

大豆发酵食品——腐乳中芽孢杆菌的分离与鉴定

韩北忠 吴戈 翟永玲

(中国农业大学食品学院) (北京王致和食品厂)

摘要 对国内采集的 18 种腐乳样品中的芽孢杆菌进行了分离和鉴定。总芽孢杆菌和蜡状芽孢杆菌分别以选择性培养基 PCA 和 MYP 进行分离,并根据其生理特性和对 API 系统中碳水化合物化合物的利用进行鉴定。结果显示,腐乳中的芽孢杆菌主要是枯草芽孢杆菌,而且多数产品中的数量已达到 10^5 cfu·g⁻¹;个别产品中蜡状芽孢杆菌的数量超过 10^5 cfu·g⁻¹,对消费者会有一定的危害。某些腐乳产品中枯草芽孢杆菌和蜡状芽孢杆菌的数量较低,说明改善卫生条件和改进生产工艺,可以生产出优质、安全的腐乳产品。

关键词 腐乳; 芽孢杆菌; 分离; 鉴定

中图分类号 TS 214.2

Isolation and Identification of Spore-forming Bacilli From Sufu — a Fermented Soybean Food

Han Beizhong Wu Ge Zhai Yongling

(College of Food Science and Engineering, CAU) (Beijing Wang Zhihe Food Factory)

Abstract A study was done to isolate and identify spore-forming bacilli from sufu, which (18 samples) were produced and purchased in China. *Bacillus* spp. and *Bacillus cereus* were isolated with pasteurized samples in the selective media of PCA and MYP, respectively. The identification of *Bacillus* spp. and *Bacillus cereus* were done with the physiological characteristics and the API system. High levels ($> 10^5$ cfu/g) of *Bacillus* spp. were found in most of samples, and *Bacillus* spp. were identified as most probably *Bacillus subtilis*. *Bacillus cereus* ($> 10^5$ cfu/g) were detected in some of samples, which could be harmful to the consumers. Some of sufu has the lower levels of *Bacillus* spp. and *Bacillus cereus*, which indicated the high quality and safety sufu can be produced by improving sanitation and processing technology.

Key words sufu; *Bacillus* spp.; isolation; identification

腐乳是我国传统的大豆发酵食品,它风味独特、营养丰富、价格低廉,已受到国内外食品和营养学者的广泛关注^[1]。因各地环境、条件、生活习性不同,产品类型各异。生产过程主要包括:豆腐坯制作、毛坯制作(前期培菌)、盐制、后期发酵(成熟阶段)。尽管前期培菌选用了纯种培养,但是整个生产过程仍沿用开放式传统工艺,杂菌(尤其是芽孢菌)的污染很难避免。据报道^[2],豆腐(腐乳的前体物)中查出有大肠菌群、蜡状芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌等病原菌。虽

收稿日期: 2001-04-23

韩北忠,北京清华东路 17 号 中国农业大学(东校区)113 信箱, 100083

然大多数腐乳中都加有一定的具有抑菌作用的食盐(5%~15%)和酒精(1%~7%),但是芽孢菌有较强的耐盐和耐酒精能力,芽孢杆菌必然存在于成品腐乳中。

腐乳生产已有一千多年的历史,国内外均有关于其生产工艺和营养价值的报道,却很少有关于微生物学方面的研究,本实验旨在对商品腐乳中芽孢杆菌的数量和种类做初步检测,结果将有助于分析后期发酵过程中风味的形成,并对产品卫生指标的制订有一定的指导意义。

1 材料与方法

1.1 样品的采集和处理

本实验共采集了18种腐乳样品,其中有红方8种、白方6种和青方4种。样品分别产于北京、黑龙江、山西、江苏、福建、广东、广西、四川、台湾和香港。在无菌条件下,称取25g腐乳样品,置于225mL灭菌生理盐水中混合均匀,待用。

1.2 化学组分测定^[3]

干物质、pH值和食盐含量分别以烘干法(110℃,4h)、酸度计和滴定法测定。

1.3 芽孢杆菌的计数和分离

总芽孢杆菌^[4]:样品悬浮液在80℃下保持10min,冷却后将稀释液混入平板计数(PCA)培养基(Plate Count Agar, CM 325, Oxoid, England)中,在30℃条件下培养2~3d后,染色镜检并对杆菌菌落计数。挑取单个菌落划线培养,连续划线培养至纯。

