

贵州三穗特色豆豉发酵优势菌种的筛选和鉴定

Screening and identification of dominant strains of fermented characteristic lobster sauce in Guizhou Sansui

张 芹^{1,2} 王修俊^{1,2} 商景天² 高小翊²
ZHANG Qin^{1,2} WANG Xiu-jun^{1,2} SHANG Jing-tian² GAO Xiao-hong²

(1. 贵州大学发酵工程与生物制药省级重点实验室, 贵州 贵阳 550025;
2. 贵州大学酿酒与食品工程学院, 贵州 贵阳 550025)
(1. Guizhou Province Key Laboratory of Fermentation Engineering and Biopharmacy,
Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China; 2. College of Liquor Making and
Food Engineering, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China)

摘要:为实现贵州三穗特色细菌型豆豉产品品质稳定、大规模工艺化生产,在保留原有风味的基础上,实现纯种或混菌发酵,强化优良菌种,从传统生产工艺中分离筛选出 13 株菌,接种于黄豆,以感官评定和蛋白酶活力为指标进行制曲初筛及复筛,选出优势菌株 5 株,对其进行生理生化试验后,最终挑选 3 株(B、F 和 J 菌株)进行 16Sr DNA 测序并建立系统发育树。结果表明,3 株菌均属于芽孢杆菌属的亚种,是贵州三穗特色细菌型豆豉的优势菌株。

关键词:豆豉;发酵;优势菌种;筛选;鉴定

Abstract: In order to realize the stable quality and large-scale production of Guizhou Sansui characteristic bacterial lobster sauce, Pure cultivar and mixed bacillus fermentation was carried out to strengthen the dominant strains based on the preservation of the original flavors. Thirteen strains were isolated and screened from traditional production techniques and inoculated into soybeans. Preliminary screen and rescreen by using sensory evaluation and determination of protease activity as indicators, five strains of dominant strains were selected for physiological and biochemical experiments. Finally, three strains of B, F and J were selected for 16Sr DNA sequencing, and establishing phylogenetic trees. The results showed that strains of B, F and J belong to the subspecies of Bacillus, which are the dominant strains of the characteristic bacteria-type lobster sauce in Guizhou Sansui. They can lay the foundation for the preparation of the compound inoculants for lobster sauce fermentation.

Keywords: lobster sauce; fermentation; dominant strains; screen-

ing; identification

豆豉起源于中国先秦时代,古代称为“幽菽”,以大豆为原料,利用曲霉、毛霉或者细菌蛋白酶发酵作用,分解蛋白质,达到一定程度时,加盐、加酒或者利用干燥等方法来抑制蛋白酶活力,延缓发酵过程而制成^[1-2]。贵州三穗豆豉作为特色食品,极具地方特色与风味,富含钙、磷、铁、钴、硒、铜、硫胺素、核黄素及各种必需氨基酸,营养极其丰富。当地人称其为“长寿豆”,经常吃不仅有助于开胃消食、祛风散寒,还能预防脑血栓的发生^[3-5]。但也存在产品品质不稳定,生产技术不规范等不足。

目前,贵州豆豉的工业发酵大多沿用传统自然发酵,传统发酵豆豉中的自然菌株发酵能力差异大,存在一定安全隐患^[6-7],对人体健康构成威胁。为尽快使豆豉实现规范化、标准化生产,需要从传统发酵豆豉中筛选出发酵能力强、品质稳定的优良菌种,用于强化纯种发酵或进行混菌发酵,为制备稳定的复合发酵剂打下基础。本试验在前人研究的基础上,选用贵州三穗特色细菌型豆豉为原料,以感官评分和蛋白酶活力为指标对分离出的菌株进行制曲初筛和复筛,再将筛选出的菌株进行生理生化试验,最终挑选优势菌进行分子生物学鉴定,以期研制混菌发酵剂提供优良的菌种资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

细菌型豆豉半成品:贵州三穗老张家土特食品有限公司;

柠檬酸盐试剂盒、MR-VP 试剂盒、丙二酸盐试剂盒、硝酸盐还原试剂盒、3% 过氧化氢酶试剂盒、明胶液化试剂盒、Kovacs 氏靛基质试剂盒;青岛高科技工业园海博生物技术

