

酱油发酵过程中细菌的分离鉴定及其特性与交互作用

赵谋明, 陈涛, 王靖雯, 陈宇星, 李暄, 冯云子

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510641)

摘要: 本研究从高盐稀态酱油酱渣中筛选细菌菌株, 对 5 株代表性菌株进行理化性质分析探明菌株生长特性, 并在模型体系中研究其与酵母的交互作用对菌株繁殖及风味形成的影响。研究后发现, 解淀粉芽孢杆菌与枯草芽孢杆菌具有更强的蛋白酶活力, 而腐生葡萄球菌、克氏库克菌与约式不动杆菌有更强的生长活力与产酸能力。其中解淀粉芽孢杆菌的耐盐性最差, 其生长量相较于无盐状态下降低 98.5%。在细菌与酵母交互作用模型中, 发现解淀粉芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌和腐生葡萄球菌与鲁氏酵母之间存在相互促进生长的作用。如解淀粉芽孢杆菌与酵母的数量分别提升约 9.6 倍, 而腐生葡萄球菌与酵母分别提升约 5.2 倍。同时, 克氏库克菌的菌株与混菌培养体系均具有较好风味特性, 提升了乙酸、乙酸乙酯、苯乙醛、3-甲硫基丙醛和 3-甲硫基-1-丙醇等香气物质, 具有应用潜力。该研究将对酱油发酵中的风味调控提供理论依据。

关键词: 细菌; 风味; 交互作用; 酵母; 生长特性

文章编号: 1673-9078(2020)05-148-154

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.5.020

Identification of Bacteria during Soy Sauce Fermentation and the Study on Their Characteristics and Interactions

ZHAO Mou-ming, CHEN Tao, WANG Jing-wen, CHEN Yu-xing, LI Xuan, FENG Yun-zi

(School of Food Science and Engineering South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

Abstract: In this work, the physicochemical properties of 5 representative bacterial strains, which screened from the residue of high-salt liquid fermentation soy sauce, were analyzed to explore the growth characteristics, and to evaluate the effects of their interaction with yeast on the reproduction and flavor formation in the model system. The results showed that *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis* had stronger protease activity, while *Staphylococcus saprophyticus*, *Kocuria kristinae* and *Acinetobacter johnsonii* were stronger in growth activity and acid production. Among them, the salt tolerance of *Bacillus amyloliquefaciens* was the worst, and its colony-forming units (CFU) decreased by 98.5% compared to that without salt. In the model of interaction between bacteria and yeast, it was found that *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus saprophyticus* and *Zygosaccharomyces rouxii* promoted each other's growth. For example, the number of CFU of *Bacillus amyloliquefaciens* and yeast could increase by about 9.6 times respectively, while numbers of CFU of *Staphylococcus saprophyticus* and yeast could increase by about 5.2 times respectively. Meanwhile, *Kocuria kristinae* and its mixed culture systems had good flavor characteristics, which could improve various aroma compounds, such as acetic acid, ethyl acetate, benzene acetaldehyde, methional, 3-methylthio-1-propanol and so on, and had potential applications. This study will provide theoretical basis for the regulation of flavor in soy sauce fermentation.

Key words: bacterial; flavor; interaction; yeast; growth characteristics

引文格式:

赵谋明,陈涛,王靖雯,等.酱油发酵过程中细菌的分离鉴定及其特性与交互作用[J].现代食品科技,2020,36(5):148-154

ZHAO Mou-ming, CHEN Tao, WANG Jing-wen, et al. Identification of bacteria during soy sauce fermentation and the study on their characteristics and interactions [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(5): 148-154

收稿日期: 2019-08-16

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0400405); 国家自然科学基金青年基金项目(31701591); 广东省自然科学基金项目(A2017030310027)

作者简介: 赵谋明(1964-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术

通讯作者: 冯云子(1987-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 食品生物技术

酱油作为生活中常用的调味剂,距今已经有几千多年的历史^[1],在中国,日本^[2]等地广受欢迎,其消费量在世界范围内也不断扩大,是许多亚洲国家消费最广泛的调味品之一。随着消费者生活水平和品质要求的提升,人们对于酱油的风味品质也有了更高的要求。酱油的风味受到多种因素的影响其中发酵过程中微生物的生物化学反应对各类风味活性物质的生成具有重要作用^[3]。

