

生产菌种及环境微生物与腐乳品质关系研究进展

万红芳¹,赵勇²,王正全³,汪立平^{1*}

1(上海海洋大学 食品学院,上海,201306)2(上海海洋大学,食品热加工工程技术研究中心,上海,201306)
3(农业部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室,上海,201306)

摘 要 腐乳作为一种传统发酵食品,其中微生物对其品质起着决定性作用。腐乳的生产模式为开放式,因此除了发酵菌种以外,来自环境及原材料中的各种微生物都有可能侵入,进而形成复杂的微生物群落。该文归纳了我国各地腐乳生产人工接种常用菌种,并对其生长特征、与腐乳品质关系进行总结;此外,全面阐述了腐乳在生产过程中侵入的非人工接种微生物,并详细介绍了其中霉菌、酵母、芽孢杆菌、乳酸菌等微生物的研究及其对腐乳品质的积极和消极影响,旨在为腐乳及其相关发酵食品中的微生物研究提供参考,并为后续腐乳多菌种混合发酵奠定基础。

关键词 腐乳;毛霉;根霉;酵母;乳酸菌;芽孢杆菌

腐乳(sufu)又称乳腐、霉豆腐,是以大豆为主要原料,经过浸泡、磨浆、点浆、制坯、前期培菌、腌制、装坛、后期发酵而成^[1-3]。腐乳是我国独创的大豆发酵食品,已有1 000多年的生产历史,其滋味鲜美、风味独特、营养丰富,具有浓郁的民族特色^[4]。腐乳按照颜色可分为红腐乳、白腐乳、青腐乳、花色腐乳等,根据前期发酵菌种的不同,还可将腐乳大致分为毛霉型、根霉型、细菌型3种类型^[3-4]。

腐乳的发酵由多种微生物和酶协同参与,是一个复杂的生物化学过程^[3]。腐乳作为一种典型“生物活性”发酵食品,其中微生物的种类及数目对其风味品质起着决定性的作用^[4-5]。传统的腐乳为“作坊式”生产,属于自然发酵,微生物组成十分复杂;近半个世纪以来,多数厂家已实现纯种接种进行前期培菌,但腐乳是开放式生产,难以避免生产环境中其他微生物侵入,进而参与腐乳的后期发酵。

由于对腐乳中微生物了解不够全面,腐乳含盐量高、生产周期长、品质不稳定等问题^[2]一直没有得到有效的解决。因此,虽然腐乳营养丰富、味道鲜美,这一产业却难以蓬勃发展,无法打开国际市场。本文全面系统地总结了腐乳生产过程中存在的各种微生物,包括腐乳生产菌种(人工接种微生物)和从环境中侵入的其他微生物(非人工接种微生物),并重点阐述

了非人工接种的霉菌、酵母、芽孢杆菌、乳酸菌等对腐乳品质的影响。以期腐乳生产能够充分利用有益菌,严格把控杂菌及有害菌,从而提高腐乳品质及稳定性、缩短生产周期、降低盐含量,同时也为后续腐乳混菌发酵、新产品开发奠定基础。

1 腐乳生产菌种(人工接种)

20世纪90年代以后,我国腐乳生产已基本实现通过人工接种的方式进行前期培菌^[6]。由于各地气候、地理环境、饮食文化的不同,国内不同地区腐乳各具特色,其中主导发酵的菌种也存在较大的差异,表1归纳了我国各地腐乳生产常用接种微生物,主要为毛霉、根霉、细菌等。

表1 腐乳接种微生物及其产地^[1-3]
Table 1 The starters of sufu and their production regions

微生物类别	产地
五通桥毛霉	四川、五通桥
总状毛霉	四川牛华溪、台湾台南、湖南
雅致放射毛霉	北京、台湾、香港
腐乳毛霉	浙江绍兴、江苏苏州
高大毛霉	四川、新疆、贵州
鲁氏毛霉	江苏、湖南
根霉	江苏南京
华根霉	台湾
藤黄微球菌	黑龙江
枯草芽孢杆菌	武汉

1.1 毛霉

毛霉是全国各地腐乳生产使用量最多的菌种,约占90%以上^[2-3]。早在1928年,魏岩寿先生首次从

第一作者:硕士研究生(汪立平副教授为通讯作者,E-mail:lpwang@shou.edu.cn)。
基金项目:四川省教育厅四川省高校人文社会科学重点研究基地科研项目(CC17Z19)
收稿日期:2018-11-29,改回日期:2018-12-21

