

# 高盐稀醪酱油发酵原油中微生物区系研究\*

谢小保\*\* 欧阳友生 曾海燕 王春华 陈仪本

(广东省微生物研究所 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广州 510070)

**摘要** 对传统的高盐稀醪酱油发酵过程中的正常原油和异常原油中的微生物区系进行了分析,并对主要的细菌和酵母菌进行了菌种鉴定。同时,初步探讨了温度对原油中微生物区系的影响。实验结果表明,正常原油和异常原油中细菌总数、芽孢菌数、肠道杆菌、乳酸菌数和厌氧菌数没有明显差异,而酵母菌数和耐盐菌数有明显的差异。正常原油中优势酵母为球拟酵母属(*Torulopsis*)和酵母属(*Saccharomyces*),分别占酵母总数的55.9%和35.3%。异常原油中优势酵母为毕赤酵母属(*Pichia*)、假丝酵母属(*Candida*)和酵母属(*Saccharomyces*),分别占酵母总数的62.8%、17.9%和9.0%。

**关键词** 高盐稀醪发酵 微生物区系 鉴定 酱油原油

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)03-0504-04

## The Microorganism Constitutes Analysis of Soy Sauce Liquor from High-Salt-Level Watery State Fermentation\*

XIE Xiao-Bao\*\* OUYANG You-Sheng ZENG Hai-Yan WANG Chun-Hua CHEN Yi-Ben

(Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou 510070)

**Abstract** A system analysis about the microbial flora of normal and abnormal soybean sauce liquor from the high-salt-level watery state fermentation was made and the dominant bacteria and yeasts were identified. On the other hand a discussion of effect of temperature on microbial flora was made. The results indicated that there were no obvious differences about the count of aerobic spore-producing bacteria, enterobacteriaceae, lactic acid bacteria and anaerobe between the normal and abnormal soybean sauce liquor and there were marked differences about the count of yeasts and salt-tolerant bacteria. The predominant yeasts in normal soybean sauce were *Torulopsis* and *Saccharomyces*, accounting for 55.9% and 35.3% of the total yeasts separately, and in abnormal soybean sauce were *Pichia*, *Candida* and *Saccharomyces*, accounting for 62.8%, 17.9% and 9.0% respectively.

**Key words** High-salt-level watery state fermentation, Microbial flora, Identification, Soybean sauce liquor

酱油是我国一种传统大豆发酵调味品,深受我国及亚洲各国人民的喜爱。广东多数酱油生产企业采用传统的高盐稀醪发酵工艺,日晒夜露,发酵时间较长,酿制的酱油色淡味鲜,酱香浓郁,风味好。

在调查广东酱油生产企业时,发现在酱油发酵过程中,不时会出现异常发酵的现象,主要表现为抽取的发酵原油味道不纯正、有异臭味、混浊、偏黄色,最后导致酱油的色、香、味异常。由于异常发酵无规律可寻,还未能从种曲、成曲和发酵初期的酱醪中分析出异常发酵的原因,所以至今还无法对酱

油生产中异常发酵进行预测。酱油发酵过程中原油的微生物区系对酱油的质量控制十分重要,但到目前为止还未见有关报道,本文初步分析了酱油正常发酵与异常发酵罐中原油的微生物区系、优势菌群和温度对原油中微生物区系的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

正常发酵酱油原油、异常发酵酱油原油。从酱醪下的液态层自然抽取,由广东某调味食品有限公司提供。

\* 广东省科技攻关项目(No. 2003C32109)(No. 2005B20401019)