对酱油发酵过程的研究表明发酵前期曲霉占主导地位,后期则以酵母和细菌菌群为主。在酱油食品中,能检出的细菌有乳酸杆菌,芽孢杆菌,葡萄球菌,四联球菌等,它们能够分泌蛋白酶和淀粉酶,水解蛋白质和多糖产生丰富的前体环境,有利于多种风味物质的形成,并能对理化指标及感官特性等多方面造成影响。如 Seul Gi Lee 等在韩国传统发酵豆制品发现一株枯草芽孢杆菌,能产生较高的氨基酸态氮含量,增进感官特性^[4]; Ranendra Kumar 等发现,克氏库克菌可以显著影响微发酵香肠的品质^[5];葡萄球菌在熏肉等多种发酵食品中起到关键作用^[6]。而在酵母菌方面,鲁氏酵母生香作用突出,在酱油生产中应用广泛^[7]。

除了单菌种的研究外,菌种之间的交互作用也逐渐成为了科学研究的热点。酱油发酵体系更是多菌种共同作用的代表,菌群组成和相互作用影响着产品风味的形成。Young-Ran Song 等研究了耐盐酵母对低盐发酵酱油理化及微生物特性的影响,发现酵母的加入可以抑制不良细菌的生长^[8]。Putu Virginia Partha Devanth 等研究了鲁氏酵母与嗜盐四联球菌共发酵之间的相互影响,发现酵母的添加可以显著提升嗜盐四联球菌的生长量,同时细菌的存在也为鲁氏酵母提供了适宜的生长环境^[9]。但现阶段,交互作用的研究对象主要为传统优势菌种,如鲁氏酵母、嗜盐四联球菌、乳球菌等,而近期越来越多的研究发现,一些在含量上处于劣势的菌群对产品的风味贡献显著。酱油生产中参与发酵的细菌种类繁多,而其作用及与酵母的相互影响研究尚少。

因此,本研究拟从高盐稀态酱油的酱渣中筛选特征细菌,通过基因检测鉴定其微生物种类,并挑选特征细菌研究生理生化特性;其次,将筛选的代表性菌种与酵母同时添加到发酵模型中,观察两者间的交互影响,为酱油发酵工艺的风味调控、品质提升提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 原料

发酵终点的酱油及酱渣,取自广东省某酱油厂,采用高盐稀态发酵法制备。

1.1.1 材料与试剂

氢氧化钠、甲醛、盐酸、葡萄糖、重铬酸钾、乙醇(分析纯)、三氯乙酸(分析纯)购于 Sigma(上海)有限公司;MRS 固体培养基、PCA 固体培养基,MRS 肉汤培养基,麦芽汁培养基,购于广东环凯有限公司。

基础培养基(g/L):葡萄糖 20,酵母粉 20,磷酸氢二钾 2.0,乙酸钠 5.0,硫酸镁(MgSO₄·7H₂O) 0.2,硫酸锰(MnSO₄·4H₂O) 0.05,吐温-801.0。

大曲酶解提取液:大曲与水 1:4(m:m)比例混合,40℃酶解 4 h,过滤离心后调节盐浓度到达 7%。

1.1.2 设备

EL 204/EL3002 电子天平,梅特勒-托利多仪器有限公司;THZ-82A 恒温振荡器,常州澳华仪器有限公司;HH-8 数显电子恒温水浴锅,江苏省金坛市宏华仪器厂;UV-2100 紫外可见分光光度计,上海尤尼柯 UNIC 科学仪器有限公司;RACE 1310 气相色谱仪的 Q Exactive GC-Orbitrap/MS,德国 Thermo Fisher 科技公司;TraceGOLD TG-5SiIMS 毛细管色谱柱,德国 Thermo Fisher 科技公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细菌的分离、纯化

细菌的分离采用稀释平板涂布法。称取 2.5 g 酱渣到无菌采样袋中,加入 22.5 mL 生理盐水震荡 15 min,以此 10 倍逐步稀释至 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶。

取稀释后的菌悬液 0.1 mL,涂布到 MRS 平板和 PCA 平板上,一组在 37℃下倒置培养 48 h,另一组在培养基表面倒上液体石蜡隔绝氧气,厌氧培养 48 h。待长出菌落后观察其生长情况,取典型细菌进行划线分离和纯化镜检,分别接种到斜面试管和甘油管进行保藏。

1.2.2 基因测序

1.2.2.1 基因组 DNA 提取

将分离得到菌株送至华大基因进行测序。对所得菌体采用 SDS-蛋白酶 K 裂解法,CTAB 沉淀菌体碎片和多糖,离心后取上清再用无水乙醇沉淀提取总 DNA,用纯化水(加 10 ng/μL Rnase)静置过夜。

