酱油腐败菌的分离鉴定与性质研究

李娜，冯峰，黎攀，罗立新
（华南理工大学生物科学与工程学院，广东广州 510006）

摘要：乳酸菌和肠杆菌在传统食品的发酵中易引起食品腐败。本研究从传统酱醅和胀罐酱油中分离筛选到 3 株疑似腐败菌，对其进行形态、生理生化特性研究及 16S rDNA 序列分析，结合 PCR-RFLP、ERIC-PCR 及 Species-Specific PCR，最终分别鉴定为产气肠杆菌、屎肠球菌（从酱醅中分离到）和马里乳杆菌（从胀罐酱油中分离到）。研究表明，产气肠杆菌具有极强产气性、而马里乳杆菌也具微弱产气性；将这三株菌接种到成品酱油中发现，均能微弱改变酱油 pH 值；同时这三株菌均对温度、pH、盐度具有耐受性；产气肠杆菌和屎肠球菌为条件致病菌，对消费者存在潜在危害，同时本研究发现马里乳杆菌的存在会引起酱油胀气、降低 pH，从而导致酱油腐败。这三株菌的分离鉴定，对酱油的质量保证和食用安全性具有重要意义。

关键词：酱油；腐败菌；鉴定；乳酸菌；肠杆菌

文章篇号：1673-9078(2014)10-120-125 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.10.021

Separation, Identification, and Characterization of Food Spoilage Bacteria in Soy Sauce

LI Na, FENG Feng, LI Pan, LUO Li-xin
(School of Bioscience &Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: *Lactic acid bacteria* (LAB) and *Enterobacter* species commonly cause spoilage in traditional fermented foods. In this study, three bacterial strains suspected to cause food spoilage were isolated from traditional Chinese grain soy sauce and swollen canned soy sauce. The morphological and physiochemical characteristics and 16S rRNA sequences of the strains were studied. Using PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), enterobacterial intergenic consensus–PCR (ERIC-PCR), and species-specific PCR, these strains were identified as *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecium* (isolated from grain soy sauce), and *Lactobacillus acidipiscis* (isolated from swollen canned soy sauce). The results showed that *E. aerogenes* possessed very strong gas-producing abilities, and *L. acidipiscis* was also a weak gas-producer. When the three bacterial strains were inoculated into soy sauce products, slight changes in the pH values of products were observed. In addition, all of the isolates were temperature-, pH-, and salinity tolerant. Both *E. aerogenes* and *E. faecium* are opportunistic pathogens and are potentially harmful to consumers. Furthermore, the presence of *L. acidipiscis* in soy sauce could cause gas production and a reduction in pH, thus resulting in spoilage. The separation and identification of three bacterial strains were important to ensure adequate quality and food safety of soy sauce.

Key words: soy sauce; spoilage bacteria; identification; lactic acid bacteria; *Enterobacter*

酱油是世界上受欢迎的调味品之一，其在中国有着悠久的历史。传统的中国酱油发酵主要包括四个步骤：(i)原材料的准备；(ii)酱醅即把米曲霉、酱油曲霉孢子和真霉混合发酵两天,这种发酵方式最初运用在日本清酒发酵剂中；(iii)与盐水混合发酵；(iv)酱汁的提取和混合。在这些过程中，酱醅的发酵阶段对其最后的品质是至关重要的，某些发酵过程（如乳酸和酒精发酵）对芳香成分的形成具有重要的作用[1]。许多报道对酱油中存在的微生物群落有争议，包括参与酱醅发酵过程影响瓶装产品质量的乳酸菌[2]。酸化和酵素作用过程伴随着乳酸菌的生长[3]，对许多发酵食品的风味、质地、防腐剂的质量有着很大的影响。肠球菌是重要乳酸菌的组成部分，并在发酵食品的生产中发挥重要的作用。

然而，屎肠球菌是典型的条件致病菌，能够引起菌血症、心内膜炎和其他传染性疾病[4]。肠杆菌属是能够通过食物由动物传染人类的重要致病菌，已经引起了相关方面的重视[5]。此外，在食品加工过程中它们可能会污染并降低食品价值。

