

于坚, 孙嘉笛, 孙秀兰, 等. 发酵类食品中微生物鉴定方法及功能研究进展 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 409–416. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050244

YU Jian, SUN Jiadi, SUN Xiulan, et al. Research Progress of Microorganism Identification Methods and Functions in Fermented Food[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 409–416. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050244

· 专题综述 ·

发酵类食品中微生物鉴定方法及 功能研究进展

于 坚¹, 孙嘉笛¹, 孙秀兰¹, 黄耀光¹, 黄鹤阳¹, 刘忠思², 张银志¹, 纪 剑^{1,*}

(1. 江南大学, 江苏无锡 214100;

2. 卫龙生物技术有限公司, 河南漯河 462000)

摘 要: 发酵类食品是主要通过直接接种微生物而产生特殊风味或者将食物浸入含有微生物的臭卤水中, 从而获得特殊食品风味的中国传统食品。其中, 采用含有微生物的卤水进行发酵是常见的发酵方式。因此, 微生物在该类食品中一直扮演着一种非常重要的角色, 具有较高的研究价值。本文阐述了发酵类型的食品所需要的卤水中微生物的鉴定常用方法, 以及卤水微生物与风味成分的产生之间的关系, 同时论述了卤水中微生物在各种发酵食品制作过程中所起到的功能特性, 包括提高豆制品的营养价值、延长保质期、去除有害成分等问题, 并提出了较为可行的新型发酵类食品卤水改进方向, 为进一步开发理想的食品微生物发酵剂, 控制有害物质的残留、拓展相关有益微生物资源的研究提供较为明确的指导方向。

关键词: 卤水改良, 发酵食品, 微生物, 菌群分析, 功能特性

中图分类号: Q819

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)14-0409-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050244



本文网刊:

Research Progress of Microorganism Identification Methods and Functions in Fermented Food

YU Jian¹, SUN Jiadi¹, SUN Xiulan¹, HUANG Yaoguang¹, HUANG Heyang¹, LIU Zhongsi²,
ZHANG Yinzhi¹, JI Jian^{1,*}

(1. Jiangnan University, Wuxi 214100, China;

2. Weilong Biotechnology Co., Ltd., Luohe 462000, China)

Abstract: Fermented foods are traditional Chinese foods that produce special flavors by directly inoculating microorganisms or immersing the food in stinky brine containing microorganisms to obtain special food flavors. Among them, using brine containing microorganisms for fermentation is a common fermentation method. Therefore, microorganisms have always played a very important role in this type of food and have high research value. This review describes the common methods for identification of microorganisms in brine required for fermented foods, and the relationship between brine microorganisms and the production of flavor components. At the same time, the functional characteristics of the microorganisms in the brine in the production of various fermented foods are discussed, including issues such as improving the nutritional value of soy products, extending the shelf life, and removing harmful ingredients. The improvement direction of the more feasible new fermented food brine are proposed to provided clear guidance for the further development of the ideal food microbial starter, the control of the residue of harmful substances, and the expansion of related beneficial microbial resources.

Key words: brine improvement; fermented food; microorganism; flora analysis; functional characteristics

收稿日期: 2021-05-28

基金项目: “十三五”国家重点研发计划”(2017YFF021130)。

作者简介: 于坚 (1997-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全与毒理, E-mail: jiangsuyzyj@163.com。

* 通信作者: 纪剑 (1988-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 食品安全与毒理, E-mail: jijian@jiangnan.edu.cn。

发酵类食品是我国一类具有悠久历史文化的食品,是我国早期劳动人民合理使用微生物资源的智慧的结晶,最早可起源于中国明代。最初的发酵类食品致力于改善食品的原有风味,从而获得更好的食用体验。然而,随着发酵工艺条件的不断进步,以及针对发酵过程中的微生物种类的研究不断深入,并且呈现了诸如功能性发酵食品的新趋势。而在这其中微生物的作用不可忽视。因此发酵类食品中的微生物研究具有重大的意义。

我国有较多使用微生物作为媒介发酵形成的传统食品^[1]。其中臭豆腐是最为著名的一种。它是将块状的豆腐浸泡在卤水中达数小时或几天发酵后制成的食品。制作臭豆腐的卤水是以一些香辛料、竹笋、蔬菜、豆腐花、豆豉等植物为原料,并经过微生物自然发酵作用形成。臭豆腐因发酵工艺和地域的细微差异分为南豆腐和北豆腐。北方王致和臭豆腐主要采用深度发酵,南方臭豆腐需要先制作卤水后再将豆腐进行浅度发酵。此外,腐乳也是一种非常重要的发酵类食品。腐乳中含有的氨基酸具有促进脂肪代谢,控制人体胆固醇含量,控制血压,抑制肿瘤生长,防止心脑血管疾病的发生等的作用^[2],并且具有较高的食用价值,食物材质结构类似于干酪,获得了“东方奶酪”的美称^[3]。

其中,微生物的种类和含量对于发酵类食品的风味以及营养价值具有非常重大的影响。此外,发酵的温度、pH 和营养基质等因素都可能会对发酵相关的微生物的存在与发酵能力产生较大的影响^[4]。同时,卤水中的微生物可能会产生多种对人体有益的代谢物,例如氨基酸、抗氧化因子等。目前,许多研究者针对发酵食品工艺中常用微生物进行了非常深入的研究,该类微生物逐渐成为了传统发酵工业的研究重点^[5-6]。因此,对于臭豆腐等发酵类食品中新型微生物的分离,分析与风味的关系,深入探究并开发新型的微生物功能性物质,对于未来改良开发新型风味与新型功能性卤水,并提高我国传统发酵工业的创新能力,具有非常重要的意义。