\*\* 通讯作者 Tel: 020-87688142, Fax: 020-87688142, E-mail: xxiaobao@tom.com

收稿日期: 2006-08-23, 修回日期: 2006-11-17

## 1.2 培养基

**1.2.1 细菌培养基**:牛肉膏 3g,蛋白胨 10g,氯化钠 5g,琼脂 15~20g,水 1000mL,pH7.0~7.2。加入 10% NaCl 或 6% NaCl,则为耐盐细菌培养基。

**1.2.2 酵母培养基**:大麦芽汁 1000mL,氯霉素 0.1g,琼脂 20g,pH 5.5。加入 10% NaCl 或 6% NaCl,则为耐盐酵母培养基。

**1.2.3 麦康凯培养基**:蛋白胨 17g,胨 3g,胆盐 5g,NaCl 5g,乳糖 10g,结晶紫 0.001g,中性红 0.025g,蒸馏水 1000mL,pH7.2。

**1.2.4 乳酸菌培养基(改良 TJA 培养基)**:番茄汁 50mL,酵母抽取液 5g,牛肉膏 10g,乳糖 20g,葡萄糖 2g,磷酸氢二钾 2g,Tween80 1g,乙酸钠 5g,琼脂 15g,蒸馏水 1000mL,pH6.8。

## 1.3 方法

**1.3.1 分离培养和计数**:采用平板培养计数法。无菌吸取 10mL 样品,放入盛 90mL 无菌生理盐水并带有玻璃珠的三角烧瓶中振摇 20min 制成稀释液。将稀释液连续 10 倍稀释配制成系列浓度的样液。准确吸取 0.2mL 样液分别放入营养琼脂、酵母菌培养基、乳酸菌培养基平板中,用无菌玻璃棒在培养基表面轻轻涂布均匀。将接种好的营养琼脂平板置  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  培养 2d~3d,耐盐细菌培养基培养 5d~7d,乳酸菌培养基平板置  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  培养 2d~3d<sup>[1]</sup>。酵母培养基平板置于  $25^{\circ}\text{C} \sim 28^{\circ}\text{C}$  孵箱培养 3d~7d。

**1.3.2 芽孢菌计数**:无菌吸取 10mL 样品,放入盛 90mL 无菌生理盐水并带有玻璃珠的三角烧瓶中振

摇 20min 制成稀释液,80℃水浴处理 15min。然后进行 10 倍稀释,取不同浓度稀释液进行平板涂布,培养基与细菌培养基相同,37℃倒置培养 2d~3d。

**1.3.3 肠道杆菌**:采用麦康凯培养基,37℃条件下培养 1d~2d,再根据革兰氏阴性杆菌、触酶试验阳性、氧化酶试验阴性、硝酸盐还原试验阳性进行鉴别。

**1.3.4 厌氧菌计数**:与细菌培养操作方法和培养基相同,培养条件为厌氧培养。

**1.3.5 菌种鉴定**:酵母菌鉴定参照文献 [2,3],细菌的形态特征、需氧特性、培养特征等细菌学特征参考文献 [4],根据这些特征将菌株初分成几大类群,并采用 Biolog 鉴定系统确定细菌属种。

## 2 结果与分析

### 2.1 原油中细菌类群及其数量分析

在酱油发酵第 30d 时,发现少量发酵罐出现了异常发酵的现象。正常发酵的原油,具有浓郁的酱油香味、澄清透明、色泽红润;异常发酵的原油,有异臭味、混浊、色淡偏黄色。

对正常发酵和异常发酵原油中微生物区系进行分析,结果见表 1。结果表明,正常原油和异常原油中细菌总数差异不大;肠道杆菌的数量较少,可能是原油中的高盐环境不适合肠道杆菌生长;正常原油和异常原油中的芽孢菌数、乳酸菌数相差也不大,正常原油耐盐菌数比异常原油低 2 个数量级,差异显著。

表 1 原油中细菌类群及其数量分析

项目	异常发酵原油(取样时间)			正常发酵原油(取样时间)		
	30d	40d	46d	30d	40d	46d
细菌总数	$5.3 \times 10^4$	$7.2 \times 10^4$	$1.2 \times 10^4$	$5.7 \times 10^4$	$8.8 \times 10^4$	$9.5 \times 10^4$
肠道杆菌	$2.0 \times 10^2$	< 100	< 100	$1.0 \times 10^2$	< 100	< 100
芽孢菌	$2.1 \times 10^3$	$2.6 \times 10^3$	$1.3 \times 10^3$	$1.0 \times 10^3$	$5.0 \times 10^2$	$3.2 \times 10^3$
乳酸菌	$4.2 \times 10^5$	$7.4 \times 10^4$	$2.6 \times 10^5$	$2.5 \times 10^5$	$1.5 \times 10^5$	$3.5 \times 10^5$
厌氧菌	$1.7 \times 10^5$	$7.0 \times 10^4$	$2.3 \times 10^4$	$2.3 \times 10^5$	$1.1 \times 10^5$	$1.0 \times 10^5$
10% NaCl 耐盐菌	$2.5 \times 10^7$	$1.8 \times 10^7$	$7.7 \times 10^6$	$2.2 \times 10^5$	$5.7 \times 10^4$	$4.1 \times 10^4$
6% NaCl 耐盐菌	$3.3 \times 10^7$	$1.7 \times 10^7$	$8.1 \times 10^6$	$2.7 \times 10^5$	$6.9 \times 10^4$	$1.9 \times 10^4$

