

# 细菌型豆豉发酵芽孢杆菌的筛选与鉴定

贾东旭, 吴拥军\*, 李耀中, 许文钊

(贵州大学生命科学学院, 贵州省农业生物工程重点实验室, 贵州 贵阳 550025)

**摘要:** 对贵州省 10 个细菌型豆豉产区的样品进行菌种分离与鉴定。旨在通过纯种发酵、口感评测、产蛋白酶能力测定、产气实验, 筛选出能够取代自然发酵、蛋白酶产量高、发酵风味好、发酵不产气的芽孢杆菌菌株。结果从分离的 184 株芽孢杆菌中, 筛选出 3 株发酵品质突出且不产气的菌株: BJ3-2、BJ1-3 和 ZY4-5, 其产蛋白酶能力(h/c)分别为 3.60、1.71 和 1.50。生理生化鉴定和 16S rDNA 序列分析结果显示, 它们均为枯草芽孢杆菌。扩大纯种发酵实验证明, 可以将其作为工业发酵参考菌株。

**关键词:** 细菌型豆豉; 芽孢杆菌; 纯种发酵; 蛋白酶; 分离鉴定

## Screening and Identification of *Bacillus* for Lobster Sauce Fermentation

JIA Dong-xu, WU Yong-jun\*, LI Yao-zhong, XU Wen-zhao

(Guizhou Key Laboratory of Agricultural Bioengineering, College of Life Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

**Abstract:** Bacterial strains were isolated and identified from bacteria-fermented lobster sauce samples collected from 10 producing areas in Guizhou province. Through the experiments of pure fermentation, sensory evaluation, determination of protease-producing activity and aerogenesis test, this study aimed to screen non-anaerogenic *Bacillus* strains that have high protease-producing activity and good flavor and can replace the bacterial strains in spontaneous fermentation of lobster sauce. As a result, 3 strains (BJ3-2, BJ1-3 and ZY4-5) with prominent fermentation quality are screened out from 184 strains of *Bacillus*, whose protease-producing activities (h/c) are 3.60, 1.71 and 1.50 respectively. The physiological and biochemical identification and the 16S rDNA analysis showed that they belong to *Bacillus subtilis*. Moreover, the enlarged pure fermentation experiment proved that BJ3-2, BJ1-3 and ZY4-5 may be taken as the reference strains for industrial fermentation

**Key words:** bacteria-fermented lobster sauce; *Bacillus*; pure fermentation; protease; isolation and identification

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)05-0217-05

豆豉是一种以豆类为原料经过微生物发酵而成的传统发酵食品, 历史悠久, 营养丰富, 流传到国外后演变成天培、纳豆等功能性食品。豆豉按制曲发酵时参与的主要微生物种类不同, 可分为米曲霉型、根霉型、毛霉型、细菌型及脉胞菌型五大类。细菌型豆豉的制作工艺是将煮熟的黑豆或黄豆, 盖上稻草或南瓜叶保温培养。2d 后细菌在豆表面繁殖, 出现黏质物, 可牵拉成丝并有特殊香味时加入食盐、白酒及其他辅料, 发酵 5~7d 成熟<sup>[1]</sup>。参与细菌型豆豉发酵的菌种有芽孢杆菌、微球菌和乳酸菌等, 其中芽孢杆菌在豆豉中不但数量突出, 而且含有大量形成豆豉风味的酶类物质, 因此芽孢杆菌在豆豉的发酵过程中发挥非常重要的作用。

秦礼康等<sup>[2]</sup>从贵州黔西和大方两地传统陈窖豆豉耙

中, 经过蛋白酶和脂肪水解酶活力、耐盐性能、抗紫外光照射和抗生素敏感性等实验, 筛选了若干株可作为陈窖豆豉耙纯菌发酵的芽孢杆菌参考菌株; 袁贵英等<sup>[3]</sup>对河南自然发酵制成的臭豆豉的微生物组成进行了分析, 初步确定河南臭豆豉自然发酵的主要微生物为枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌; 余爱农等<sup>[4]</sup>对细菌型豆豉香气成分进行研究, 发现有月桂醛、12-羟基-7 $\alpha$ -桉叶-4-烯-6-酮等 27 种香气成分; 此外, 还有很多借鉴日本纳豆, 从豆豉中提取豆豉纤溶酶<sup>[5]</sup>的相关研究。

