

酱油酿造中由污染的芽孢杆菌产生的抗酵母生长物质

曹小红 高 嘉

(天津轻工业学院食品工程系,天津 300222)

摘 要 实验证明,从酱油酿造的酱醪中分离的产芽孢杆菌(以 *B. subtilis* 为主)所产生的代谢物对酵母的生长有明显的抑制作用。由于大量的污染,直接影响了酱油的质量,应控制芽孢杆菌的污染。

关键词 *B. subtilis* 酱醪 酵母抗生物

酱油制造是一个开放的、多菌种参加的发酵过程。添加的微生物主要有米曲霉、黑曲霉、酵母、乳酸菌等,污染的有害微生物以细菌为主。在探讨酱油工艺的试验中偶然发现,为了改变风味所添加的酵母和乳酸菌均在发酵过程中不增殖,添加1周后无活菌检出。为了解这一现象,对酱醅发酵时所污染的有害微生物进行了分离与鉴定试验。通过实验证明,分离得到的基本上是 *Bacillus* 属细菌,以 *B. subtilis* 为主体,其他为类似于 *B. licheniformis* 属的细菌。在此基础上,对 *Bacillus* 属细菌代谢物中的抗酵母物质进行提取精制,评价其抗菌效价。将分离株 I-1NB5 株(*B. subtilis*)通过大量的通气培养,培养液通过活性炭吸附,再用酸性的丙酮洗脱,经真空浓缩与冷冻干燥后,得到微褐色的粗提物粉末。检测其培养液及粗提取物溶液(1 mg/mL)对 *Saccharomyces rouxii* Y-12 株及 Y-1125 株的抗酵母性,实验证实其培养液稀释至 16 倍、粗提物稀释至 64 倍均可抑制酵母的生长。

1 材料与方法

1.1 材 料

菌种:米曲霉(*Aspergillus oryzae* 沪酿 3042)为天津调味品研究所提供;酱油酵母(*Saccharomyces rouxii* Y-12)由日本东京农业大学提供;乳酸菌(*Pc. halophilus* Y-

7)由日本东京农业大学提供。

原料:脱脂大豆、小麦、麸皮、食盐。

培养基:分离、检测各种菌用培养基均为日水制药(株式会社)的琼脂培养基。

1.2 方 法

1.2.1 酱油酿造小试

在实验室内,原料使用脱脂大豆和麦麸,种曲为目前广泛使用的 *Aspergillus oryzae* 沪酿 3042,采用低盐固态发酵法(图1)试制酱油。我们针对图1所试制酱油及酱醅进行了微生物的测定,以期发现影响质量的原因。