基金项目:贵州省科技计划项目(编号:黔科合支撑[2016]2537 号)

作者简介:张芹,女,贵州大学在读硕士研究生。

通信作者:王修俊(1965—),男,贵州大学教授,本科。

E-mail: 775298123@qq.com

收稿日期:2018-03-31

有限公司；

牛肉膏蛋白胨琼脂培养基:蛋白胨 10 g、牛肉膏粉 3 g、氯化钠 5 g、琼脂 15 g,加蒸馏水 1 000 mL,pH 7.0~7.4；

胰酪胨大豆琼脂培养基:胰酪胨 15 g、大豆木瓜蛋白酶消化物 5 g、氯化钠 5 g、琼脂 15 g,加蒸馏水 1 000 mL,pH 7.1~7.5。

1.2 主要试验设备

台式离心机:TDL-40B 型,上海安亭科学仪器厂；
电子精密天平:FA2004B 型,上海越平科学仪器有限公司；

电热鼓风恒温干燥箱:GZX-GF101-3-BS-Ⅱ型,上海货德实验设备有限公司；

酸度计:PHS-3C 型,上海理达仪器厂；
显微镜:CX31 型,奥林巴斯(中国)有限公司；
测序仪:3730XL 型,美国 Applied Biosystems 公司；
分光光度计:JU-A-O7-O3 型,上海菁华科技有限公司；
电子恒温水浴锅:DK-98-11A 型,天津市泰斯特仪器有限公司；

生化培养箱:SPX-250B-G 型,上海博迅实业有限公司；
手提式不锈钢蒸汽灭菌锅:2012-B4051 型,上海东亚压力容器制造有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 优势菌株筛选工艺路线

菌种的分离和纯化→制曲初筛→制曲复筛→菌种形态学观察和生理生化试验→分子生物学鉴定

1.3.2 豆豉菌种的分离和纯化 从保鲜袋中取 25 g 豆豉加入装有玻璃珠的无菌生理盐水中,摇床分散 30 min,得到稀释 10 倍的菌液。同法将菌液梯度稀释为 $10^{-2} \sim 10^{-9}$,每个梯度做 3 个平行。摇匀用移液枪取稀释倍数为 $10^{-2} \sim 10^{-9}$ 的菌液各 100 μ L 均匀涂布于胰酪胨大豆琼脂培养基平板上。37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后,观察挑取有透明圈的菌落并将其反复划线于胰酪胨大豆琼脂培养基平板上培养并镜检,直至得到纯菌株^[8],筛选出 13 株菌,将分离成单菌落的菌种接种在牛肉膏蛋白胨固体斜面培养基上于 4 $^{\circ}$ C 下保存。

1.3.3 初筛和复筛 挑取具有不同菌落形态的菌株,分别在 37 $^{\circ}$ C 条件下液体培养 24 h^[9]。挑选颗粒饱满的黄豆清洗 3 次置于冷水中浸泡 12 h,沥干水分装于烧杯中,先包上纱布,再包报纸,在 115 $^{\circ}$ C 0.1 MPa 下高压蒸煮 30 min,待冷却至 37 $^{\circ}$ C 左右后在超净工作台中接入活化后的菌液,搅拌均匀。按黄豆:种子原菌液(10^8 CFU/mL)=100:1 (g/mL)的比例接种,37 $^{\circ}$ C 培养 48 h。对照自然发酵豆豉,对发酵豆豉的色泽、黏丝、口感、形态、风味,按照豆豉感官评价标准进行感官评定,筛选出黏丝较长、咀嚼性好、形态湿润饱满、风味与自然发酵豆豉相似或具有独特风味的菌株^[10-11]。按初筛法进行复筛,48 h 后测定蛋白酶活力,筛选出蛋白酶活力较高的菌株^[12-13]。参照蛋白酶活力测定法(SB/T 10317—1999)绘制出标准曲线见图 1,通过测定吸光度计算出酶活性。