1.2.2.2 16s rDNA 的扩增

以 1 μL 提取 DNA 为模板,加入缓冲液 3 μL,dNTP 2 μL,聚合酶 0.2 μL,引物 27f(AGAGTTTGATCMTG GCTCAG)和 1492R(TACGGYTACCTTGTTACGACT T)各 3 μL 进行扩增,总反应体系 30 μL。

循环参数:95℃预变性 5 min;95℃变性 30 s,

55 °C退火 30 s, 72 °C延伸 60 s, 35 个循环; 最后引物 72 °C延伸 10 min, 12 °C下终止反应。

1.2.2.3 DNA 测序

取 3 μL PCR 扩增产物, 用 1%琼脂糖凝胶电泳, 染色后在紫外灯下观测结果, 对扩增产物进行测序, 测序结果与美国国立生物技术信息中心 (national center for biotechnology information, NCBI) 数据库中核酸序列进行比对, 确定种属情况。

1.2.3 细菌生长曲线的绘制

将活化后的菌株以 2%的接种量接种到 30 mL 的 MRS 肉汤培养基中, 37 °C 静置培养, 每隔 3 h 取样, 测定菌悬液的 OD 600 nm 值, 绘制各菌株的生长曲线。

1.2.4 菌株碳氮源利用情况分析

以基础培养基的 20 g 葡萄糖的含碳量为标准, 分别用有相同含碳量的不同碳源代替 (果糖、核糖、木糖、乳糖、蔗糖、半乳糖、可溶性淀粉), 配成 8 种不同的碳源配方, 观察不同碳源对菌株生长情况的影响。以基础培养基的 20 g 酵母粉的含氮量为标准, 分别用有相同含氮量的不同氮源代替 (大豆蛋白胨、胰蛋白胨、尿素、硫酸铵、硝酸钠), 配成 6 种不同的氮源配方, 观察不同氮源对菌株生长情况的影响。

1.2.5 耐盐性试验

将菌株分别以 500~1000 CFU 的接种量, 接种到不加盐大曲酶解液中与加盐大曲酶解液 (7% NaCl) 中, 分别在 37 °C 下培育 2 d 与 4 d。用平板计数的方式确定其中的活菌总数, 比较不同菌株的耐盐能力。

1.2.6 大曲酶解液发酵

在准备好的大曲酶解液 (7%NaCl) 中接种细菌与鲁氏酵母, 接种量为 500~1000 CFU, 种子液为细菌菌株和鲁氏酵母分别在 MRS 肉汤培养基与麦芽汁培养基上培养 24 h 得到。

完成接种的大曲酶解物试管, 置于 37 °C、120 r/min 摇床培养 4 d。待液体产生明显浑浊后, 对其内部细菌与酵母生长数量及风味形成进行测定。

1.2.7 挥发性物质的测定 (SPME)

1.2.7.1 挥发性化合物的萃取^[10]

挥发性化合物的萃取方法采用团队已优化的方法。将发酵液 4 mL 放入顶空进样瓶中, 调节盐浓度至 270 g/L, 加入 20 μL 内标 (1.724 mg/L 的 2-甲基-3-庚酮甲醇溶液)。采用 75 μm CAR/PDMS 萃取头进行香气萃取。

1.2.7.2 GC-MS 的测定^[10]

本实验采用 TR-5ms 弹性石英毛细色谱分析柱

(30 m×0.25 mm×0.25 μm), 载气为高纯氦气 (1.0 mL/min), 采用电子轰击电离 (EI) 离子源, 电子能量 70 eV, 电子倍增器电压 350 V, 离子扫描范围 33~350 m/z, 扫描速度 3.00 scans/s, 离子源温度 250 °C, 传输线温度 250 °C。

程序升温条件: 起始温度 40 °C, 保持 2 min, 以 5 °C/min 升到 120 °C, 保持 2 min, 再以 7 °C/min 升至 220 °C, 保持 5 min。分流比 10:1。

1.2.8 数据分析

采用 MEGA-X 制作菌种 16S rRNA 基因序列系统进化树。采用 SPSS 软件 (SPSS 20.0) 单因素方差分析样品间的显著性差异, 采用 Duncan 检验, 同行不同小写字母表示同一行数据具有显著性差异 ($p < 0.05$)。部分结果采用 Microsoft Office Excel 2017 进行分析处理, 实验结果表示为平均值±标准偏差。

