org>
BAO Jie, REN Xiaolei, GUO Baosong, et al. Isolation of protease strains from traditional soybean paste and their application in soymilk[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2023, 39(11): 266-273. (in Chinese with English abstract) doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.202303161 <http://www.tcsae.org>

0 引言

大豆是中国重要经济作物, 其中 2020 年辽宁地区大豆产量可达 3 008.1 kg/hm²^[1]。大豆中富含的大豆蛋白不仅可以作为添加剂改善食品起泡性^[2]、乳化性^[3]等功能特性, 还因其氨基酸组成与牛奶相近, 除蛋氨酸略低外, 其余必需氨基酸含量均较丰富, 可作为动物蛋白的良好替代品^[4]。与动物蛋白相比, 大豆蛋白的吸收利用率较低, 需经过水解成大豆多肽或氨基酸, 才能提高其消化吸收效率^[5]。此外, 经过水解的大豆蛋白溶解性、稳定性等功能特性也明显提高^[6]。目前常用的大豆蛋白水解方法有酸法水解、碱法水解和酶法水解, 其中酸碱水解法会对丝氨酸等氨基酸造成破坏, 营养成分损失大^[7], 还会伴随不良副反应, 不适用于食品加工。因此, 常选用酶法水解获取大豆多肽或氨基酸^[8], 该方法广泛应用于食品^[9]、工业^[10]等领域。

研究表明, 商业蛋白酶对底物的要求较高且生物利用度低, 水解后的大豆蛋白含有苦味, 商业蛋白酶并不完全适用于大豆蛋白的水解和加工^[11], 从大豆发酵产品筛选产蛋白酶微生物进行酶法发酵可有效解决这一问题。传统农家酱是以大豆为主要原料的传统发酵食品, 距今已有 2000 余年历史, 随着自然驯化, 其中菌株天然适合大豆食品的加工, 其经由炒制、制砖、发酵、下酱等多个流程制得, 具有浓郁豆香和独特风味^[12]。且因传统农家酱常以家庭为单位进行酿造, 所以根据发酵环境的不

同, 微生物种类丰富, 包括曲霉属 (*Aspergillus*)、乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 等^[13]。从传统农家酱中筛选具有蛋白酶活性的菌株, 对大豆蛋白适应性更强, 可提高大豆蛋白的水解效率, 增强人体对大豆蛋白的消化吸收, 具有很高的利用价值和良好的挖掘潜力。

本文从东北传统农家酱中筛选、分离出 8 株产蛋白酶菌株, 采用形态学和分子生物学方法进行菌株分类鉴定及抗生素敏感性、溶血性和吲哚试验等安全性评价, 并将 8 株产蛋白酶菌株应用于豆浆处理。分析了菌株发酵处理前后的豆浆中可溶性肽、氨基态氮、水解度 3 项指标的变化, 探讨了 8 株产蛋白酶菌株对豆浆中大豆蛋白的水解效果。以期大豆保健功能食品的开发提供潜在应用菌株及理论支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 材料

东北传统农家酱, 购自辽宁省抚顺市; 大豆, 购自北大荒旗舰店。

1.1.2 试剂

LB 培养基、哥伦比亚琼脂培养基、脱纤维羊血、蛋白胨水, 购自高科技工业园海博生物技术(青岛)有限公司; 引物 27F、1492R, 购自生工生物工程(上海)股份有限公司; Genview 琼脂糖, 购自 Genview Scientific Inc.; 茚三酮(化学纯), 购自大茂(天津)化学试剂厂; C₈H₅KO₄、CuSO₄、K₂SO₄、H₂SO₄、Na₂CO₃、NaOH、酚酞、甲醛溶液; 福林酚试剂、酪蛋白等, 购自索莱宝科技(北京)有限公司。大豆分离蛋白, 购自源叶生物(上海)科技有限公司。药敏纸片, 购自比克曼(湖南)生物科技有限公司。

收稿日期: 2023-03-23 修订日期: 2023-05-18

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32072185)

作者简介: 鲍捷, 研究方向为食品科学与工程。

Email: 20171083200845@xy.dlpu.edu.cn

^{*}通信作者: 张素芳, 博士, 教授, 研究方向为食品科学与工程。

Email: zhangsf@dlpu.edu.cn

1.1.3 培养基

产蛋白酶菌株筛选培养基: 培养基组分 A: 琼脂 40.0, 121 °C 灭菌 15 min, 趁热加入至平皿 (约至平皿高度的 1/8), 冷却至室温后放置牛津杯 (内径: 6 mm, 外径: 8 mm, 高: 10 mm); 培养基组分 B: NaCl 20.0, 胰蛋白胨 20.0, 酵母浸粉 10.0, 琼脂 40.0 (固体培养基), pH 值为 (7.0±0.1), 121 °C 灭菌 15 min; 培养基组分 C: 大豆分离蛋白 30.0, 90 °C 灭菌 5 min。培养基组分 B、C 混合后冷却至 50 °C 左右, 倒入放置好牛津杯的琼脂平皿中, 完全凝固后取出牛津杯;

溶血性验证培养基: 参照哥伦比亚琼脂培养基产品说明书配置;

稀福林试剂: 福林酚试剂 10 mL、去离子水定容至 20 mL。

1.2 仪器与设备

光学显微镜, 德国徕卡显微系统; PCR 仪, 美国伯乐公司; 水平电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; 凝胶成像仪, 以色列 DNR 公司; 全自动凯氏定氮仪, 欧莱博科学仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 菌株的筛选和分离纯化

称取豆酱样品 1 g, 用 5 mL 无菌水重悬, 将悬液进行倍比稀释, 取 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 三个稀释度液体各 100 μ L, 均匀涂布于 LB 固体培养基上, 37 °C 静置培养 12 h, 选择菌落数小于 300 的平板, 挑取不同形态的单菌落, 于 LB 固体培养基划线分离纯化 3 代, 直至获得纯培养。挑取单菌落接种于 LB 液体培养基中, 200 r/min、37 °C 培养至 $OD_{600}=0.6$ 。取 1.5 mL 菌液 12 000 r/min 离心 3 min, 取上清 10 μ L 滴加于产蛋白酶菌株筛选培养基加样孔内, 置于 37 °C 静置培养, 每 4 h 观察一次, 挑取透明水解圈直径最大的 8 株菌, 保藏备后续分析。