1.3.4 菌种形态学观察和生理生化试验 将经过初筛和复筛后筛选出的待测菌株进行革兰氏染色,在显微镜下观察各

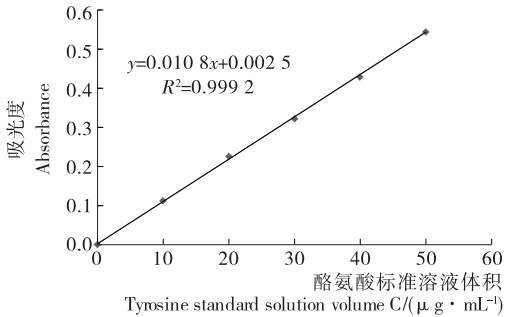


图 1 酪氨酸标准曲线

Figure 1 Tyrosine standard curve

菌种形态并进行生理生化试验。参照枯草芽孢杆菌,生理生化试验主要包括糖发酵(葡萄糖、蔗糖、乳糖)产酸产气、硝酸盐还原、过氧化氢酶、液化明胶、吡啶试验、V-P 试验、丙二酸盐利用、柠檬酸盐利用、甘露醇试验、水解酪素、甲基红试验、水解淀粉等,并分别在 3%,5%,7%,10%,15%的 NaCl 含量条件下以及在 5,15,25,35,45,50,55,60 $^{\circ}$ C 温度梯度下观察菌种的生长情况。具体培养基的配制和鉴定参考文献[14~16]。

1.3.5 分子生物学鉴定和建立系统发育树

(1) 提取基因:按照生工 SK8255Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒说明书进行提取。对待测菌株进行基因 DNA 的提取纯化及 16Sr DNA 序列分析并建立系统发育树。

(2) 引物:上引物序列 27F(5'-AGTTTGATCMTG-GCTCAG-3');下引物序列 1492R(5'-GGTTACCTTGT-TACGACTT-3')。

(3) PCR 反应体系:Template(基因组 DNA 20~50 ng/ μ L) 0.5 μ L,10 $\times$ Buffer(with Mg^{2+}) 2.5 μ L,dNTP(2.5 mmol/L)1 μ L,Taq DNA 聚合酶 0.2 μ L,前后引物均为 0.5 μ L,双蒸水 25 μ L。

(4) PCR 反应条件:预变性 94 $^{\circ}$ C 4 min,30 个循环,72 $^{\circ}$ C 修复延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 终止反应。

(5) 反应结束后,用 1% 琼脂糖凝胶电泳对 DNA 鉴定,并纯化回收产物。

2 结果与分析

2.1 菌种的形态观察和初步鉴定

采用稀释分离、划线纯化的方法,从样品豆豉中分离获得 13 株细菌,其中 3 株有不良气味,舍弃。将其他菌株进一步培养观察并镜检,各菌株的菌落和细胞形态见表 1。

从表 1 中可以看出,这 10 株菌的菌落形态和豆豉常用菌株——枯草芽孢杆菌高度相似。图 2 是 B、C、F、J 的革兰氏染色结果(放大倍数为 40 $\times$ 10 倍),为了进一步确定这 10 株菌在制曲中气味口感和色泽,进行制曲初筛和复筛。

2.2 制曲初筛和复筛

将 10 株纯菌接种于黄豆中,通过感官评分和蛋白酶活力筛选出黏丝较长、咀嚼性好、形态湿润饱满、风味与自然发酵豆豉相似或具有独特风味的菌株。

从表 2 可知,与自然制曲相比,感官评分较高的菌株有

表 1 细菌型豆豉菌落形态和细胞形态特征

Table 1 The colony and cell morphology of feature in bacteria fermented lobster sauce			
菌株	菌落形态	细胞形态	细胞大小/mm
A	灰白色,圆形,半透明,湿润,凸,易挑取,光滑	杆状	(3.0~4.0)×1.0
B	白色,不规则,不透明,较湿润,易挑取,光滑	短杆状	(1.0~3.0)×1.0
C	白色,圆形,不透明,较湿润,易挑取,光滑	短杆状	(1.0~3.0)×1.0
D	灰白色,圆形,透明,湿润,易挑取,光滑	短杆状	(3.0~4.0)×1.0
E	奶油色,不规则,半透明,湿润,扁平,易挑取,光滑	杆状	(5.0~7.0)×1.0
F	奶油色,圆形,半透明,湿润,凸起,易挑取,光滑	杆状	(3.0~4.0)×1.0
G	白色,不规则,不透明,湿润,扁平,	椭圆	(1.0~1.5)×1.0
H	灰白色,圆形,半透明,凸起,湿润,易挑取,光滑	椭圆	(1.0~1.5)×1.0
I	灰白色,圆形,半透明,凸起,湿润,易挑取,光滑	椭圆	(2.0~3.0)×(1.0~2.0)
J	灰白色,圆形,透明,湿润,易挑取,光滑	长杆状	(3.0~4.0)×1.0

