

陈窖豆豉粬益酵菌株筛选

秦礼康¹, 曾海英¹, 丁霄霖²

(1. 贵州大学生命科学学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要: 从贵州黔西和大方两地传统陈窖豆豉粬不同工艺阶段分离到的 40 株菌株, 经胞外蛋白质和脂肪水解酶活力、耐盐性能、抗紫外光照射和抗生素敏感性等综合性能评价, 筛选到 12 株芽胞杆菌可作为陈窖豆豉粬纯菌发酵的选择菌株。

关键词: 陈窖豆豉粬; 益酵菌株; 筛选

Selection of the Fermentative Strains for the Manufacture of Long-ripened *Douchi ba*

QIN Li-kang¹, ZENG Hai-ying¹, DING Xiao-lin²

(1. College of Life Science, Gui Zhou University, Gui yang 550025, China;
2. College of Food Science, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: As starter cultures, twelve strains of *Bacillus* were screened for the manufacture of long-ripened *Douchi ba* from 40 strains isolated from naturally fermented *Douchi ba* samples at consecutive stages from *Qianxi* and *Dafang* of Gui Zhou Province, through comprehensive evaluation including extracellular proteolytic activity and lipolytic activity, salt tolerance, ultraviolet light resistance, and antibiotic sensitivity.

Key words: long-ripened *Douchi ba* (DCB); fermentative strain; selection

中图分类号: 0939.97

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)11-0077-05

适宜原料、优良菌株和合理工艺是保证传统发酵食品工业化生产的三大要素。其中, 微生物起着最关键的决定性作用。所以, 特定微生物的控制、优势发酵菌群的演替或者性能优良发酵菌株的筛选, 一直是发酵食品研究的热点^[1-3]。作为发酵食品主要构成的大豆发酵食品或调味品, 因产品独特的感官特征、极高的营养价值和突出的生物活性, 一直倍受中国、日本、韩国、印尼、非洲等多个国家的高度重视, 历经大量学者的深入研究, 酱油、腐乳、豆豉、豆酱、纳豆、丹贝等多种大豆发酵食品现已实现了规模化生产。所

以, 近年来对一些地方特色大豆发酵食品的挖掘, 已日益成为各国学者的关注对象^[4, 5]。

陈窖豆豉粬, 作为贵州独有的传统豆豉类发酵调味品, 近年来已显现了较大的市场潜力, 但陈窖豆豉粬的生产, 目前仍沿用传统的家制工艺, 生产规模小, 劳动强度大, 工序多, 周期长, 季节限制严重, 产品质量极难保证。因此, 作者在分离鉴定贵州传统陈窖豆豉粬微生物区系^[6]和滋香味化合物^[7]的基础上, 首次以胞外蛋白酶和脂肪酶水解活力、抗逆境(耐盐)生长能力、抗紫外光照射能力以及抗生素敏感性为指标, 对

收稿日期: 2006-08-20

基金项目: 贵州省自然科学基金项目(黔科合 2005-2023); 贵州省教育厅自然科学研究项目(黔教科 2004-204)

作者简介: 秦礼康(1965-), 男, 副教授, 博士, 研究方向为食品科学与工程。

1999, 64(1): 89-93.

[12] Choi M H, Ki Ma G H, Lee H S. Effects of ascorbic acid retention on juice color and pigment stability in blood orange (*Citrus sinensis*) juice during refrigerated storage[J]. Food Research International, 2002, (35): 753-759.

[13] Roig M G, Bello J F. Studies on the occurrence of non-enzymatic browning during storage of citrus juice[J]. Food Research International,

1999, 32(9): 609-619.

[14] Yrjö H, Roos, Mari J H. Nonenzymatic browning behavior as related to glass transition of a food model at chilling temperatures[J]. J. Agr. Food Chem, 1994. 893-898.

[15] Wong M, Stanton D W. Nonenzymatic browning in kiwi fruit juice concentrate systems during storage[J]. J. of Food Sci, 1998, (3): 1699-1722.