2 结果与讨论

2.1 酱油细菌基因鉴定结果

从高盐稀态酱油酱醅中分离得到 150 株菌, 并从中挑选出形态具有代表性的菌株送检华大基因, 经过 16s 鉴定共得到了 22 株菌, 包括芽孢杆菌属 13 株, 微球菌属 1 株, 葡萄球菌属 3 株, 不动杆菌属 5 株, 所有细菌的 16s rRNA 基因序列系统进化树如图 1 所示。从中挑选出 5 株具有代表性的菌株进行后续实验, 分别为 SWJS B1801 A62 解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)、SWJS B1801 B06 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、SWJS B1803 B07 腐生葡萄球菌 (*Staphylococcus saprophyticus*)、SWJS K1802 B07 克氏库克菌 (*Kocuria kristinae*) 和 SWJS A1803 D06 约氏不动杆菌 (*Acinetobacter johnsonii*)。

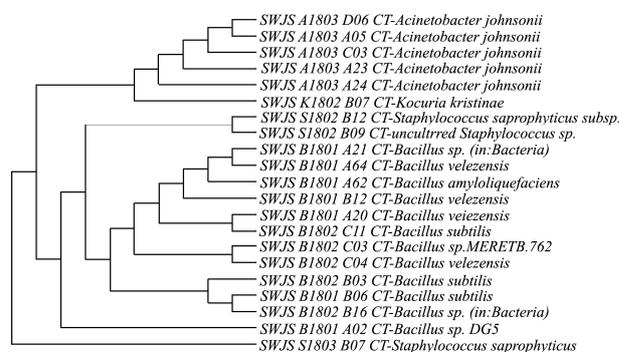


图 1 酱醅细菌 16S rRNA 基因序列系统进化树

Fig.1 Phylogenetic tree of moromi bacteria based on their 16S rRNA gene

2.2 酱油细菌形态观察结果

5 株代表细菌的菌落特征描述与生理生化实验结果如表 1 所示。镜检结果表明，芽孢杆菌以离散状态的长杆状营养体和芽孢为主；而葡萄球菌和克氏库克菌以球状结构为主，不同的是葡萄球菌会表现出聚集的状态，而克氏库克菌离散效果会更明显。约氏不动

杆菌在镜检观察中同样以球状为主，但部分时间会存在短杆状。平板形态观察结果表明，在 MRS 固体培养基中，解淀粉芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌的菌落形态为放射形薄膜状，常形成具有皱襞、堤状隆起的无色半透明大菌落；而腐生葡萄球菌、克氏库克菌以及约氏不动杆菌则表现的边缘整洁湿润，形成平滑、轻度隆起的白色不透明小菌落。

表 1 5 株酱醪细菌的菌落特征及其生理生化测定

Table 1 Colony features and biochemical characteristics of 5 strains of moromi bacteria

菌株	解淀粉芽孢杆菌	枯草芽孢杆菌	腐生葡萄球菌	克氏库克菌	约氏不动杆菌
镜检形状	杆状	杆状	球状	球状	球状，短杆
聚集情况	离散	离散	聚集	离散	离散
芽孢	有	有	无	无	无
菌落大小	中等大菌落	巨大菌落	小菌落	露珠状	露珠状
菌落形状	圆形	圆形	圆形	圆形	圆形
菌落边缘	放射形	放射形	整齐	整齐	整齐
表面状态	皱襞状	皱襞状	平滑	平滑	平滑
隆起度	堤状	堤状	轻度隆起	轻度隆起	轻度隆起
菌落颜色	无色	无色	白色	白色	白色
菌落透明度	半透明	半透明	不透明	不透明	不透明
菌落硬度	膜状	膜状	湿润	湿润	湿润
菌落图片					

2.3 酱油细菌生长特性分析

2.3.1 细菌生长曲线分析

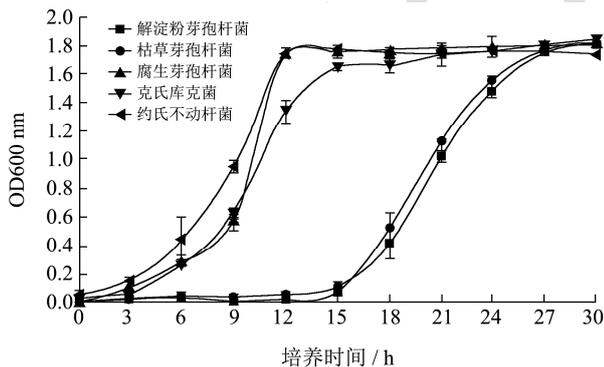


图 2 5 株酱醪细菌的生长曲线测定

Fig.2 Growth curve determination of 5 strains of moromi bacteria

生长曲线是描述生物生长繁殖变化的曲线，在严格控制培养条件的前提下，可通过测定培养液的 OD 值了解细菌生物量变化及判断细菌是否进入对数生长期，生长能力强的菌株可以在发酵早期占据数量上的优势地位^[11]。5 株酱醪细菌的生长曲线测定结果如图 2 所示。由图可知，5 株菌的生长趋势相似，由迟缓期