之前的相关研究已经阐述了乳酸菌属和肠杆菌属的有害性与酱油腐败有关[6]。很少有人知道这些潜在的致腐败菌参与中国传统酱油的酿造。酱油腐败主要

收稿日期：2014-05-11
基金项目：国家自然科学基金资助项目（31271924）
作者简介：李娜（1989-）女，硕士，研究方向：工业微生物
通讯作者：罗立新（1963-），男，教授，研究方向：微生物学及发酵

表现为胀罐(产气)和由于微生物导致的 pH 值改变[7]，而这些性质又决定了食品的质量和安全。因此，本研究的目的是通过表型分析和分子生物学的方法确定疑似乳酸菌和肠杆菌是存在于酱油发酵过程中的。

1 材料和方法

1.1 样品收集

本研究所用的胀罐的和正常的瓶装酱油来源于中国西北部的山西省当地的一家工厂；所用的酱醅样品来源于中国南部广东省的某工厂，并且他们的瓶装酱油同样有胀罐现象。

1.2 主要试剂和材料

限制性内切酶Hae III、Hinf I和Msp I；T4 DNA连接酶；DNA Marker；PCR片段纯化试剂盒和基因组提取试剂盒均为捷瑞公司提供;其它化学试剂均为分析纯

1.3 主要仪器设备

SUKUN 双层小容量全温恒温培养摇床；eppendorf舒适型恒温混匀器；eppendorf梯度PCR仪；Tanon EPS 100核酸电泳仪；Bio-Rad照胶成像仪

1.4 实验方法

1.4.1 菌株分离

取酱醅 10.00 g 或者瓶装酱油 10.00 mL 加到 90.00 mL 0.85% NaCl 溶液中，150 r/min 下摇床混匀。再用 10 倍连续稀释法进行梯度稀释。取 100.00 uL 稀释液涂板于 LB 培养基、添加 5%葡萄糖的 LB 培养基和添加 5%葡萄糖 MRS 培养基。LB 和 MRS 平板均在 37 ℃恒温培养箱培养 1~3 天。同时对胀罐酱油进行菌落计数。纯菌落划线后保存在 30%甘油的 MRS 培养基（-80 ℃）。

1.4.2 表型特征分析

用光学显微镜观察其革兰氏染色、形态和运动性。根据文献方法[8]对其过氧化氢酶活性和硝酸盐还原性能进行了测试。D-葡萄糖和乳糖产气实验通过倒扣在 MRS 肉汤中的杜氏管进行检测。糖发酵实验参照之前所述[9]。

1.4.3 ERIC-PCR 基因分型和 PCR-RFLP 菌株鉴定

通过 ERIC-PCR 技术对分离菌株的基因型的多样性进行分析。采用细菌基因组提取试剂盒（捷瑞 GK1071）提取总基因组。ERIC-PCR 技术所用的上游引物 ERIC-1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3')和下游引物 ERIC-2（5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'）[10]。ERIC-PCR 总反应体系为 25 μL，包括预混酶 Ex Taq DNA 聚合酶 12.5 μL、上下游引物各 1 μL（20 μM）、模板 DNA 1 μL，补水至 25 μL 体系。设定反应条件为 94 ℃预变性 5 min，30 个循环（94 ℃变性 30 s，50 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 4 min）后，72 ℃延伸 10 min，16 ℃保存。扩增片段在 1.5%琼脂糖凝胶中电泳检测后，用凝胶成像系统对其成像。扩增片段大小用 Quantity One 4.4.0 分析软件进行定量。

PCR-RFLP 技术对分离株 16S rRNA 基因进行分析以获得其基因型特征。用先前描述的方法对 16S rRNA 基因进行扩增。根据操作说明，扩增片段分别用 Hae III、Hinf I 和 Msp I 进行酶切消化。酶切片段通过 3.0%的琼脂糖凝胶电泳检测，用凝胶成像系统对其成像。酶切片段大小用 Quantity One 4.4.0 分析软件进行定量