腐乳中分离得到 1 株毛霉,将其命名为腐乳毛霉 (*Mucor sufu*),证实了毛霉对腐乳发酵起着重要的作用;1942 年,方心芳从四川五通桥地区生产的腐乳中分离得到一株毛霉,将其命名为五通桥毛霉 (*Mucor wutungkiao*);此后,研究者们又相继从各地腐乳中分离得到雅致放射毛霉 (*Actinomucor elegans*)、总状毛霉 (*Mucor racemosus*)、高大毛霉 (*Mucor racemosus*)、鲁氏毛霉 (*Mucor rouxianus*) 等,并逐步实现了以纯种接种的方式生产腐乳,如北京王致和腐乳(雅致放射毛霉)、四川桥牌腐乳(五通桥毛霉)、江苏绍兴腐(腐乳毛霉)、八公山腐乳(总状毛霉)^[1-3],表 2 归纳了目前我国用于毛霉型腐乳生产的菌种及其主要生长特征。

1.2 根霉

根霉与毛霉形态相似,分泌的酶系也类似,但毛霉生长温度较低($\leq 30\text{ }^{\circ}\text{C}$),毛霉型腐乳的生产严重地受到季节和温度的限制;根霉在 $30\sim 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 能较好地生长繁殖,受温度的影响较小,且分泌的淀粉酶、脂肪酶、糖化酶活力较强^[7],因此非常适用于夏季高温

时腐乳的生产。目前应用于腐乳生产的根霉主要有以下几种:米根霉 (*Rhizopus oryzae*)、华根霉 (*Rhizopus chinonsis*)、少孢根霉 (*Rhizopus oigoaporus*)。米根霉菌落疏松或黏稠,菌丝体呈白色,成熟后变为灰褐色,在 $37\sim 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 能生长;华根霉菌落疏松或稠密,菌丝体呈白色,成熟后变为黑褐色,在 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下仍能生长;少孢根霉是从印尼丹贝中分离而得,其菌丝体为白色,成熟后为褐色,在 $35\sim 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下生长良好^[8]。

1.3 细菌

接种细菌进行前期培菌而制成的腐乳即称作细菌型腐乳,目前仅有黑龙江和武汉的一些地区生产该类型的腐乳。黑龙江地区使用的细菌菌种主要为藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*),其菌落呈浅金黄色,适宜生长温度为 $25\sim 27\text{ }^{\circ}\text{C}$,可在质量分数 5% NaCl 中生长^[9-10];武汉的一些厂家使用的是枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*),其菌落呈污白色、粗糙,最适生长温度为 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$,可在质量分数 7% NaCl 中生长^[10],如表 2 所示。

表 2 毛霉型腐乳菌种及其主要特征

Table 2 The starters and their main characteristics of mucor-type sufu

种名	适宜温度/ $^{\circ}\text{C}$	主要特征
五通桥毛霉	10 ~ 25	菌丝呈白色,成熟后略黄,高度 10 ~ 35 mm,4 $^{\circ}\text{C}$ 勉强生长,35 $^{\circ}\text{C}$ 不能生长 ^[1] 。
雅致放射毛霉	25 ~ 30	菌丝呈白色或浅黄色,棉絮状,高约 10 mm,其孢子呈圆形,直径约 5 ~ 8 μm ^[1] 。
总状毛霉	20 ~ 25	菌丝呈纯白色,成熟后为灰褐色,孢囊梗无色,呈总状分枝,4 $^{\circ}\text{C}$ 以下,37 $^{\circ}\text{C}$ 以上都不能生长 ^[11] 。
腐乳毛霉	27 ~ 30	菌丝呈洁白色,菌丝浓密,32 ~ 36 $^{\circ}\text{C}$ 生长受到抑制,含 NaCl 质量分数 6% 时生长异常,不能形成正常菌丝和菌落 ^[3] 。
高大毛霉	28 ~ 32	菌丝体为白色、粗壮,孢子呈灰褐色、密且大,菌落直立,呈放射状 ^[12] 。
鲁氏毛霉	24 ~ 28	菌丝初期为黄白色,成熟后为灰褐色,菌丝直立、稀薄,结合孢子丰富 ^[11] 。

2 生产菌种与腐乳品质关系

2.1 毛霉

毛霉能够形成洁白而细高的菌丝,覆盖于腐乳坯表层,赋予腐乳独特的质感并能保持其良好的外形;毛霉还能分泌高活力的蛋白酶,大豆蛋白在蛋白酶的作用下发生水解,凝胶体破断,生成多肽、缩氨酸、游离氨基酸等,增强腐乳营养的同时并赋予其独特的鲜味。LIU 等^[13]研究了雅致放射毛霉接种腐乳在发酵过程中蛋白酶及化学组分的变化,发现腐乳在发酵过程存在多种不同分子质量的蛋白酶(162.6、124.6、104.3、66.9、44.9 kDa),其中以中性蛋白酶含量较高,蛋白酶活力及种类与腐乳品质具有显著的相关性。此外,毛霉蛋白酶具有较强的肽酶活性,如羧肽酶,催化水解多肽链羧基末端氨基酸,苦味肽被水解

