

固定化增殖细胞快速发酵生产酱油^{*}

刘健平 钟英长

(中山大学生命科学学院生化系, 广州 510275)

摘 要 从酱醪中分离出嗜盐片球菌 (*Pediococcus halophilus*), 鲁氏接合酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*), 多艺球拟酵母 (*Torulopsis versatilis*) 和埃切球拟酵母 (*Torulopsis etchellsii*). 采用聚乙炔醇 (PV A) 硼酸 (H_3BO_3) 固定化方法将它们分别进行包埋、增殖, 再依次去发酵酱醪水解液, 仅需 10 d 生产出的酱油与商品酱油相当, 这比传统酿造法大大缩减了时间.

关键词 固定化细胞, 发酵, 酱油

分类号 TS 201.3

酱油是人们日常生活中常用的调味品, 大多数厂家采用低盐固态发酵法生产, 约需 3~4 个月. 酿造理论研究表明: 米曲霉 (*Aspergillus oryzae*), 嗜盐片球菌 (*Pediococcus halophilus*), 鲁氏接合酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*), 多艺球拟酵母 (*Torulopsis versatilis*) 和埃切拟球菌 (*Torulopsis etchellsii*) 等 5 种菌在酱油酿造中起必不可少的作用, 而其它微生物作用不大^[1].

本文以聚乙炔醇 (Polyvinyl alcohol, PV A) 为载体, 分别包埋 4 种细胞并增殖培养, 再依次发酵酱醪水解液, 为大大缩短酱油的发酵时间而做了初步研究.

1 材料和方法

(1) 试剂: 聚乙炔醇 棉子糖 赤藓糖醇 尸胺 放线菌酮、纤维二糖、麦芽糖、糊精、葡萄糖、果糖、半乳糖、甘露醇、琥珀酸、柠檬酸、硝酸钠、蔗糖、淀粉、海藻酸钠、山梨醇、硼酸、氯化钙.

(2) 仪器: 10 mL 微量滴定管、10 mL 艾氏发酵管、雷磁 PHS-29A 型酸度计、722 型分光光度计、J-320 型扫描电子显微镜、Shimadzu GC-14B 岛津气相色谱、Shimadzu LC-10A 岛津高效液相色谱.

(3) 培养基 (液): ① 粗酱油 ($d=10\%$), 葡萄糖 ($d=1\%$), 乙酸钠 ($d=3\%$), 酸母膏 ($d=0.3\%$), 氯化钠 ($d=10\%$), 琼脂 ($d=2\%$), pH 7.0; ② 大豆汁糖密培养液; ③ 细菌产酸产气培养液; ④ 细菌硝酸盐还原培养液; ⑤ 明胶液化培养基; ⑥ 细菌生芽孢培养基; ⑦ 细菌耐盐性培养液; ⑧ 细菌 pH 生长培养液; ⑨ 酵母碳源同化培养液; ⑩ 酵母硝酸盐还原培养液; ⑪ 酵母高渗透压培养基; ⑫ 酵母放线菌酮培养基 ($d=0.1\%$). ②~

* 收稿日期: 1997-06-24 刘健平, 男, 25 岁, 硕士

⑫号培养基 (液) 配方见文献 [2].

(4) 菌种的分离与鉴定: 酱醪样品从厂家购得.

细菌的分离与鉴定: 熔化的培养基①倒入平皿, 45℃时加入 1 mL 酱醪的 20 倍水稀释液, 均匀混合, 置于烧蜡烛的干燥器内, 缺氧环境中 30℃静置 7 d. 挑单个菌落, 划线培养, 再挑单菌落穿刺接种于培养基①中. 鉴定方法详见张继忠^[2]所述, 均在缺氧干燥器内进行.

酵母菌的分离与鉴定: 酱醪 0.5 mL 投入 50 mL 培养液②中, 30℃ 120 r/min 摇床 3 d, 然后取 1 mL 做 $10^{-1} \sim 10^{-7}$ 的系列稀释, 涂平板后倒置培养. 挑单个菌落划线, 培养, 再挑单菌落接于培养基②. 鉴定方法详见张继忠^[2]所述.

(5) 固定微生物细胞: 见图 1, 详见文献 [3].

(6) 酱醪水解液的制备: 见文献 [1].