对细菌型豆豉的研究虽然较多, 但应用于工业化生产的却很少, 目前还一直沿用传统自然发酵工艺, 主要因为细菌型豆豉纯种发酵风味较单一, 逊于自然发酵的豆豉, 作为细菌型豆豉的代表, 贵州地区的特色

收稿日期: 2008-11-03

基金项目: 贵阳市科技基金项目([2007]筑科 2 合同字第 17-2 号)

作者简介: 贾东旭(1982-), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物技术。E-mail: jiadongxu@yahoo.com.cn

\* 通讯作者: 吴拥军(1971-), 男, 副教授, 研究方向为食品生物技术。E-mail: wyjbio@163.com

风味——水豆豉,也存在这样的问题,且自然发酵带来的产气杂菌污染,产品“产气”、“顶盖”现象严重,导致产品质量不稳定。因此,筛选适宜工业化生产的豆豉菌株是解决制约细菌型豆豉生产问题的关键。笔者从贵州省主要豆豉生产地区,采集自然发酵风味良好的成品豆豉,并从中分离、鉴定、筛选出风味突出、发酵性能优越的芽孢杆菌菌株,旨在为实现细菌型豆豉工业化纯种发酵奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

豆豉样品采集自贵州省贵阳、遵义、镇远、大方、毕节、兴义、瓮安、江口、习水、六盘水10个地区,分别命名为:GY、ZY、ZH、DF、BJ、XY、WA、JK、XS和LP;黄豆为市售。

纳豆芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* natto)CICC:10023 工业微生物菌种保藏管理中心;枯草芽孢杆菌 B<sub>1</sub>⑥(*Bacillus subtilis* B<sub>1</sub>⑥) 贵州大学微生物实验室; *E.coli* DH 5 $\alpha$  贵州省农业生物工程重点实验室。

酵母膏和胰蛋白胨 Oxoid 公司; ExTaq 酶、dNTP、pMD18-T、Wizard 基因组 DNA 纯化试剂盒及琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒 Ver.2.0 宝生物工程(大连)有限公司; 氨苄西林 Sigma 公司; EZNA Plasmid Minikit I Omega 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 培养基配制

牛肉膏蛋白胨培养基和豆芽汁蔗糖培养基:参照文献[6]方法;酪蛋白琼脂:参照文献[7]方法;发酵培养基[8](改良):黄豆用水浸泡5~6h,分装三角瓶,每瓶50g,纱布封口,121℃灭菌30min;发酵产气实验培养基:黄豆用水浸泡5~6h,分装试管,每管2g,装入适量水,以高出豆面3cm为宜,倒置放入杜氏发酵管,121℃灭菌30min;扩大发酵培养基:黄豆用水浸泡5~6h,分装三角瓶,每瓶600g,纱布封口,121℃灭菌30min;糖发酵培养基、柠檬酸盐培养基、丙酸盐培养基、结晶紫染色液、卢哥氏碘液、格里斯氏试剂及二苯胺试剂参照文献[9]的方法配制。

## 1.3 方法

### 1.3.1 菌种分离和纯化

取2g样品于18g无菌水的三角瓶中,并加入0.1%吐温80,200r/min下离心分离30min,然后梯度稀释为 $10^{-2}$ ~ $10^{-9}$ ,每个稀释梯度做3个重复。静置10min后取1ml,均匀涂布于牛肉膏蛋白胨平板上,37℃下培养24h,进行革兰氏染色和芽孢染色,将G<sup>+</sup>芽孢杆菌单菌落纯化3代后保种于牛肉膏蛋白胨斜面试管。每个样品随机挑取4~5个菌株,并记录菌株的平板形态,然后