进入对数期后，到达测量极限。其中克氏库克菌，腐生葡萄球菌，与约氏不动杆菌在 6 h 时进入对数期，而解淀粉芽孢杆菌与枯草芽孢杆菌在 15 h 时进入对数期，说明芽孢杆菌属比起其他三个菌株相对较晚进入快速生长期。

2.3.2 碳氮源利用情况分析

5 个代表性菌株的碳氮源利用情况如表 2 所示。结果发现以葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖和可溶性淀粉作为碳源时，各菌株均能正常生长；但核糖和木糖并不适合所有的菌株，解淀粉芽孢杆菌与枯草芽孢杆菌在其中均不能正常生长。

而在氮源中，蛋白胨、大豆蛋白胨和胰蛋白胨富含氨基酸与多肽等营养物质，均能提供 5 株细菌生长所需的营养物质^[12]。其次，尿素仅能为枯草芽孢杆菌所利用。而硫酸铵与硝酸钠作为无机氮源，被视为速效氮源，能快速为微生物分解吸收，但在利用选择性上也高于有机氮源^[12]，这在本研究的结果中也有体现（表 2），其中硫酸铵能提供芽孢杆菌与腐生葡萄球菌的生长所需。而在硝酸钠培养液中能观察到两株芽孢杆菌与约氏不动杆菌的增殖。

表2 碳氮源对酱醪细菌生长的影响

Table 2 Effects of carbon and nitrogen sources on the growth of moromi bacteria

碳源	鉴定结果					氮源	鉴定结果				
	解淀粉芽孢杆菌	枯草芽孢杆菌	腐生葡萄球菌	克氏库克菌	约氏不动杆菌		解淀粉芽孢杆菌	枯草芽孢杆菌	腐生葡萄球菌	克氏库克菌	约氏不动杆菌
葡萄糖	++	++	++	++	++	蛋白胨	++	++	++	++	++
果糖	++	++	++	++	++	大豆蛋白胨	++	++	++	++	++
核糖	-	-	-	-	++	胰蛋白胨	++	++	++	++	++
木糖	-	-	++	-	++	尿素	-	+	-	-	-
乳糖	++	++	++	+	++	硫酸铵	+	++	+	-	-
蔗糖	++	++	++	+	++	硝酸钠	+	++	-	-	+
半乳糖	-	+	++	+	+						
可溶性淀粉	+	+	++	++	++						

注：以“++”表示菌株大量生长；以“+”表示菌株少量生长；以“-”表示菌株不生长。

2.3.3 耐盐性比较

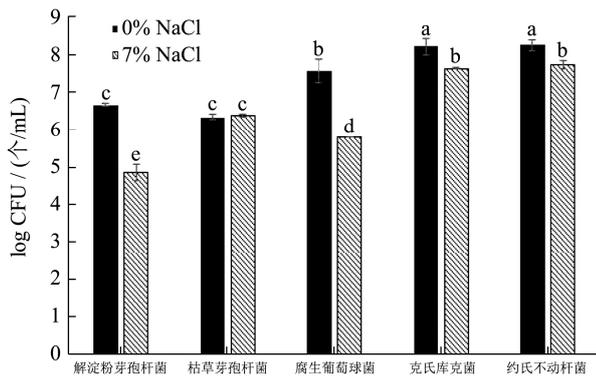


图3 酱醪细菌耐盐性比较

Fig.3 Comparison of tolerance to salt of moromi bacteria

注：图中数据里标注不同字母 a、b、c 的组别表示具有显著性差异 ($p < 0.05$)。

图3通过测定各菌株在0%盐浓与7%盐浓度的大曲酶解液中的生长情况，研究了各细菌的耐盐能力。结果表明，枯草芽孢杆菌的生长量在7% NaCl（培养4 d）与0% NaCl（培养2 d）下无显著性变化 ($p < 0.05$)，说明枯草芽孢杆菌的耐盐性最好，可以含有盐的条件

下保持较高的生长速度。解淀粉芽孢杆菌与腐生葡萄球菌的耐盐性最差，其活菌生长量分别相较于无盐状态下降低98.5%与98.2%，显著低于其他细菌 ($p < 0.05$)。酱油的盐含量保持在16%~18%，因此具备耐盐性的微生物可以在酱油发酵过程中保持一定的生物量，对实现其风味改善作用较为重要^[9]。