表 2 制曲初筛感官评价表

Table 2 Sensory evaluation standard for primary screening of lobster sauce						
编号	色泽	黏丝	口感	形态	气味	总分
自然制曲	黄褐色	黏丝长,多	酥软	饱满,湿润	豉香味浓	79.0
A	深黄褐色	黏丝长,多	酥软	饱满,湿润	豉香味淡	74.0
B	黄褐色	黏丝长,多	酥软	饱满,湿润	豉香味淡,有淡淡酱香	78.0
C	深黄褐色	黏丝长,多	酥软	饱满,湿润	豉香味浓	74.0
D	黄褐色	黏丝短,少	湿润微苦	饱满,较干	豉香味浓	68.0
E	深黄褐色	黏丝短,少	湿润	饱满,较干	豉香味淡,有轻微氨味	70.0
F	深黄褐色	黏丝短,少	酥软	饱满,湿润	豉香味浓	73.0
G	黄褐色	黏丝短,少	湿润	饱满,较干	豉香味淡	74.0
H	黄褐色	黏丝长,多	酥软	饱满,湿润	豉香味浓,有轻微氨味	72.5
I	深黄褐色	黏丝长,多	干硬	饱满,较干	豉香味浓	65.5
J	金黄色	黏丝长,多	软绵	饱满,湿润	豉香味浓	80.5

A、B、C、F、G、H、J,其中 H 菌株有氨味,影响豆豉风味,舍弃。G 菌株制曲豆豉形态较干,豉香味淡,导致豆豉的质地硬。细菌在制曲过程中会分泌各种蛋白酶,蛋白酶利用黄豆中的蛋白质分解出各种氨基酸,特别是人体必需氨基酸——酪氨酸,并且蛋白酶对豆豉风味和色泽的形成也具有一定的

促进作用,所以蛋白酶活力成了评价豆豉品质的一个重要指标^[17-18]。从图 3 可知,与自然菌株相比,A、B、C、F、G、H、J 蛋白酶活力均比自然菌株高,但 G、H 存在一定感官问题,所以舍弃。综合感官评价和蛋白酶活力,选择 A、B、C、F、J 5 株菌进行生理生化试验。