进行归类。

### 1.3.2 初筛

接种菌株于牛肉膏蛋白胨液体试管,30℃下培养12h,按黄豆(g):种子菌液(ml)=125:1的比例接种到发酵培养基,37℃下培养72h,以B<sub>1</sub>⑥、纳豆芽孢杆菌纯种发酵豆豉和自然发酵豆豉为对照,感官评价发酵豆豉的色泽、风味等,每个地区筛选出1~3株发酵品质较好的菌株。

### 1.3.3 复筛

菌株产蛋白酶能力的测定:将菌株点接于酪蛋白琼脂平板中央,37℃下培养24h,分别测量菌落透明圈直径(h)和菌落直径(c)3次,计算平均值,h/c值大小表示菌株产蛋白酶能力的高低。

色泽和风味的的评价:于200g黄豆中接种菌株进行发酵(方法同1.3.2),感官评定筛选菌株发酵豆豉的外观、风味和质地等,评分标准见表1。以分值高低表示发酵豆豉品质的优劣。

表1 感官评价标准

Table 1 Standards of sensory evaluation for lobster sauce

指标	评分标准
色泽	黄褐色(8~10分)、深黄褐色或淡黄褐色(5~7分)、黑褐色(0~4分)
黏丝	很黏(8~10分)、中等(5~7分)、不黏(0~4分)
豉香	浓郁(16~20分)、中等(11~15分)、豉味淡或有异味(0~10分)
氨味	轻(16~20分)、中等(11~15分)、重(0~10分)
酱香	浓郁(16~20分)、中等(11~15分)、轻(0~10分)
质地	适中(15~20分)、太硬或太软(10~14分)

### 1.2.4 发酵产气实验

将1ml牛肉膏蛋白胨液体培养的菌液接种于发酵产气实验培养基,37℃下培养72h,观察试管中的倒置杜氏发酵管中是否有气泡,出现气泡者为阳性。

### 1.2.5 菌种鉴定

形态学和生理生化鉴定:参照文献[9]~[11]中的方法。

16S rDNA 序列分析:用 Wizard 基因组 DNA 纯化试剂盒提取菌株基因组做模板。以芽孢杆菌 16SrDNA 保守序列设计特异性引物 P16SL: 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'、P16SR: 5'-GCCCGTCGAATTCCTTTGAG-3', PCR 反应条件为: 94℃ 5min, 94℃ 40s, 53℃ 40s, 72℃ 50s, 5个循环; 94℃ 40s, 54℃ 40s, 72℃ 50s, 25个循环; 72℃ 6min, 4℃ 保存。参照文献[12]的方法将 PCR 胶回收产物与 pMD18-T 载体连接,转化感受态 *E.coli* DH 5 $\alpha$  PCR 和酶切鉴定后,阳性克隆子送宝生物工程(大连)有限公司

测序。利用 GenBank 核苷酸数据库中的 Blast 比对序列及信息,采用 Megalign 软件绘制聚类图谱,并结合理化鉴定结果鉴定供试菌株。

### 1.2.6 扩大纯种发酵

接种菌株于扩大发酵培养基(方法同 1.3.2)进行发酵实验。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌落形态

经革兰氏染色和芽孢染色,在牛肉膏蛋白胨平板上初步确定为芽孢杆菌的菌落形态主要有 6 大类(表 2)。细菌型豆豉的芽孢杆菌形态中,1、3、4 和 5 类比较多见,2 类菌株相对较少,6 类仅在镇远地区个别豆豉样品中出现。分析 1、3、4 和 5 类可能是传统细菌型豆豉发酵的主要菌株,2、6 为不同地区风味出现差异的主要菌株。

表 2 细菌型豆豉中芽孢杆菌菌落形态特征

Table 2 Common colony features of *Bacillus* strains in bacteria-fermented lobster sauce

编号	平板菌落形态
1	纯白色,形状不规则,菌落中心区域有褶皱状隆起,有的呈同心环状,不透明,表面干燥,易挑取
2	纯白色,近似圆形,菌落表面有褶皱状隆起,边缘有透明状物质,不透明,表面干燥,易挑取
3	灰白色,近似圆形,半透明,表面湿润,有光亮,易挑取
4	纯白色,形状不规则,不透明,表面干燥,粗糙,但没有褶皱,易挑取
5	灰白色,形状不规则,表面有褶皱,不透明,黏稠,易挑取
6	灰白色,形状圆形或椭圆形,黏稠油体状,透明,易挑取