1.3.2 蛋白酶粗酶活的测定

将上述 8 株菌培养至 $OD_{600}=0.6$, 12 000 r/min 离心 3 min, 取上清参考国标 SB/T 10 317-1999 中的福林法, 测定菌株发酵上清液的碱性蛋白酶酶活^[14], 蛋白酶活力单位规定为: 以酪蛋白为底物, 每分钟催化生成 1 μ g 酪氨酸的酶量为一个活力单位 (U)。公式如下:

$$X = A \times K \times \frac{4}{10} \times n = A \times K \times \frac{2}{5} \times n$$

式中 X 为样品的酶活力, U/mL; A 为样品平行试验的平均吸光度; K 为吸光常数 ($K=97.59$, 实验室测定值); n 为稀释倍数。

1.3.3 菌株鉴定

1) 形态学鉴定

对筛选到的 8 株菌进行形态学和光学显微镜观察, 记录菌落大小、形状、质地、边缘、光泽和颜色等形态特征, 并采集显微图像。

2) 分子生物学鉴定

菌株基因组提取方法参考文献进行^[15]。16S rDNA PCR 扩增采用通用引物 27F 和 1492R^[16]。PCR 反应体系 (50 μ L): 2×Taq Master Mix 25 μ L, 上下游引物 (20 μ M) 各 1 μ L, 基因组模板 (50 ng/ μ L) 1 μ L, 灭菌水 23 μ L。

PCR 反应条件为 95 °C 预变性 3 min, 95 °C 变性 15 s, 55 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 次循环, 最后 72 °C 延伸 5 min。

取 4 μ L 的 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 条带清晰符合预期大小的扩增产物送至测序公司测序。测序结果在美国国家生物信息中心 (NCBI) 数据库中进行 Blastn。基于比对结果进行分离菌株分类鉴定。

1.3.4 菌株安全性试验

1) 抗生素敏感性试验

使用 K-B 纸片法对芽孢杆菌的抗生素敏感性谱进行了表征^[17]。冻存菌株用 LB 固体培养基活化两代后, 挑单菌落接种于 LB 液体培养基, 37 °C, 200 r/min 培养至 $OD_{600}=(0.6\pm0.1)$, 取 100 μ L 菌液均匀涂布在 LB 固体培养基上, 液体吸收完全后将抗生素药敏纸片贴于平板上, 保持纸片间的距离不小于 24 mm。静置培养 12 h 后测量并统计抑菌圈直径, 分析其是否耐药。评价等级: 耐药 R (≤ 5 mm), 中度敏感 MS ($< 5 \sim < 11$ mm) 或敏感 S (≥ 11 mm), 每组试验 3 个平行。

2) 溶血性试验

为评价 8 株菌的安全性, 进行溶血性试验^[18]。溶血素可以将红细胞破裂溶解, 形成溶血环, 许多细菌的致病性都与溶血特性相关。溶血性分为 α 溶血、 β 溶血与 γ 溶血, 前两者表现为有草绿色溶血环和完全透明溶血环, γ 溶血无溶血环即不溶血。筛选出的 8 株菌株在 LB 固体培养基上活化一代, 挑单菌落划线于溶血性验证培养基中, 在 37 °C 静置培养 18 h, 观察是否溶血, 以金黄色葡萄球菌 ATCC 25 923 作为阳性对照。

3) 吡啶试验

大豆中富含色氨酸, 产色氨酸酶的微生物能够分解其中色氨酸产生吡啶, 吡啶的产生通常伴随不良气味的产生, 影响食品风味^[19]。为进一步评价 8 株菌的安全性, 进行了吡啶试验分析^[20]。筛选出的 8 株菌株 LB 固体培养基上活化一代后, 挑单菌落接种蛋白胨水生化反应管, 置 37 °C 静置培养 18 h, 加入 Kovacs 氏靛基质试剂 8~10 滴, 同时设空白对照试验。观察试验结果, 如有吡啶存在, 呈现玫瑰红色, 判定为阳性反应; 滴加试剂后不变色为阴性反应。

1.3.5 产蛋白酶菌株在豆浆中的应用

1) 豆浆制作

取 200 g 已浸泡 10 h 的大豆, 加水至 1000 mL, 豆浆机研磨破碎后, 采用 0.3 mm 筛过滤豆浆于 100 mL 锥形瓶 (每瓶装 50 mL 豆浆) 中, 121 °C 灭菌 15 min。接种筛选获得的产蛋白酶菌株, 接种前活化两代, 调节菌液浓度至 OD_{600} 值为 0.6, 1% 接种量接种于豆浆, 37 °C、200 r/min 摇床培养 18 h。

2) 可溶性肽

标准曲线的绘制选用酪蛋白。取 1 mL 发酵豆浆, 按照 JITPAKDEE 的方法^[21]进行三氯乙酸 (trichloroacetic acid solution, TCA) 可溶性肽测定。

3) 氨基态氮与水解度

参考徐鑫等^[22]的方法测定发酵豆浆的氨基态氮。取发酵豆浆, 以去离子水做空白对照, 利用甲醛滴定法,

记录使用 NaOH 标准溶液 (0.1 mol/L) 的毫升数。并带入公式:

氨基态氮 =
$$\frac{(V - V_0) \times N \times 0.014}{1.25 \times \frac{10}{25}} \times 100$$

式中 V 为样品滴定消耗氢氧化钠体积, mL; V_0 为空白样品消耗氢氧化钠体积, mL; N 为 NaOH 标准溶液浓度, mol/L。

按《食品安全国家标准, 食品中蛋白质的测定: GB 5009.5-2016》凯氏定氮法进行蛋白质含量的测定, 参考吴成^[23] 的方法进行水解度的测定。其中, $W_0=0.178$, 以未处理豆浆氨基氮含量计, W_1 以产蛋白酶菌株处理豆浆氨基氮含量计, W_2 为豆浆凯氏定氮得到, 结

果为 2.01 g/100 mL。公式如下:

水解度 =
$$\frac{W_1 - W_0}{W_2} \times 5.71 \times 100\%$$

式中 W_0 为未发酵豆浆中游离氨基酸的浓度, g/100 mL; W_1 为发酵豆浆中酶解出的游离氨基酸的浓度, g/100 mL; W_2 为底物浓度, g/mL。

4) 感官评定

感官评定分为 5 个维度, 4 个等级, 使用的描述词汇及评分标准见表 1。招募 34 名食品专业研究生 (11 名男生、23 名女生) 组成感官评定小组。测试样品被盛装于透明一次性杯中, 杯上无样品名称, 仅有数字编号, 品评顺序随机。评分时去掉最高分与最低分后取算数平均值。