1 发酵食品中微生物的分离与鉴定方法

此前针对于发酵食品中常见的微生物种属的鉴定方法主要是纯培养分离方法。但是,随着新兴的高科技技术如生物信息技术和生物分子技术的普及,高效的 PCR-DGGE 技术和高灵敏度的高通量测序技术开始出现在微生物的鉴定领域。

1.1 纯培养分离

纯培养分离方法是根据可能的微生物去遴选可能合适的培养基进行菌种扩大培养,再通过微生物的生理生化及形态特征进行菌落挑取后纯化并进行菌种鉴别的一种发酵食品微生物的研究方法。常常用于当研究对象中存在多种菌落时使用,是一种最为常见且简便的微生物研究方法。孙贵朋^[7]用纯培养方法对从发酵卤水中分离到的 6 株高纯度细菌,其中

的 5 种菌属于芽孢杆菌的类别,而其中的 1 株属于鲁氏不动杆菌。翁美芝等^[8]采用平板接种分离法对发酵淡豆豉中产纤溶酶微生物进行筛选,得到了枯草芽孢杆菌等三种不同的细菌。张煜坤等^[9]采用浓度梯度稀释法及平板涂布法分别对 3 种神农架豆豉样品中微生物进行分离鉴别,分离出不同形态的单菌落,然后将获得的分离菌落进行 DNA 测序最终得到 4 株枯草芽孢杆菌属的 4 个亚种。

1.2 PCR-DGGE 技术

梯度凝胶电泳(DGGE)是一种基于生物信息学和分子生物学两种学科作为理论基础的生命科学鉴定。采用在一般电泳实验的基础上,根据 DNA 片段在不同浓度的变性剂温度中双链结构解螺旋后片段大小的不同,将片段碱基组成相异,但是大小接近的片段进行分离,并经过官方常用的包含生物信息的数据库内的数据进行比对后,获得微生物的遗传学信息。Tanaka 等^[10]采用该项技术研究了豆酱生产过程中微生物群落的组成,细菌 DGGE 图谱表明酱油在微生物反应过程中主要起作用的是乳杆菌属、发酵乳杆菌等。燕平梅等^[11]采用该项技术分析散装泡菜、白菜泡菜、泡菜菜 3 种不同泡菜中酵母菌多样性,并鉴定出多种类型的酵母菌。另外,目前也有研究者将 PCR-DGGE 技术应用到水果酵素发酵相关的微生物菌群分析,能够检测出培养基中致病菌类^[12]。

1.3 高通量测序技术

高通量测序(HTS),也可叫做二代基因检测,在使用过程中可以产生多种基因信息。该项技术能够同时筛选多个不同的基因组区域,准确的识别出样品中绝大多数的微生物类群,包括不能在培养基内培养的,以及丰度较低的菌类^[13]。HTS 包括 ABI SOLiD 连接法测序、454 焦磷酸测序和 Illumina Solexa 合成测序等。孙娜等^[14]采用 HTS 对发酵前期和发酵末期青腐乳卤水中的微生物种类进行分析。Ezeokoli 等^[15]利用高通量测序技术分析发酵豆制品中的核心菌落,用 16S rRNA 技术分析了 7 个大豆发酵制品样品中的 DNA 序列。HTS 的技术优势在于可以较为完整地获取菌种的遗传信息,通过例如 NCBI 等大型生物信息数据库的数据比较,可以较为准确地获知该种微生物的种属名称,对后续的微生物培养与特性研究给予一定的支撑。

2 发酵食品中的微生物种类分析

在发酵食品的卤水制作时,微生物的种类选择极其重要。并且此前的研究表明,卤水中含有的微生物种类非常的丰富,不同的微生物在卤水的发酵、风味、功能性等方面起着重要的作用。卤水中微生物在臭豆腐等豆类食品发酵过程中作用十分明显,不仅能够分解大豆中蛋白质、脂质等大分子物质,而且能够参与风味物质的形成,有效提高大豆极其相关产品的营养成分的分解与吸收。其中,在发酵类食品中含有的微生物主要为细菌、真菌两大类,具体名称如表 1

表 1 发酵食品制作中的微生物
Table 1 Microorganisms in the production of brine

菌种分类	形态分类	中文学名	拉丁学名	常用食品
细菌类	球菌类	漫游球菌 ^[16]	<i>Vagococcus collins</i>	臭豆腐卤水
		鸟肠球菌 ^[16]	<i>Enterococcus</i>	
		巴黎链球菌 ^[16]	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	
		乳球菌 ^[16]	<i>Lactococcus</i>	
		亮粘球菌 ^[17]	<i>Leuconostoc</i>	酱油
		小球菌 ^[17]	<i>Pediococcus</i>	
		链球菌 ^[17]	<i>Streptococcus</i>	
		嗜麦芽单胞球菌 ^[17]	<i>Stenotrophomonas</i>	
		四球菌 ^[17]	<i>Tetragenococcus</i>	
		禽肠球菌 ^[17]	<i>Enterococcusavium</i>	
真菌	杆菌类	芽孢杆菌 ^[18]	<i>Bacillus</i>	茶叶
		乳酸杆菌 ^[18]	<i>Lactobacillus</i>	
		魏氏杆菌 ^[18]	<i>Weissella</i>	
	酵母类	酿酒酵母 ^[18]	<i>Sac-charomyces cerevisiae</i>	茶叶
		毕赤酵母 ^[19]	<i>Pichia pastoris</i>	酒曲、豆豉、盐渍辣椒
		汉逊氏酵母 ^[19]	<i>Hansenula severus</i>	
		异常汉逊氏酵母 ^[19]	<i>Hansenula anomala</i>	臭豆腐、腐乳
	霉菌类	鲁氏毛霉 ^[19]	<i>Mucor roxianus</i>	
		黑曲霉 ^[19]	<i>Aspergillus niger</i>	
				酱油