### 2.2 原油中酵母菌数量分析

正常发酵和异常发酵原油中酵母菌数量的分析结果见表 2。结果表明,异常原油中酵母菌数和耐

盐酵母菌数在  $1.8 \times 10^4$  cfu/mL ~  $1.8 \times 10^5$  cfu/mL 之间,正常原油中酵母菌数和耐盐酵母菌数在  $2.1 \times 10^2$  cfu/mL ~  $5.6 \times 10^3$  cfu/mL 之间,比异常发酵原油

表2 原油中酵母菌数量分析

项目	异常发酵原油(取样时间)			正常发酵原油(取样时间)		
	30d	40d	46d	30d	40d	46d
酵母菌数	$1.0 \times 10^5$	$1.7 \times 10^5$	$1.8 \times 10^4$	$5.6 \times 10^3$	$3.4 \times 10^3$	$2.1 \times 10^2$
6% NaCl 耐盐酵母菌	$1.5 \times 10^5$	$1.4 \times 10^5$	$4.6 \times 10^4$	$2.7 \times 10^3$	$2.9 \times 10^3$	$2.9 \times 10^2$
10% NaCl 耐盐酵母菌	$1.4 \times 10^5$	$1.8 \times 10^5$	$5.6 \times 10^4$	$3.1 \times 10^3$	$2.7 \times 10^3$	$2.2 \times 10^2$

酵母菌数低 2 个数量级,差异显著。

同时对原油中的盐分、总酸、pH 值、还原糖和氨基态氮等常规理化指标进行了分析,结果表明,正常原油与异常原油中的常规理化指标没有明显的差异及规律性。

### 2.3 温度对原油中微生物区系的影响

在调研酱油生产中出现异常发酵的原因时,发现冬天出现异常发酵的几率明显大于其它季节,夏天出现的几率最低,因此,本研究设计了温度对原油中微生物区系影响的实验。将第 30 天开始出现的

异常原油放置于 37℃ 和 15℃ 培养箱中,分析原油中的微生物主要菌群的变化,检测结果见表 3。结果表明,异常原油在 15℃ 放置不同时间后的微生物区系与异常发酵罐中原油微生物区系基本一致,但温度提高到 37℃ 后,耐盐细菌和酵母菌数明显下降,逐渐与正常发酵罐中原油微生物菌群组成和数量接近,显示温度与发酵罐中原油的微生物区系有密切的关系,但温度对酱油发酵的具体影响还有待深入研究。

表3 温度对原油中微生物区系的影响

项目	放置时间(15℃)			放置时间(37℃)	
	0d	10d	16d	10d	16d
细菌总数	$5.3 \times 10^4$	$4.3 \times 10^5$	$2.1 \times 10^5$	$6.7 \times 10^4$	$4.5 \times 10^4$
芽孢菌	$2.1 \times 10^3$	$3.8 \times 10^3$	$2.9 \times 10^3$	$3.0 \times 10^3$	$2.7 \times 10^3$
乳酸菌	$4.2 \times 10^5$	$5.6 \times 10^5$	$3.3 \times 10^5$	$2.9 \times 10^5$	$2.5 \times 10^5$
厌氧菌	$1.7 \times 10^5$	$1.8 \times 10^5$	$3.7 \times 10^5$	$2.9 \times 10^5$	$1.8 \times 10^5$
10% NaCl 耐盐菌	$2.5 \times 10^7$	$1.8 \times 10^7$	$1.4 \times 10^7$	$1.5 \times 10^6$	$7.2 \times 10^5$
酵母菌数	$1.0 \times 10^5$	$3.4 \times 10^5$	$3.7 \times 10^5$	$3.9 \times 10^4$	$5.7 \times 10^3$
10% NaCl 耐盐酵母菌	$1.4 \times 10^5$	$3.8 \times 10^5$	$2.3 \times 10^5$	$6.7 \times 10^4$	$5.2 \times 10^3$