表 1 发酵豆浆感官评定描述及评分标准

Table 1 Description and scoring criteria for sensory evaluation of fermented soymilk				
项目 Item	评分 Score			
	8~10	5~7	2~4	0~1
组织状态 Vision	发酵豆浆状态均匀, 无沉淀, 无气泡	发酵豆浆中有少许悬浮颗粒, 无气泡	发酵豆浆中有悬浮颗粒, 有少许气泡	发酵豆浆呈絮状, 有明显分层
色泽 Color	豆浆乳白微黄, 光泽莹润自然	豆浆呈白色或灰白色, 光泽暗淡	豆浆颜色发黄, 光泽暗淡, 略显浑浊	豆浆呈絮状, 乳清颜色浑浊, 絮状物颜色异常
气味 Smell	具有发酵后的特殊香气, 气味醇厚, 无豆腥味, 无酸涩味	具有发酵后的特殊香气, 但气味稍淡, 有少许豆腥味、酸涩味及其他不良气味	无发酵后的特殊香气, 有少许豆腥味、酸涩味及其他不良气味	无发酵后的特殊香气, 有明显不良气味且气味刺鼻
口感 Texture	爽滑细腻, 吞咽顺畅	口感细腻, 但有少许黏滞或稀释感	口感略粗糙, 黏滞或稀释感明显	有明显颗粒感, 难以吞咽, 黏滞或稀释感明显
滋味 Taste	口味醇正, 醇厚协调, 滋味绵长	口味寡淡, 无尖酸味, 无涩味、苦味	有少许尖酸味或涩味、苦味	有明显异味

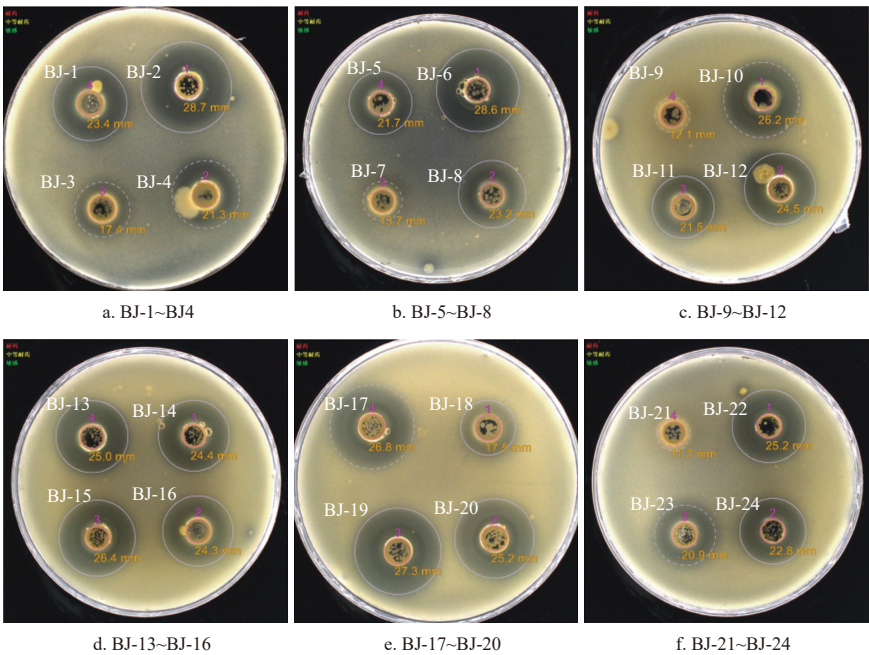
2 结果与分析

2.1 豆酱中产蛋白酶菌株的分离与鉴定

2.1.1 菌落的形态学观察结果

以东北传统农家酱为原材料, 通过蛋白酶活性筛

选平板分离出 24 株具有蛋白酶活性的菌株, 取含蛋白酶的发酵上清滴加于产蛋白酶菌株筛选培养基。编号后用全自动菌落计数仪 (法国) 进行水解圈直径测量, 结果如图 1 所示, 菌株 BJ-2 水解圈最大, 直径为 28.7 mm。



注: BJ- n 为菌株编号,下同。
Note:BJ- n is the strain number, the same below.

图 1 传统农家酱中菌株水解大豆分离蛋白水解圈

Fig.1 Hydrolysis ring of strains in traditional farmhouse sauce to hydrolyze soy protein isolate

选择其中水解圈直径最大的 8 株菌, 进行了菌落形态观察和显微镜检, 通过形态学观察可知, 8 株菌均呈

乳白色, 均不透明; 6 株表面光滑且缘整齐, 2 株表面粗糙且边缘模糊; 通过镜检可知, 8 株菌均为短杆菌, 且

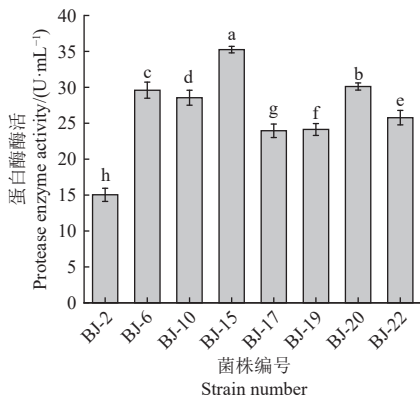
大多单个存在，具体的菌落形态学描述详见表 2。

表 2 传统农家酱中菌株形态学特征
Table 2 Morphological characteristics of strains in traditional soybean paste

菌株编号 Strain number	菌落形态 Colony morphology	菌体形态 Bacterial morphology
BJ-2	乳白色，圆形，表面光滑，边缘整齐	短杆状，单个存在
BJ-6	乳色，圆形，表面粗糙，边缘模糊	短杆状，多为单个存在
BJ-10	乳白色，圆形，表面光滑，边缘整齐	短杆状，多为单个存在
BJ-15	乳白色，圆形，表面光滑，边缘整齐	短杆状，多为单个存在
BJ-17	乳白色，圆形，表面光滑，边缘整齐	短杆状，单个存在
BJ-19	乳白色，圆形，表面粗糙，边缘模糊	短杆状，单个存在
BJ-20	乳白色，圆形，表面光滑，边缘整齐	短杆状，多为单个存在
BJ-22	乳白色，圆形，表面光滑，边缘整齐	短杆状，单个存在

2.2 蛋白酶酶活的测定

从图 2 可以看到，菌株产蛋白酶酶活范围为 15.03~35.24 U/mL，其中菌株 BJ-15 产量最高，菌株 BJ-2 产量最低。菌株测量酶活时选取的是碱性蛋白酶的测定方法，蛋白酶根据活性部位、生理功能、水解条件等分类条件的不同种类极多，其中碱性蛋白酶对大豆蛋白的水解效果相比其他蛋白酶更好^[24]，且几乎所有产蛋白酶微生物都能产生碱性蛋白酶^[25-26]，应用也更广。芽孢杆菌所产蛋白酶可总结为两类^[27]，一种为只含有碱性蛋白酶的 Carlsberg 型碱性蛋白酶；另一种为同时含有碱性蛋白酶和中性蛋白酶的 Novo 型碱性蛋白酶。两者相较，Carlsberg 型碱性蛋白酶底物专一性更广泛，且更加稳定。此外，菌株在测量酶活时，应国标要求，选取的底物为酪蛋白，试验结果表明菌株对酪蛋白也有水解能力，未来可对菌株所产蛋白酶的底物种类进一步研究，或将这些菌株应用于含酪蛋白的食品中。



注：不同小写字母表示不同组别之间具有显著差异，下同。
Note: Different lowercase letters indicate significant differences between groups, the same below.

