



利用多菌种生产传统发酵食品研究进展

陈楠, 戴传云*

(重庆科技学院化学化工学院, 重庆 401331)

摘要: 传统发酵食品种类丰富, 风味独特, 是食品工业重要组成部分, 利用多菌种生产传统发酵食品可实现产品品质标准化和均一化, 提高生产的工业化程度。本文综述多菌种在传统发酵食品生产中的应用, 分析应用过程中出现的问题, 并提出相应的解决措施, 旨在为实现传统发酵食品工业化提供一定的参考。

关键词: 多菌种; 发酵剂; 传统发酵食品; 品质

Multi-Starter Cultivation for Preparation of Traditionally Fermented Foods

CHEN Nan, DAI Chuan-yun*

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University of Science and Technology, Chongqing 401331, China)

Abstract: Traditionally fermented foods with plentiful varieties and special flavor are a major part of current food industry. The industrialization and standardization of traditionally fermented foods can be significantly improved through the application of multi-starter cultivation. In this paper, fermentation with multi-starter, current problems and corresponding solutions during the production of traditionally fermented foods have been discussed, which will provide a theoretical reference for the industrialization of traditionally fermented foods.

Key words: multi-starter strain; traditionally fermented food; quality

中图分类号: TS26

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)03-0308-04

中国传统发酵食品生产历史悠久, 风味独特, 深受人们喜爱。传统发酵食品包括白酒、发酵乳制品、发酵调味制品、发酵蔬菜制品及发酵肉制品等, 这些都是我国食品工业的重要组成部分。传统发酵食品独特的风味及品质与其复杂的微生物群落关系密切, 如: 白酒繁杂的风味与酒曲、酒醅、窖泥中的微生物菌群密不可分; 腌渍蔬菜在乳酸菌作用下产生酸爽口感; 腌制肉制品色泽和质构的稳定离不开乳酸菌、葡萄球菌、酵母菌等微生物。近年来研究发现, 除原料本身的生物活性物质外, 传统发酵食品还能在微生物和酶的作用下产生多糖、生物活性肽、维生素等功能因子^[1], 具有较高的营养保健价值, 开发潜力巨大。但传统发酵食品生产中普遍存在工业化程度低、产品品质不均一及不良微生物污染等问题, 制约了传统发酵食品的发展。利用多菌种在生产过程中形成优势菌群, 调控代谢, 能提高产品品质和生产效率, 是实现传统发酵食品工业化生产的有力手段。本文将综述多菌种生产传统发酵食品的现状及存在的问题, 并提出解决措施。

1 多菌种发酵在国内外传统发酵食品生产中的应用

从我国古老的大曲酿酒到目前各种冷冻干燥发酵剂

在传统发酵食品生产中的组合使用, 多菌种发酵在传统发酵食品生产中应用广泛^[2]。国内外研究者在多菌种发酵食品的工艺、微生物作用机理、风味形成及发酵剂制备等方面进行了多项研究, 如日本继承和发扬了多菌种酱油酿造技术, 已成为酱油生产强国; 韩国利用乳酸菌发酵蔬菜已实现了工业化^[3]; 欧洲和北美洲是商业化发酵剂的主要生产地(表1)。我国传统发酵食品主要利用多菌种或多菌种与酶的混合制剂生产, 菌种从产品及生产环境中分离纯化, 主要为乳酸菌等细菌及酵母、霉菌等真菌(表2)。

表1 商品化食品发酵剂供应商及产品
Table 1 Commercial suppliers of food fermentation starters

生产商	发酵剂产品	国家
Mofin Alce集团公司	冷冻干燥益生菌制剂、冷冻干燥型乳酸发酵剂	意大利
汉森公司	酸奶发酵剂、酪乳发酵剂	丹麦
Gewurzmuller公司	葡萄酒酿酒酵母	德国
拉曼集团	葡萄酒、水果酒酿酒酵母制剂、乳酸菌制剂	加拿大
罗地亚	克菲尔发酵剂、标准化冷冻乳制品发酵剂	法国
丹尼斯克	酸奶、干酪及肉制品发酵菌种	丹麦

收稿日期: 2011-09-28

基金项目: 重庆市科技攻关项目(CSTC2010AB1017)