表1 分离菌株胞外蛋白酶和脂肪酶活力
Table 1 Proteolytic and lipolytic activities of isolates

菌号	菌数(CFU/ml)	蛋白酶活力	脂肪酶活力	菌号	菌数(CFU/ml)	蛋白酶活力	脂肪酶活力
B _{1(2, 4)}	2.2×10^8	+++	-	B ₂₁	1.3×10^7	++	-
B ₃	3.0×10^8	+	-	B ₂₂	2.0×10^6	++	-
B ₅	1.0×10^9	+++	-	NB _{2, 3}	7.5×10^7	-	-
B _{6(8, 9)}	8.4×10^8	—	-	C ₁	2.9×10^8	+++	-
B ₇	8.5×10^8	+++	-	C _{2(3, 4)}	2.3×10^8	-	-
B ₁₀	1.8×10^8	+++	-	M ₁	3.5×10^6	+	-
B ₁₁	2.5×10^6	+++	+	M ₂	2.0×10^7	++	-
B ₁₂	2.2×10^7	+++	+	M ₃	1.4×10^8	-	-
B ₁₃	3.6×10^7	+++	-	M ₄	4.0×10^7	+	-
B ₁₄	1.0×10^8	+++	-	M ₅	1.6×10^7	-	-
B ₁₅	2.5×10^7	+++	-	M ₆	1.2×10^7	-	-
B ₁₆	2.4×10^8	+++	-	M ₇	6.5×10^6	++	-
B ₁₇	2.9×10^8	+++	-	Y ₁	2.0×10^6	+	-
B ₁₉	3.0×10^6	+++	-	Y ₂	$< 10^6$	++	-
B ₂₀	1.0×10^7	++	-				

分离菌株进行综合性能评价, 从而为陈窖豆豉耙实施产业化工艺改进(如纯菌接种或菌群强化发酵等)提供优良菌株。

1 材料与方法

1.1 胞外蛋白酶和脂肪酶活力

根据 Ama-Awua^[8]、Freitas^[9]和 Macedo^[10]的报道, 采用牛津杯 - 底物平板法进行测定。分别在 30%(W/V) 牛奶琼脂和 10%(W/V) 三丁酰甘油酯(Fluka, Switzerland) 琼脂平板上接种 200 μl 纯化菌株, 于适宜温度下培养 3d(每个菌株接种设 2 次重复) 后, 观察培养物浊区有无溶解圈。无溶解圈则蛋白和脂肪水解酶活力阴性(-), 而产生透明区的为蛋白和脂肪水解活力阳性, 用三个水平表示其酶活力大小: 菌落周围透明圈(含牛津杯直径) < 20mm, 酶活力弱(+); 20~30mm, 酶活力中等(++); > 30mm, 酶活力强(+++)。

1.2 耐盐性能

采用光电比浊法进行测定。将分离纯化菌株培养液旋涡振荡后分别接种 200 μl 于 5%、10%、15% 氯化钠营养肉汤培养基或马铃薯 - 葡萄糖 - 琼脂(PDA)液体培养基各两支。取一支作对照, 立即测量添加菌液后的 OD 值, 同时减去培养基空白。取另一支置于 37 或 25 下培养 24~48h 后再进行光电比浊。根据菌株在相应盐浓度下培养前后菌数的 OD 值变化判定其耐盐性能。

1.3 抗紫外光照射

将纯化菌株培养液进行梯度稀释后, 取 200 μl 稀释菌液涂布于营养琼脂培养基或 PDA 琼脂培养基各两个平板。取其中一平板置于 30 W 紫外光下 40 cm 处照射 30min, 另一平板作未照射紫外光的对照组, 两者均置于 37 或 25 下培养 24~48h 后进行菌落计数, 重复三次计平均值。比较照射组与未照射组菌落数变化, 从而初步判定试验菌株对紫外光照射敏感性。

1.4 抗生素敏感性

采用平板 - 纸片法测定。抗生素纸片从贵州省人民医院细菌科购置。对待检菌株先进行活菌计数, 而后采用平板 - 纸片法, 接种试验菌株, 37 或 25 下培养 24~48h 后观察抑菌环大小。药敏试验抑菌环直径判断标准由杭州天和微生物试剂有限公司提供。