图 2 传统农家酱中菌株蛋白酶酶活
Fig.2 Protease enzyme activity of strains in traditional soybean paste

2.3 菌株的分子学鉴定

提取 8 株产蛋白酶菌株的基因组为模板，利用引物 27F 和 1492R 进行 16S rDNA 片段扩增，PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳，所有泳道均在 1 500 bp 左右出现了一条清晰条带。PCR 产物送至生工生物工程（上海）股份有限公司进行测序。测序结果在 NCBI 上进行 Blastn 分析。

测序结果如表 3 所示，8 株菌从属层面来看，均为

芽孢杆菌属；从种层面看，可分为 6 种，分别为漳州芽孢杆菌、贝莱斯芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、暹罗芽孢杆菌、甲基营养芽孢杆菌和特基拉芽孢杆菌。枯草芽孢杆菌、漳州芽孢杆菌^[28]广泛应用于产碱性蛋白酶研究；贝莱斯芽孢杆菌^[29]、暹罗芽孢杆菌^[30]、特基拉芽孢杆菌^[31]已报道具有抑菌活性，常用于农业或食品保鲜；另外甲基营养芽孢杆菌^[32]还具有降解有害物质、保护治理环境的作用。董丹等^[33]从发酵初期豆瓣酱中筛选出 39 株芽孢杆菌，其中 5 株产蛋白酶的芽孢杆菌分别为枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、沙福芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌和 *Sonorensis* 芽孢杆菌，本文筛选菌株与已报道的食源性产蛋白酶菌株在属水平较为一致。

表 3 传统农家酱中产蛋白酶菌株 16S rDNA 序列分析结果
Table 3 Results of 16S rDNA sequence analysis of protease-producing strains in traditional soybean paste

菌株编号 Strain number	鉴定结果 Identification results	中文名称 Chinese name	同源性 Homology/%	参考菌株 Reference strain
BJ-2	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	漳州芽孢杆菌	99	MG937684.1
BJ-6	<i>Bacillus velezensis</i>	贝莱斯芽孢杆菌	99	KY887762.1
BJ-10	<i>Bacillus subtilis</i>	枯草芽孢杆菌	99	MT807910.1
BJ-15	<i>Bacillus subtilis</i>	枯草芽孢杆菌	99	MK966347.1
BJ-17	<i>Bacillus siamensis</i>	暹罗芽孢杆菌	99	MN371812.1
BJ-19	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	甲基营养芽孢杆菌	99	KM659226.1
BJ-20	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	甲基营养芽孢杆菌	99	HQ844459.1
BJ-22	<i>Bacillus tequilensis</i>	特基拉芽孢杆菌	99	HQ857764.1

2.4 安全性试验

2.4.1 抗生素敏感性试验

因为抗生素的滥用，菌株耐药性逐渐提高，为避免超级细菌的产生，抗生素敏感试验至关重要。前文筛选得到的 8 株芽孢杆菌的抗生素敏感性如表 4 所示。8 株芽孢杆菌对受试抗生素敏感性基本一致，表现为对庆大霉素、氨苄西林和青霉素中度敏感，对其他抗生素敏感。本实验菌株均有抗生素敏感性，说明安全性均较高，可以用于后续研究。

表 4 传统农家酱中产蛋白酶菌株耐药性评价
Table 4 Evaluation of drug resistance of protease-producing strains in traditional soybean paste

菌株编号 Strain number	庆大霉素 Gentamicin	红霉素 Erythromycin	四环素 Tetracycline	头孢曲松 Ceftriaxone	氨苄西林 Ampicillin	氯霉素 Chloramphenicol	复方新诺明 Compound trimoxazole	环丙沙星 Ciprofloxacin
BJ-2	MS	MS	MS	S	MS	MS	S	S
BJ-6	MS	S	MS	S	S	S	S	S
BJ-10	MS	S	S	S	MS	S	S	S
BJ-15	MS	S	S	S	MS	S	S	S
BJ-17	MS	S	S	S	MS	S	S	S
BJ-19	MS	S	MS	S	MS	S	S	S
BJ-20	MS	S	S	S	MS	S	S	S
BJ-22	MS	S	S	S	MS	S	S	S

注：R 耐药；MS 中度敏感；S 敏感。
Note: R is resesntive; MS is moderately sensitive; S is sensitive.

2.4.2 溶血性、引味试验

试验结果显示，所分离的 8 株菌在血平板上 37 ℃ 培养 18 h 时，均无溶血圈产生，说明 8 株菌均不产溶血素；8 株菌在蛋白胨水生理生化管 37 ℃ 培养 18 h，加入 Kovacs 氏靛基质试剂后，均无颜色变化，说明 8 株菌均不会分解色氨酸产生吲哚。

2.5 产蛋白酶菌株在豆浆中的应用

2.5.1 可溶性肽

从图3得知,用选取的8株芽孢杆菌处理后的豆浆可溶性肽含量范围在170.4~200.9 $\mu\text{g/mL}$ 之间,相较于未发酵豆浆增加了16.4%~37.2%。在确定可溶肽增加的基础上,后续可以针对肽段的长度、种类等进行更深入的研究,或是通过与其他酶活性菌株混合发酵,进一步改善发酵豆浆品质。通过微生物分泌的各种酶,传统发酵大豆制品中的蛋白质被水解成小肽,除了能方便吸收外,还能给豆浆增添保健效果,赋予独特风味^[34]。如一些菌株可以产生大豆血管紧张素转化酶抑制肽,这种酶具有降压潜力,在调节血压方面具有重要作用^[35];一些菌株还可以产生抗氧化肽^[36],起到抗氧化效果。