成游离氨基酸,进而去除或降低苦味^[14-15]。

2.2 根霉

根霉也属于毛霉目,因此与毛霉具有相似的形态和生长特性。虽然根霉可在夏季较高温度下正常生长,不过与毛霉相比,根霉菌丝较为粗糙,蛋白酶活力也较低,所以根霉型腐乳成型不够完整,其滋味也略逊色于毛霉型腐乳。李顺等^[7]对八公山腐乳总状毛霉和米根霉的前期培菌进行比较,发现总状毛霉发酵前期蛋白酶活力高于米根霉(42.79 $\mu\text{g/mL}$,33.51 $\mu\text{g/mL}$),而淀粉酶、糖化酶、脂肪酶活力低于米根霉,但其中呈味氨基酸和疏水氨基酸差别不大,两种菌发酵互有优势。杨汶燕等^[16]研究了 3 种不同发酵方式腐乳生化指标的动态变化,发现毛霉型腐乳氨基酸态氮、可溶性蛋白质相对较高,根霉型腐乳总酸、还原糖、总酯相对较高,而根霉和毛霉复合发酵腐乳可以同时使这些指

标都保持在较高的水平。因此,利用根霉和毛霉混合接种腐乳进行前期培菌,不仅可减小温度的影响,而且能解决成型不完整的问题,具有良好的应用前景。

2.3 细菌

相比于霉菌型腐乳,细菌型腐乳最大的特点是氨基酸含量非常高,因此滋味更加鲜美、质地柔软而绵长。黑龙江克东腐乳作为一种细菌型腐乳,在国内众多腐乳中独树一帜,具有明显的地域特色。FENG等^[9]对6种克东腐乳原生微球菌菌株进行发酵性能评估,结果表明,所选菌株既能避免高浓度生物胺的积累,又能保持典型的感官特性,同时又能保存传统克东腐乳的风味质地。武汉地区芽孢杆菌腐乳生产相对较少^[17],主要是因为芽孢杆菌酶活力过高,容易导致蛋白质过度水解,难以保证腐乳良好的风味质地。此外,细菌型腐乳存在一个显著的缺点,由于缺乏菌丝体的包裹,该类型腐乳难以保持完整美观的外形,不适于长途运输,因此往往只在当地销售。

3 腐乳中混入的环境微生物(非人工接种)

虽然目前大部分腐乳的生产称为“纯种发酵”,但实际上,在腐乳制坯至装坛的过程中,来自于原材料及环境中的各种微生物,已非常自然地侵入发酵菌种之中,并逐渐形成了稳定的微生物群落结构。研究者们利用传统分离培养的方法,从腐乳中分离得到了

多种非人工接种微生物,主要包括霉菌、酵母、芽孢杆菌、乳酸菌等^[18-20]。

近些年来,随着分子生物技术的发展,科研工作者们利用变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)^[20-21]、高通量测序(high-throughput sequencing, HTS)^[22-23]等技术,不仅更加准确地鉴定了可培养微生物的具体类别,而且还发现了许多不可培养的微生物,这对全面了解腐乳中微生物群落结构,提高腐乳安全性具有重要意义。

3.1 霉菌和酵母

霉菌和酵母广泛存在于自然环境中,腐乳在腌制至装坛灌汤的过程中,极易遭受霉菌和酵母的侵染。从环境中混入腐乳的霉菌代表属主要有曲霉属(*Aspergillus*)、青霉属(*Penicillium*)、地霉属(*Geotrichum*)、镰刀孢属(*Fusarium*)、毛孢子菌属(*Trichosporon*)等,酵母代表属主要有毕赤酵母属(*Pichia*)、假丝酵母属(*Candida*)、酵母属(*Saccharomyces*)、耶罗酵母属(*Yarrowia*)等。

GU等^[24]通过PDA培养基,从青腐乳(臭豆腐)中共分离获得116株真菌,经过18S rDNA鉴定为26个种(表3),结果表明,侵入腐乳中的霉菌和酵母种类繁多,且不同区域样本中真菌种类的分布存在明显的差异,这说明除生产用菌种外,腐乳中其他真菌组成也是具有地域性差异的。

表3 不同地区青腐乳中的真菌组成^[24]