1.4.4 16S rRNA 测序和 species-specific PCR

将分离的单菌落接种于 MRS 培养基中 30 ℃培养 1~3 d 生长至稳定期。采用细菌基因组提取试剂盒（捷瑞 GK1071）提取总基因组。16S rRNA 通用引物为：上游引物 27F（5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG -3'），下游引物 1492R（5'-GGTTACCTTGTTACGAC TT-3'）。扩增的 16S rRNA 片段插入质粒 pMD18-T 后，在英俊公司测序。测得的 16S rRNA 基因序列运用 NCBI 数据库中的 BLAST 工具搜索与其具有较高同源性的细菌，进行比对。用 MEGA 4.0 UPGMA 法构建系统发育树。同时采用了 species-specific PCR 鉴定肠球菌[11]。

1.4.5 分离株的生长情况和酸碱活性测定

分离株以 1%的接种量接种至 MRS 培养基中，30 ℃或 37 ℃培养。以 3%（*V/V*）接种量接种至含 5%（*m/V*）的葡糖糖酱油成品中，30 ℃培养。不同时间点取样，测定其生长曲线和酸碱活性。用 pH 计测定 pH 值来评估菌株酸碱活性。

1.4.6 温度、pH 值和耐盐性研究

分别检测分离菌在不同的温度（4、15、45、50 ℃）、不同的初始 pH 值（3、4、5、6）及不同盐浓度（5%、10%、15%、18%（*m/V*））下的生长情况。对分离株的热稳定性进行检测，预培养的分离株悬浮液在 65 ℃温浴 1 min 和 5 min，30 ℃为阳性对照，计算存活率。

2 结果和讨论

2.1 细菌的分离和鉴定

表 1 分离菌株的表型特征

Table 1 Phenotypic characterization of the bacterial isolates

特征		菌株 A	菌株 B	菌株 C
革兰氏染色		-	+	+
细胞形态		R	C	R
过氧化氢酶活性		+	-	-
硝酸盐还原性		+	-	-
能动性		+	-	-
糖发酵	D-葡糖糖	+	+	+
	乳糖	+	+	+
	D-甘露醇	+	+	+
	L-阿拉伯糖	+	-	+
	D-木糖	+	-	+
	麦芽糖	+	+	+
产气	葡糖糖	+++	-	+
	乳糖	+++	-	+

注：+代表革兰氏阳性；-革兰氏阴性；R杆状；C球菌；+++强阳性反应。

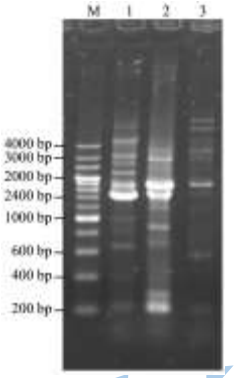


图 1 分离株的 ERIC－PCR 谱图

Fig.1 ERIC-PCR profile of the isolates

注：M为200 bp Marker；泳道1、2、3分别为产气肠杆菌、屎肠球菌、马里乳杆菌。

本研究中，从酱醅中分离出两株不同的细菌命名为菌株 A 和菌株 B。菌株 A 为革兰氏阴性、过氧化氢酶阳性、能动、硝酸盐还原阳性杆菌，具有利用葡萄糖和乳糖产气的能力。鉴于其革兰氏阳性，过氧化氢酶阴性，硝酸盐还原阴性和非能动的特征，菌株 B 被认为是乳酸菌。为进一步鉴定分离株，进行糖发酵实验（表 1）。根据革兰氏手册，菌株 A 和 B 分属于肠杆菌属和肠球菌属（或者链球菌属）。菌株 C 在 MRS 琼脂培养基上 30 ℃培养 3 d 后只在胀罐的酱油产品中检出，为革兰氏阳性、过氧化氢酶阴性、硝酸盐还原阴性、杆状、微产气能力，属于乳杆菌，其在胀罐酱油中含量大约为 3.60 Log CFU/mL（数据未显示）。对三株菌进行 ERIC-PCR（图 1）和 PCR-RFLP（图 2）分型。这三株菌均有独特 ERIC/RFLP 型，应分属于不同种。