所示。

2.1 细菌

细菌是一类非常常见的菌类,并且在中国传统发酵食品中应用非常广泛,目前在发酵类食品的卤水中发现的细菌种类主要是球菌类和杆菌类。

2.1.1 球菌类 球菌一般为球状或近球状类型的细菌。根据显微镜下菌落排列数量以及方式的不同,区分为单、双、链、四联和八叠等^[20]。赵国忠等^[21]通过 16S rRNA 测序方法鉴定了臭豆腐卤水中的微生物种类,认为臭豆腐卤水中的主要细菌为漫游球菌(*Vagococcus collins*)、鸟肠球菌(*Enterococcus*),并且为臭豆腐的规范性制作提供了指导性建议。范博望等^[22]通过对臭豆腐卤水的稀释分离,发现了臭豆腐卤水中存在巴黎链球菌(*Streptococcus lutetiensis*)等球形细菌。此外,其研究发现,若采用相同的发酵条件,对单一菌和混合菌进行卤水发酵比较,单一菌经过相同时间发酵后产生的卤水感官评价不如混合菌株发酵出的卤水优越,进一步证明了高质量卤水是混合发酵的结果。范洪臣等^[23]也通过分离腐乳的发酵用酱料中的微生物获取了多种如芽孢杆菌等多种微生物,并分析了最佳的配比方案。

2.1.2 杆菌类 杆菌是指形状为圆柱,或者近卵圆形的菌株。根据堆积数量可分为单、双、链、球、棒状、分枝、双歧杆菌等。Gu 等^[24]采用二代测序方法,研究臭豆腐中微生物菌群的多样性,乳杆菌属是整个发酵过程中的主要乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB),臭豆腐中还具有盐单胞菌属等部分潜在有害细菌,提高了对臭豆腐中微生物的认识。Xie 等^[25]采用随机扩增多态性 DNA 分型和 16S rDNA 测序对从 3 种

发酵茶叶和酱油卤水中分离到的 168 个菌株进行测序。共鉴定出 136 株代表菌株,有乳杆菌和魏氏杆菌等 7 个属 32 个种。南晓芳^[26]从 9 个豆豉和腐乳样品中共分离出 31 株乳酸菌,筛选出 5 株耐盐乳杆菌,发现 5 株菌对大肠杆菌等致病菌有较好的控制作用,并且都具有降解胆固醇的能力以及抗氧化能力。5 株菌株的有害产物检测均呈阴性,并且均对抗生素敏感,是比较安全的菌株。

2.2 真菌

真菌是具真核、可产孢子且不具有叶绿体的真核菌类。在传统发酵食品工业中,常见的真菌类为各种酵母菌和一些少量的霉菌类。这些少量的真菌微生物可产酸产碱,代谢糖类物质产生芳香醇类和芳香醛类物质,使卤水呈现足够的风味。

2.2.1 酵母类 酵母(*Saccharomyces*)是一种单胞菌,常常用于酱油、面团等食品的发酵。常见的酵母菌有酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、茶酵母和啤酒酵母等。王正莉等^[27]在传统发酵酒曲和豆豉类食品中分离得到了西弗汉逊氏酵母(*Hansenula severus*)、异常汉逊氏酵母(*Hansenula anomala*)等 10 多种真菌类微生物,并且根据风味成分对其进行了关联。此外,赵玲艳等^[28]对盐渍辣椒发酵过程中所参与的菌种进行了种群样品分析,发现优势真菌属为毕赤酵母属(*Pichia pastoris*)、异常汉逊氏酵母属(*Hansenula anomala*)等。基于这一点,分析了盐渍辣椒真菌菌落的多样性,以及发酵过程中微生物群落结构以及相对丰度的变化,分析了多种微生物在发酵过程的风味作用,对于新菌种资源的开发具有重要意义。

2.2.2 霉菌 以北方王致和臭豆腐为首的传统发酵类食物中存在的霉菌类常见的为各种曲霉,此外还有常见的毛霉等。此类微生物可以在臭豆腐等豆制品表面形成坚硬的外壳状物质,并代谢内部的豆类蛋白等,分泌不同类型的氨基酸等。Qiu 等^[29]从发酵豆豉产品中得到了一种食品级黑曲霉(*Aspergillus niger*),可以参与酱油、豆豉等食品的代谢,并对食品中的霉菌毒素具有一定的抑制作用。此外,高玉荣等^[30]采用鲁氏毛霉(*Mucor roxianus*)发酵后的豆制品分析了不同时间点的风味变化。总状毛霉也可以在豆粕食品的发酵过程中对食品本身风味产生非常积极的影响。因此,霉菌类在发酵臭豆腐等食品的制作流程中是主要的发酵剂。

3 发酵食品中微生物的功能性分析及品质风味关系

发酵食品中含有许多功能型微生物,他们能够通过分解原料中的大分子物质,并产生大量的水解蛋白和游离氨基酸,以及大量的维生素类物质^[31],主要可以形成发酵类食品的特殊腌渍风味。此外,采用不同的菌种进行发酵可以获得多种功能的卤水,如改善营养组成、改善肠道菌群组成、减少食物中的抗营养成分等,具体功能特性如表 2 所示。研究微生物在发酵类食品发酵流程中的所起到的作用,对于提高此类食品的风味以及功能品质具有重要意义。

表 2 卤水中不同微生物与功能
Table 2 Different microorganisms and functions in brine

功能特性	代表微生物	拉丁学名
形成食品风味	乳酸杆菌 ^[32]	<i>Lactobacillus</i>
改善营养组成	鲁氏毛霉 ^[33]	<i>Mucor roxianus</i>
益生功能	乳酸杆菌 ^[33]	<i>Lactobacillus</i>
吸附有害物质	黑曲霉 ^[34]	<i>Aspergillus niger</i>
抑制有害菌	芽孢杆菌 ^[34]	<i>Bacillus</i>