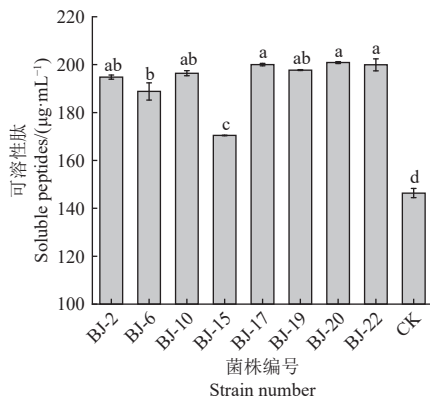


图3 产蛋白酶菌株处理后豆浆可溶性肽变化

Fig.3 Changes of soluble peptides in soymilk after treatment by protease-producing strains

与蛋白酶酶活结合来看,部分菌株在筛选平板上水解圈大,蛋白酶活力高,但可溶性多肽含量较低,主要有两点原因。第一,本文测定的蛋白酶酶活为碱性蛋白酶酶活,酶活测定缓冲液pH值为10,但实际豆浆处理体系大约pH值为6,两者pH值不一样,所以蛋白酶酶活较高的菌株在pH值为6的豆浆中应用时,酶活并不一定最好。第二,蛋白酶的底物谱广,但与不同底物的亲和力不同。测定蛋白水解圈时底物是市售大豆分离蛋白(主成分是 β -伴球蛋白和球蛋白),测定碱性蛋白酶酶活时所用底物是市售酪蛋白,但在实际豆浆发酵体系中,用的是大豆总蛋白,包括球蛋白^[37]、清蛋白^[38]等。底物不同,即使是同种酶,也会表现出不同的酶活差异。

2.5.2 豆浆氨基态氮及水解度测定

芽孢杆菌发酵豆浆时,蛋白质水解主要发生在对数生长期,与豆浆pH值的变化、风味等有关。如图4a为不同产蛋白酶菌株处理后豆浆氨基态氮变化,图4b为不同产蛋白酶菌株处理后豆浆水解度变化,蛋白酶处理后,豆浆的氨基态氮和水解度显著增加,效果最好的为菌株BJ-6处理豆浆,氨基态氮上升了10.87%,水解度为23.49%。本节数据趋势同样与水解圈大小及蛋白酶活力不一致,原因与2.5.1相似,且现有许多文献的结果也有类似结果。王朋朋^[39]筛选得到6株产蛋白酶的曲霉,其中菌株A6、A8、A15、B3的蛋白酶酶活分别为1572.54、1324.46、1456.24、1378.89 U/g,但氨基态氮

含量分别为23.57、20.38、20.17、21.57 mg/g,可以看到其结论与本文类似,蛋白酶酶活与氨基态氮含量也无相关性。邓维琴等^[40]从豆瓣酱中筛选出17株曲霉,其中菌株PCSM002的蛋白酶酶活大于菌株PCSM001,但在实际应用中,PCSM001发酵豆瓣酱的氨基态氮含量高于PCSM002发酵豆瓣酱。

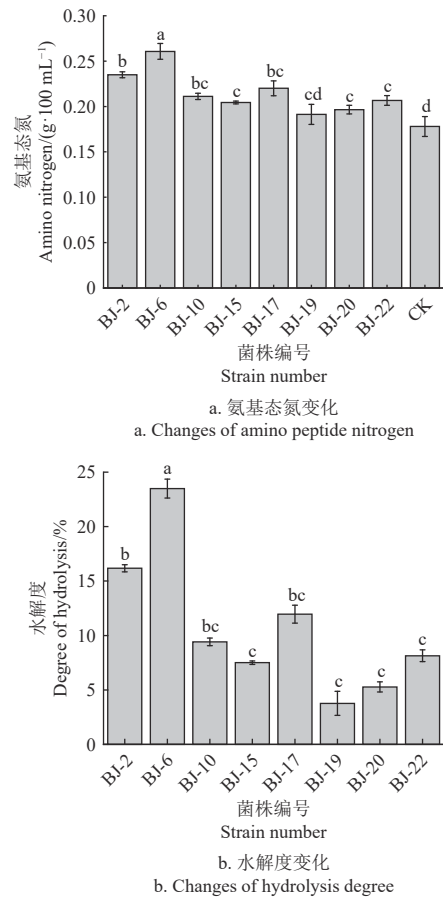


图4 产蛋白酶菌株处理后豆浆氨基态氮、水解度变化

Fig.4 Changes of amino peptide nitrogen and protein hydrolysis degree of soymilk after treatment by protease-producing strains

蛋白水解度除与菌株所产蛋白酶的酶活有关外,还与菌株在豆浆中的生长速度、微生物产酶种类、豆浆的品质等有关^[41]。例如:微生物发酵产蛋白酶,将蛋白水解为小肽和氨基酸的同时,微生物也会利用小肽和氨基酸进行生长繁殖,消耗水解产物;又或是微生物除产蛋白酶外,同时产生转氨酶、脱羧酶等酶系,将氨基酸转化为胺类化合物;而豆浆的品质则会影响豆浆中的蛋白含量,从而影响水解度。在发酵豆制品中,水解度是监测蛋白水解的重要参数,能够反映蛋白质的变化情况、营养价值和功能特征。

2.5.3 感官评定

从组织状态、色泽、气味、口感和滋味5个方面对不同菌株发酵的豆浆进行评价,结果见图5。其中发酵后豆浆的组织状态和色泽较发酵前均有所提高,但气味、滋味下降。所有感官评定员反馈,豆浆发酵后豆腥味显著减少,并有酸味生成,品尝时入口略苦,但有回甘,类似豆汁口感。其中,豆浆的豆腥味主要源于脂肪氧化生成的醇、醛、酮类化合物^[42],经菌株处理后能有效降低这些具有异味的小分子化合物^[43]。而入口略苦可能是

因为蛋白质在水解过程中, 随着小分子多肽的生成, 疏水性氨基酸残基暴露, 苦味的程度与疏水氨基酸含量有关, 疏水氨基酸在多肽中含量越多, 苦味越重^[44]。而酸味的生成与回甘滋味可能与大豆蛋白水解后, 游离氨基酸含量上升, 风味物质的释放有关^[45-46]。