作者简介: 陈楠(1982—), 女, 讲师, 博士研究生, 研究方向为食品微生物。E-mail: chennan0205@gmail.com

*通信作者: 戴传云(1976—), 男, 教授, 博士, 研究方向为生物大分子的药物传递系统。E-mail: cydai@126.com



表2 我国传统发酵食品主要接种微生物及其发酵方式
Table 2 Main starter strains and fermentation styles of traditionally fermented foods in China

传统发酵食品	接种微生物	纯种或混合发酵
发酵蔬菜制品	植物乳杆菌、肠膜明串珠菌、乳酸乳杆菌、酵母菌、乳酸乳球菌等 ^[4-5]	混合
发酵调味品	毕赤酵母、球拟酵母、丝孢酵母、红酵母、鲁氏酵母、根霉、毛霉、曲霉等 ^[6-7]	混合
发酵肉制品	戊糖片球菌、马肠片球菌、马胃葡萄球菌、红酵母、赛道威汉逊酵母、汉逊德巴利酵母、乳杆菌等 ^[8-9]	混合
白酒	芽孢杆菌、乳酸杆菌、醋酸杆菌、微细菌属、节细菌属、葡萄球菌属微生物 ^[10-11]	混合
发酵乳制品	干酪乳杆菌、植物乳杆菌、嗜热链球菌、嗜酸乳杆菌、开菲尔乳杆菌、乳酸乳球菌等 ^[12]	混合
其他发酵食品	假丝酵母、醋酸杆菌、乳杆菌等	混合

多菌种发酵可提高原料利用率、缩短加工周期,提高生产效率。沈国华^[13]利用多种乳酸菌发酵蔬菜并对温度进行控制,发现接种后发酵速度比自然发酵提高3倍。李正国^[14]研发的榨菜人工发酵剂可将榨菜生产周期由90d缩短至45d。赵丽华等^[15]利用复合发酵剂及戊糖片球菌生产羊肉香肠,结果表明多菌种发酵羊肉香肠的咀嚼性、胶黏性高于对照组,复合发酵剂接种后先于对照组形成优势菌群,其次代谢物与原料中蛋白质、脂肪等物质作用加速风味和质构形成。翟玮玮^[16]利用根霉、米曲霉、黑曲霉分别制曲混合发酵生产酱油,提高了蛋白酶活力和原料利用率,产品中总氮、氨基酸态氮含量增加,在后熟期添加乳酸菌和酵母菌,能改善酱油风味。

利用多菌种发酵可改善产品营养品质。发酵乳制品采用不同乳酸菌进行组合发酵,可减少生产中噬菌体污染,生产出不同益生特性、酸度、黏性的产品,如双联或三联益生菌组合发酵的乳制品能改善人体肠道菌群,增强免疫能力^[17]。Minervini等^[18]筛选出*Streptococcus thermophilus*、*Lactobacillus casei*两种乳酸菌发酵羊乳,产品中益生菌的数量大于 10^7 CFU/g,并产生了血管紧张素转化酶(ACE-I)抑制肽、 γ -氨基丁酸(GABA)两种生物活性物质,为开发功能性发酵羊乳提供了新思路。Mollet^[19]利用敲出ldhD基因的乳酸菌*Lactobacillus johnsonii* La1发酵牛乳,该乳酸菌仅代谢产生可消化的L-乳糖,不产生D-乳糖,使得发酵牛乳制品的消化利用率得到了提高。Plaude等^[20]用*Streptococcus thermophilus*、*Lactobacillus helveticus*和*Bifidobacterium longum*三种益生菌纯种接种、混合接种生产酱油,酱油中大豆异黄酮及B族维生素含量较对照组均有提高。

多菌种发酵食品的品质与菌种的组合方式、接种量、发酵时间、温度等因素关系密切。Kourkoutas等^[21]采用冷冻干燥方法制备了克菲尔发酵剂,并用于生产弗塔型干酪。实验考察了发酵剂添加量、不同生产工艺条件等因素对弗塔型干酪感官品质的影响,并利用固相微萃取-气相-质谱法(SPME-GC-MS)方法对发酵剂生产的干酪