3.1 形成食品风味

发酵类食品例如臭豆腐等的风味主要是源于各种挥发类物质,使得豆腐原材料中的蛋白、糖在自身内源酶和微生物分泌酶系作用下形成大量酯类、醇类、含硫化物等挥发性物质,使得豆腐具有特殊的气味^[31]。气味物质所带来的食品风味是多种微生物联合作用下产生的,并且在不同发酵时期风味物质也有一定的差异^[31]。不同卤水配方中微生物的种类也不尽相同,所形成的风味物质具有一定的差异,因此,发酵微生物在臭豆腐风味物质形成过程中发挥着重要作用。

李雨枫等^[35]研究了臭豆腐卤水在发酵时微生物种类和数量的变化及风味成分分析,利用固相微萃取(SPME)联合气相质谱(GC-MS)的方法(SPME-GC-MS)检测发酵完成的卤水中存在的挥发性成分,并比较了它们的差异性。主要发现了吡嗪等气味物质,其中明串珠菌属和盐厌氧菌属与含硫化物、吡嗪有

极大的关联,是臭味的主要来源;乳杆菌属、四联球菌属和酯类、酮类、醇类物质的相关性最大,为臭豆腐提供香气。邓思敬等^[36]利用实验室前期从自然发酵臭豆腐的剩余卤水中得到的 13 株乳酸菌,并从中筛选 8 株活性优良的菌种接种于生产配方中,经过 37 ℃ 发酵 20 h 制得臭豆腐发酵液,经过 GC-MS 鉴定得到 61 种气味性物质,其香气成分与市售发酵臭豆腐卤水相仿。郑小芬等^[37]采用同样的上述方法,分析了 2 种不同臭豆腐所对应的卤水中气味物质的差异,采用归一化法计算了其相对含量。根据微生物种类与气味物质之间的相关系数,并预测成分的变量重要性,还确定了芽孢杆菌、肠杆菌、乳杆菌、鞘氨醇杆菌、单胞菌、四基因球菌等 9 种细菌和交链孢属、杂交链霉属、放线菌属等 6 种真菌是发酵过程中核心功能微生物^[38]。

3.2 改善营养组成

维生素 B₁₂ 是维持大脑关键功能的重要营养素,对于抑制抑郁症、老年痴呆及贫血具有重要作用,腐乳中 B 族维生素种类多样,腐乳在发酵时经过微生物的作用会产生维生素 B₁₂^[38]。经过鲁氏毛霉、酿酒酵母等真菌类微生物发酵后,腐乳中含有大豆多肽和蛋白黑素,其中蛋白黑素具有强抗氧化性^[39]。这些微生物所产生的大豆多肽等物质具有抗高血压、降血脂、抗氧化、提高免疫力、抗癌作用及缓解运动疲劳等多项功能^[40]。另外,发酵过程中的酵母能够将蛋白质、脂肪、糖类等生物大分子物质分解为游离氨基酸、脂肪酸和葡萄糖等小分子物质,在发酵时也会产生一些人体必需氨基酸。例如,陈嘉序等^[41]通过对魏氏杆菌等微生物发酵的食品中的成分研究,发现雌马酚和大豆异黄酮类等营养物质含量出现了明显的升高。这也表明微生物的发酵对于发酵食品的营养成分的改善有一定的作用。

3.3 增强食品抗氧化作用

人体在新陈代谢中可能产生较多的自由基,过多自由基的生成会影响人体健康,导致人体衰老。臭豆腐在发酵过程中产生大豆异黄酮、大豆多肽等抗氧化物质,能够延缓衰老,促进人体健康。研究表明发酵食品中的微生物例如毛霉、曲霉等霉菌微生物可以产生具有增强食品的抗氧化的能力的营养物质^[42]。邹磊等^[43]分别接种两种不同的毛霉制作了腐乳,并对其进行自由基的去除、抑制油脂过氧化以及其还原能力检测实验,以此为标准评价微生物在发酵过程中产生的代谢物的抗氧化能力,结果发现,黄色毛霉发酵产生的腐乳中具有更优的抗氧化功能。王富豪等^[44]提取了多个大豆品种里大豆异黄酮的含量,并对其对 DPPH、ABTS 自由基去除水平进行了测定,发现糖苷型异黄酮含量与 DPPH 和 ABTS 自由基去除水平有较高的线性相关性。董爽等^[45]对鲁氏毛霉促腐乳发酵过程中产生的抗氧化物质含量变化进行了研究,在豆腐坯上接种毛霉进行发酵后,测定发酵

腐乳在不同阶段的抗氧化能力,发现随着微生物分泌的酶的作用腐乳的抗氧化能力在前发酵期和水解阶段快速上升,发酵后期上升较慢,在后酵期达 20 d 时,腐乳的抗氧化能力达到最大值。

3.4 降血压作用

血管紧张素 II 是可以引起血压升高的血管收缩剂。因此,抑制这些可以产生血管紧张素 II 的酶的活性,以减少这种物质的产生是用于控制高血压的一个重要途径。在腐乳生产过程中,某些生物活性肽能够抑制血管紧张素 II 催化酶的活性从而起到防止血压升高的作用,其中鲁氏毛霉和乳酸杆菌的联合发酵可以达到该种效果。Kuba 等^[46]从鲁氏毛霉和乳酸杆菌的联合发酵的腐乳中分离到两种具有抑制上述酶类活性的生物活性肽,其活性肽序列分别为 Ile-Phe-Leu 和 Trp-Leu。其中产生的 γ -氨基丁酸(GABA)会结合神经受体在脑血管中,能够有效提升血管的扩张能力,从而抑制血管血压过高。