2.3 生化试验

通过综合初筛、复筛结果,对 A、B、C、F、J 5 株菌进行相关生理生化特征试验,具体结果见表 3。

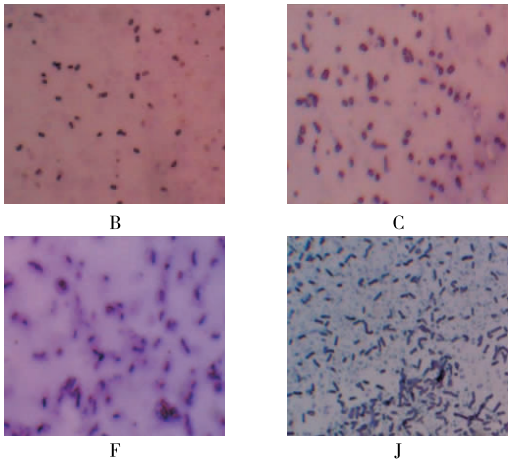


图 2 B、C、F、J 革兰氏染色结果

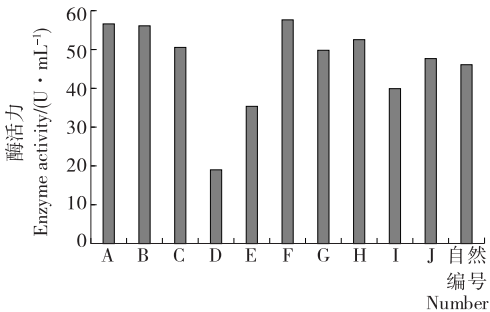


图 3 分离菌株产蛋白酶酶活

Figure 3 Protease-producing activity of screened bacterial strain

Figure 2 Gram staining results of *Bacillus* B,C,F and J

从表 3 可知,5 株菌均属于革兰氏阳性菌(+),厌氧生长,利用葡萄糖、蔗糖、乳糖且不产气,在过氧化氢酶试验、V-P 试验和甲基红试验中待测菌株均呈现阳性,柠檬酸盐试验和吡啉试验均呈阴性,待测菌株均能利用淀粉、酪素、明胶等。在测定菌株耐盐性和耐温性试验中,NaCl 浓度为 15% 时因渗透压过大待测菌株不能生长,低温(5℃以下)或高温(60℃以上)待测菌株无法生长。

根据《伯杰氏细菌鉴定手册》和《常见细菌系统鉴定手册》中芽孢杆菌的鉴定依据,其中 B、F 和 J 在 55℃下均能生长,超过 60℃下不生长,所以该 3 株菌培养温度不能超过 55℃。随着 NaCl 浓度的逐渐增加,菌种生长受到抑制,当

表 3 A、B、C、F、J 号菌株的生理生化特征[†]

Table 3 Physiological and biochemical characteristics of strains A,B,C,F and J

菌株	A	B	C	F	J
革兰氏染色	+	+	+	+	+
厌氧生长	—	—	—	—	—
接触酶	+	+	+	+	+
葡萄糖产气	—	—	—	—	—
乳糖产气	—	—	—	—	—
蔗糖产气	—	—	—	—	—
葡萄糖产酸	+	+	+	+	+
乳糖产酸	+	+	+	+	+
蔗糖产酸	+	+	+	+	+
V-P 试验	+	+	+	+	+
过氧化氢酶试验	+	+	+	+	+
甲基红试验	+	+	+	+	+
硝酸盐还原试验	—	—	+	+	—
吡啉试验	—	—	—	—	—
水解淀粉	+	+	+	+	+
明胶液化试验	+	+	+	+	+
水解酪素	+	+	+	+	+
丙二酸盐试验	—	+	—	—	+
柠檬酸盐试验	—	—	—	—	—
NaCl 浓度	3%	+	+	+	+
	5%	+	+	+	+
	7%	+	+	+	+
	10%	+	+	+	+
	15%	—	—	—	—
	5℃	—	—	—	—
生长温度	15℃	+	+	+	+
	25℃	+	+	+	+
	35℃	+	+	+	+
	45℃	+	+	+	+
	50℃	+	+	+	+
	55℃	—	+	—	+
	60℃	—	—	—	—