香味成分进行了系统分析,结果表明,发酵剂接种量对产品品质影响显著,克菲尔发酵剂接种量为1g/L、氯化钠含量为7%时生产的干酪具有更好的风味及更长的货架期。

发酵食品中生物胺、亚硝酸盐的含量等被认为是影响其安全性的因素之一。接种合适的菌种可对产品中生物胺、亚硝酸盐含量进行控制。Mohamed等^[22]接种*Lactobacillus plantarum* 2142、*Lactobacillus casei* subsp. *casei* 2763 和*Lactobacillus curvatus* 2771控制德国泡菜中生物胺含量,结果证实接种上述乳酸菌能明显抑制游离氨基酸生成从而降低组胺、腐胺等生物胺含量。类似的结果也出现在多菌种生产的发酵肉类制品中,如Muhammad等^[23]接种*Staphylococcus carnosus* FS19 和*Bacillus amyloliquefaciens* FS05发酵鱼肉香肠,120d后实验组中生物胺总量比对照组分别降低15.9%和12.5%。Yan Pingmei等^[24]筛选出*Lb. pentosus*和*Leu. Mesenteroides*作为泡菜发酵菌种,进行发酵实验,结果显示发酵剂能抑制硝酸盐还原细菌*Enterobacteria*的增殖,这解释了乳酸菌发酵剂能降低腌渍蔬菜亚硝酸盐含量的原因。乳酸菌在发酵过程中还能产生乳酸细菌素,抑制腐败菌的生长,被认为是天然安全的防腐剂^[25]。Tolonena等^[26]利用多种乳酸菌发酵生产泡菜,发现产品中均含有不同量的乳链菌肽(Nisin),能抑制大肠杆菌、金黄色葡萄糖球菌、沙门氏杆菌等增殖,具有广谱抗菌性,可提高发酵食品安全性。

2 利用多菌种生产我国传统发酵食品存在的问题

2.1 传统发酵食品微生物生态学研究薄弱

利用多菌种生产传统发酵食品,须首先掌握其微生物群落组成及动力学特征。传统发酵食品微生物群落结构复杂,而对此开展的生态学研究尚处于起步阶段,对传统发酵食品中微生物群落组成、微生物群落与环境的相互作用、微生物群落功能的研究尚不深入,特别是少数民族传统发酵食品,因地域性强,对其微生物群落结构和功能的研究则更少。这些方面,基础研究的薄弱限制了多菌种联合发酵在生产中的应用。

2.2 优良菌种的选育及改良不足

多菌种发酵应用的难点在于缺乏高性能菌种,因此筛选和改良菌种的功能也是需要解决的问题之一。我国传统发酵食品中部分微生物生境特殊(高盐、酸性、乙醇、烟熏等),导致其代谢途径特异,能产生具有生物学活性的次生代谢物,优良微生物资源十分丰富,而目前对这种资源的发掘不足。一方面,当前所用菌种主要通过自然筛选方法从产品或生产环境中获得,这种筛选途径效率低,筛选到适合于生产的优良发酵菌种难度大;另一方面,筛选菌种的基因组学、蛋白质组学、代谢组学、遗传特性及食品加工性能等基础研究薄弱,缺乏对野生型菌



种功能和性状的定向改良,在生产中易发生性能衰退及自然变异,不利于发酵产品品质标准化和均一化。

2.3 多菌种发酵可能对传统发酵食品风味和品质产生负面影响

利用多菌种生产传统发酵食品能提高生产效率、确保产品品质均一,但也可能影响产品风味和品质。接种多菌种可能改变传统发酵食品微生物群落结构;多菌种的接种方式、发酵时间、接种量、菌种配比等不当也会对产品的品质产生不良影响,如果多菌种发酵降低甚至丧失了传统发酵食品的原有风味特色,那么这种工艺革新便失去了意义。目前传统发酵食品中各风味物质的平衡、功能物质的形成与微生物群落的关系尚未全部阐明,接种多菌种对发酵食品优势菌群的影响、发酵代谢的调控等问题也需要深入研究。如何在利用多菌种提高生产效率与保持传统发酵食品优良特性间找到平衡,也是多菌种生产传统发酵食品面临的挑战。