3.5 抑制抗营养成分

大豆的抗营养成分包括营养抑制因子等热敏性物质以及植酸、寡糖、单宁、抗原蛋白等耐热并抗维生素因子及其他化学成分^[39]。在发酵豆制品中存在的部分微生物能够降解大豆中的抗营养因子,并将其转化为被人体吸收的成分。例如从印度尼西亚的豆酵饼中发现的寡孢根霉能够降解引起胃胀气的水苏糖等物质,以及甘油三酯等酯类,并使之降解成可供人体吸收分解的单糖和二糖^[47]。

3.6 改善肠道菌群

肠道微生物与它们可以产生的次级代谢产物对人体健康和保持肠道中免疫系统的稳态具有巨大的功效。熊骏等^[48]从传统方法发酵制作而成的发酵类豆豉中分离出具有抑菌活性的乳酸菌,可以产生有机酸、细菌素等,对广谱的致病菌均可以产生较好的抑制效果。Lee 等^[49]从韩国传统酱油中分离筛选出 3 株芽孢杆菌 MKSK-E1、MKSK-J1 和 MKSK-M1,并在模拟胃肠道环境条件下,证明了这 3 株菌具有广泛的抑菌活性。因此,这 3 株菌对人体具有益生菌功能性,可以从发酵豆制品中分离出对人体有益的微生物,并制成相应的益生菌产品。Yuan 等^[50]研究发现在猪每日饲料中添加 3.75% 质量分数的发酵豆粕和 7.5% 质量分数的大豆浓缩蛋白,分别提高了 38~68 d 的仔猪的养份消化率、粪便酶活性和乳酸菌数量,降低粪便中大肠杆菌数量,能够有效改善猪肠道菌群组成。Yi 等^[51]从臭豆腐卤水中分离到一株居里乳杆菌 CCTCC M2011381 在大豆分离蛋白、豆奶和银杏饮料中的生长 20 h 后,该菌株的数量均增加。此外,根据小鼠体内实验,在所有发酵基质中存活的菌株均能在小鼠肠道中存活。

3.7 抑制有害菌

臭豆腐卤水在发酵产生多种营养物质的期间经过益生芽孢杆菌、乳酸杆菌、鸟肠球菌等微生物的作

用会产生大量的挥发性物质^[51],具有延长食品货架期,增强食品安全品质的作用。另一方面大豆中的物质能够被黑曲霉^[52]、异常汉逊氏酵母^[53]等真菌分解产生抗菌物质。在某些以根霉为发酵剂制成的发酵豆制品中,异黄酮对蜡样芽孢杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌等能够引起食物中毒和腐败的致病微生物有较强的抑制作用。

3.8 吸附有害物质

发酵食品中的微生物的另一个作用就是减少有害物质的产生,例如卤水中的乳酸菌能够抑制不饱和脂肪酸的过氧化或减少来源于相应醇类的醛^[54],部分乳杆菌能够吸附食品中的真菌毒素,研究发现真菌毒素的存在并不影响乳杆菌的生长,3 株植物乳杆菌对黄曲霉毒素的吸收能力最强,对真菌毒素的结合率接近 60%,而对 ST 产毒菌株的结合率可达 20% 以上。乳酸菌还能够吸附重金属离子,如汞、镉等。有研究表明,源自我国传统泡菜的菌株 *Lb. plantarum* 70810 EPS 在鱼肠道环境中,当 pH5.0 且温度为 30 °C 时,该菌株 6 h 内的对铅的吸附能力可达 160.62 mg/g,傅立叶变换红外光谱表明,参与吸附的是-OH、-NH 和 COO-等官能团^[55]。He 等^[54]分离出了一株酱油中的食品级黑曲霉,发现该种菌株可以抑制酱油等发酵食品中玉米赤霉烯酮(ZEN)等真菌毒素的产生。徐智虎等^[56]分离出了贵州传统的发酵类食品中的乳酸杆菌,并进行了性质探究,发现此类乳酸杆菌具有较好的吸附生物胺等有害物质的能力。因此,在发酵食品中,微生物除了可以提高营养价值与风味外,还具有减少有害物质生成的作用。

4 挑战与展望

4.1 特殊风味臭卤水发酵存在的挑战

微生物已被证明是丰富的自然资源,在食品领域的应用最广。以臭豆腐为主的发酵类食品十分需要微生物的发酵,采用多样的微生物对食品进行混合发酵,可以较大程度上赋予食品一定的风味特性以及功能特性。因此,必须重视对已有的卤水中存在的微生物种类及其功能探究。

此外,在卤水发酵过程中,由于发酵条件的简陋以及发酵前期的卫生措施简陋,时常存在着一些有害微生物,其能够产生生物胺,对人体健康造成威胁,如有害霉菌、蜡样芽孢杆菌等^[57]。

4.2 下一步的研究展望

未来更应该以臭豆腐卤水中的微生物作为重要的研究对象,探究卤水发酵过程中各种微生物菌群的特性,控制致病菌繁衍,减少有害物质的出现,促进有益产物的产生。合理利用臭豆腐卤水中的微生物资源,分离发酵期间产生的对人体有益的微生物,并将其作为益生菌资源,减少益生菌资源的浪费,开发既有有益菌的发酵剂又能减少有害菌的数量的混合发酵剂,提高产品的品质。研究卤水发酵的过程中所出现的不同微生物的作用,开发不同种类的卤水,制作

工业化卤水微生物生产发酵剂,为发酵食品逐步走向工业化和标准化提供一定的参考。卤水中微生物多样,研究微生物之间的生物化学作用,对于提高发酵类型食品的品质具有巨大的战略意义。