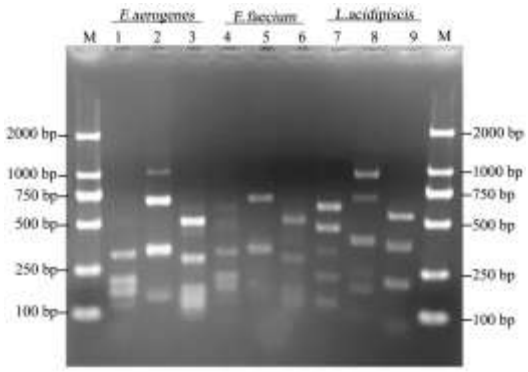


图 2 分离株的 PCR-RFLP 图谱

Fig.2 PCR-RFLP profile of the isolates

注：M为2000 bp Marker；泳道1、4、7为*Hae* III酶切；泳道2、5、8为*Hin*fI酶切；泳道3、6、9为*Msp*I酶切。

表 2 分离株的 16S rRNA 鉴定

Table 2 16S rRNA sequence of the isolates

菌株	最高同源菌	相似度/%	检索号
A	产气肠杆菌	99	NR102493.1
B	屎肠球菌	99	GU968175.1
C	马里乳杆菌	99	JQ043375.1

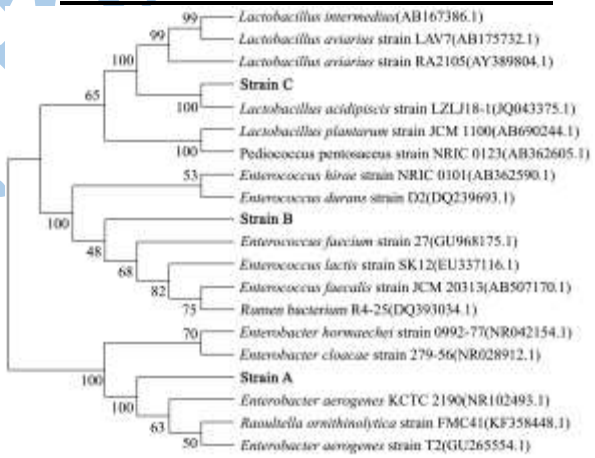


图 3 分离株 16S rRNA 基因的系统进化树，采用 UPGME 法（1000 bootstrap analysis）

Fig.3 Phylogenetic tree of the isolates based on 16S rRNA using the UPGMA method (1000 bootstrap replicates)

采用 16S rRNA 测序法进一步鉴定这三株菌。根据测序结果（表 2）及进化树(图 3)分析表明，菌株 A 和产气肠杆菌有99%的同源性，菌株 B 和屎肠球菌（或粪肠球菌）有 99%的同源性，菌株 C 和马里乳杆菌有 99%的同源性。为进一步区分菌株 B，分采用屎肠球菌和粪肠球菌特异性引物进行 PCR。根据文献报道[11]，用屎肠球菌特性引物可以得到约 550 bp PCR 产物（图 4），而粪肠球菌特异性则未扩增出目的片段，