2.3.4 产酸产蛋白酶情况分析

5株酱醪细菌的蛋白圈与溶钙圈检出情况如表3所示。结果表明，解淀粉芽孢杆菌与枯草芽孢杆菌均能产生蛋白水解圈，表示其能够产生蛋白水解酶；而腐生葡萄球菌、克氏库克菌以及约氏不动杆菌则检出溶钙圈，表明其在五株菌中拥有更强的产酸能力。在酱油发酵的过程中，细菌可以产生多种蛋白酶，分解蛋白质、多肽等营养物质产生多种风味物质^[3]。同时可以产生有机酸，降低酱醪pH值，为酵母的后续生长与发酵提供适宜的环境^[9]。胡传旺比较了酱油中筛选的细菌蛋白酶活力，发现解淀粉芽孢杆菌具有最强的蛋白酶活力^[13]。产酸方面，研究发现葡萄球菌属表现出比芽孢杆菌更好的产酸能力^[13]。

表3 5株酱醪细菌的蛋白水解圈与溶钙圈检出情况

Table 3 Soluble protein circle and dissolved calcium of moromi bacteria

	解淀粉芽孢杆菌	枯草芽孢杆菌	腐生葡萄球菌	克氏库克菌	约氏不动杆菌
蛋白圈	+	+	-	-	-
溶钙圈	-	-	+	+	+

注：以“+”表示产生蛋白圈/溶钙圈；以“-”表示不产生蛋白圈/溶钙圈。

2.4 细菌与酵母共培养结果

大曲酶解液模型中细菌与鲁氏酵母计数结果如图

4所示。酱油的酱醪阶段就是将大曲与盐水混合后继续发酵完成，因此，本文采用大曲酶解液来模拟酱油短期发酵的模型^[14]。结果表明，克氏库克菌与约氏不

动杆菌在单培养模型拥有最高的生长量(图 4a), 显著高于其他单细菌培养组 ($p<0.05$), 其生长量分别是生长量最低的解淀粉芽孢杆菌的 616 倍与 752 倍。这与生长曲线趋势相符(图 2), 说明两者在营养物质充分的情况下具有较高的繁殖速率。而同样, 解淀粉芽孢杆菌与枯草芽孢杆菌的生物量, 显著低于其他组 ($p<0.05$)。

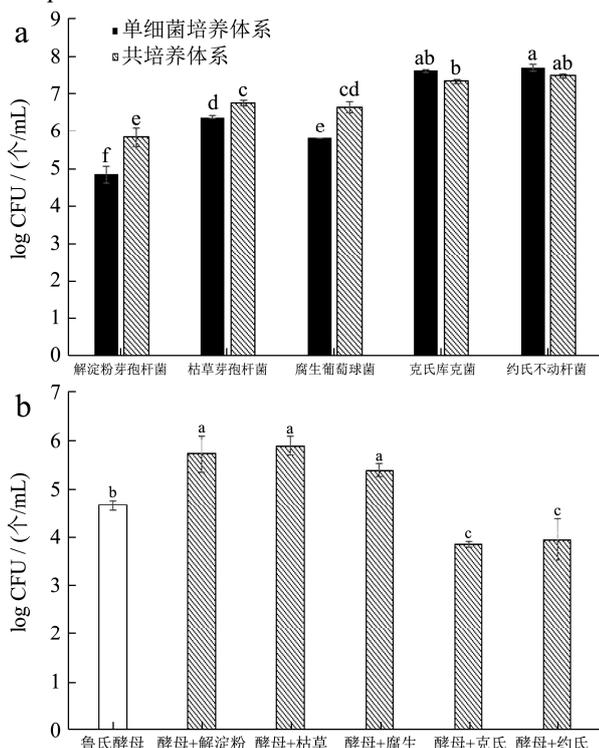


图 4 大曲酶解液中细菌与酵母计数结果

Fig.4 Bacterial and yeast counts in bacterial yeast co-culture model

注: 图 a: 7% NaCl 下细菌生长量; 图 b: 7% NaCl 下酵母生长量; 图中数据里标注不同字母 a、b、c 的组别表示具有显著性差异 ($p<0.05$)。