蜡状芽孢杆菌^[5]:取0.1mL一定浓度的稀释液涂布于选择性培养基——甘露醇蛋黄多粘菌素(MYP)琼脂培养基(Mannitol Yolk Polymyxin, cereus selective agar, No. 1 05267, Merck, Germany)上,在30℃条件下培养24h后选择适当菌落做进一步证实试验并计数。蜡状芽孢杆菌在此培养基上的菌落为粉红色(表示不发酵甘露醇),周围有粉红的晕(表示产生卵磷脂酶)。从培养皿中挑取5个粉红色菌落,转入加有新鲜羊血的BHI培养基(Brain Heart Infusion, No. 2337500, DIFCO, France)上培养24h(30℃),若菌落周围有透明圈,可以证实其为蜡状芽孢杆菌。

1.4 芽孢杆菌的鉴定及其生化特性

革兰氏染色、芽孢形态、鞭毛染色、ONPG、H₂S、V-P反应、明胶液化、氧化酶和过氧化氢酶试验参照《食品微生物检验手册》^[6]方法进行。

碳水化合物的利用:以API(Alysis Profile Index)系统方法,选用50种不同的碳水化合物为底物进行测定。分离的菌种经纯种扩大培养,制成一定浓度的菌悬液,取该菌悬液0.2mL混入10mL的API 50 CHB培养基(No. 50 430 bioMérieux, France)中,再分别接种到50种不同的碳水化合物底物上,在30℃条件下培养48h,并分别在24h和48h时记录结果。结果通过制造商提供的软件(API LAB software Version 3.3.3, bioMérieux, France)进行分析^[7],并与Bergey's Manual^[8]中相应模式菌株比较。

2 结果

2.1 腐乳的化学组分和芽孢杆菌数

表1中列出了所测腐乳的干物质量、pH值、食盐含量、总芽孢杆菌和蜡状芽孢杆菌数,其化学组分和芽孢杆菌数之间无相关性。总芽孢杆菌数和蜡状芽孢杆菌数分别在 10^3 ~ 10^7 cfu·

g^{-1} 和 $10 \sim 10^5 \text{ cfu} \cdot g^{-1}$ 之间, 差异非常大。

表1 腐乳的化学组分和芽孢杆菌数(以湿基计)

样品编号	水含量 /[$g \cdot (100 g)^{-1}$]	pH	食盐含量 /[$g \cdot (100 g)^{-1}$]	总芽孢杆菌 /[$(\lg N) \cdot g^{-1}$]*	蜡状芽孢杆菌 /[$(\lg N) \cdot g^{-1}$]*	
红方	1	66.4	6.64	9.3	4.6	2.5
	2	65.6	6.59	8.2	4.9	2.7
	3	67.8	6.23	10.5	5.2	2.2
	4	69.0	6.01	9.7	5.7	3.6
	5	58.4	6.35	12.6	6.8	3.2
	6	59.3	6.21	14.7	5.5	2.7
	7	55.1	5.62	14.6	7.0	5.3
	8	57.3	5.48	13.1	6.7	4.6
白方	1	70.2	6.36	9.9	6.1	3.6
	2	72.3	6.80	7.5	5.3	2.7
	3	58.2	5.45	13.2	7.6	5.1
	4	63.6	5.25	10.3	4.7	3.3
	5	67.0	5.68	6.1	3.5	2.4
	6	70.1	6.12	8.4	3.1	2.2
青方	1	70.8	7.43	11.8	6.2	3.2
	2	73.1	7.46	10.3	5.8	3.6
	3	69.2	7.15	14.5	3.2	1.8
	4	67.8	7.21	13.9	3.5	2.7

注: N 为杆菌总数

2.2 腐乳中所分离芽孢杆菌的鉴定

腐乳中所分离菌株的生理特性与模式菌株的比较见表2。由PCA培养基所分离的芽孢杆菌, 其中有85%的菌株其生理特性与模式菌株(枯草芽孢杆菌)基本一致; 由MYP培养基所分离的粉红色菌落, 经BHI培养基证实, 其中的90%初步确认为蜡状芽孢杆菌, 而且它们与模式菌株的生理特性完全一致。

表2 分离菌株的生化特性与模式菌株的比较

生化特性	枯草芽孢杆菌 ^m	芽孢杆菌	蜡状芽孢杆菌 ^m	蜡状芽孢杆菌
革兰氏染色	+	+	+	+
芽孢形态	椭圆	椭圆	椭圆	椭圆
鞭毛染色	+	+	+	+
ONPG	+	d	-	-
H ₂ S	-	-	-	-
V-P 反应	+	+	+	+
明胶液化	+	+	+	+
氧化酶	+	d	+	+
过氧化氢酶	+	+	+	+

注: + 为阳性反应, - 为阴性反应, d 为菌株间有差异, m 为模式菌株。

表3示出分离菌株与模式菌株对API系统中50种碳水化化合物的利用情况。其中由PCA培养基分离的芽孢杆菌可以利用甘油等25~27种碳水化合物,由MYP培养基分离的已初步确认的蜡状芽孢杆菌可以利用甘油等13~16种碳水化合物。经计算机软件分析,上述芽孢杆菌可鉴定为枯草芽孢杆菌,初步确认的蜡状芽孢杆菌可鉴定为蜡状芽孢杆菌。