菌株 B 为屎肠球菌。

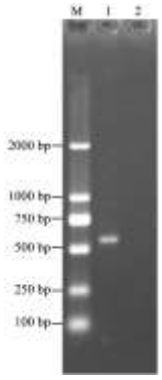


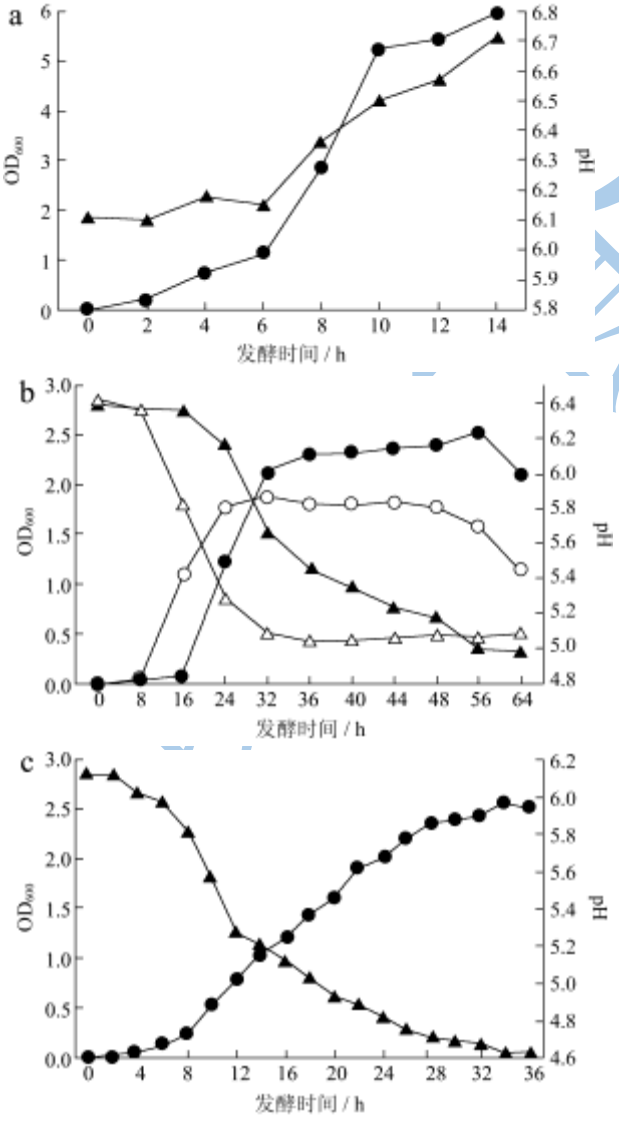
图 4 菌株 B 种特异性 PCR 图谱

Fig.4 Species-specific PCR profile of strain B

注：M为2000 bp Marker；泳道1为屎肠球菌特异性引物扩增片段；泳道2为粪肠球菌特异性引物的目的条带。

2.2 分离株的生长和酸碱活性

为了进一步研究这三株特性及其在酱油腐败中的作用，分别测定其生长曲线和酸碱活性。



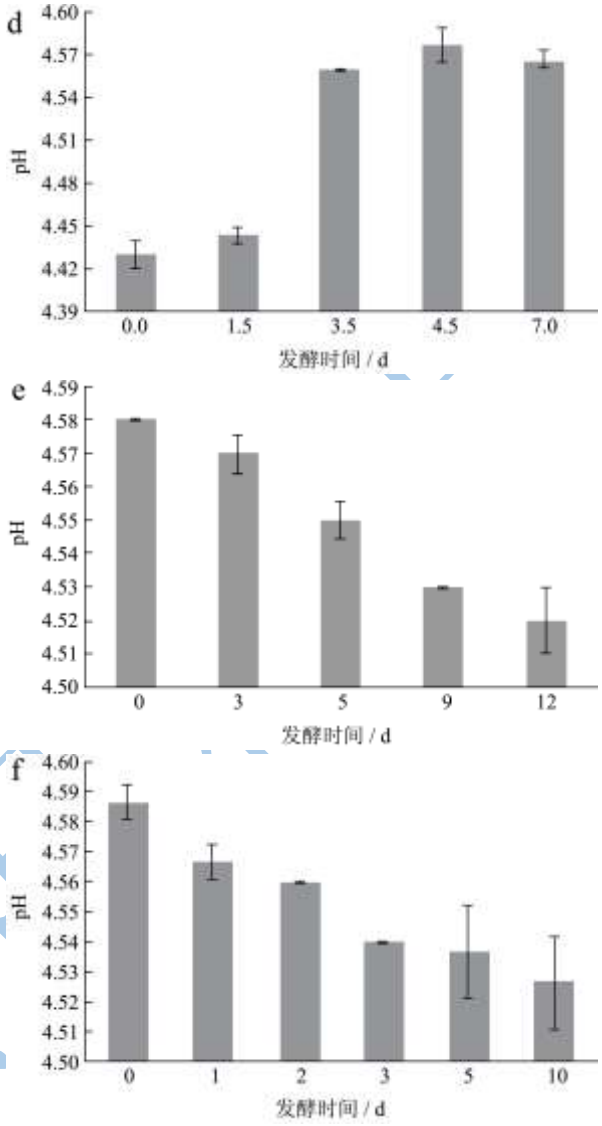


图 5 分离株的生长曲线和酸碱性质检测

Fig.5 Growth curves and acid-base properties of the isolates

注：产气肠杆菌(a)、屎肠球菌(b)和粪肠球菌(c)在MRS培养基中30 ℃(●)或37 ℃(○)培养的生长曲线；产气肠杆菌(d)、屎肠球菌(e)和粪肠球菌(f)在30 ℃(▲)或37 ℃(△)中热稳定性检测。