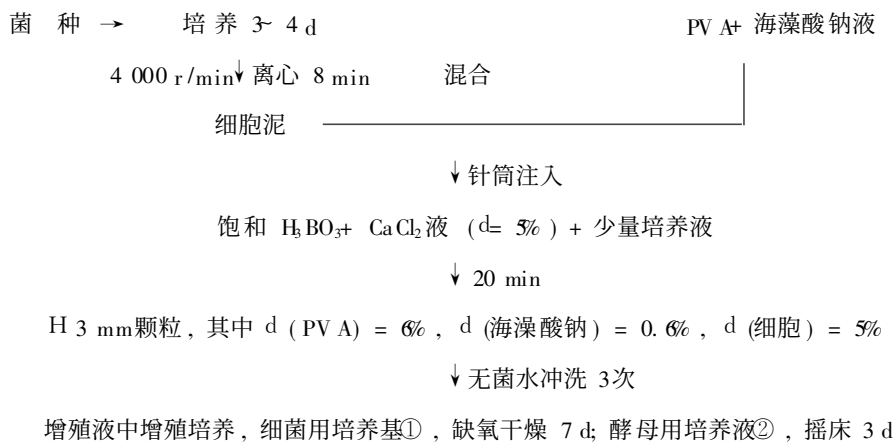


图 1 聚乙烯醇-硼酸法固定细胞示意

(7) 凝胶中酵母菌数测定: 见文献 [4].

(8) 产气初步试验: 约 2 mL 固定化增殖酵母颗粒投入 10 mL 艾氏发酵管内, 采用培养液②, 及时更换培养液, 记录其 20 d 内产气速率的变化.

(9) 用固定化增殖细胞发酵酱醪水解液: 用 1 倍体积嗜盐片球菌颗粒投入到 10 倍体积水解液中, 烧蜡烛干燥器内 30℃静置 4 d, 取出该颗粒后, 再投入 1 倍体积的鲁氏酵母颗粒, 30℃ 120 r/min 摇床 3 d, 取出该颗粒后, 再投入 0.5 倍体积的多艺球拟酵母和 0.5 倍体积的埃切球拟酵母颗粒, 摇床 3 d, 取出该 2 种颗粒. 采用上述方法前后共需 10 d.

(10) 酱油成分分析: 氨基氮、食盐、还原糖按俞一夫^[5]法进行; 气相色谱测乙醇含量: H2 mm× 2.0 m 玻璃柱, Chromosorb W (AW-OMCS) 80~ 100 目; 高效液相色谱测乳酸: H6.0 mm× 0.05 m Shim-pack CLC-ODS, 80% NaH2PO4 ($c = 5 \times 10^{-3}$ mol/L) + 20% MeOH, 223 nm; 高效液相色谱测乙酸乙酯: H6.0 mm× 0.05 m Shim-pack CLC-ODS, 50% NaH2PO4 ($c = 5 \times 10^{-3}$ mol/L) + 50% MeOH, 208 nm.

(11) 扫描电子显微镜制片及观察: 4℃戊二醛前固定, 四氧化钨 ($d = 1\%$) 后固定, 乙酸异戊酯置换, 详见张景强^[6]所述.

2 结 果

2.1 细菌的分离及鉴定结果

从样品分离皿中发现 1 种极小白色菌落和 1 种较大浅黄色菌落, 经形态特征检验及 18 项生理生化试验, 得知白色菌落的细菌, 不运动, 微需氧, 耐 d 为 10% 的 NaCl, pH 5. 0 不生长而 pH 9. 0 生长, 从图 2 可见其四联状或成对排列, 根据文献 [7], 鉴定其为嗜盐片球菌 (*Pediooccus halophilus*). 为革兰氏阳性菌, 细胞成对或四联排列; 穿刺培养为白色丝状物, 平皿培养为极小白色菌落. 其生理生化特征如下: 硝酸盐不还原; 明胶不液化; 不运动; 不产芽孢; 微需氧; 在 d (NaCl) 为 5%, 10%, 15%, 18% 中均能生长; pH 为 7. 0, 9. 0 时能生长; 葡萄糖、果糖、半乳糖、甘露醇、麦芽糖、糊精、蔗糖发酵均产酸不产气; 淀粉、棉子糖、山梨醇发酵均不产酸.

2.2 酵母菌的分离及鉴定结果

共分离到 8 种酵母, 经形态特征检验及 13 项生理生化试验, 其中 3 种结果见表 1. 根据“最少试验组”^[8]法, 鉴定它们分别是鲁氏接合酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*)、多艺球拟酵母 (*Torulopsis versatilis*)、埃切球拟酵母 (*Torulopsis etchellsii*).

2.3 固定化颗粒的扫描电镜观察结果

从图 3、4 可见, 在每种颗粒表面, 细胞都成团成堆紧附于凝胶网格中, 有的甚至胀破了凝胶网.