表3 分离菌株对碳水化化合物的利用与模式菌株的比较

碳水化合物		枯草芽孢杆菌 ^m	芽孢杆菌	蜡状芽孢杆菌 ^m	蜡状芽孢杆菌
甘油	(1)*	+	+	+	+
L-阿拉伯糖	(4)	+	+	-	-
核糖	(5)	+	+	+	+
D-木糖	(6)	+	+	-	-
半乳糖	(10)	d	-	-	-
D-葡萄糖	(11)	+	+	+	+
D-果糖	(12)	+	+	+	+
D-甘露糖	(13)	+	+	+	+
肌醇	(17)	+	+	-	-
甘露醇	(18)	+	+	-	-
山梨醇	(19)	+	+	-	-
α -甲基-D-葡萄糖苷	(21)	+	d	-	-
N-乙酰葡萄糖胺	(22)	-	+	+	+
苦杏仁苷	(23)	+	+	-	-
熊果苷	(24)	+	+	+	+
七叶灵	(25)	+	+	+	+
水杨酸	(26)	+	+	d	+
纤维二糖	(27)	+	+	+	d
麦芽糖	(28)	+	+	+	+
乳糖	(29)	d	-	-	-
蜜二糖	(30)	+	d	-	-
蔗糖	(31)	+	+	d	d
海藻糖	(32)	+	+	+	+
菊粉	(33)	+	d	-	-
D-棉籽糖	(35)	+	+	-	-
淀粉	(36)	+	+	+	+
糖原	(37)	+	+	+	+
β -龙胆二糖	(39)	+	+	-	d
D-松二糖	(40)	+	+	-	-

注: + 为可以利用, - 为不可以利用, d 为菌株间有差异, m 为模式菌株, * 括号中数字为碳水化合物在API系统中的序号。

3 讨论

由于腐乳生产无一定的标准,所以不同产品或同一产品不同批次中的化学组成有较大的差异。腐乳生产过程仍沿用开放式的传统工艺,多数产品中总芽孢杆菌数高于 10^5 cfu \cdot g $^{-1}$,其

中某些产品中的蜡状芽孢菌数也高于 10^5 cfu·g⁻¹。Andersson 等人曾指出^[9]: 当食品中蜡状芽孢杆菌数高于 10^3 cfu·g⁻¹时, 对消费者将有潜在的危害。生产部门, 特别是卫生管理部门对此应有一定的重视。另一方面, 有些产品(产于管理水平较高, 卫生条件较好的企业)中总芽孢杆菌数低于 10^5 cfu·g⁻¹, 蜡状芽孢杆菌数也低于 10^3 cfu·g⁻¹, 由此说明, 只要企业加强科学管理, 完全能够生产出优质、安全的腐乳产品。

本研究得到了荷兰 Wageningen 大学研究生院(Graduate School of VLA G)的资助, 谨致谢意。

参 考 文 献

- 1 Han Beizhong, Rombouts FM, Nout M J R. A Chinese fermented soybean food. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 65: 1~ 10
- 2 A shraf H R, White M, Klubek B. Microbiological survey of tofu sold in a rural Illinois county. *Journal of Food Protection*, 1999, 62(9): 1050~ 1053
- 3 Han Beizhong, Kiers J L, Nout M J R. Solid-substrate fermentation of soybeans with *Rhizopus* spp. : Comparison of discontinuous rotation with stationary bed fermentation. *Journal of Biotechnology and Bioengineering*, 1999, 88(2): 205~ 209
- 4 Han, Beizhong, Beumer R R, Rombouts F M, et al. Microbiological safety and quality of sufu — a Chinese fermented soybean food. *Food Control*, 2001 (in press)
- 5 Anonymous. ISO/DIS 7932, Microbiology — General Guidance for the Enumeration of *Bacillus cereus* — Colony-count Technique at 30 °C. Switzerland: International Organization for Standardization, 1993
- 6 苏世彦主编. 食品微生物检验手册. 北京: 中国轻工业出版社, 1998. 11~ 13, 303~ 313
- 7 Te Giffel M C, Beumer R R, Granum P E, et al. Isolation and characterization of *Bacillus cereus* from pasteurized milk in household refrigerators in the Netherlands. *International Journal of Food Microbiology*, 1997, 34: 307~ 318
- 8 Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A. *Bergey's Manual of Determination Bacteriology*. 9th ed. London: Williams & Wilkins Press, 1994. 559
- 9 Andersson A, Ronner U, Granum P E. What problem does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? *International Journal of Food Microbiology*, 1995, 28: 145~ 155