在共培养体系中, 与解淀粉芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、腐生葡萄球菌共培养体系中, 细菌和酵母数量都出现了明显提升 ($p<0.05$) (图 4a 与图 4b), 如解淀粉芽孢杆菌共培养体系下, 细菌生长量提升 8.7 倍, 酵母提升 10.5 倍; 而腐生葡萄球菌共培养体系下细菌提升 6 倍, 酵母提升 4.3 倍。这可能是由于酵母的存在可以抑制细菌分泌部分不利于自身生长的代谢产物, 这为细菌自身提供了适宜的增殖环境^[13]。同时因为芽孢杆菌降解蛋白质, 保障酵母繁殖所需的营养需求。但与克氏库克菌和约氏不动杆菌共同培养体系中, 酵母则出现了显著下降 ($p<0.05$), 相较于空白组分别降低了 84.4%与 80.6%。这可能与其产酸作用显著性降低体系 pH 值有关(图 5)。Makio Kobayashi 等研究发现酱油鲁氏酵母的最适生长环境在 pH

4.75~4.95^[7], 而克氏库克菌与约氏不动杆菌参与的发酵液终止 pH 却在 3.8~4.2, 已低于鲁氏酵母的最适生长 pH。

由此可见, 解淀粉芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、腐生葡萄球菌与鲁氏酵母之间存在相互促进生长的作用, 而克氏库克菌、约氏不动杆菌与鲁氏酵母之间存在相互抑制生长的作用。这些相互作用一部分依赖于菌株对发酵环境 pH 值的改变来实现, 一部分通过互相之间降解蛋白质多糖等物质为对方生长发酵提供营养物质。同时, 克氏库克菌与约氏不动杆菌作为酱油发酵中低含量菌株, 在少量的情况下或许不会出现与酵母明显的抑制作用, 并能在低含量下能保有优势贡献。

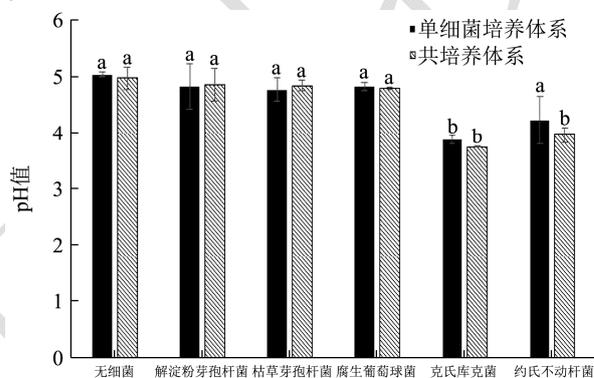


图 5 大曲酶解液发酵终止 pH 值

Fig.5 The pH value at the end of bacterial yeast co-culture model

注: 图中数据里标注不同字母 a、b、c 的组别表示具有显著性差异 ($p<0.05$)。

2.5 挥发性物质测定结果

针对共培养发酵模型差异最大的化合物及部分酱油关键香气化合物解谱分析, 对数据进行主成分分析, 结果如图 6 所示。由此可见, 在大曲酶解液中添加了菌株后, 整体风味均发生了变化, 与空白样品明显的区分开来, 其中以克氏库克菌的风味影响最为特别, 其次为约氏不动杆菌。不仅如此, 这两株菌的共培养风味与鲁氏酵母单培养风味差距也最远, 这与共培养的计数结果相符合(图 4)。这主要由乙醇和苯乙醇的产量差异引起, 单酵母菌培养液中乙醇、苯乙醇含量较大, 而添加克氏库克菌与约氏不动杆菌共培养后, 乙醇产量相对较少。其中克氏库克菌的乙醇只有纯酵母培养下的 6%, 但是其乙酸乙酯含量却达到纯酵母培养时的 3 倍。这部分结果可能是因为菌株产酸, 较低的 pH 影响了鲁氏酵母的代谢活性, 减少了乙醇的生成, 另一方面, 也可能是因为细菌产的乙酸与酵母产的乙醇酯化形成了乙酸乙酯。

5 株细菌中, 克氏库克菌能显著提升部分酱油香气活性化合物的含量, 如乙酸(酸香)、3-甲硫基丙醛(烤土豆香)、乙酸乙酯(果香)、苯乙醛(花香)等^[10], 分别提升 466%, 157%, 95%, 42%。除此以外, 相较于单菌培养, 克氏库克菌与鲁氏酵母的混菌培养中二甲基二硫、2-糠醇、1-辛烯-3-醇、3-甲硫基-1-

丙醇的含量能得到进一步的增长, 如 1-辛烯-3-醇在培养体系中的含量整体提升 53%, 而 3-甲硫基-1-丙醇整体提升 34%。细菌与酵母的协同作用使得体系的风味更加丰富, 这些物质的增加或许与发酵体系中的洋葱香、焦糖香、蘑菇香和烤土豆香的提升有关^[1,10]。