2 结果与分析

2.1 分离菌株胞外蛋白酶和脂肪酶活力

蛋白质和脂肪水解是氨基酸、脂肪酸等小分子物质形成的主要途径, 而这些小分子物质对发酵食品风味的发展又起着非常重要的作用^[9, 10]。据 Quoba^[11, 12]、Ama-Awua^[8]等人对 Soumbala 或 Dawadawa 优势发酵菌群的研究, 芽胞杆菌(*Bacillus*)对蛋白质、脂肪和淀粉的水解能力, 在数量上和质量上均显示明显的菌株依赖性。因此, 对陈窖豆豉耙分离纯化的菌株进行胞外蛋白酶和脂肪酶活力测定, 是评定其作为潜在发酵剂菌株性能优劣的关键指标之一。

测定结果(表 1)表明, 从陈窖豆豉耙分离出来的 22 株芽胞杆菌中, 除 B₃、B_{6(8, 9)}、B_{20~22} 等菌株外, 其余芽胞杆菌均显示极高的胞外蛋白酶活力, 其中尤以 B₁₉ 和 B₁₁ 菌株最为突出(菌数量级仅为 10⁶); 酵母菌和霉菌菌株的蛋白酶活力相对较弱, 有的甚至不具胞外蛋白酶活力, 如 M₃、M₅ 和 M₆; 球菌属与非芽胞杆菌, 除 C₁ 显示较强的胞外蛋白酶活力外, 其余菌株无活力, 可以认为, 这些菌系在豆豉耙生产过程中是作为非主要作用微生物参与发酵。另外, 黔西、大方两地陈窖豆豉耙中分离出的芽胞杆菌也表现出不同的蛋白酶活力, 前者明显强于后者, 这可能与两地的地域环境、微生态圈、原料选择以及培菌工艺的不同有关。

就脂肪酶活力而言, 仅 B₁₁、B₁₂ 号菌株表现一定

的脂肪酶活力,而绝大多数分离菌株均表现阴性结果,这与 Quoba 等人^[13]的研究结果类似。

2.2 分离菌株耐盐性

在多数大豆发酵食品生产过程中,都不可避免地要添加食盐,除调味和防腐这双重功效外,更重要的是,借助盐溶作用提取前期主发酵微生物菌体繁殖产生的各种水解酶系,为后熟过程中一系列复杂的生化反应奠定基础。但大量研究表明,后熟过程中一些非主发酵微生物的介入,对产品色、香、味、体的形成起着极为重要的作用。当食盐达一定浓度时,对这些微生物会产生渗透胁迫以及毒性作用,使微生物受到抑制甚至死亡。因此,对食盐浓度的耐受性有助于评定生产菌株抗逆境生长性能的优劣。

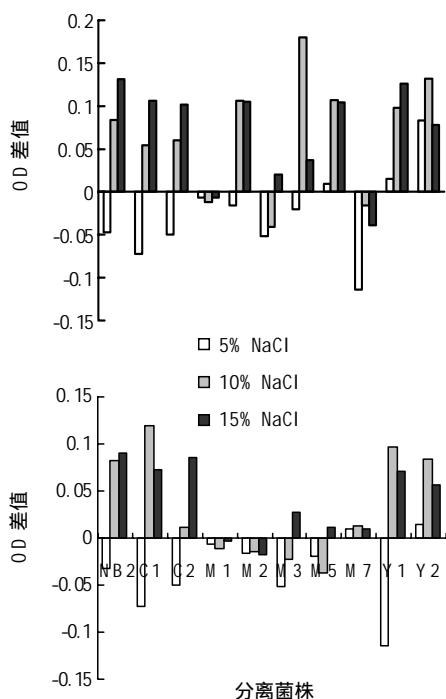


图1 分离菌株在不同盐浓度下培养前后的菌数变化(OD 差值)
Fig.1 Changes in amount of micropopulation (OD difference) before and after incubation at different concentration of salt