### 2.2 初筛

工业发酵产品要求在色泽和风味上均比较突出,因此粗筛的重点是以对照菌株为参考,感官评测筛选出各地区发酵品质较好的菌株。对 10 个地区细菌型豆豉样品中分离到的 184 株芽孢杆菌进行纯种发酵,并对其色泽和风味等感官指标进行评定,去除发酵风味相近和口感较差的菌株,共筛选出 9 个地区共 14 株发酵品质突出的菌株,见表 3。其中,毕节地区 3 株,兴义、六盘水、镇远各 2 株,其他各 1 株。各地区菌株的发酵风味和口感均有较大差别,其中以毕节地区(BJ)品质最佳。

### 2.3 复筛

#### 2.3.1 产蛋白酶能力的测定

表 4 分离菌株产蛋白酶能力

Table 4 Protease-producing activities of screened *Bacillus* strains

菌种	h (mm)	c (mm)	h/c 值
B1 ⑥	21.8	3.0	7.30
纳豆芽孢杆菌	19.4	6.6	2.94
BJ3-2	21.6	6.0	3.60
ZH3-1	17.8	7.2	2.47
DF1-3	13.8	6.7	2.05
BJ1-3	18.4	10.8	1.71
WA1-3	18.1	11.4	1.59
ZY4-5	19.6	13.0	1.50
XS1-2	20.0	13.6	1.44
BJ1-4	16.2	11.2	1.44
XY2-5	19.2	13.4	1.43
ZH3-5	18.7	13.3	1.40
LP1-1	6.0	4.6	1.30
XY2-3	20.0	16.3	1.23
LP4-5	20.2	16.4	1.23
GY12-2	22.2	20.9	1.06

表 3 初筛结果

Table 3 Results of preliminary screening of *Bacillus* strains

菌种	发酵特征					
	色泽	菌膜	黏丝	气味	滋味	质地
GY12-2	深黄褐色	有、多	有、很黏	氨味重	氨味重、回味微苦	软
XY2-3	微黄褐色	有、中	无	氨味重	酱味浓、回味很苦	软
XY2-5	黄褐色	有、多	有、中	氨味中、豉香浓郁	豉味很淡	适中
LP1-1	黄褐色	有、多	有、少	氨味重	豉味淡	适中
LP4-5	黄褐色	有、多	有、少	氨味重	豉味淡	软
ZH3-1	黄褐色	有、多	有、很黏	氨味中、酱味弱	豉味淡、微苦	太软
ZH3-5	深黄褐色	有、中	有、少	氨味中、酱味中	酱味中	软
BJ1-3	黄褐色	有、多	有、中	氨味轻、豉香味	酱味中	软
BJ1-4	黄褐色	有、中	有、很黏	氨味重	豉味淡	软
BJ3-2	深黄褐色	有、中	有、很黏	酱味中	酱味明显	软
ZY4-5	黄褐色	有、多	有、中	氨味中	豉香、氨味淡	软
WA1-3	黄褐色	有、多	有、很黏	氨味中、有豉香	略苦、有氨味	软
DF1-3	黄褐色	有、中	无	与其他豉味不同	无味	适中
XS1-2	黄褐色	有、中	有、中	氨味重	很苦	软

豆豉的制曲过程是利用菌株产生的蛋白酶分解豆中的蛋白质,形成一定量的氨基酸、糖类物质,赋予豆豉固有的风味,可见蛋白酶在形成豆豉风味过程中发挥了非常重要的作用。通过酪蛋白平板法粗测菌株的产蛋白酶能力,结果见表4。可知,B<sub>1</sub>⑥、BJ3-2、纳豆芽孢杆菌、ZH3-1和DF1-3的h/c值均大于2.0,其中BJ3-2为3.60,明显高于生产标准菌株纳豆芽孢杆菌,表明该菌株产蛋白酶能力很强。