Table 3 The composition of fungi of grey sufu in different regions

产地	真菌类别
黄州	聚多曲霉(<i>Aspergillus sydowii</i>);出芽短梗霉(<i>Aureobasidium pullulans</i>); <i>Candida deformans</i> (假丝酵母属);加利假丝酵母(<i>Candida galli</i>);涎沫假丝酵母(<i>Candida zeylanoides</i>); <i>Galactomyces candidum</i> (白地霉属); <i>Galactomyces geotrichum</i> ; <i>Pichia guilliermondii</i> (毕赤酵母属);黏质红酵母(<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>);酿酒酵母(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>); <i>Saccharomyces bayanus</i> (酵母属);耶罗维亚酵母(<i>Yarrowia lipolytica</i>)
长沙	平常假丝酵母(<i>Candida inconspicua</i>); <i>Trichosporon montevidense</i> (毛孢子菌属);耶罗维亚酵母(<i>Yarrowia lipolytica</i>)
绍兴	聚多曲霉(<i>Aspergillus sydowii</i>);杂色曲霉(<i>Aspergillus versicolor</i>);射脉菌属(<i>Phlebia subserialis</i>); <i>Pichia guilliermondii</i> (毕赤酵母属);耶罗维亚酵母(<i>Yarrowia lipolytica</i>)
西安	葡萄牙棒孢酵母(<i>Clavispora lusitanae</i>); <i>Nakazawaea ernobii</i> ; <i>Lachancea fermentati</i> ;酿酒酵母(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>); <i>Trichosporon domesticum</i> ;耶罗维亚酵母(<i>Yarrowia lipolytica</i>)
广州	白假丝酵母(<i>Candida albicans</i>);黏质红酵母(<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>);酿酒酵母(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>); <i>Trichosporon domesticum</i> (毛孢子菌属);耶罗维亚酵母(<i>Yarrowia lipolytica</i>)

3.2 细菌

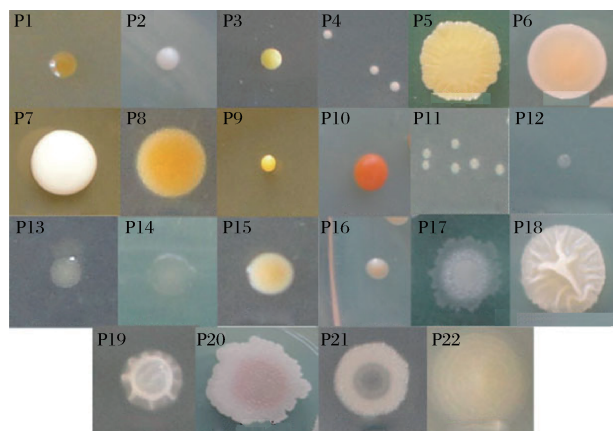
虽然添加大量食盐在一定程度上抑制了杂菌的生长,但腐乳中细菌依然种类繁多,数目庞大,这主要是因为腐乳富含蛋白质、脂肪、碳水化合物、维生素等营养物质,为一些耐盐和嗜盐菌提供了较为适宜的生存环境。

HAN等^[18]对3种不同类型(红腐乳、白腐乳、

青腐乳)的23个商品腐乳样本中的微生物进行了调查,结果表明各种样本中常温需氧菌总数(total count of mesophilic aerobic bacteria, TMAB)都非常高($>10^5$ CFU/g),而且85% TMAB为革兰氏阳性菌,其中大部分为芽孢杆菌;此外,一些样本中的乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB)含量也相当大,数目可达 $10^6 \sim 10^7$ CFU/g,其中白腐乳中LAB数目要高于青腐

乳,而红腐乳中 LAB 数很少。

FENG 等^[20]研究了克东腐乳在发酵过程中细菌的群落结构,利用培养方法共分离鉴定了 22 种细菌(图 1),发现肠球菌(*Enterococcus durans*)、肉葡萄球菌(*Staphylococcus carnosus*)、蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和变形杆菌(*Proteus mirabilis*)等为腐乳发酵过程中的优势菌;通过 PCR-DGGE 方法共发现了 27 种细菌,其中优势菌组成与培养方法结果一致,同时检测到了多种培养方法未分离到的微生物,但是分离培养得到的几株细菌并没有在 PCR-DGGE 方法中检测到,这说明 2 种方法都有一定局限性,结合使用多种检测方法能够更全面地了解微生物群落结构。