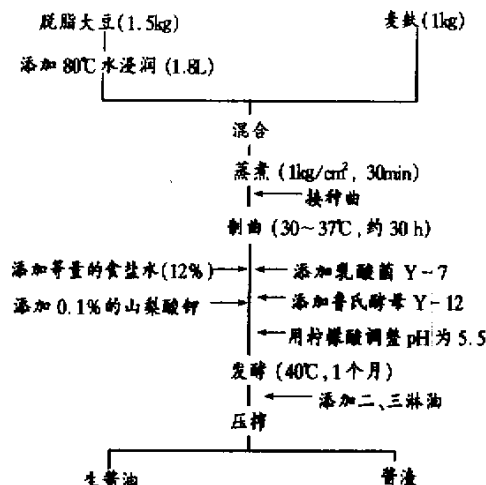


图1 酱油酿造的低盐固态发酵法

1.2.2 酱醅中各种菌数及 pH 的测定

在分解、发酵的4周时间内,每周从小试酱醅中分离各种菌并测定菌数,试料用无菌

生理盐水(0.85%)以 10 倍的倍率稀释,稀释液与各种琼脂培养基混释或涂抹培养。

细菌使用的是添加了霉菌生长抑制剂的日水制药的 Modified Trypto-Soya 琼脂培养基;乳酸菌培养使用的是添加 0.1% 的 Kabi-cidin 与 0.1% 的 Sodium thioglycollate(日水制药)的 Modified briggs 琼脂培养基;酵母采用的是添加 0.1% 的 Tween 80 的土豆琼脂培养基;厌氧菌分离时,取 0.1 mL 稀释液,用三角玻璃棒涂抹于 GAM 琼脂培养基的表面;厌氧培养用特制塑料袋,进行厌氧培养;芽孢杆菌数测定是将 10 倍的试料稀释液在 100℃ 加热 10 min 后,与琼脂培养基混释培养,以上培养基的食盐含量均调整为 10%。培养温度根据对象菌采用 25、30 或 37℃,培养 2~5 d。

pH 值使用 pH 自动测定仪(F-14)测定。

1.2.3 分离菌的分类与鉴定

在高稀释倍数的各种培养基上,挑选菌落特征不同的菌株进行分离培养。对分离菌株通过初步镜检、革兰氏染色后,进一步筛选,发现大部分为芽孢杆菌,利用 Bergey's manual^[1]所记载的方法进行分类鉴定。

1.2.4 芽孢杆菌产酵母抗生物质的初步探讨

将分离的芽孢杆菌在 *S. rouxii* Y-12 株混释的琼脂培养基上,划线涂抹培养,产生抑制圈的菌株为 20 株。挑选抑菌能力最强的 I-1NB5 株(*B. subtilis*)在土豆琼脂培养基上大量富集培养,所得菌液高速离心分离后,用活性炭吸附,再用 pH2 的丙酮溶出,溶出液进行减压浓缩后冷冻干燥,即得提取的粗粉末,对其抑菌效价进行确认。

2 结果与讨论

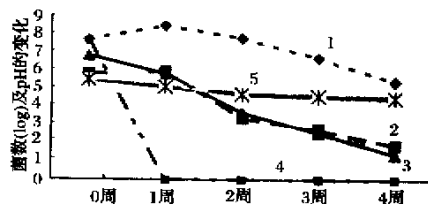
2.1 酱醅中各种菌数及 pH 的测定

2.1.1 一般细菌

菌数在酱醅分解、发酵 2 周后上升至

表 1 各种菌及 pH 值的变化趋势

	0 周	1 周	2 周	3 周	4 周
细菌	5.4×10^7	3.1×10^8	6.5×10^7	5.2×10^6	2.6×10^5
乳酸菌	6.7×10^5	9.0×10^5	2.3×10^3	5.6×10^2	7.8×10
厌氧菌	2.8×10^6	6.8×10^5	4.8×10^3	3.6×10^2	2.4×10
酵母	4.5×10^7	0	0	0	0
pH 值	5.5	5.1	4.7	4.6	4.5



1-细菌 2-乳酸菌 3-厌氧菌 4-酵母菌 5-pH 值

图 2 各种菌数及 pH 值的变化趋势

10^8 cfu/g, 在此之后下降至 10^5 cfu/g。10 倍稀释液加热后,测定菌数仍无变化,说明污染的微生物均以芽孢的状态存在。

2.1.2 乳酸菌

在发酵开始为 10^5 cfu/g, 2 周后减少至 10^3 cfu/g 以下。由于制曲阶段杂菌的大量繁殖,酱醅的环境已不适合乳酸菌的生存,故乳酸菌在发酵初期开始迅速减少。

2.1.3 厌氧菌

在发酵开始为 10^6 cfu/g, 到后期下降至 10 cfu/g。制曲阶段产生了一定量的厌氧菌,发酵开始后,由于添加了食盐(12%)温度又升高到 45℃,抑制了厌氧菌的继续繁殖。

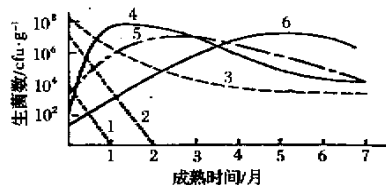
2.1.4 酵母

酵母在发酵开始添加了 10^5 cfu/g, 1 周后再未检出。影响酵母生长的因素是多方面的,首先温度不适宜,更主要的是大量杂菌所产生的代谢物对酵母的生长产生了拮抗作用。