在研究中，在 30 ℃发酵培养 64 h 和 37 ℃发酵培养 36 h 培养后，屎肠球菌将 MRS 液体培养基初始 pH 6.4 降低至 pH 5.0（图 5b）。马里乳杆菌在 30 ℃培养 36 h 后，将 MRS 液体培养基的 pH 值从 6.1 降至 4.6（图 5c）。同时，将马里乳杆菌和屎肠球菌接种至成品酱油中，仍具有微弱产酸活性（图 5e 和 5f），在酱油成品中和 MRS 培养基中产酸活性的差异可能是由于酱油的盐度极高（达 18%）所导致[12]。相反，在 30 ℃培养 14 h 后，产气肠杆菌可将 MRS 液体培养基初始 pH 值从 6.1 升至 6.7（表 5a），在 30℃发酵培养 5 d 后，也可将酱油产品的 pH 值从 4.4 升至 4.6（表 5 d），产气肠杆菌引起的 pH 值上升可能是由其参与发酵过程中所涉及的蛋白水解活性所导致的[13]。

乳酸菌可以通过直接产生风味代谢产物并提高食品的营养品质以帮助发酵食品获得独特的物理特性[14]。但是，马里乳杆菌是从胀罐酱油中所分离筛选到的，马里乳杆菌在酱油中的生长代谢可消耗酱油养分、降低 pH，本实验同时证实，马里乳杆菌在利用葡萄糖和乳糖下具有微弱的产气能力，因此马里乳杆菌可引起酱油腐败。产气肠杆菌具极强产气活性，同时，产气肠杆菌和屎肠球菌是条件致病菌，只在酱醅中筛选到，对公众安全存在潜在威胁。鉴于此，进一步研究这三株菌的温度、pH 和盐的耐受性。

2.3 分离菌株的温度、pH 和盐的耐受性

表 3 表示了三株菌对温度、pH 和盐的耐受性。三株菌在 4 ℃和 50 ℃时均能生长；除了屎肠球菌，其他两株菌在 pH 3 时都可以生长。三株菌甚至在 NaCl 浓度（*m/V*）为 18%时，仍能生长，表明三株菌具有抗盐胁迫性。

此外，同时检测这三株菌在不同温度处理条件下的存活率（图 6）。产气肠杆菌对热环境更敏感，在经过 65 ℃处理 1 min 后即不能存活，而屎肠球菌在 65 ℃处理 1 min 后存活率仍超过 51.9%；但在 65 ℃处理 5 min 后，屎肠球菌不能存活。在经过 65 ℃，1 min 保温处理后马里乳杆菌仍有 87.8%的存活率，且在 65 ℃保温处理 5 min 后仍有超过 2%的存活率，但在 65 ℃处理 10 min 后则无法存活(数据未显示)。测定这三株菌在不同温度下的活性和稳定性，为用巴氏消毒法将其从酱油终产品中彻底灭菌提供了有用的价值。

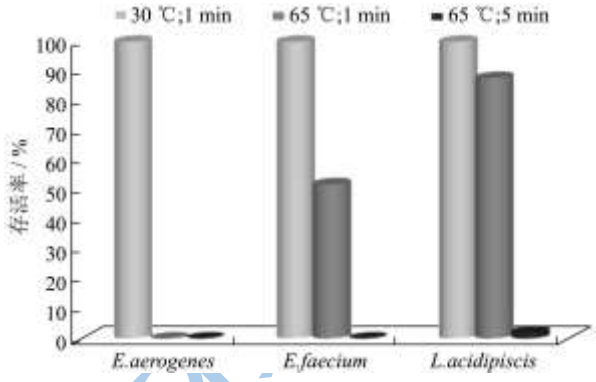


图 6 三个分离株的热稳定性

Fig.6 Thermal stability of the three isolates

表 3 分离株的温度、pH 和盐耐受性

Table 3 Temperature, pH, and salt tolerance of the isolates

菌株	温度/℃				pH				盐浓度(*m/V*)/%			
	4	15	45	50	3	4	5	6	5	10	15	18
产气肠杆菌	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w
屎肠球菌	w	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	w
马里乳杆菌	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w