表5 复筛-感官打分评测

Table 5 Sensory scores of lobster sauce fermented by screened *Bacillus* strains

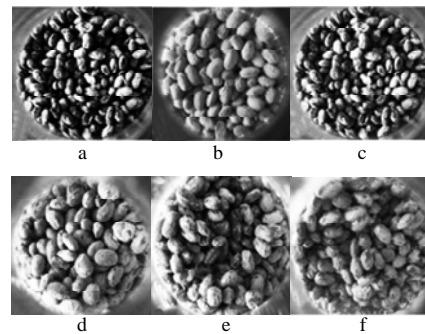
不同菌种 发酵的豆豉	外观(20分)		风味(60分)			质地 (20分)	总分 (分)
	色泽 (10分)	黏丝 (10分)	豉香 (20分)	氨味 (20分)	酱香 (20分)		
B <sub>1</sub> ⑥	4	10	20	20	20	15	89
自然发酵豆豉	10	6	20	10	0	15	61
纳豆芽孢杆菌	10	2	14	12	0	15	53
BJ3-2	7	7	16	20	16	15	81
ZHY3-1	10	10	6	14	0	10	50
DF1-3	10	0	2	20	0	15	47
BJ1-3	10	10	16	16	11	12	75
WA1-3	10	10	8	11	0	12	51
ZY4-5	10	6	15	16	0	14	61
XS1-2	10	6	4	8	0	14	42
BJ1-4	10	10	6	8	0	14	48
XY2-5	10	6	14	14	0	15	59
ZHY3-5	8	4	8	11	12	12	55
LP1-1	10	4	10	4	0	15	43
XY2-3	6	7	10	4	0	12	39
LP4-5	10	4	10	9	0	12	45
GY12-2	7	10	10	6	0	15	48

### 2.3.2 色泽和风味的评价

以B<sub>1</sub>⑥、纳豆芽孢杆菌和自然发酵的豆豉为对照,通过对菌株进行放大发酵,从外观、风味和质地评测其发酵豆豉品质,并打分,结果见表5。可知,BJ3-2、BJ1-3和ZY4-5分别以81、75和61分居分离菌种前三位,其中BJ3-2跟B<sub>1</sub>⑥的发酵风味相似,B<sub>1</sub>⑥的酱香味浓、豉粒颜色较深,BJ3-2的酱香味适中,豉粒颜色与自然发酵豆豉更接近,BJ1-3与自然发酵豆豉的风味相似,ZY4-5与纳豆芽孢杆菌的发酵风味相似,且比纳豆芽孢杆菌的氨味稍淡,更具食用性。因此,根据感官评分,确定发酵品质突出的菌株为:ZY4-5、BJ3-2和BJ1-3。

以上3个菌株发酵豆豉感官特征见图1,产蛋白酶能力对比见图2。豆豉发酵过程各种酶类物质对其发酵品质均有一定的贡献,但蛋白酶对豆豉风味的影响最大,因此选择通过菌株产蛋白酶能力和感官评价结合的方法来快速筛选优良菌株。分析ZH3-1、DF1-3和WA1-3产蛋白酶能力虽然高、风味却不理想

的原因,可能是菌株酶系不完整或某些酶类产量低,



发酵菌株 a~f 依次为: B<sub>1</sub>⑥、纳豆芽孢杆菌、自然发酵豆豉 BJ1-3、BJ3-2 和 ZY4-5。

图1 菌株发酵感官特征

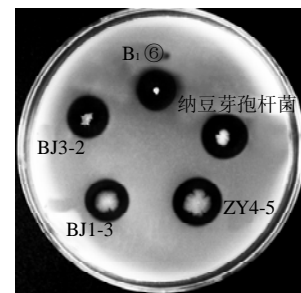
Fig.1 Sensory features of lobster sauce fermented by screened *Bacillus* strains

图2 ZY4-5、BJ1-3、BJ3-2、B<sub>1</sub>⑥和纳豆芽孢杆菌产蛋白酶能力的比较

Fig.2 Comparison of protease-producing activity among *Bacillus* ZY4-5, BJ1-3, BJ3-2, B<sub>1</sub>⑥ and *Bacillus subtilis* natto