从图1可以观察到,5%食盐浓度时,21株被检菌株中,仅B₁₂、B₁₆、B₁₇、M₇、Y₂等菌株生长被抑制,即菌数有所减少(培养前后OD差值为正值),其余菌株培养后的菌数均不同程度增加(培养前后OD差值为负值),证明能耐受5%食盐浓度;食盐浓度为10%时,除B₆、B₁₀、B₁₃、M₁、M₂、M₃、M₅能耐受外,其余菌株生长都被抑制;食盐浓度达15%时,仅有B₆、B₁₃、M₁和M₂这四个菌株还能生长繁殖(OD差值仍为负值),其余菌株活菌数急骤减少,出现大量活菌细胞死亡。从这一结果可以确定,21株被检菌株中,除B₁₂、B₁₆、B₁₇、M₇、Y₂等菌株外,其余菌株均能耐受陈窖

豆豉发酵体系的盐浓度(多为4%),具较好抗逆性,可作纯菌发酵的选择菌株。

2.3 分离菌株抗紫外光照射

太阳光除可见光外,尚有长波的红外线和短波的紫外线。发酵基质直接曝晒于太阳光中,除红外线产生热量引起水分蒸发而间接地影响微生物生长外,紫外线还具有直接杀菌作用。在传统陈窖豆豉生产过程中,豆豉捣泥后的翻曲晾晒(约15d)以及成型后的反复续晒(约7d左右)工序,都可能对体系微生物菌群起到一定的杀伤作用,残存下来的菌群及数量,将直接影响后熟过程中产品的滋香味形成以及外观色泽的好坏。对分离菌株进行30W紫外光下40cm处照射30min的模拟试验,其结果(表2)表明,总体上,分离纯化的芽胞杆菌和大部分霉菌对紫外光照射都有一定的耐受性,而球菌、酵母菌和无芽胞杆菌对紫外光照射则较为敏感。尤其是无芽胞杆菌,经30min照射后再培养,已无菌落生长。在31株供试菌株中,抗紫外光照射能力最强的菌株主要为:B₁₃和B₁₄两株枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*);M₁爪哇毛霉(*Mucor javanicus*)、M₃鲁氏毛霉(*Mucor rouxians*)、M₂(4)总状毛霉(*Mucor racemosus*)等四株毛霉。

2.4 分离菌株抗生素敏感性

富含益生菌的发酵食品,改善肠道菌群平衡,已为世界各国学者所接受^[14~16],但是因摄入食品残留的大量抗生素或者药物抗性菌,导致肠道菌群外获抗药因子产生耐药性,日益引起食品界和医学界的高度关注^[18]。

陈窖豆豉产品,有时作为调味品直接食用,食用过程无加热杀菌工艺,豉体上附着的食物性微生物,对食用人群的公共卫生及安全性具有相当大的影响。因此,对陈窖豆豉的分离菌株进行了11种常用抗生素的敏感性试验。从检测结果(见表3)可看出:31株分离菌株之间,耐药率差异较大。其中除霉菌以外,其它类型微生物菌株耐药率均低于30%,有的菌株几乎对常用11种抗生素纸片均表现出高度敏感,从公共卫生角度来看,它们是相对安全的菌株,这为我们选育安全的生产菌株提供了参照。而发酵体系中存在的霉菌其耐药率相当高,有的甚至达99.99%,这些菌株具有多重药物抗性,因而不建议用作豆豉生产菌株。另一方面大多数菌株均表现出对丁胺卡那与庆大霉素敏感,而部分菌株对青霉素和氨苄青霉素具有明显的耐药性。在检测的试验菌株中仅6%的菌株未出现抑菌圈;9%的菌株抑菌圈<18mm;36%的菌株抑菌圈在19~30mm之间;55%的菌株抑菌圈>30mm。由此了解陈窖豆豉中的益酵微生物除霉菌外,绝大多数都是具有较高的食用安全性。