参考文献

- [1] 张雅卿,叶书建,周睿,等.发酵食品风味物质及其相关微生物[J].酿酒科技,2021,11(2):85-96. [ZHANG Y Q, YE S J, ZHOU R, et al. Fermented food flavor substances and related microorganisms[J]. Wine Making Science and Technology, 2021, 11(2): 85-96.]
- [2] 万红芳,赵勇,王正全,等.生产菌种及环境微生物与腐乳品质关系研究进展[J].食品与发酵工业,2019,45(6):255-261. [WAN H F, ZHAO Y, WANG Z Q, et al. Research progress on the relationship between production strains and environmental microorganisms and fermented bean curd quality[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(6): 255-261.]
- [3] STEINKRAUS K H. Classification of fermented foods: Worldwide review of household fermentation techniques[J]. Food Control, 1997, 8(5): 311-317.
- [4] 马勇.青方腐乳酿造技术研究[J].中国酿造,1996,11(5):35-36,44. [MA Y. Research on brewing technology of green fermented bean curd[J]. China Brewing, 1996, 11(5): 35-36,44.]
- [5] 吴彩梅,王静,曹维强.臭豆腐的不安全因素及其监控[J].食品与发酵工业,2005(7):97-99,103. [WU C M, WANG J, CAO W Q. Unsafe factors and monitoring of stinky tofu[J]. Food and Fermentation Industries, 2005(7): 97-99,103.]
- [6] JOU H J, TSAI P J, TU J H, et al. Stinky tofu as a rich source of bioavailable S-equol in Asian diets[J]. Journal of Functional Foods, 2013, 5(2): 651-659.
- [7] 孙贵朋.臭豆腐卤液中微生物多样性研究[D].广州:华东理工大学,2011. [SUN G P. Study on the diversity of microorganisms in stinky tofu brine[D]. Guangzhou: East China University of Science and Technology, 2011.]
- [8] 翁美芝,邓雄伟,王立元,等.淡豆豉炮制过程中产纤溶酶微生物的筛选和鉴定[J].中草药,2020,51(24):6221-6228. [WENG M Z, DENG X W, WANG L Y, et al. Screening and identification of fibrinolytic enzyme-producing microorganisms during the processing of light tempeh[J]. Chinese Herbal Medicine, 2020, 51(24): 6221-6228.]
- [9] 张坤煜,赵舒欣,王红丁,等.神农架豆豉样品中微生物的分离鉴定[J].绿色科技,2020(20):167-170. [ZHANG K Y, ZHAO S X, WANG H D, et al. Isolation and identification of microorganisms in Shennongjia Douchi samples[J]. Green Science and Technology, 2020(20): 167-170.]
- [10] TANAKA Y, WATANABE J, MOGI Y. Monitoring of the microbial communities involved in the soy sauce manufacturing process by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis[J]. Food Microbiology, 2012, 31(1): 228-298.
- [11] 燕平梅,李安萍.PCR-DGGE法分析泡菜中酵母菌微生物的多样性[J].中国调味品,2020,45(12):23-26. [YAN P M, LI A P. Analysis of the diversity of yeast microorganisms in kimchi by PCR-DGGE method[J]. China Seasoning, 2020, 45(12): 23-26.]
- [12] 李希羽,高洁,李云蛟,等.水果酵素自然发酵过程中优势菌群与有机酸变化规律分析[J].食品科学,2020,41(24):61-68. [LI X Y, GAO J, LI Y J, et al. Analysis of dominant flora and organic acid changes during the natural fermentation of fruit enzymes[J]. Food Science, 2020, 41(24): 61-68.]
- [13] 夏傲喃,李建华,林祥娜,等.发酵食品微生物多样性分析方法研究进展[J].食品研究与开发,2021,42(4):220-224. [XIA A N, LI J H, LIN X N, et al. Research progress on microbial diversity analysis methods of fermented food[J]. Food Research and Development, 2021, 42(4): 220-224.]
- [14] 孙娜,张雅婷,于寒松,等.发酵型青腐乳菌群结构与风味物质及其相关性分析[J].食品科学,2020,41(22):177-183. [SUN N, ZHANG Y T, YU H S, et al. Analysis of fermented bean curd flora structure and flavor substances and their correlation[J]. Food Science, 2020, 41(22): 177-183.]
- [15] EZEOKOLI O T, ADELEKE R A, BEZUIDENHOUT C C. Core bacterial community of soy-daddawa: Insights from high-throughput DNA metabarcoding[J]. LWT, 2018, 97: 61-66.
- [16] 何理.发酵型臭豆腐生产工艺及营养价值的研究[D].广州:华南理工大学,2012. [HE L. Research on the production technology and nutritional value of fermented stinky tofu[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012.]
- [17] 邓林,刘延岭,魏明英,等.四川冬菜卤水发酵制取酱油的工艺研究[J].食品与发酵科技,2012,48(3):26-29. [DENG L, LIU Y L, WEI M Y, et al. Study on the technology of preparing soy sauce from Sichuan winter vegetable brine fermentation[J]. Food and Fermentation Science & Technology, 2012, 48(3): 26-29.]
- [18] WANG Z, ZHENG C, MA C, et al. Comparative analysis of chemical constituents and antioxidant activity in tea-leaves microbial fermentation of seven tea-derived fungi from ripened Pu-erh tea[J]. LWT, 2021, 142: 111006.
- [19] BUYTAERS F E, FRAITURE M A, BERBERS B, et al. A shotgun metagenomics approach to detect and characterize unauthorized genetically modified microorganisms in microbial fermentation products[J]. Food Chemistry: Molecular Sciences, 2021, 2: 100023.
- [20] 刘玉平,陈海涛,孙宝国,等.固相微萃取与GC-MS法分析发酵型臭豆腐中挥发性成分[J].食品工业科技,2009,30(12):403-405. [LIU Y P, CHEN H T, SUN B G, et al. Analysis of volatile components in fermented stinky tofu by solid phase micro-extraction and GC-MS[J]. Science and Technology of Food Industry, 2009, 30(12): 403-405.]
- [21] 赵国忠,谢小芳,邱海波,等.臭豆腐卤水微生物群落及其接种发酵[J].中国酿造,2017,36(2):21-24. [ZHAO G Z, XIE X F, DI H B, et al. Microbial community of stinky tofu brine and its inoculation and fermentation[J]. China Brewing, 2017, 36(2): 21-24.]
- [22] 范博望,任翊,樊青青,等.臭豆腐卤水中的主要发酵菌株及发酵研究[J].生物化工,2021,7(2):52-54. [FAN B W, REN Y, FAN Q Q, et al. Study on the main fermentation strains and fermentation of stinky tofu brine[J]. Biochemical Industry, 2021, 7(2): 52-54.]
- [23] 范洪臣,王冰,马永强.克东腐乳的研究进展[J].中国调味品,2021,46(6):184-187. [FAN H C, WANG B, MA Y Q. Research progress of Kedong fermented bean curd[J]. Chinese Condi-