从而导致风味较差。

### 2.4 发酵产气实验

大豆中含有棉籽糖、水苏糖和蔗糖等,在豆豉发酵过程中,还能形成蔗果三糖等多种糖类物质,这些物质能发酵产气,能否筛选到发酵糖类物质不产气的菌株成为解决工业发酵细菌型豆豉的关键问题之一。因此,选择整理黄豆为材料,将复筛得到的菌株ZY4-5、BJ3-2和BJ1-3进行发酵产气实验。结果表明,3个菌株均为阴性,即发酵大豆不产气的菌株。

### 2.5 菌株鉴定

#### 2.5.1 形态学和生理生化鉴定

对通过初筛、复筛和产气实验得到的ZY4-5、BJ3-2和BJ1-3进行形态学和生理生化特征的观察,结果如下。

个体形态:BJ1-3、BJ3-2和ZY4-5的革兰氏染色图片(10×100倍,图3)显示其均为革兰氏阳性菌。3个菌株的个体形态大体一致:其菌体长(μm)×宽(μm)分别为2.45×0.55、2.6×0.5、2.25×0.56,且菌体两端均有芽孢,椭圆形、无膨大。

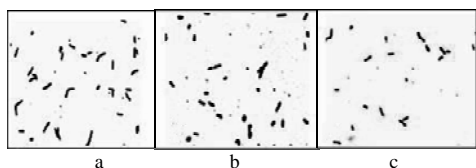


图3 BJ1-3(a)、BJ3-2(b)和ZY4-5(c)的革兰氏染色结果

Fig.3 Gram staining results of *Bacillus* BJ1-3 (a), BJ3-2 (b) and ZY4-5 (c)

菌落特征(图4): 3个菌株的菌落特征均为纯白色、不透明、外观不规则,但稍有差异。其中BJ1-3表面无褶皱、菌体干燥;BJ3-2菌落中心呈同心环状隆起、菌体黏稠;ZY4-5菌落中心区域有隆起、菌体干燥。

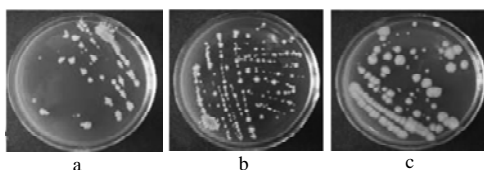
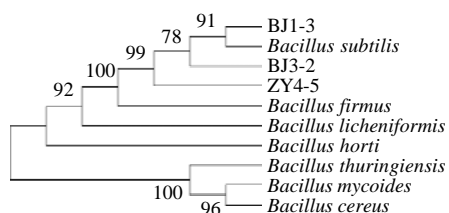


图4 BJ1-3(a)、BJ3-2(b)和ZY4-5(c)的平板形态特征

Fig.4 Flat plate feature of *Bacillus* BJ1-3 (a),BJ3-2 (b) and ZY4-5 (c) after cultured at 37 °C for 24 h

生理生化特征: 除D-木糖和D-甘露糖的产酸、利用丙酸盐实验外,其他各生理生化指标均与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)一致。结合BJ1-3、BJ3-2和ZY4-5的个体形态和菌落特征,并按照文献[9]~[11]提供的鉴定依据,3个菌株都是能形成芽孢的革兰氏阳性细菌,属芽孢杆菌科芽孢杆菌属。因此,初步确定BJ1-3、BJ3-2和ZY4-5为枯草芽孢杆菌。

### 2.5.2 16S rDNA 序列分析



各菌株NCBI登录号依次为:*Bacillus cereus*(FJ030641)、*Bacillus thuringiensis*(FJ009412)、*Bacillus mycoides*(AF234860)、*Bacillus horti*(AB111936)、*Bacillus firmus*(EU924075)、*Bacillus subtilis*(EU660315)、*Bacillus licheniformis*(AF234857)。

图5 枯草芽孢杆菌 ZY4-5、BJ3-2 和 BJ1-3 的 16S rDNA 序列的聚类分析

Fig.5 Clustering analysis of 16S rDNA sequences of *Bacillus* ZY4-5, BJ3-2, BJ1-3 and their relatives