P1-屎肠球菌(*Enterococcus faecium*); P2-坚强肠球菌(*Enterococcus durans*); P3-*(Enterococcus canintestini)*; P4-巴黎链球菌(*Streptococcus lutetiensis*); P5-鸡葡萄球菌(*Staphylococcus gallinarum*); P6-松鼠葡萄球菌(*Staphylococcus sciuri*); P7-肉葡萄球菌(*Staphylococcus carnosus*); P8-腐生葡萄球菌(*Staphylococcus saprophyticus*); P9-克氏库克菌(*Kocuria kristinae*); P10-玫瑰色库克菌(*Kocuria rosea*); P11-肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*); P12-*(Marinilactibacillus psychrotolerans)*; P13-绿色气球菌(*Aerococcus viridans*); P14-*(Ornithinibacillus bavariensis)*; P15-变异棒杆菌(*Corynebacterium variabile*); P16-*(Corynebacterium stationis)*; P17-蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*); P18-解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*); P19-枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*); P20-巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*); P21-*(Bacillus tequilensis)*; P22-奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)

图 1 克东腐乳发酵过程中不同菌落形态特征^[20]

Fig. 1 Morphology of different colonies of bacterial groups associated with Kedong sufu fermentation

刘亚栋^[22]利用高通量测序的方法,对 22 份市售腐乳样品中的细菌进行检测,结果发现厚壁菌门(Firmicute)在腐乳细菌中占绝对优势,该门下的优势菌属主要包括芽孢杆菌属(*Bacillus*)、梭菌属(*Clostridium*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、链球菌属(*Streptococcus*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、乳球菌属(*Lactococcus*)等,通过聚类分析发现样品间细菌群落组成和丰度差异较大。这进一步说明了腐乳中的微生物是具

有地域环境差异,有必要对不同地区、不同类型腐乳中微生物动态变化进行深入研究。HTS 作为近几年新兴发展的生物学技术,能 1 次对数百万条 DNA 分子进行测序,可准确、快速地揭示样本中的微生物多样性及其群落组成,然而目前应用于腐乳的研究相对较少,利用传统培养方法结合 HTS 技术来研究腐乳微生物的区系组成及动态变化将极具潜力。

4 混入腐乳的微生物与腐乳品质关系

侵入腐乳中的微生物种类繁多,结构复杂,既包括有利于发酵、促进风味形成的微生物,也存在一些导致腐败变质甚至危害健康的杂菌及有害菌。因此了解这些微生物的类别及代谢对腐乳品质生产具有重要的意义。

4.1 霉菌

除菌种霉菌(毛霉和根霉)以外,环境中侵入多数霉菌并不有利于腐乳的发酵。人工接种菌种(毛霉和根霉)在数量上占优势,可以竞争性抑制大部分环境霉菌侵入。不过在腐乳发酵的前一个月,曲霉菌属、青霉菌属、镰刀菌属微生物较为常见,这些属下的多种霉菌已被证实可产生霉菌毒素,如黄曲霉素、橘霉素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇等^[25],因此腐乳也极有可能受到霉菌毒素污染,这可能对人体健康安全具有潜在威胁。

HAN 等^[19]研究了不同含盐量红、白腐乳发酵过程中微生物的动态变化,发现所有腐乳样品经后期发酵 30d 后,基本无真菌检出($<10^1$ CFU/g)。这可能是因为在汤料中盐和酒精的协同作用下,多数真菌特别是霉菌无法生长。不过即使霉菌基本上不会出现在腐乳发酵的最后阶段,但其在发酵前期可能产生毒素,进而构成危害。

4.2 酵母

酵母常存在于各种发酵食品中,如豆酱^[25]、香肠^[26]、奶酪^[27]、食醋^[28]等,一般情况下不会引起腐败变质,但其中一些类别过量生长,也有可能对腐乳外观和风味造成不良影响,如膜醭毕赤酵母^[29]。

此外,酵母细胞中酶含量丰富,能够利用多种有机酸,可以将葡萄糖转化为甘油、乙醇、异丁醇、异戊醇等物质,SONG 等^[30]对酱油发酵过程中酵母群落和挥发性风味变化进行监测,发现酵母种类与样品风味密切相关,所以同为大豆发酵食品,酵母对腐乳的风味形成也应该具有一定的相关性。罗晓妙等^[31]从自然发酵腐乳中分离得到酵母,并将其用于腐乳混菌

发酵剂的研制,结果表明,添加体积分数 10% 酵母菌液,可制得微生物活性良好的腐乳发酵剂。

4.3 芽孢杆菌

芽孢杆菌在自然界分布广泛,而且芽孢具有很强抗逆性^[32],因此在各种类型、各种品牌腐乳中都能检测到大量的芽孢杆菌($>10^5$ CFU/g)^[18]。虽然武汉地区的一些厂家使用芽孢杆菌作为人工接种微生物,但绝大部分腐乳中的芽孢杆菌均是从环境中侵入的。腐乳中常见的芽孢杆菌主要有枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌等^[20,33]。