注：+阳性反应；-阴性反应；w微弱反应。

3 小结

本研究首次从酱醅中分离筛选出条件致病菌产气肠杆菌和屎肠球菌，并从胀罐酱油中分离筛选出马里乳杆菌。产气实验证实，产气肠杆菌具强产气性，马里乳杆菌也具微弱产气性；经酸碱活性实验证实，产气肠杆菌具有强产碱性，同时屎肠球菌和马里乳杆菌有微弱的产酸活性，这些特性将导致酱油腐败，影响酱油成品的质量和安全性。同时对这三株菌温度、pH 及其耐盐性等特性研究，为酱油成品中彻底灭菌提供一定的依据。而酱油腐败有众多因素掺杂其中，有待于进一步研究。

参考文献

[1] 吴惠玲,魏鲁宁,周紫琦,等.蛋白酶固定化条件优化及在酱醪发酵中的应用[J].现代食品科技,2013,29(5):1080-1084
Wu Hui-ling,Wei lu-lin, Zhou zi-qi, et al, Optimization of immobilization conditions for protease and its application in the fermentation of soy sauce [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(5): 1080-1084

[2] Yin-zhuo Yan, Yu-lin Qia, Feng-di Ji, et al, Microbial composition during Chinese soy sauce koji-making based on culture dependent and independent methods [J]. Food Microbiology, 2013, 34(1): 189-195

[3] 邹阳,赵谋明,赵海锋,高效液相色谱法同时测定酱油中的8种生物胺[J].现代食品科技,2012,28(5): 70-573
ZOU Yang, ZHAO Mou-ming, ZHAO Hai-feng, Simultaneous determination of 8 kinds of biogenic amines in soy sauce by HPLC [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(5):570-573

[4] Charles M A P Franz, Michael E Stilesb, Karl Heinz Schleifer, et al, Enterococci in foods-a conundrum for food safety [J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 88(2): 105-122

[5] 黄宇锋,刘冬虹,聂炎炎,等,肉和肉制品中肠杆菌科细菌的检测和计数[J].现代食品科技,2013,29(2):409-412

HUANG Yu-feng, LIU Dong-hong, NIE Yan-yan, et al, Detection and enumeration of enterobacteriaceae in meat and meat products [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(2): 409-412

[6] Wendy Franco, Ilenys M. Pérez-Díaz, Suzanne D. Johanningsmeier, et al, Characteristics of spoilage-associated secondary cucumber fermentation [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(4): 1273-1284

[7] C Ubeda, R M Callejón, C Hidalgo, et al, Determination of major volatile compounds during the production of fruit vinegars by static headspace gas chromatography-mass spectrometry method [J]. Food Research International, 2011, 44(1): 259-268

[8] Somboon Tanasupawat, Ezaki T, Suzuki K, et al, Characterization and identification of Lactobacillus pentosus and Lactobacillus plantarum strains from fermented foods in Thailand [J]. Journal of General and Applied Microbiology, 1992, 38(2): 121-134

[9] Devriese, L B Pot, M Collins. Phenotypic identification of the genus Enterococcus and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups [J]. Journal of Applied Microbiology, 1993, 75(5): 399-408

[10] 郑扬云,吴清平,吴克刚等,空肠弯曲菌分离株 ERIC-PCR 分型和生化分型的比较研究[J].现代食品科技,2013,29(8): 1843-1850

ZHENG Yang-yun, WU Qing-ping, WU Ke-gang, et al, Comparison of the Typing Methods of ERIC-PCR and biochemical for *Campylobacter jejuni* isolates [J]. Modern Food Science and Technology, 2013. 29(8): 1843-1850

[11] Salim Ammor, Cinta Rachman, Stéphane Chaillou, et al, Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages [J]. Food Microbiology, 2005, 22(5): 373-382

[12] Fredy Morales, Jesús I Morales, César H Hernández, et al, Isolation and partial characterization of halotolerant lactic acid bacteria from two Mexican cheeses [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2011, 164(6): 889-905

[13] Luca Cocolin1, Marisa Manzano1, Carlo Cantoni, et al, Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(11): 5113-5121

[14] Shan-na Liu, Ye Han, Zhi-jiang Zhou. *Lactic acid bacteria* in traditional fermented Chinese foods [J]. Food Research International, 2011, 44(3): 643-651

现代食品科技