将ZY4-5、BJ3-2和BJ1-3的阳性克隆子送宝生物工程(大连)有限公司测序,获得的16SrDNA序列长度均为932bp,其序列登录号分别为FJ235077、FJ235078和FJ235079。从Genbank中选择了有代表性的蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)、蕈状芽孢杆菌(*Bacillus mycoides*)、花园芽孢杆菌(*Bacillus horti*)、坚强芽孢杆菌(*Bacillus*

*firmus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)等七株芽孢杆菌的16S rDNA的序列,应用Megalign软件绘制聚类图谱,结果见图5。可知,3个菌株均与*Bacillus subtilis*在同一分支中,此结果与理化鉴定结果一致。因此,确定ZY4-5、BJ3-2和BJ1-3为枯草芽孢杆菌。

### 2.6 扩大纯种发酵

ZY4-5、BJ3-2和BJ1-3的扩大纯种发酵豆豉不仅豉香浓郁,拉丝长,发酵风味好,而且各自的特点也得到体现。BJ3-2蛋白酶产量高,拉丝特别长,并且酱香味浓郁;ZY4-5菌膜包裹均匀,风味颇似纳豆芽孢杆菌,具有食用性;BJ1-3与自然发酵的豆豉风味很相近。3个菌株扩大纯种发酵豆豉的品质均优于少量纯种发酵时的品质,发酵时间与豆豉传统工艺相近,基本满足规模发酵的条件,可以作为工业纯种发酵的参考菌株。

### 3 结论

对贵州省10个地区细菌型豆豉样品中芽孢杆菌的分离,进行纯种发酵、口感评测、蛋白酶能力的测定和产气实验,从中筛选出3株风味和口感突出、蛋白酶产量较高、发酵不产气的芽孢杆菌菌株:ZY4-5、BJ3-2和BJ1-3,其中BJ3-2的蛋白酶活力高于对照菌株纳豆芽孢杆菌。通过形态学、生理生化和16S rDNA序列分析,确定3个菌株皆为枯草芽孢杆菌,且其扩大纯种发酵的色泽、风味和口感等品质都很好。因此,ZY4-5、BJ3-2和BJ1-3皆可取代自然发酵菌种,作为纯种发酵的参考菌株应用于工业。

### 参考文献:

- [1] 鄯晋晓,盛占武,蒋和体.细菌型豆豉的研究现状及发展前景[J].中国酿造,2007(3):1-4.
- [2] 秦礼康,曾海英,丁霄霖.陈窖豆豉耙盐酵菌株筛选[J].食品科学,2006,27(11):77-81.
- [3] 袁贵英,石明生,姬长新,等.河南臭豆豉发酵微生物的分离鉴定[J].江苏调味副食品,2007(2):28-36.
- [4] 余爱农,杨春海,谭志斗,等.细菌型豆豉香气成分的研究[J].食品科学,2002,23(12):98-100.
- [5] SUMI H, HAMADA H, TSUSHIMA H, et al. A novel fibrinolytic enzyme(nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean food in the Japanese diet[J]. Experientia, 1987, 43: 1110-1111.
- [6] 沈萍,范秀荣,李广武.微生物学实验[M].3版.北京:高等教育出版社,2002:214-216.
- [7] 中国科学院微生物研究所.菌种保藏手册[M].北京:科学出版社,1980:53.
- [8] 邵元龙,谢和.两株枯草芽孢杆菌蛋白酶的提取及产酱香研究[J].郑州轻工业学院:自然科学版,2005,20(3):51-53.
- [9] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,1999:353-387.
- [10] 布坎南R E,吉本斯N E.伯杰细菌鉴定手册[M].8版.北京:科学出版社,1984:729-758.
- [11] 周德庆.微生物学实验手册[M].上海:上海科学技术出版社,1986:101-114.
- [12] 萨姆布鲁克J,弗里奇E F,曼尼阿蒂斯T.分子克隆[M].北京:科学出版社,2002:35-47.