表 1 酵母的形态及生理生化特征

试 验 项 目	酵母菌 1	酵母菌 2	酵母菌 3
D-葡萄糖发酵	+	+	+
棉子糖同化	-	+	-
赤藓糖醇同化	-	-	-
D-山梨 (糖) 醇同化	+	-	-
琥珀酸同化	-	+	+
柠檬酸同化	-	-	-
硝酸盐还原	-	+	+
尸胺同化	+	+	+
60% -D-葡萄糖生长	+	+	+
蔗糖同化	-	-	-
麦芽糖同化	+	+	+
纤维二糖同化	-	+	-
0.1% 放线菌酮生长	-	+	-
个体形态	细胞单个或小簇, 肥大	细胞小簇或成对, 椭圆	细胞单个或成对, 椭圆
培养特征	菌落光亮, 褐色	菌落灰白, 软粘质	菌落浅褐色, 软粘质

2.4 凝胶酵母数测定

选择鲁氏酵母颗粒作代表, 测得其所含细胞密度为 1.7×10^8 个 /mL.

2.5 产气试验结果

以鲁氏酵母颗粒为代表, 在 20 d 的发酵期内一直维持着约 1.5 mL/h 的产气速率, 颗



图 2 嗜盐片球菌的显微电镜照片 (× 5 000)

图 3 多艺球拟酵母的固定化细胞电镜照片 (× 800)

图 4 埃切球拟酵母的固定化细胞电镜照片 (× 3 300)

粒未变形、分解,说明其耐高盐,有良好机械强度.

2.6 固定化增殖细胞发酵酱醪水解液结果

用嗜盐片球菌颗粒发酵酱醪水解液,只需 4 d 水解液 pH 就降至 5.0 左右;鲁氏酵母颗粒只需 2 d 就能使 φ (乙醇) = 1.76%,第 3 天达 2.6%;再用多艺球拟酵母和埃切球拟酵母颗粒发酵,3 d 后出现典型酱香.

2.7 酱油成分分析结果

将按上述方法和时间处理的酱油进行成分分析,以未经处理的酱醪水解液和 3 种市售酱油做对比 (见表 2).

表 2 酱油成分分析

项 目	氨基氮 / (10 ⁻² g° mL ⁻¹)	还原糖 / (10 ⁻² g° mL ⁻¹)	食盐 / (10 ⁻² g° mL ⁻¹)	ρ(乳酸) %	ρ(乙醇) %	ρ(乙酸乙酯) %
商品酱油 1	0.92	3.28	21.8	0.61	1.72	0.005
商品酱油 2	1.02	5.94	19.3	0.94	2.12	0.006
商品酱油 3	1.05	5.20	20.3	1.06	2.68	0.016
酱醪水解液	1.51	9.37	20.2	未检到	0.13	未检到
固定化细胞发酵酱油	1.10	4.87	20.5	0.81	3.08	0.015

从表 2 可知,固定化细胞发酵法生产的酱油其 d (乳酸)、d (乙酸乙酯) 由酱醪水解液中的未检到而分别升达 0.81%, 0.015%, 乙醇增长约 3%, 氨基氮、还原糖、食盐 6 项指标均与市售酱油相当. 生产出的酱油有酱香, 褐色泽, 无混浊霉花, 而整个发酵仅需 10 d 左右, 这比传统酿造法所需的 3~4 个月大大缩短了时间.

参 考 文 献

- 1 福崎幸藏. 中小型酱油厂实用技术. 北京: 轻工业出版社, 1990. 74~ 199
- 2 张继忠. 微生物分类学. 上海: 复旦大学出版社, 1990. 89~ 427
- 3 王建龙, 周定, 柳萍. 工业微生物, 1993, 23 (6): 7~ 10
- 4 杨萍, 董家灿, 刘士清. 工业微生物, 1992, 22 (6): 12~ 16
- 5 俞一夫. 粮油食品分析与检测. 北京: 轻工业出版社, 1992. 248~ 250
- 6 张景强. 生物电子显微技术. 广州: 中山大学出版社, 1987. 113~ 126
- 7 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册 (第八版). 北京: 科学出版社, 1984. 707~ 710
- 8 Barnett J A. Yeasts Characteristics and identification. Cambridge Cambridge University Press, 1983. 124~ 725

Rapid Fermentation for Soy Sauce Production by Immobilized Cells

Liu Jianping^{*} *Zhong Yingcheung*

Abstract One strain of bacterium and three strains of yeasts identified as *Pediococcus halophilus*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Torulopsis versatilis* and *Torulopsis etchellsii* were isolated from Moromi. They were immobilized seperately in the PV A- H_3BO_3 gel beads. After proliferation of cells in the beads, they were used for the fermentation of hydrolyzed soy bean broth. The results showed that within ten days the product was similar to the conventional soy sauce.

Keywords immobilized cells, fermentation, soy sauce

^{*} School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275