- ments, 2021, 46(6): 184–187.]
- [24] GU J, LIU T, HOU J, et al. Analysis of bacterial diversity and biogenic amines content during the fermentation processing of stinky tofu[J]. *Food Research International*, 2018, 111: 689–698.
- [25] XIE, CHUNZHI, ZENG, et al. Comprehensive explorations of nutritional, functional and potential tasty components of various types of Sufu, a Chinese fermented soybean appetizer[J]. *Food Science and Technology*, 2019: 39.
- [26] 南晓芳. 豆豉和腐乳中耐盐乳酸菌的筛选、鉴定及其功能特性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2016. [NAN X F. Screening, identification and functional characteristics of salt-tolerant lactic acid bacteria in tempeh and fermented bean curd[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2016.]
- [27] 王正莉, 王卫, 陈林, 等. 传统腌腊肉制品中微生物多样性研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2021, 42(8): 202–206. [WANG Z L, WANG W, CHEN L, et al. Research progress of microbial diversity in traditional cured meat products[J]. *Food Research and Development*, 2021, 42(8): 202–206.]
- [28] 赵玲艳, 黄嘉欣, 杨剑, 等. 盐渍辣椒真菌多样性分析[J]. *中国食品学报*, 2021, 11(8): 1–9. [ZHAO L Y, HUANG J X, YANG J, et al. Diversity analysis of salted pepper fungi[J]. *Chinese Journal of Food Science*, 2021, 11(8): 1–9.]
- [29] QIU T Y, HAIMING W, YANG Y, et al. Exploration of biodegradation mechanism by AFB1-degrading strain *Aspergillus niger* FS10 and its metabolic feedback[J]. *Food Control*, 2021, 121(2): 107609.
- [30] 高玉荣, 刘晓燕. 多菌种低盐分段发酵生产豆豉工艺[J]. *农业工程学报*, 2010, 26(S1): 369–373. [GAO Y R, LIU X Y. Multi-strain low-salt staged fermentation process for producing tempeh[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2010, 26(S1): 369–373.]
- [31] LIBO L, XIAOQIAN C, LINLIN H, et al. Traditional fermented soybean products: Processing, flavor formation, nutritional and biological activities[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020.
- [32] WANG B, WU Q, XU Y, et al. Multiple sugars promote microbial interactions in Chinese baijiu fermentation[J]. *LWT*, 2021, 138: 110631.
- [33] ZHANG H, WANG L, WANG H, et al. Effects of initial temperature on microbial community succession rate and volatile flavors during Baijiu fermentation process[J]. *Food Research International*, 2021, 141: 109887.
- [34] SHI Y, HUANG K, PAN X, et al. Substrate degradation, biodiesel production, and microbial community of two electro-fermentation systems on treating oleaginous microalgae *Nannochloropsis* sp[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 329: 124932.
- [35] 李雨枫, 徐睿斌, 蒋立文, 等. 臭豆腐卤水发酵过程中微生物变化及风味成分研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2014, 5(10): 3098–3109. [LI Y F, XU R X, JIANG L W, et al. Study on microbial changes and flavor components during fermentation of stinky tofu brine[J]. *Journal of Food Safety and Quality Inspection*, 2014, 5(10): 3098–3109.]
- [36] 邓思敬, 杜磊, 谢静莉, 等. 发酵臭豆腐卤液的乳酸菌发酵菌种研究及香气成分分析[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(17): 107–113, 118. [DENG S J, DU L, XIE J L, et al. Study on lactic acid bacteria fermentation strains of fermented stinky tofu brine and analysis of aroma components[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(17): 107–113, 118.]
- [37] 郑小芬, 苏悟, 蒋立文. 两种臭豆腐卤水中挥发性成分的比较[J]. *中国酿造*, 2013, 32(10): 122–125. [ZHENG X F, SU W, JIANG L W. Comparison of volatile components in two kinds of stinky tofu brines[J]. *China Brewing*, 2013, 32(10): 122–125.]
- [38] MA, WANG, CHENG, et al. Selected quality properties and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of low-salt Sufu, a new type of Chinese fermented Tofu[J]. *International Journal of Food Properties*, 2014, 17(9): 2025–2038.
- [39] 彭湘屏, 卢红梅. 腐乳研究新进展[J]. *中国调味品*, 2010, 35(2): 31–34, 45. [PENG X P, LU H M. The new development of fermented bean curd research[J]. *China Seasoning*, 2010, 35(2): 31–34, 45.]
- [40] 肖聪丽, 李理, 陈敏. 大豆多肽的分离纯化及其体外降血脂功能研究[J]. *中国酿造*, 2020, 39(7): 30–35. [XIAO C L, LI L, CHEN M. Isolation and purification of soybean peptides and its *in vitro* hypolipidemic function[J]. *China Brewing*, 2020, 39(7): 30–35.]
- [41] 陈嘉序, 陈如扬, 连媛, 等. 大豆异黄酮的生物转化及功能活性研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2021, 42(9): 176–182. [CHEN J X, CHEN R Y, LIAN Y, et al. Research progress on bio-transformation and functional activity of soybean isoflavones[J]. *Food Research and Development*, 2021, 42(9): 176–182.]
- [42] 于坚, 夏邦恩, 王廷玮, 等. 土茯苓的功能性分析及其在功能性食品中的应用进展[J]. *食品研究与开发*, 2021, 42(8): 166–171. [YU J, XIA B E, WANG T W, et al. Functional analysis of *Smilax glabra* and its application progress in functional foods[J]. *Food Research and Development*, 2021, 42(8): 166–171.]
- [43] 邹磊, 呼晴, 殷丽君. 黄色毛霉腐乳抗氧化能力的研究[J]. *食品与机械*, 2007, 11(5): 98–100, 108. [ZOU L, HU Q, YIN L J. Study on antioxidant ability of mucor yellow Sufu[J]. *Food & Machinery*, 2007, 11(5): 98–100, 108.]
- [44] 王富豪, 黄璐, 薛晨晨, 等. 不同品种大豆异黄酮组分及体外抗氧化活性分析[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(17): 247–255. [WANG F H, HUANG L, XUE C C, et al. Analysis of isoflavone components and antioxidant activity *in vitro* of different varieties of soybean[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(17): 247–255.]
- [45] 董爽, 陶杰, 汪建明. 酶促腐乳生产过程中各种理化性质的变化研究[J]. *食品与发酵科技*, 2014, 50(5): 23–26, 69. [DONG S, TAO J, WANG J M. Study on the changes of various physical and chemical properties in the production process of enzymatic fermented bean curd[J]. *Food and Fermentation Technology*, 2014, 50(5): 23–26, 69.]
- [46] KUBA M, TANAKA K, TAWATA S, et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides isolated from Tofuyo fermented soybean food[J]. *Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry*, 2003, 67(6): 1278–1283.
- [47] 侯星, 易弋, 张兴猛, 等. 发酵食品中微生物的功能特性[J].