枯草芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌可产生蛋白酶、 α -淀粉酶、糖化酶等,是食品工业发酵的重要菌种^[34];此外,它们能够分泌多种抗菌物质,可以抑制病原菌的生长甚至杀灭有害微生物,是目前使用较为广泛的益生菌。GAO 等^[35]从腐乳中分离鉴定了一株枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* CF-3),结果表明 CF-3 具有良好的抗真菌稳定性,可用于水果病害防控。

然而,蜡样芽孢杆菌是一种条件致病菌,可以产生腹泻毒素和呕吐毒素导致人类中毒^[32],张金兰等^[36]对来自市场的 52 个腐乳样品进行了调查,发现不同腐乳中蜡样芽孢杆菌的含量为 $10 \sim 10^5$ CFU/g; HAN 等^[18]在调查研究的 23 个腐乳样本中,发现其中 3 个样本蜡样芽孢杆菌含量超过 10^5 CFU/g。ANDERSSON 等^[37]指出,当食品中蜡样芽孢杆菌数高于 10^3 CFU/g 时,对消费者将有潜在的危害,我国国家卫生计生委发布的《蜡样芽孢杆菌食物诊断标准及处理原则》(W/S 82-1996)中规定蜡样芽孢杆菌食物中毒判断标准为 10^5 CFU/g。我国腐乳产业规模已经超过百亿^[38],但其所面临的质量安全问题却非常严重,蜡样芽孢杆菌的数量已经直接影响到了腐乳的出口。

4.4 乳酸菌

乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB)种类和数目在不同类型、不同含盐量腐乳中具有很大差异($10^2 \sim 10^9$ CFU/g)。一般低盐、白腐乳中 LAB 数目较高,而高盐、红腐乳中 LAB 数目很少^[18-19,23]。这主要是因为高浓度的食盐对 LAB 具有较强的抑制作用,红腐乳中的红曲霉也可以抑制 LAB 的生长^[39]。

腐乳中常见的 LAB 主要为链球菌属(*Streptococcus*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、乳球菌属(*Lactococcus*)等,它们在酿造食品中起着非常重要的作用^[40]。LAB 能产生多种抗菌物质及

代谢产物,如细菌素、过氧化氢、双乙酰等,不仅可以抑制产毒细菌,还有抗霉菌的特性^[41],腐乳中乳酸菌的存在往往有利于控制有害菌的生长,延长腐乳保质期。马艳莉等^[42]利用乳酸菌制作豆坯生产低盐腐乳,并对其理化、微生物和感官指标进行研究,结果发现,乳酸菌低盐腐乳中氨基态氮和水溶性蛋白含量显著高于对照组,而细菌总数和芽孢杆菌数低于对照组,且感官评价总体接受较好。罗晓妙等^[31]在多菌种腐乳发酵剂的研制中发现,LAB 比例对腐乳发酵物形态影响较大,需添加体积分数 10% 的 LAB 菌液,才可获得良好生物活性的发酵剂。

不过多项研究表明腐乳中屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)含量往往较高^[20-22],这是具有一定争议性的,因为屎肠球菌属于肠道菌,腐乳中出现大量该菌,表明很可能直接或间接受到粪便污染。不过研究者们从各种奶酪中也常常会检测到大量屎肠球菌的存在^[27,43],且没有检测到大肠菌群,这表明一些发酵食品中的屎肠球菌并不一定是粪便污染所致,而是其中微生物菌群正常组成部分。

5 结论

腐乳风味独特、营养丰富,在世界发酵食品中独树一帜,在千年的历史长河中,腐乳给广大劳动人民增添了许多“美好的滋味”。随着生活水平的提高,人们越来越渴望营养美味、健康安全的食品,然而,由于微生物研究不够全面深入,腐乳中可能存在一些质量问题 and 安全隐患,有害霉菌、蜡样芽孢杆菌菌群普遍存在于各地区、各类型腐乳中,这严重制约了腐乳行业的发展;不过腐乳中也存在许多具有多种酶系、抑制有害菌生长的有益微生物(如乳酸菌),其对腐乳风味的形成、保质期的延长至关重要。因此,除了要选取优良菌种进行前期培菌,也要加强腐乳后期发酵过程中微生物的研究,通过传统培养方法与 PCR-DGGE、HTS 等现代分子生物学技术结合,全面了解不同腐乳中微生物组成及动态变化,深度挖掘微生物资源,在分离筛选功能菌的同时,严格把控杂菌和有害菌。为了全面提高腐乳质量,保证其安全性,多菌种混合发酵是今后腐乳研究和生产的必然之势。

参 考 文 献

- [1] 王瑞芝. 中国腐乳酿造[M]. 北京:轻工业出版社,2006.
- [2] 张琴. 我国腐乳的生产概况[J]. 中国调味品,2002(6): 9-13.