2.1.5 酱醅的 pH 值变化情况

图 3 所示为采用日本高盐液态发酵法,酱醅发酵过程中微生物的变化趋势,与本实验的根本区别在于酵母与乳酸菌的变化。高盐液态发酵过程中,酵母与乳酸菌在发酵初期呈上升趋势,2~3 个月后才开始下降。而

低盐固态发酵时,酵母与乳酸菌 1 周后立即消失。其原因是多方面的,高盐液态发酵的温度比较温和,不超过 40℃,特别是添加酵母后,温度一般控制在 25℃ 左右,有利于酵母的生长;可是低盐固态发酵的温度为 40~55℃ 之间,蛋白质分解可快速进行,却不利于酵母与乳酸菌生长,所以酱油的风味受到极大的影响。为此需要了解采用低盐固态发酵法,酿造酱油过程中污染的微生物分布情况。



1-野生酵母 2-球菌 3-芽孢杆菌;
4-乳酸菌 5 6-酱油酵母

图3 酱醅发酵过程中微生物的变化趋势
(日本高盐液态发酵法)

2.2 分离菌的分类与鉴定

在 Modified briggs 琼脂培养基上,检出的 96 分离株中有 92 株是芽孢杆菌,其中 59 株是 *B. subtilis*,还有部分 *B. licheniformis* 的类似菌。在 Modified Trypto-Soya 琼脂培养基上,分离的 95 株中,有 1 株是球菌,其余均是芽孢杆菌(*B. subtilis*、*B. licheniformis*)为主体。GAM 琼脂培养基上分离的菌均为 *Bacillus* 属的细菌,12 株的球菌从性状上看,可认为是 *Staphylococcus* 属细菌。

3 芽孢杆菌产酵母抗生物质的评价

为了改良风味,后酵阶段添加了酵母与乳酸菌,但发现均不能正常生长。通过大量的实验证明,*B. subtilis* 与酵母间产生拮抗作用,抑制了酵母的生长。故我们对 *Bacillus* 属细菌代谢物中的抗酵母物质进行提取精制,评价其抗菌效价。

将分离株 I-1NB5 株(*B. subtilis*)通过大量的通气培养,检测其培养液及粗提物溶液(1mg/mL)对 *Z. rouxii* Y-12 株及 Y-1125 株的抗酵母性。实验证明,其培养液稀

释至 16 倍、粗提物稀释至 64 倍均可抑制酵母的生长(见图 4 和图 5)。

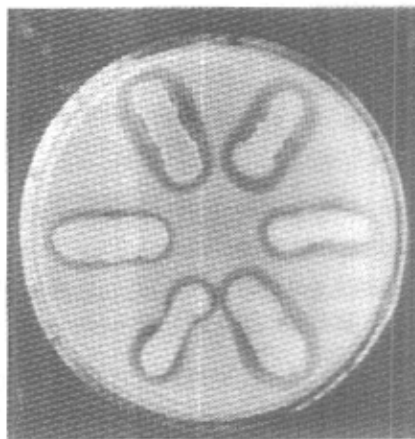


图4 分离的 *B. subtilis* 对酵母生长的抑制作用

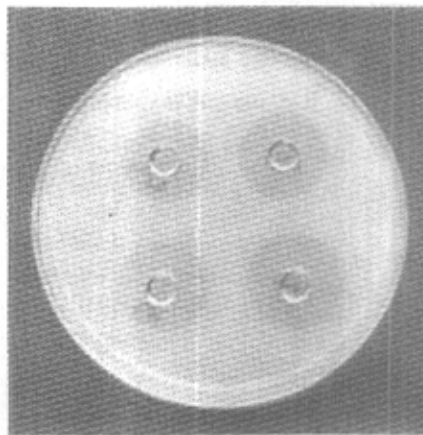


图5 *B. subtilis* 的粗提物溶液对酵母生长的抑制作用

4 结 论

在中国由于对酱油需要量的增大,低盐固态发酵法便应运而生。可是此方法却影响了酱油的质量和风味,与传统的高盐液态法相比酿造的酱油有较大的差异。

本实验采用低盐固态发酵法试酿酱油。在酱醅发酵的 4 周中,在分离乳酸菌、酵母、一般细菌、厌氧菌为目的培养基上,每周测定其菌数,各种培养基分离菌的细菌数在 10^7