2.4 发酵菌种安全性

发酵菌种的安全隐患主要来自四个方面:菌种的致病性;菌种产生的次生代谢物、抗生素、激素等物质对人的潜在危害;基因工程技术改良菌种的生物安全问题及生产过程中不良微生物的二次污染。这些问题与传统发酵食品生产工艺及微生物的特性相关,为多菌种发酵在传统发酵食品中的应用带来一定的安全隐患。另外,随着益生菌资源的开发,越来越多的国外益生菌申请进入国内市场,这些益生菌能否分享传统发酵菌种的安全性,益生菌在传统发酵食品中应用的安全风险如何进行评估等也是需要解决的问题之一。

2.5 商业化发酵剂的缺乏

优良的商业化发酵剂是实现传统发酵食品生产工业化、标准化的必要条件。目前我国缺乏能满足不同特征产品生产所需的商业化发酵剂。就乳酸菌发酵剂而言,我国多数发酵乳制品企业靠进口国外冷冻干燥乳酸菌发酵剂^[25]。国内还没有供发酵蔬菜制品、发酵肉制品、发酵豆类制品等食品生产的专门商业化发酵剂。除菌种因素外,发酵剂制备中的关键技术问题(如菌种的扩大培养、高效菌体保护剂的筛选、菌粉的冷冻干燥及保藏、冻干菌粉复水性等)尚未解决,阻碍了发酵剂的开发和生产,造成商业化发酵剂缺乏。

3 对应的解决措施

针对多菌种发酵在传统发酵食品生产中出现的問題,提出以下解决措施:

3.1 开展传统发酵食品微生物生态学研究

利用宏基因组学(metagenomic)、宏蛋白质组学(metaproteomic)技术开展传统发酵食品微生物生态学研

究。近年来兴起的宏基因组学,可通过提取环境中所有微生物的DNA,对其进行序列和功能分析,从而反映环境中微生物群落结构及遗传多样性^[27],该技术包括DNA提取纯化、宏基因组文库构建及目标克隆子筛选等步骤,用于研究传统发酵食品微生物能更准确地掌握其菌群多样性及结构组成,避免了传统分离培养方法所得微生物群落信息不全面的缺点,同时也可对发酵过程中的优势菌、功能菌和功能性酶类进行筛选,目前已有研究者开始对中国大曲酒微生物宏基因组进行研究^[28]。在发酵食品微生物宏基因组数据不断积累的基础上,可进一步利用宏蛋白质组学把微生物群落组成与其功能联系起来,研究不同时间、不同空间中基因的表达,掌握菌群落动态变化过程,分析发酵食品中微生物群落的功能及微生物群落与环境间的相互作用。利用这些研究结果建立相应信息数据库,为多菌种联合发酵在传统发酵食品生产中应用提供理论依据。

3.2 建立传统发酵食品菌种资源库,合理利用新技术改良发酵菌种

对我国传统发酵食品中优良菌种进行收集和开发,逐步建立传统发酵食品菌种资源库,为筛选和改良发酵菌种提供资源。同时对生产中使用菌种的基因组学、蛋白质组学、代谢组学等生物学信息进行研究,为菌种的定向改良奠定基础。随着分子生物学技术的发展,发酵菌种选育也由自然筛选发展到对菌种的设计和改良,如利用重组工程技术改良乳酸菌,使其表达重要蛋白(如风味酶、转运蛋白、防腐剂、调节蛋白等)以及通过调控细胞内关键酶活性,促进目标代谢物表达,使其更适应于工业生产^[29-31]。应利用原生质融合、基因工程、空间诱变育种等新技术定向选育出更多的适合我国传统发酵食品生产,具有自主知识产权的发酵菌种。

3.3 利用传统发酵食品风味、功能物质形成原理指导多菌种在生产中的应用

传统发酵食品风味形成与原料、生产环境、生产工艺、微生物的活动密不可分。微生物代谢的酶类将原料中的蛋白质、糖类、脂肪等分解成氨基酸、寡糖为其生长提供营养,同时也形成风味物质的前体,而代谢生成的乙醇、乙醛、乳酸、丁酸乙酯等则直接形成产品的风味。多菌种生产传统发酵食品,应明确各产品风味物质的主体成分及形成机理。利用食品风味化学分析新技术如气相色谱-质谱、气相色谱-吸闻技术、电子鼻技术^[32]等加强对传统发酵食品的特征风味的分析研究,构建传统发酵食品的特征风味指纹图谱,与感官评价相结合,指导菌种选择和组合配比;功能性物质的积累应利用基因组学研究方法从基因水平阐述微生物代谢与传统发酵食品功能物质积累的关系,指导多菌种发酵对功能物质积累的调控,使其达到传统发酵食品风味和品质的要求。