[†] “+”表示阳性;“—”表示阴性。

浓度达到 15% 时菌种不生长,综合以上试验结果,选择 B、F 和 J 进行分子生物学鉴定。

2.4 分子生物学鉴定

对 B、F 和 J 菌株进行 16Sr DNA 序列测定,PCR 电泳图谱及系统发育树见图 4~7。

由图 4 可知,B、F、J 3 菌株在约 1 400 bp 处出现明显的荧光条带,说明 PCR 扩增成功,序列大小分别为 1 451,

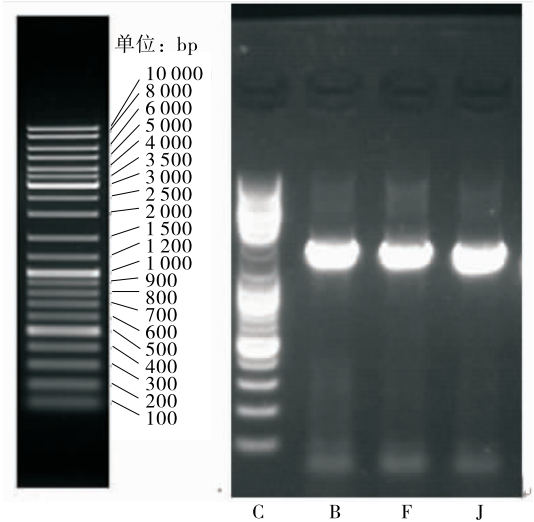


图 4 PCR 产物电泳图谱

Figure 4 PCR products electrophoretogram

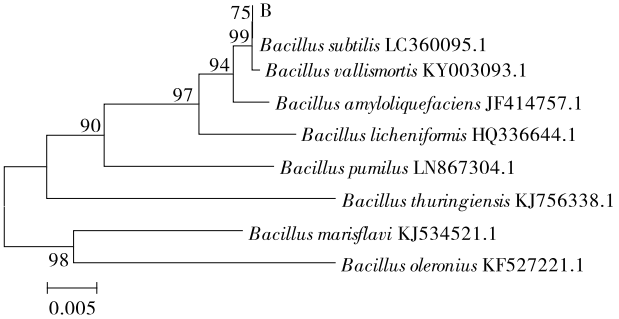


图 5 利用 16Sr DNA 序列对 B 菌株进行构建系统发育树

Figure 5 Phylogenetic tree for B strain based on their 16Sr DNA sequences

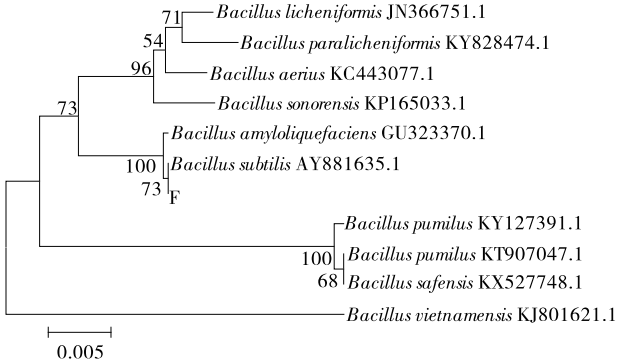


图 6 利用 16Sr DNA 序列对 F 菌株进行构建系统发育树

Figure 6 Phylogenetic tree for F strainbased on their 16Sr DNA sequences

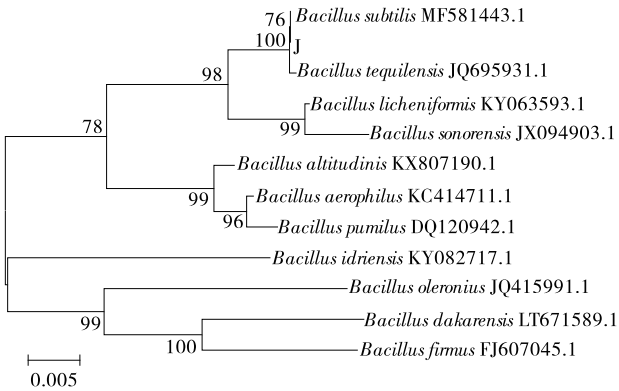


图 7 利用 16Sr DNA 序列对 J 进行构建系统发育树
Figure 7 Phylogenetic tree for J strain based on their 16Sr DNA sequences

1 407,1 421 bp。由图 5~7 可知,菌株 B、F、J 与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)系统位置最近。根据 16Sr DNA 序列同源性对比和系统发育树的构建,可以得到菌株 B、F、J 属于细菌范畴,杆菌纲芽孢杆菌目芽孢杆菌科芽孢杆菌属,为枯草芽孢杆菌属的亚种。

3 结论

本试验从贵州三穗豆豉中分离纯化得到 13 株细菌,将分离出来的菌株以感官评定为指标进行初筛,以蛋白酶活力为指标复筛出 5 株菌(A、B、C、F 和 J),通过生理生化确定了 3 株(B、F 和 J)并对其进行 16Sr DNA 基因的测序与分析。结果表明,菌株 B、F、J 均为芽孢杆菌(*Bacillus*),根据 16Sr DNA 序列同源性对比和系统发育树的构建,可以得到 B、F 和 J 菌株均为芽孢杆菌属的亚种,是贵州细菌型豆豉的优势菌株。与自然菌株蛋白酶活力相比,优势菌株 B、F、J 的蛋白酶活力分别提高了 10.03,11.56,1.57 U/mL,这为制备复合发酵剂提供了优良的菌种。关于三穗地区细菌型优势菌株的筛选与鉴定,本试验分子鉴定数量相对较少,未来可取不同地区细菌型样品,进行生物多样性鉴定以完善对细菌型豆豉的研究。

参考文献

[1] 胡鹏. 传统毛霉型豆豉发酵过程中生物胺的变化及组胺生成机理的初步研究[D]. 重庆: 西南大学, 2014: 8-9.