cfu/g 左右,乳酸菌与酵母均未检出;分离菌基本上是 *Bacillus* 属细菌,以 *B. subtilis* 为主体,其他为 *B. licheniformis* 的类似菌。分离的 *Bacillus* 属细菌的培养液通过活性炭吸附,在用酸性的丙酮洗脱,经真空浓缩与冷冻干燥后,得到微褐色的粗粉末。此物质的抗酵母效价为 1mg/mL 的溶液,其稀释倍数为 64。由以上的结果可知,由于酱醪中污染了大量的产芽孢杆菌(*B. subtilis*),这些污染菌

与酱油发酵用菌共同争夺酱醪中的营养,特别是发现它们的代谢物还将抑制酵母等的生长,所以产芽孢杆菌(*B. subtilis*)的存在将直接影响酱油的质量。

在今后的研究中,应进一步探讨其抑菌谱的大小,产生最大抑菌效力的环境(最适 pH、温度等),适用对象范围以及有关抑菌活性物质的基础理论研究。

Antibiotic Substance to Yeast Growth Produced by Contaminated *B. subtilis* in Soy Sauce Brewing

Cao Xiaohong Gao Jia

(Department of Food Engineering, Tianjin Institute of Light Industry, Tianjin, 300222)

ABSTRACT Experiments proved that the metabolic substance produced by *B. subtilis* isolated from the mash in soy sauce brewing inhibited to the growth of yeast. It directly influenced the quality of soy sauce due to plenty of contamination. It is necessary to control the contamination of *B. subtilis*.

Key words *B. subtilis*, soy sauce mash, antibiotic substance to yeast growth

韩国将每年从我国进口 30 万 t 大豆

韩国每年需要进口食用大豆 30 万 t,过去这些大豆基本上是从美国进口,但由于自 2001 年 3 月 1 日起,韩国法定要求销售商在销售大豆时必须标明是否是转基因产品,而且食用大豆(用于豆腐、酱油、豆浆等)必须是非转基因产品,否则要受到严厉处罚。于是,韩国农林部国立农产物品质管理院,对韩国市场销售的大豆进行了转基因大豆抽查检测。结果表明,从美国进口的大豆 40% 以上为转基因大豆,而从我国进口的大豆还没有检出是转基因产品。

因此,韩国 2002 年将从我国进口全年所需的约 30 万 t 食用大豆。但韩国认为,目前我国出具的非转基因证书有多家,极不规范,要求今后进口我国食用大豆的进口商,要附有检验检疫机构出具的非转基因证书。

日本开发海带酒和裙带菜酒

日本利用海带、裙带菜等褐藻开发研制出营养疗效高的低度营养酒。

海带酒的生产方法:将海带切碎,加水浸泡除去夹杂物质,再于热水中浸泡、搅拌、萃取各种有效营养成分,冷却过滤得粘稠基料。用乳酸调节 pH4.0,加葡萄糖、酵母种液进行发酵,补糖、降温后过滤、除渣,于 5℃ 贮藏数月使其后熟。海带酒酒精度 9%,糖 8%,碱度 18 度,酒质佳美。

裙带菜酒的生产方法:干裙带菜切碎放水中浸泡,除去盐分与夹杂物,控干水分,于热水中用乳酸调 pH3.0,浸渍、搅拌使营养成分溶出,冷却、过滤作发酵酒基料。调整 pH4.0,加葡萄糖及清酒酵母发酵,数天后,再补加葡萄糖继续发酵,过滤后于低温处贮存数月后熟,制得裙带菜酒含酒度 11%,糖 8%,碱度 20,有果酒样芳香味。