3.4 加强菌种安全性评价

最大程度降低食品工业用菌种的安全风险, 需要加强对菌种的食用历史、菌种与寄主的相互作用, 菌种在胃肠道的定殖性、转移性、繁殖性等进行研究。对于基因工程改造菌种应进行严格的安全评价。在生产过程中, 传统发酵食品生产企业应按危害分析和关键控制点(HACCP)实施指南进行管理, 提高发酵食品安全卫生标准, 防止生产中有害菌二次污染污染。

3.5 开发直投式发酵剂

直投式发酵剂无需进行活化、扩培等预处理, 可省去菌种车间, 简化生产工艺, 使生产规范化^[33], 在传统发酵食品生产中具有很好的应用前景。对直投式发酵剂制备中的科学问题进行研究, 利用透析培养、耦合发酵、代谢调控等技术手段改进菌种高密度培养技术; 在细胞和分子水平上研究冷冻干燥过程中保护剂对微生物细胞的保护机制, 设计高效保护剂, 提高直投式发酵剂菌种存活率, 保护其发酵性能; 利用冷冻干燥、真空喷雾干燥等技术开发单一或复合菌种, 便于组合出适合不同产品生产需要的多菌种发酵配方, 满足各生产需要。

4 结 语

我国传统发酵食品是劳动人民生产生活中的智慧结晶^[34], 是我国宝贵的文化遗产, 也是重要的食品资源, 应着力推进传统发酵食品工业化进程, 使其更具有市场竞争力。传统发酵食品市场广阔, 发展潜力巨大, 利用多菌种组合发酵的优势, 对传统发酵食品生产工艺进行革新并解决多菌种发酵生产传统食品过程中的问题, 对继承和发展传统发酵食品, 促进行业健康发展有重要意义。

参考文献:

- [1] 赵树欣. 应重视对我国传统发酵食品的研究[J]. 食品工业, 2004, 3(1): 176-179.
- [2] HANSEN E B. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future[J]. International Journal of Food Microbiology, 2002, 78: 119-131.
- [3] LEE C H. Fermentation technology in Korea[M]. Seoul: Korea Univ Press, 2001.
- [4] 李正国, 付晓红, 邓伟, 等. 传统分离培养结合DGGE 法检测榨菜腌制过程的细菌多样性[J]. 微生物学通报, 2009, 36(3): 371-376.
- [5] 付琳琳, 曹郁生, 李海星. 应用PCR-DGGE技术分析泡菜中乳酸菌的多样性[J]. 食品与发酵工业, 2005, 34(12): 35-38.
- [6] 高秀芝, 王小芬, 李献梅, 等. 传统发酵豆酱与商品豆酱养分及微生物多样性比较[J]. 食品科学, 2009, 30(3): 222-225.
- [7] 朱扬玲. 采用PCR-DGGE方法研究浙江玫瑰醋酿造过程中的微生物多样性[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2009.
- [8] 谢小保, 欧阳友生, 曾海燕. 高盐稀醪酱油发酵原液中微生物区系研究[J]. 微生物学通报, 2007, 34(3): 504-507.
- [9] 贺稚非, 李洪军, 余翔. 金华火腿现代化发酵工艺中微生物区系变化研究[J]. 西南大学学报, 2007, 29(3): 142-150.
- [10] 乔宗伟, 张文学, 张丽莺. 浓香型白酒发酵过程中酒醅的微生物区系分析[J]. 酿酒, 2005, 39(1): 34-39.
- [11] 胡承, 应鸿, 许德富. 窖泥微生物群落的研究及其应用[J]. 酿酒科技, 2005(3): 34-38.
- [12] 周剑忠, 董明盛, 江汉湖. PCR-DGGE指纹技术与分离技术结合筛选藏灵菇奶发酵过程的优势菌[J]. 中国农业科学, 2006, 39(8): 1632-1638.
- [13] 沈国华. 纯种接种技术在腌渍蔬菜加工上的应用研究[J]. 中国调味品, 2002(6): 24-31.
- [14] 李正国. 一种榨菜直投式发酵剂及其制备方法: 中国, CN101560489[P]. (2009-10-21) [2011-09-27].
- [15] 赵丽华, 靳烨, 马长伟, 等. 戊糖片球菌与复合发酵剂对羊肉干发酵香肠质地剖面分析(TPA)和色泽的影响[J]. 食品科技, 2009, 10(2): 122-126.
- [16] 翟玮玮. 酱油多菌种制曲工艺条件研究[J]. 中国酿造, 2005(10): 35-38.
- [17] LEROY F, de VUYST L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry[J]. Food Science and Technology, 2004, 15(2): 67-78.
- [18] MINERVINI F, BILANCIA M T, et al. Fermented goats' milk produced with selected multiple starters as a potentially functional food[J]. Food Microbiology, 2009, 26(6): 559-564.
- [19] MOLLET B. Genetically improved starter strains: opportunities for the dairy industry[J]. Int Dairy J, 1999, 9(1): 11-15.
- [20] CHAMPAGEN P P, TOMPKINS T A, BUCKLEY N D, et al. Effect of fermentation by pure and mixed cultures of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus helveticus* on isoflavone and B-vitamin content of a fermented soy beverage[J]. Food Microbiology, 2010, 27(7): 962-972.
- [21] KOURKOUTAS Y, KANDYLIS P, PANPS P, et al. Evaluation of freeze-dried kefir coculture as starter in feta-type cheese production[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(9): 6124-6135.
- [22] MOHAMED A R, HASSAN S, SOHER S, et al. Reduced biogenic amine contents in sauerkraut via addition of selected lactic acid bacteria[J]. Food Chemistry, 2011, 129(4): 1778-1782.
- [23] MUHAMMAD Z Z, FATIMAH A B, JINAP S, et al. Novel starter cultures to inhibit biogenic amines accumulation during fish sauce fermentation[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 145(1): 84-91.
- [24] YAN Pingmei, XUE Wentong, TAN S S, et al. Effect of inoculating lactic acid bacteria starter cultures on the nitrite concentration of fermenting Chinese paocai[J]. Food Control, 2008, 19(1): 50-55.
- [25] 王小娜, 宋达峰, 顾青. 产细菌素乳酸菌的鉴定及其特性研究[J]. 中国食品学报, 2011, 11(3): 181-185.
- [26] TOLONENA M, RAJANIEMI S, PIHLAVA J M, et al. Formation of nisin, plant-derived biomolecules and antimicrobial activity in starter culture fermentations of sauerkraut[J]. Food Microbiology, 2004, 21(2): 167-179.
- [27] 欧敏功, 崔晓龙, 李一青, 等. 宏基因组学在未培养微生物研究中的应用[J]. 微生物学杂志, 2007, 27(2): 88-91.
- [28] 黄祖新. 宏基因组学及其在大曲酒微生物研究中的应用[J]. 酿酒科技, 2009(10): 17-20.
- [29] 张和平. 我国乳品工业乳酸菌资源的开发利用现状及发展趋势[J]. 农产食品科技, 2008(3): 3-6.
- [30] 许伟, 张晓君, 李琦, 等. 微生物分子生态学技术在传统发酵食品行业中的应用研究进展[J]. 食品科学, 2007, 28(12): 521-525.
- [31] 付桂明, 许阳, 李燕萍. 工业微生物菌种改良与重组工程技术[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 924-927.
- [32] 黄江艳, 李秀娟, 潘思轶, 等. 固相微萃取技术在食品风味分析中的应用[J]. 食品科学, 2011, 32(1): 43-49.
- [33] 王卫东, 陈安徽, 杨万根, 等. 人工发酵蔬菜研究进展[J]. 食品科学, 2010, 31(21): 413-416.
- [34] 李里特. 中国传统发酵食品现状与进展[J]. 生物产业与技术, 2006, 11(6): 56-59.