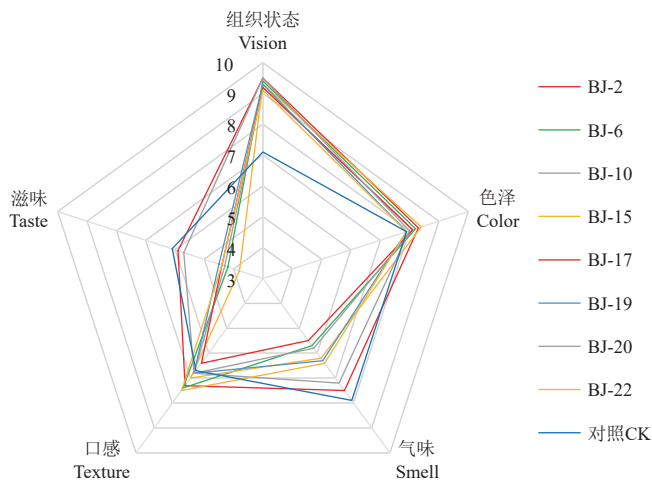


图 5 产蛋白酶菌株处理后豆浆感官评定结果

Fig.5 Sensory evaluation of soymilk after treatment of protease-producing strains

总体来看, 菌株 BJ-2、BJ-20 为发酵剂的两个发酵组评价较好。其中, BJ-2 发酵豆浆的组织状态和色泽分别得分 9.5 和 8.3 分, BJ-20 发酵豆浆的组织状态和色泽分别得分 9.5 和 8.0 分, 较发酵前相比明显改良。感官评定员反馈, 两种发酵豆浆的组织状态均匀, 未见悬浮颗粒物, 且呈显乳白色, 略带光泽。这可能是因为随着水解度的提高, 大豆分离蛋白的相对分子量逐渐减小, 其平均粒径、黏度、持水性降低, 溶解性和持油性显著提高^[47]。

3 结 论

本文从东北传统农家酱中筛选出产蛋白酶的菌株 8 株, 经鉴定后发现 8 株菌均为芽孢杆菌。在确定其安全性后, 利用 8 株芽孢杆菌处理豆浆。发现相较处理前, 豆浆处理后可溶性肽质量分数增加了 16.4%~37.2%, 处理效果最佳的豆浆氨基态氮含量上升了 10.87%, 水解度为 23.49%。此外, 这 8 株菌还可有效改良豆浆口感, 为豆浆赋予独特风味。

本文为应用于豆类产品功能菌剂的开发打下基础, 还可作为潜在回添菌剂, 应用于东北传统农家酱工厂化生产。除此之外, 本文还验证了筛选菌株应用于豆浆时的酶解特性, 确定菌株对豆浆的水解效果良好, 为后续豆浆的营养改良提供了数据支持与理论依据, 在未来也可针对蛋白、多肽、氨基酸进行更深入的研究, 为豆浆的改良提供更多选择与研究方向。

【参 考 文 献】

[1] 佟斌. 辽宁省 1974-2020 年审定大豆品种产量和品质性状分析[J]. 中国种业, 2023(4): 5.
TONG Bin. Analysis of yield and quality traits of approved soybean varieties in Liaoning Province from 1974 to 2020[J]. China Seed Industry, 2023(4): 5. (in Chinese with English abstract)

abstract)
[2] 王梦萍, 陈燕琼, 王金梅, 等. 糖接枝处理改善大豆蛋白纤维聚集泡沫稳定性[J]. 农业工程学报, 2016, 32(4): 249-255.
WANG Mengping, CHEN Yanqiong, WANG Jinmei, et al. Improvement of foam stability of soy protein on fibrillar aggregate by glycosylation[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2016, 32(4): 249-255. (in Chinese with English abstract)
[3] 陈林, 吴克刚, 柴向华, 等. 微射流均质预处理提高大豆分离蛋白酶解效率及酶解产物乳化性能[J]. 农业工程学报, 2015, 31(5): 331-338.
CHEN Lin, WU Kegang, CHAI Xianghua, et al. Microfluidization pretreatment improving enzymatic hydrolysis of soy isolated protein and emulsifying properties of hydrolysates[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2015, 31(5): 331-338. (in Chinese with English abstract)
[4] KHORASANI G R, OZIMEK L, SAUER W C, et al. Substitution of milk protein with isolated soy protein in calf milk replacers[J]. Journal of Animal Science, 1989, 67(6): 1634-1641.
[5] CERVANTES-PAHM S, STEIN H. Ileal digestibility of amino acids in conventional, fermented, and enzyme-treated soybean meal and in soy protein isolate, fish meal, and casein fed to weanling pigs[J]. Journal of Animal Science, 2010, 88(8): 2674-2683.
[6] 肖志刚, 王依凡, 王可心, 等. 高压均质-冷冻干燥技术制备大豆分离蛋白微粒及其功能特性[J]. 农业工程学报, 2021, 37(13): 306-313.
XIAO Zhigang, WANG Yifan, WANG Kexin, et al. Preparation and functional properties of soy protein isolate particles by high pressure homogenization-freeze drying technology[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2021, 37(13): 306-313. (in Chinese with English abstract)
[7] SALAZAR-VILLANEA S, BRUININX E M A M, BUTRÉ C I, et al. Processing temperature and sugar type affect the rate and the extent of proteolysis of a model soy protein isolate system[J]. Animal Feed Science and Technology, 2020, 269: 114680.
[8] LAXMAN R S, SONAWANE A P, MORE S V, et al. Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*[J]. Process Biochemistry, 2005, 40(9): 3152-3158.
[9] 王振国, 高育哲, 时家峰, 等. 挤压温度对大豆分离蛋白与原花青素复合物结构和功能特性的影响[J]. 农业工程学报, 2022, 38(21): 279-286.
WANG Zhenguo, GAO Yuzhe, SHI Jiafeng, et al. Effects of extrusion temperature on the functional and structural properties of soybean protein isolate and proanthocyanidin complex[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2022, 38(21): 279-286. (in Chinese with English abstract)
[10] 冉锐敏, 王璐瑶, 何宾宾, 等. 纳米氧化锌/葡萄糖皮红改性大豆分离蛋白膜的制备与性能研究[J]. 农业工程学报, 2021, 37(14): 294-301.
RAN Ruimin, WANG Luyao, HE Binbin, et al. Preparation and characterization of soy protein isolate films modified by ZnO nanoparticles and grape-skin red[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2021, 37(14): 294-301. (in Chinese with English abstract)
[11] PAVLOVIĆ N, JOVANOVIĆ J, ĐORĐEVIĆ V, et al. Production and characterization of liposomes with encapsulated bioactive soy protein hydrolysate[J]. Hemijska