[2] WU Lan-fang, JIANG Ai-min, JING Yong-shuai, et al. Antioxidant properties of protein hydrolysate from Douchi by membrane ultrafiltration [J]. International Journal of Food Properties, 2017, 20(5): 997-1 006.

[3] NI Yin-yun, WANG Jia-le, QIAN Bing-jun, et al. Purification and side chain selective chemical modifications of glutamate dehydrogenase from bacillus subtilis natto [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 172(7): 3 593.

[4] 谢晨晨, 刘敬为, 张怡, 等. 纳豆芽孢杆菌发酵厨余物的初步研究[J]. 饲料工业, 2014(11): 26-27.

[5] LIU Hui, WANG Peng, HU Yi-hua, et al. Construction of an RNAi expression vector and transformation into *Penicillium chrysogenum* [J]. Annals of Microbiology, 2014, 64 (1): 113-120.

[6] 杨志波, 王修俊, 艾静汶, 等. 豆豉发酵优势菌种的筛选与鉴定[J]. 中国调味品, 2014(7): 13-17.

[7] 张莉. 纳豆加工工艺的研究和产品开发[D]. 济南: 山东轻工业学院, 2012: 15-18.

[8] 李小永, 陈伟, 程芳, 等. 一株细菌型豆豉发酵菌种的筛选及鉴定[J]. 食品工业科技, 2011(11): 212-215.

[9] 吴拥军, 贾东旭, 王嘉福, 等. 豆豉芽孢杆菌前发酵条件初探与酶活力测定[J]. 食品工业科技, 2010, 27(9): 191-194.

[10] 艾静汶, 王修俊, 周沅洁, 等. 贵州特色食品水豆豉生产工艺与质量变化关系的研究[J]. 中国调味品, 2013, 38(3): 64-68.

[11] 李慧. 混菌型豆豉发酵及风味物质的研究[D]. 大连: 大连工业大学, 2009: 18-20.

[12] 朱隆绘, 王修俊, 艾静汶, 等. 自然发酵辣椒中天然微生物的分离与鉴定[J]. 中国调味品, 2013, 38(2): 30-33.

[13] 陈瑾, 邵冰洁, 朱晓昊, 等. 糯米炸糕中发酵细菌鉴定与优势菌株筛选[J]. 食品与机械, 2016, 32(4): 33-36.

[14] 布坎南 R E. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 北京: 中国科学出版社, 2001: 256-287.

[15] 东秀珠. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 中国科学出版社, 2001: 364-370.

[16] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海: 上海科技出版社, 1986: 21-25.

[17] 陈美珍, 余杰, 郭慧敏. 大豆分离蛋白酶解物清除羟自由基作用的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(1): 43-47.

[18] 张帅, 张其圣, 陈功, 等. 自然发酵豆瓣后熟期微生物多样性及高产蛋白酶菌株的初探[J]. 食品与发酵科技, 2018(1): 39-44.

信息窗

法参议院批准将餐饮业有机食品比例定为两成

据法国《费加罗报》6月28日援引法新社报道,法国参议院于当地时间6月28日审查农业食品法案时,批准将餐饮业中有机产品的比例目标定为20%。

参议院通过了由共同报告员安娜-卡特琳·卢瓦西耶(Anne-Catherine Loisier)女士提出的一项修正案,并对其中一些款项做出修改。卢瓦西耶称,法国所有部门对于满足有机产品上升的需求信心十足,因此在修正案提出将餐饮业中有机产品比例目标定为20%

修正案还确定了蛋白质多样化的最低标准,并将制定

一项多年计划。卢瓦西耶表示,法案的逐步实施应当与利益相关者进行磋商,并且考虑到当地生产力的变化。

另一位共同报告员米歇尔·雷松(Michel Raison)强调,他们将避免通过进口来提升有机产品占比,希望尽量促使农民在餐厅周围就近生产有机食品。

法案已在国民议会获得通过。参议院的法案审查原本预计从26持续至29日,但因为需要辩论时间,所以将持续至7月2日。

(来源: <http://news.foodmate.net>)