- [3] 涂婧,李笑梅. 腐乳相关研究及开发进展[J]. 大豆科技,2016(4):39-44.
- [4] HAN B Z, ROMBOUTS F M, NOUT M J. A Chinese fermented soybean food[J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 65(1):1-10.
- [5] 解万翠,尹超,宋琳,等. 中国传统发酵食品微生物多样性及其代谢研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(10):253-259.
- [6] 王瑞芝. 应用现代生物技术酿造腐乳的技术探讨[J]. 中国酿造, 2004, 23(2):1-5.
- [7] 李顺,顾永忠,杨英,等. 八公山腐乳酿制过程中毛霉和根霉的前期发酵比较研究[J]. 食品科学, 2016, 37(17):163-168.
- [8] 张金兰,鲁绯,纪凤娣,等. 大豆发酵食品中根霉的研究进展[J]. 中国酿造, 2010, 29(9):1-4.
- [9] FENG Z, HUANG S, AI Z W, et al. Evaluation of autochthonous micrococci strains as starter cultures for the production of Kedong sufu[J]. Journal of Applied Microbiology, 2016, 120(3):671-683.
- [10] 张金兰,张建,纪凤娣,等. 传统大豆发酵食品中主要功能细菌的研究进展[J]. 中国酿造, 2011, 30(1):5-8.
- [11] 姚翔,邓放明,陆宁. 自然发霉条件下腐乳醅中优势微生物的分离与初步鉴定[J]. 食品工业科技, 2012, 33(11):209-211.
- [12] 曾长顺,林北梅,陈平,等. 忠县豆腐乳坯高大毛霉的分离及最适生长条件的试验研究[J]. 中国调味品, 1986(7):3-10.
- [13] LIU J, HAN B, DENG S. Changes in proteases and chemical compounds in the exterior and interior of sufu, a Chinese fermented soybean food, during manufacture[J]. LWT - Food Science and Technology, 2018, 87:210-216.
- [14] 李理,杨晓泉,赵谋明. 毛霉蛋白酶在腐乳成熟中的作用[J]. 中国酿造, 2005, 25(4):18-21.
- [15] TAKAHASHI K, CHANG W J, ARIMA K. The structure and function of acid proteases:IV. Inactivation of the acid protease from *Mucor pusillus* by acid protease-specific inhibitors[J]. Journal of Biochemistry, 1976, 80(1):61-67.
- [16] 杨汶燕,林奇,王继伟,等. 腐乳发酵过程中生化指标动态变化的研究[J]. 中国调味品, 2011, 36(5):72-75.
- [17] 陈忠杰,胡燕. 枯草芽孢杆菌腐乳发酵过程中主要成分的变化[J]. 中国调味品, 2013, 38(7):40-43.
- [18] HAN B Z, BEUMER R R, ROMBOUTS F M, et al. Microbiological safety and quality of commercial sufu - a Chinese fermented soybean food[J]. Food Control, 2001, 12(8):541-547.
- [19] HAN B Z, CAO C F, ROMBOUTS F M, et al. Microbial changes during the production of Sufu-a Chinese fermented soybean food[J]. Food Control, 2004, 15(4):265-270.
- [20] FENG Z, GAO W, REN D, et al. Evaluation of bacterial flora during the ripening of Kedong sufu, a typical Chinese traditional bacteria-fermented soybean product[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2013, 93(6):1471-1478.
- [21] 陈颖慧. PCR-DGGE 分析不同品牌腐乳中细菌的多样性[J]. 中国调味品, 2017, 42(7):29-32.
- [22] 刘亚栋. 利用 16S rDNA 测序的方法鉴定腐乳中微生物的种类多样性[D]. 济南:山东师范大学, 2017.
- [23] 廖新浴,陈信贤,刘东红,等. 不同种类腐乳产品中优势菌种的分离与鉴定[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(14):3755-3759.
- [24] GU J, LIU T, SADIQ F A, et al. Biogenic amines content and assessment of bacterial and fungal diversity in stinky tofu - A traditional fermented soy curd[J]. LWT- Food Science and Technology, 2018, 88:29-34.
- [25] KIM T W, LEE J H, KIM S E, et al. Analysis of microbial communities in doenjang, a Korean fermented soybean paste, using nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis[J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 131(2):265-271.
- [26] RANTSIOU K, URSO R, IACUMIN L, et al. Culture dependent and-independent methods to investigate the microbial ecology of Italian fermented sausage[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2005, 71(4):1977-1986.
- [27] ALEGRA Á, SZCZESNY P, MAYO B, et al. Biodiversity in Oscypek, a traditional polish cheese, determined by culture-dependent and -independent approaches[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2012, 78(6):1890-1898.
- [28] NIE Z, ZHENG Y, DU H, et al. Dynamics and diversity of microbial community succession in traditional fermentation of Shanxi aged vinegar[J]. Food Microbiology, 2015(47):62-68.
- [29] MONTVILLE T J, MATTHEWS K R, KNIEL K E, et al. Food Microbiology: An Introduction[M]. Beijing: Science Press, 2011.
- [30] SONG Y R, JEONG D Y, BAIK S H. Monitoring of yeast communities and volatile flavor changes during traditional Korean soy sauce fermentation[J]. Journal of Food Science, 2015, 80(9):M2005-M2014.
- [31] 罗晓妙,王锐. 多菌种腐乳发酵剂的研制[J]. 中国调味品, 2015, 40(4):76-80.
- [32] LOGAN N A, VOS P D. Bacillus[M]. New Jersey: John Wiley & Sons, Ltd, 2009.