- industria, 2020, 74(5): 327-339.
- [12] 王哲. 东北传统豆酱制作工艺及酱文化发展研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2017.
WANG Zhe. Research on the Production Technology and Development of Sauce Culture of Traditional Soybean Paste in Northeast China[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2017. (in Chinese with English abstract)
 - [13] 马岩石, 姜明, 李慧, 等. 基于高通量测序技术分析东北豆酱的微生物多样性[J]. 食品工业科技, 2020, 41(12): 100-105.
MA Yanshi, JIANG Ming, LI Hui, et al. Analysis of microbial diversity of northeast soy sauce based on high-throughput sequencing technology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(12): 100-105. (in Chinese with English abstract)
 - [14] 国家国内贸易局. SB/T 10317-1999 蛋白酶活力测定法 [S]. 北京: 标准出版社, 1999.
 - [15] 徐文欢, 吴若菡, 李采婵, 等. 传统虾酱中酵母菌分离鉴定及碳源利用特性[J]. 中国食品学报, 2021, 21(4): 303-309.
XU Wenhuan, WU Ruohan, LI Caichan, et al. Separation and identification of yeast from traditional shrimp paste and their carbon utilization characteristics[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(4): 303-309. (in Chinese with English abstract)
 - [16] WANG J, ZHANG S, TAN H, et al. PCR-based strategy for construction of multi-site-saturation mutagenic expression library[J]. *Journal of microbiological methods*, 2007, 71(3): 225-230.
 - [17] 李仕楷, 刘佳琪, 李荣旭, 等. 鹅源鼠伤寒沙门菌 crp, hfq 基因缺失株的构建及生物学特性分析[J]. 中国预防兽医学报, 2023, 45(1): 8.
LI Shikai, LIU Jiaqi, LI Rongxu, et al. Construction and biological characteristics of CRP, HFQ gene deletion strains of *Salmonella typhimurium* (*Salmonella typhi*) [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2023, 45(1): 8. (in Chinese with English abstract)
 - [18] 李锦锦, 洪宝华, 倪思圳, 等. 凡纳滨对虾中发光坎氏弧菌的分离, 鉴定及致病性[J]. 水产学报 (中文版), 2021, 45(4): 600-612.
LI Jinjin, HONG Baohua, NI Sizhen, et al. Isolation, identification and pathogenicity analysis of luminous *Vibrio campbellii* from *Litopenaeus vannamei* [J]. Journal of Fisheries of China (Chinese Edition), 2021, 45(4): 600-612. (in Chinese with English abstract)
 - [19] LEONG J, MOREL P C H, PURCHAS R W, et al. Effects of dietary components including garlic on concentrations of skatole and indole in subcutaneous fat of female pigs[J]. *Meat Science*, 2011, 88(1): 45-50.
 - [20] 陶保华, 胡超群, 吴蔚. 斑节对虾弧菌病的病原生物学研究[J]. 热带海洋学报, 2001, 20(2): 80-87.
TAO Baohua, HU Chaoqun, WU Wei. Pathogenic biology of Vibriosis of *Penaeus monodon* [J]. Journal of Tropical Oceanography, 2001, 20(2): 80-87. (in Chinese with English abstract)
 - [21] JITPAKDEE H. Selected probiotic lactic acid bacteria isolated from fermented foods for functional milk production: Lower cholesterol with more beneficial compounds[J]. *LWT-Food Science & Technology*, 2021, 135(1): 110061.
 - [22] 徐鑫, 何佳易, 刘国艳, 等. 小黄鱼抗氧化肽制备条件的响应面优化[J]. 食品科学, 2011, 32(21): 165-170.
XU Xin, HE Jiayi, LIU Guoyan, et al. Response surface optimization of antioxidant peptide preparation conditions in small yellow fish[J]. Food Science, 2011, 32(21): 165-170. (in Chinese with English abstract)
 - [23] 吴成. 多次去皮对腐皮品质的动态影响研究 [D]. 杭州: 浙江工商大学, 2018.
WU Cheng. Dynamic Influence of Multiple Peeling on the Quality of Rotten Skin[D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2018. (in Chinese with English abstract)
 - [24] 杨君丽, 魏安池, 周冬丽. 7S 和 11S 大豆球蛋白酶解物抗氧化性的研究[J]. 粮食加工, 2010(1): 63-67.
YANG Junli, WEI Anchi, ZHOU Dongli. Studies on antioxidation activity of hydrolysates from soybean 7S and 11S globulin proteins[J]. Grain Processing, 2010(1): 63-67. (in Chinese with English abstract)
 - [25] SUBERU Y, AKANDE I, SAMUEL T, et al. Cloning, expression, purification and characterisation of serine alkaline protease from *Bacillus subtilis* RD7[J]. 2019, 20: 101264.
 - [26] DORRA G, INES K, IMEN B S, et al. Purification and characterization of a novel high molecular weight alkaline protease produced by an endophytic *Bacillus halotolerans* strain CT2[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018, 111: 342-351.
 - [27] TERUI G. Fermentation Technology Today[M]. Fermentation Technology Today, 1972.
 - [28] 洪碧红, 何建林, 白妞妞, 等. 利用漳州芽孢杆菌发酵生产碱性蛋白酶的方法及其应用 [P]. 中国专利: 2021 202011291825.5, 2021-01-29.
 - [29] ASATUROVA A, SHTERNISH M, TSVETKOVA V, et al. Biological control of important fungal diseases of potato and raspberry by two *Bacillus velezensis* strains[J]. *PeerJ*, 2021, 9(4): e11578.
 - [30] Cheng Z, LI R, JIANG Z, et al. Combined effect of *Bacillus siamensis* and chlorogenic acid on maintenance of quality and control of disease in stored wax apple fruit[J]. *Food Quality and Safety*, 2022, 5(4): fyac026.
 - [31] CORTÉS-CAMARGO S, ACUA-AVILA P E, ARRIETA-B A D, et al. Biosurfactant production by *Bacillus tequilensis* ZSB10: structural characterization, physicochemical, and antifungal properties[J]. *Journal of Surfactants and Detergents*, 2021, 24(5): 773-782.
 - [32] LUGE R, ZHENG X, OBA B T, et al. *Bacillus* and rhamnolipid activated soil microbial community to realize total petroleum hydrocarbons remove[J]. *Chemosphere*, 2021, 275(2): 130062.
 - [33] 董丹, 关统伟, 车振明, 等. 发酵初期豆瓣酱中微生物多样性分析及产酶菌株的筛选[J]. 食品工业, 2015, 36(7): 175-178.
DONG Dan, GUAN Tongwei, CHE Zhenming, et al. Microbial diversity and screening of enzyme producing strains in two months period of fermented bean sauce[J]. *The Food Industry*, 2015, 36(7): 175-178. (in Chinese with English abstract)
 - [34] LIU L, CHEN X, HAO L, et al. Traditional fermented soybean products: processing, flavor formation, nutritional and biological activities[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022, 62 (7): 1971-1989.
 - [35] SOLANKI D, HATI S, DAS S, et al. Bioactivities and ACE-inhibitory peptides releasing potential of lactic acid bacteria in fermented soy milk[J]. *Food Production Processing Nutrition*, 2021, 3(10): 14.
 - [36] SANJUKTA S, PADHI S, SARKAR P, et al. Production, characterization and molecular docking of antioxidant peptides from peptidome of kinema fermented with proteolytic *Bacillus* spp[J]. *Food Research International*, 2021, 141(6): 110161.
 - [37] XIE J, ZOU X, LI Y, et al. Effects of high - pressure - modified soy 11S globulin on the gel properties and water - holding capacity of pork batter[J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2022, 57(4): 2458-2466.
 - [38] HAN W, ZHUANG X, LIU Q, et al. Fermented soy whey