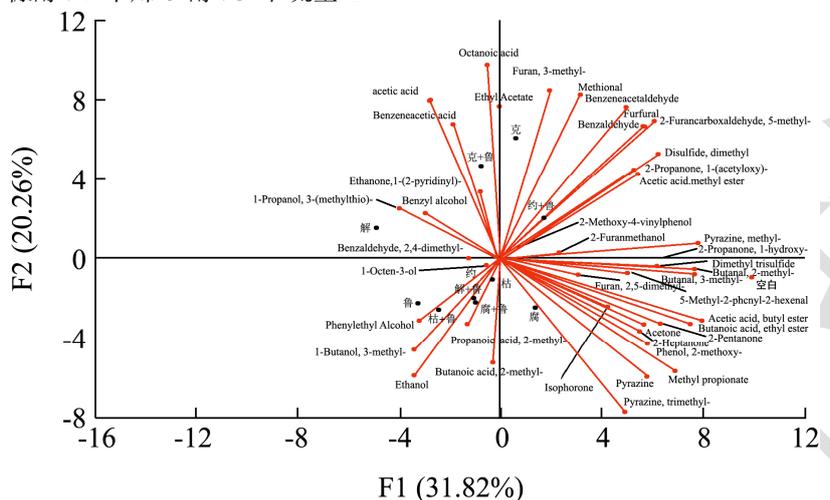


图 6 细菌、酵母共培养模型挥发性物质的主成分分析

Fig.6 Principal component analysis of volatile substances in bacteria-yeast co-culture model

3 结论

本文对高盐稀态酱油酱渣中细菌进行了分离鉴定, 将所得菌株分为 4 个属。挑选 5 株代表性细菌进行生长特性分析, 发现芽孢杆菌属(解淀粉芽孢杆菌与枯草芽孢杆菌)相对腐生葡萄球菌、克氏库克菌与约式不动杆菌生长较慢, 进入对数生长期的时间要晚 9 h。但芽孢杆菌属具有相对较强的蛋白酶活力, 可能有助于发酵过程中蛋白的降解; 而腐生葡萄球菌、克氏库克菌与约式不动杆菌则有较强的产酸能力。交互作用发酵模型结果表明, 克氏库克菌与约式不动杆菌产酸后会将发酵体系的 pH 值降低至 3.8~4.2, 进而一定程度抑制鲁氏酵母的生长; 而其他三个菌种与酵母之间则能够互相促进生长, 解淀粉芽孢杆菌体系中细菌与酵母分别增加 8.7 倍和 10.5 倍, 腐生葡萄球菌中细菌与酵母分别增加 6 倍与 4.3 倍。在风味物质生成上, 相对单菌种培养, 共发酵体系中风味物质组成复杂, 且并不同于简单的累加, 表明细菌与酵母交互作用对风味物质的生成影响极具研究价值。其中, 克氏库克菌的风味改善作用最为明显, 可以提升 3-甲硫基丙醛、乙酸乙酯、苯乙醛等多种酱油关键香气物质, 表明克氏库克菌可能具有一定的风味改善作用。而在细菌与酵母共同培养后, 能进一步生成 1-辛烯-3-醇和 3-甲硫基-1-丙醇, 两者分别在单菌的基础上提升 53%

和 34%, 增加了酱油的品质。由此可以发现, 细菌单培养以及其与酵母的共同培养值得进一步验证, 该研究将为酱油风味功能菌的应用研究提供理论和技术基础。

参考文献

- [1] Wenyi Z Y A T. Flavor and taste compounds analysis in Chinese solid fermented soy sauce [J]. African Journal of Biotechnology, 2009, 4(8): 673-681
- [2] Nagahara A, Benjamin H, Storkson J, et al. Inhibition of benzo[a]pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by a principal flavor component of Japanese-style fermented soy sauce [J]. Cancer Res, 1992, 52(7): 1754-1756
- [3] Harada R, Yuzuki M, Ito K, et al. Microbe participation in aroma production during soy sauce fermentation [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2018, 125(6): 688-694
- [4] Lee S G, Chang H C. Assessment of *Bacillus subtilis* SN7 as a starter culture for Cheonggukjang [J]. Food Control, 2016: 2-31
- [5] Martín B, Garriga M, Hugas M, et al. Molecular, technological and safety characterization of Gram-positive catalase-positive cocci from slightly fermented sausages [J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 107(2): 148-158

(下转第 222 页)