- [33] 刘阳,邹伟,左上春,等.自然发酵腐乳中芽孢杆菌的分离与鉴定[J].食品工业科技,2015,36(22):213-215;226.
- [34] 姚粟,于学健,白飞荣,等.中国传统发酵食品用微生物种名单的研究[J].食品与发酵工业,2017,43(9):238-258.
- [35] GAO H, XU X, DAI Y, et al. Isolation, identification and characterization of *Bacillus subtilis* CF-3, a bacterium from fermented bean curd for controlling postharvest diseases of peach fruit[J]. Food Science & Technology Research, 2016, 22(3): 377-385.
- [36] 张金兰,鲁绯,张伟伟,等.腐乳中蜡样芽孢杆菌污染情况的调查分析[J].中国酿造,2010,29(10):15-18.
- [37] ANDERSSON A, R NNER U, GRANUM P E. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*[J]. International Journal of Food Microbiology, 1995, 28(2): 145-155.
- [38] 谢婧,肖凌云,吴菲菲,等.腐乳中微生物污染状况分析[J].中国调味品,2011,36(9):6-8.
- [39] SHI Y C, PAN T M. Beneficial effects of *Monascus purpureus* NTU 568-fermented products: A review[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2011, 90(4): 1 207-1 217.
- [40] LIU S N, HAN Y, ZHOU Z J. Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods[J]. Food Research International, 2011, 44(3): 643-651.
- [41] GEREZ C L, TORRES M J, VALDEZ G F D, et al. Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria[J]. Biological Control, 2013, 64(3): 231-237.
- [42] 马艳莉,刘亚琼,夏亚男,等.乳酸菌豆坯发酵生产低盐腐乳品质及生物胺含量研究[J].中国食品学报,2017,17(4):265-271.
- [43] DUTHOIT F, GODON J J, MONTEL M C. Bacterial community dynamics during production of registered designation of origin salers cheese as evaluated by 16S rRNA gene single-strand conformation polymorphism analysis[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(7): 3 840-3 848.

Research progress on the relationship between sufu quality and microorganisms from starters and environment

WAN Hongfang¹, ZHAO Yong², WANG Zhengquan³, WANG Liping^{1*}

1(College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

2(Engineering Research Center of Food Thermal-processing Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)3(Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Aquatic Products on

Storage and Preservation (Shanghai), Ministry of Agriculture, Shanghai 201306, China)

ABSTRACT Sufu is a traditional fermented food, and microorganisms play decisive roles for its quality. Sufu is produced in an open mode. Therefore, other than starter strains, all kinds of microorganisms from environment and raw materials are likely to invade, which leads to its complex microbial communities. This paper summarized commonly used starters to produce sufu in China that are artificially inoculated, and their growth characteristics and effects on Sufu quality were reviewed. In addition, this review comprehensively explained non-artificial inoculation microorganisms invaded into sufu during its production process, particularly reviewed studies on mold, yeast, *Bacillus*, and lactic acid bacteria and their positive and negative effects on the quality of sufu. This review aimed to provide a reference for studying microorganisms in Sufu and its related fermented foods, as well as laying a foundation for subsequent co-fermentation of multiple strains to produce sufu.

Key words sufu; *Mucor*; *Rhizopus*; yeast; lactic acid bacteria; *Bacillus*