- 中国调味品, 2019, 44(1): 191-194, 197. [HOU X, YI Y, ZHANG X M, et al. Functional characteristics of microorganisms in fermented foods[J]. *China Condiments*, 2019, 44(1): 191-194, 197.]
- [48] 熊骏, 韩瑞娜, 张忠华, 等. 豆豉中高效抑菌活性乳酸菌的筛选及其抑菌研究[J]. 中国微生物生态学杂志, 2011, 23(6): 485-489. [XIONG J, HAN R N, ZHANG Z H, et al. Screening of lactic acid bacteria with high antibacterial activity in tempeh and its antibacterial research[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2011, 23(6): 485-489.]
- [49] LEE S, LEE J, JIN Y I, et al. Probiotic characteristics of *Bacillus* strains isolated from Korean traditional soy sauce[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2017: 79.
- [50] YUAN L, CHANG J, YIN Q, et al. Fermented soybean meal improves the growth performance, nutrient digestibility, and microbial flora in piglets[J]. *Animal Nutrition*, 2017, 3(1): 19-24.
- [51] YI A, YZ A, KSR A, et al. Gastrointestinal survival and potential bioactivities of *Lactobacillus curieae* CCTCC M2011381 in the fermentation of plant food[J]. *Process Biochemistry*, 2020, 88: 222-229.
- [52] 邱天宇, 王海鸣, 朱瑜, 等. 响应面优化黑曲霉生物发酵花生粕脱除黄曲霉毒素研究[J]. 农产品加工, 2020(20): 1-7. [QIU T Y, WANG H M, ZHU Y, et al. Response surface optimization of *Aspergillus niger* bio-fermentation of peanut meal to removal of aflatoxins[J]. *Agricultural Products Processing*, 2020(20): 1-7.]
- [53] 江月, 何松贵, 周世水. 异常汉逊酵母和植物乳杆菌菌液浓度与光密度值的关系研究[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(19): 99-100. [JIANG Y, HE S G, ZHOU S S. Study on the relationship between the concentration of abnormal *Hansenula* yeast and *Lactobacillus plantarum* and optical density value[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2017, 45(19): 99-100.]
- [54] HE M, LI Y, PI F, et al. A novel detoxifying agent: Using rice husk carriers to immobilize zearalenone-degrading enzyme from *Aspergillus niger* FS10[J]. *Food Control*, 2016, 68: 271-279.
- [55] MCKNIGHT S V, BOUTT D F, MUNK L A. Impact of hydrostratigraphic continuity on brine-to-freshwater interface dynamics: Implications from a two-dimensional parametric study in an arid and endorheic basin[J]. *Water Resources Research*, 2021, 57(4).
- [56] 徐智虎, 王雪邴, 刘雪婷, 等. 贵州镇远道菜中生物胺降解菌的筛选及鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2021, 21(9): 10-18. [XU Z H, WANG X L, LIU X T, et al. Screening and identification of bio-amine-degrading bacteria in Zhenyuan dishes in Guizhou[J]. *Food and Fermentation Industry*, 2021, 21(9): 10-18.]
- [57] 于坚, 孙嘉笛, 纪剑, 等. 区块链技术在食品溯源体系中的应用[J]. 食品工业科技, 2021, 42(15): 377-382. [YU J, SUN J D, JI J, et al. Application of blockchain technology in food traceability system[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2021, 42(15): 377-382.]