### 2.4 原油中细菌的鉴定

对分离的细菌进行革兰氏染色、芽孢染色、氧化酶、运动性、过氧化氢酶、TSI 斜面培养、需氧特性进行测定,并将分离获得的菌株分成革兰氏阴性肠杆菌、革兰氏阴性非肠杆菌、革兰氏阴性苛养菌、革兰氏阳性球菌、革兰氏阳性杆菌、芽孢杆菌等类群,每类细菌选择其相应的 Biolog 生化反应鉴定板,每个鉴定板含 95 个不同碳源微孔,根据微孔中颜色反应情况,用 Biolog 鉴定程序分析并确定菌株的属种。经鉴定主要有下列各属:肠球菌属(*Enterococcus*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、微球菌属(*Micrococcus*)、气球菌属(*Aerococcus*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)、泛菌属(*Pantoea*)等细菌。芽孢

杆菌属主要有地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*);葡萄球菌属主要有腐生葡萄球菌(*Staphylococcus saprophyticus*)、表皮葡萄球菌(*Staph. epidermidis*)、木糖葡萄球菌(*Staph. xylosus*);肠杆菌属主要为阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*);肠球菌属中主要有屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)。

从异常原油中分离得到 98 株耐盐菌,其中肠球菌属占 61.2%,葡萄球菌属占 14.3%,芽孢杆菌属占 13.3%,微球菌属占 5.1%,气球菌属占 2.0%,未鉴定菌占 4.1%。正常原油中分离耐盐菌 82 株,其中肠球菌属占 58.5%,葡萄球菌属占 15.9%,芽孢杆菌属占 13.4%,微球菌属占 3.7%,气球菌属占 2.4%,未鉴定菌占 6.1%。因此正常原油和异常原

油中优势细菌和各菌群比例基本一致。

## 2.5 原油中酵母菌的鉴定

对分离的酵母菌的无性生殖方式及其孢子类型、有性生殖方式、是否产假菌丝、发酵实验、硝酸盐利用、脲酶、DBB 实验、类胡萝卜素实验进行测定,经鉴定主要有下列各属:球拟酵母属(*Torulopsis*),毕赤酵母属(*Pichia*),丝孢酵母属(*Trichosporon*),红酵母属(*Rhodotorula*),假丝酵母属(*candida*),酵母属(*Saccharomyces*)。从正常原油分离获得 68 株酵母菌,其中球拟酵母属(*Torulopsis*)占 55.9%、酵母属(*Saccharomyces*)占 35.3%、假丝酵母属(*candida*)占 4.4%、丝孢酵母属(*Trichosporon*)占 1.5%、未鉴定酵母菌占 2.9%。从异常原油中分离出 78 株酵母菌,其中毕赤酵母属(*Pichia*)占 62.8%;假丝酵母属(*candida*)占 17.9%;酵母属(*Saccharomyces*)占 9.0%;红酵母属(*Rhodotorula*)占 1.3%;丝孢酵母属(*Trichosporon*)占 2.6%,未鉴定酵母占 6.4%。

## 3 讨论

异常发酵原油中耐盐菌数和酵母菌数分别比正常原油大 2 个数量级,异常发酵原油中的酵母菌种类与正常发酵原油也有较大的差别,异常原油主要以毕赤酵母和假丝酵母为主,同时还有红酵母;正常原油主要以球拟酵母和酵母属为主,这种菌相的组

成和数量的差异有可能影响原油中的其它有益菌的生长,造成微生物区系菌类的组成、数量及比例的变化,进而影响酱油正常发酵,但原油中微生物区系对酱油发酵的具体影响和作用机制有待继续深入研究。

实验结果显示,温度对原油中微生物区系有重要的影响,异常原油 15℃低温放置不同时间后的菌群组成及数量与异常发酵罐的原油基本一致,但温度提高到 37℃后,耐盐细菌和酵母菌数明显下降,逐渐与正常原油中微生物区系趋于一致。表明温度与发酵罐中原油的微生物区系有密切的关系,无疑,这一发现也为异常发酵的治理提供了重要的科学依据。

## 参考文献

- [1] 中国国家标准化管理委员会,中华人民共和国卫生部联合发布. 食品卫生微生物学检验. 北京:中国标准出版社,2004. pp. 273~280.
- [2] Kregervan N J W, Grohirgen R J. The yeasts a Taxonomic Study, Amsterdam: The Netherlands Elsevier Science publishers, 1984. pp. 11~56.
- [3] J. A 巴尼特. 酵母菌的特征与鉴定手册. 胡瑞卿译. 青岛:青岛海洋大学出版社, 1991. pp. 17~32.
- [4] 东秀珠, 秦妙英, 等. 《常见细菌系统鉴定手册》. 北京: 科学出版社, 2001. pp. 353~390.