- induced changes on intestinal microbiota and metabolic influence in mice[J]. *Food Science and Human Wellness*, 2022, 11(1): 41-48.
- [39] 王朋朋. 蛋白酶产生菌的筛选及固态发酵生产优质蛋白原料的研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2010.
WANG Pengpeng. Screening of Protease-producing Bacteria and Solid-state Fermentation to Produce High-quality Proteogen Research on Materials[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2010. (in Chinese with English abstract)
- [40] 邓维琴, 陈功, 张其圣, 等. 传统郟县豆瓣酱中高产蛋白酶曲霉的筛选及应用[J]. 微生物学通报, 2019, 46(9): 2272-2281.
DENG Weiqin, CHEN Gong, ZHANG Qisheng, et al. Screening and application of high yield protease fungus from traditional fermented Pixian broad bean paste[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(9): 2272-2281. (in Chinese with English abstract)
- [41] ZHANG W, HUANG L, CHEN W, et al. Influence of ultrasound-assisted ionic liquid pretreatments on the functional properties of soy protein hydrolysates[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2021, 73: 105546.
- [42] END H, OHN M, TANJI K, et al. effect of heat treatment on (beany flavor) of soymilk the lipid peroxide content and aokusami[J]. 2018, 10(3): 328-333.
- [43] ACHOURI A, BOYE J I, ZAMANI Y. Soybean variety and storage effects on soymilk flavour and quality[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2008, 43(1): 82-90.
- [44] SEREDA A S, VELIKORETSKAYA I A, MINEEVA D T, et al. Bacterial protease enzyme preparations for the production of non-bitter protein hydrolysates[J]. *Biotechnologia*, 2020, 36(4): 42-48.
- [45] 卢晓丹, 张敏, 苗菁. 不同来源生熟北京豆汁的风味物质和感官评价比较[J]. 食品科学, 2015(6): 103-108.
LU Xiaodan, ZHANG Min, MIAO Jing. Analysis of volatile compounds and sensory evaluation of different douzhi (Fermented mung bean juice) products[J]. *Food Science*, 2015(6): 103-108. (in Chinese with English abstract)
- [46] 刘文营, 孙佳琦, 成晓瑜, 等. 北京豆汁感官特性分析[J]. 食品科学, 2020, 41(20): 211-221.
LIU Wenying, SUN Jiaqi, CHENG Xiaoyu, et al. Sensory characteristics of Beijing douzhi (Fermented mung bean juice)[J]. *Food Science*, 2020, 41(20): 211-221. (in Chinese with English abstract)
- [47] 王利国, 刘锐, 张民, 等. 大豆分离蛋白酶解产物的理化性质研究[J]. 中国食品添加剂, 2018(3): 7.
WANG Ligu, LIU Rui, ZHANG Min, et al. Study on physicochemical properties of soybean protein isolate enzymatic hydrolysate[J]. *China Food Additives*, 2018(3): 7. (in Chinese with English abstract)

Isolation of protease strains from traditional soybean paste and their application in soymilk

BAO Jie, REN Xiaolei, GUO Baosong, LIANG Huipeng, LIN Xinping, ZHANG Sufang^{*}

(1. National Engineering Research Center of Seafood, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China;

2. School of Food, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

Abstract: Fermentation is one of the most common-used technologies in food processing. The nutritional value of food can also be maximized to increase the flavor of food. Among them, soymilk is rich in plant protein among food products. But the plant protein is relatively difficult to be absorbed by the human body. Protease-producing strains can be used to treat soy milk. Specifically, the plant protein can be converted into peptides and amino acids for better digestion and absorption rate. The protease-active strains can be screened from the traditional soybean fermented foods, and then serve as the nutrient source for the growth and reproduction of the soybeans. The proteases can be produced more suitable for the soy protein. The unique production process can also be found in the traditional soybean pastes in Northeast China. Specifically, the steamed soybeans are generally fermented to prepare using multiple procedures, such as stir-frying, brick-making, fermentation, and sauce. A long production history can then produce the unique flavor of typical fermented foods. Since manual production is often brewed in individual workshops, the types of fermentation microorganisms vary greatly, depending mainly on the brewing environment. Furthermore, the current fermentation is focused mostly on the Pixian bean paste. Many functional strains have been found in the Pixian bean paste, including the protease-producing strains. And these strains have been applied to functional foods, such as the descending amines and the inhibiting growth of *Aspergillus flavus*. Taking the Fushun farmhouse soybean paste as the research object, a series of experiments were carried out to screen the protease strains through the hydrolysis circle. Morphological observation was then characterized to identify eight strains with better decomposition of soybean protein. 16S rDNA sequencing as *Bacillus* included the 1 strain of *Bacillus zhangzhouensis*, 1 strain of *Bacillus velezensis*, 2 strains of *Bacillus subtilis*, 1 strain of *Bacillus siamensis*, 2 strain of *Bacillus methylotrophicus*, and 1 strain of *Bacillus tequilensis*. The screened strains were used for the soy milk fermentation after the safety analysis. The systematic evaluation was performed on the soluble peptide content, amino nitrogen content, hydrolysis degree, and sensory of soymilk before and after fermentation. The results showed that the soluble peptide content of soy milk increased significantly during production. There was the most significant effect of soy milk after treatment with BJ-20, the amino nitrogen and hydrolysis degree of soymilk also changed significantly. Among them, the effect of soymilk treated with BJ-6 was the most significant, with the amino nitrogen increasing by 10.87% and the hydrolysis degree being 23.49%. The sensory evaluation showed that the tissue state of soy milk was significantly improved after treatment. The finding can enrich the bean processing in the diversity of soybean products. A strong reference and theoretical support can also be provided for the soybean health function.

Keywords: agricultural products; enzyme; traditional soybean paste; protease-producing strains; soluble peptides