此外,对以上益酵微生物还进行了产硫化氢试验与靛基质试验,其结果表明,这些分离菌株硫化氢试验

表2 紫外光照射对菌株生长的影响
Table 2 Effect of ultraviolet light on strain growth

菌号	对照组(10 ⁵ CFU/ml)	紫外光照射组(10 ⁵ CFU/ml)	菌号	对照组(10 ⁵ CFU/ml)	紫外光照射组(10 ⁵ CFU/ml)
B _{1(2, 4)}	多不可计	146	B ₂₁	多不可计	51
B ₃	多不可计	288	B ₂₂	多不可计	13
B ₅	多不可计	62	NB ₂₍₃₎	多不可计	-
B ₇	多不可计	33	C ₁	多不可计	19
B _{6(8, 9)}	多不可计	23	C ₂₍₃₎	多不可计	15
B ₁₀	多不可计	38	C ₄	多不可计	7
B ₁₁	多不可计	94	M ₁	多不可计	多不可计
B ₁₂	多不可计	258	M ₂	多不可计	多不可计
B ₁₃	多不可计	多不可计	M ₃	多不可计	多不可计
B ₁₄	多不可计	多不可计	M ₄	多不可计	多不可计
B ₁₅	多不可计	56	M ₅	多不可计	36
B ₁₆	多不可计	38	M ₆	多不可计	1
B ₁₇	多不可计	40	M ₇	多不可计	4
B ₁₈	多不可计	48	Y ₁	多不可计	9
B ₁₉	多不可计	32	Y ₂	多不可计	1
B ₂₀	多不可计	49			

表3 分离菌株抗生素敏感性试验
Table 3 Antibiotic resistant test results of isolated strains

菌号	青霉素	氨苄青霉素	环丙沙星	红霉素	丁胺卡那	复方新诺明	氟哌酸	庆大霉素	先锋霉素	氯霉素	万古霉素	耐药率(%)
B _{1(2, 4)}	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0.01
B ₃	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0.01
B ₅	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0.01
B _{6(8, 9)}	L	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	13.64
B ₇	S	L	S	S	S	S	S	S	S	S	S	4.55
B ₁₀	S	S	S	L	S	S	S	S	S	S	S	4.55
B ₁₁	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	18.18
B ₁₂	L	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	13.64
B ₁₃	L	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	4.55
B ₁₄	R	R	L	S	S	S	S	S	S	S	L	18.20
B ₁₅	L	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	13.64
B ₁₆	L	R	S	S	S	S	S	S	S	S	L	9.09
B ₁₇	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	36.4
B ₁₈	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	9.10
B ₁₉	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	27.27
B ₂₀	L	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	13.64
B ₂₁	R	R	S	S	S	S	S	S	S	L	S	22.73
B ₂₂	R	R	S	S	S	S	L	S	S	S	S	22.73
NB ₂₍₃₎	S	L	S	R	S	S	S	S	S	S	S	13.64
C ₁	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	27.27
C ₂₍₃₎	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	9.09
C ₄	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
M ₁	R	L	S	S	S	R	S	S	S	S	S	22.73
M ₂	R	L	R	R	S	L	S	S	S	S	R	45.45
M ₃	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	99.99
M ₄	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	99.99
M ₅	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	99.99
M ₆	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	99.99
M ₇	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	99.99
Y ₁	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0.01
Y ₂	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0.01

注：R，耐药；L，敏感；S，高度敏感。

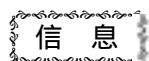
与靛基质试验均为阴性,即在其生命活动代谢中无有害物质硫化氢与吲哚的生成,可作为安全性菌株用于生产。

3 结 论

从黔西和大方两地传统陈窖豆豉不同工艺阶段共分离的40株菌(包括31株细菌、7株霉菌和2株酵母),经胞外蛋白酶和脂肪酶活力、抗逆境(耐盐)生长能力、抗紫外光照射能力以及抗生素敏感性四个方面进行综合评价,仅B1、B2、B4、B5、B7、B10、B11、B13、B14、B15、B18、B19等12株芽胞杆菌可作为陈窖豆豉纯菌发酵的参考菌株。

参考文献:

- [1] Caplice E, Fitzgerald GF. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation[J]. International Journal of Food Microbiology, 1999, 50: 131-149.
- [2] Wanakhachornkrai P, Lertsiri S. Comparison of determination method for volatile compounds in Thai soy sauce[J]. Food Chemistry, 2003, 83: 619-629.
- [3] Hansen EB. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future[J]. International Journal of Food Microbiology, 2002, 78: 119-131.
- [4] Valyasevi R, Rolfe RS. An overview of small-scale food fermentation technologies in developing countries with special reference to Thailand: scope for their improvement[J]. International Journal of Food Microbiology, 2002, 75: 231-239.
- [5] Holzapfel WH. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries[J]. International Journal of Food Microbiology, 2002, 75: 197-212.
- [6] 秦礼康, 曾海英, 丁霄霖. 陈窖豆豉传统工艺剖析及优势菌群鉴定[J]. 食品科学, 2006, 27: 118-123.
- [7] 秦礼康, 丁霄霖. 传统陈窖豆豉和霉菌型豆豉挥发性风味化合物研究[J]. 食品科学, 2005, 26(8): 275-280.
- [8] Amoa-Awua W K, Terlabie N N, Sakyi-Dawson E. Screening of 42 *Bacillus* isolates for ability to ferment soybeans into dawadawa [J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 106: 343-347.
- [9] Freitas AC, Pintado AE, Pintado ME, et al. Role of dominant microflora of Picante cheese on proteolysis and lipolysis[J]. International Dairy Journal, 1999, (9): 593-603.
- [10] Macedo AC, Malcata FX. Role of adventitious microflora in proteolysis and lipolysis of Serra cheese: preliminary screening[J]. Lebensmittelwissenschaften, 1997, 205: 25-30.
- [11] Ouoba LI, Diawara B, Amoa-Awuac WK. Genotyping of starter cultures of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* for fermentation of African locust bean (*Parkia biglobosa*) to produce Soubalanga[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 90: 197-205.
- [12] Ouoba LI, Reehinger KB, Diawara B, et al. Degradation of proteins during the fermentation of African locust bean (*Parkia biglobosa*) by strains of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* for production of Soubalanga[J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 94: 396-402.
- [13] Ouoba LI, Cantor MD, Diawara B, et al. Degradation of African locust bean oil by *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* isolated from Soubalanga, a fermented African locust bean condiment [J]. Journal of Applied Microbiology, 2002, (submitted for publication).
- [14] Kalantzopoulou G. Fermented products with probiotic qualities[J]. Anaerobe, 1997, (3): 185-190.
- [15] Samanya M, Yamauchi K. Histological alterations of intestinal villi in chickens fed dried *Bacillus subtilis* var. *natto*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A 2002, 133: 95-104.
- [16] Leroy F, Vuyst LD. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry[J]. Trends in Food Science & Technology, 2004, 15: 67-78.
- [17] 曾海英, 秦礼康, 江萍. 食源性乳酸菌外获抗药性的研究进展[J]. 食品科学, 2004, 25: 189-193.



信 息

日本生物塑料需求量增长快速

生物可降解塑料对环境友好,其包装材料制品具有较短的循环周期。据生物可降解塑料协会统计,2005年日本本土的生物塑料需求量达到3万t,较10年以前的统计数字——每年60t大大增长。

继2002年12月日本宣布采用生物技术策略指导方针和生物质战略之后,2004年6月日本卫生烯烃与苯乙烯塑胶协会又鼓励用玉米生产聚乳酸(PLA),这些都刺激了日本本土生物塑料商业生产的繁荣。

近年来,市场关注点正在从生物可降解能力向生物质质量转移,PLA尤其令人关注。聚乳酸可以从植物如玉米中提取出来,而它燃烧的时候,产生的热量较少,相应的就降低了二氧化碳排放量。它还具有广泛的应用,如气泡包装、食品包装等,是垃圾回收袋的理想原料,还可以做农业材料和土木工程材料。聚乳酸供应的不稳定性阻碍了其市场的蓬勃发展。但是2002年卡吉尔·陶氏公司产能14万t/a的PLA工厂投产之后,大大缓解了PLA市场供应短缺的问题。随着越来越多的厂商开始使用植物衍生PLA,生产成本得以降低,同时也为PLA的市场增长铺平了道路。