

传统豆制品白干与薄百叶中优势腐败菌的分离与初步鉴定

欧杰¹, 李晓蓓¹, 胡洁云², 陈平², 林露², 严维凌²

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 上海市食品研究所, 上海 200235)

摘要:以传统豆制品白干和薄百叶为材料,对贮藏过程中主要腐败微生物进行分离鉴定。利用纯培养的方法共筛选出菌落形态差别比较明显的菌株19株。对细菌菌株进行形态观察、革兰氏染色和生理生化鉴定,同时对细菌和酵母菌纯培养物提取DNA,分别进行16S rDNA和26S rDNA PCR扩增,PCR产物经测序后与NCBI中已知序列进行比对和鉴定,确定各细菌和酵母菌菌株的种属;霉菌纯培养物染色后观察孢子繁殖形态,最终确定这些菌株的种属。结果表明:白干和薄百叶中共有的优势腐败菌是溶酪葡萄球菌,枯草芽孢杆菌,约翰逊不动杆菌,戊糖片球菌;季也蒙毕赤酵母,皮状丝孢酵母;圆弧青霉和黄绿青霉。此外,白干中还有诞沫假丝酵母;薄百叶中有浅黄假单胞菌,芸苔丝孢酵母。

关键词:传统豆制品;优势腐败菌;16S rDNA;26S rDNA;分离与鉴定

中图分类号:TS201.30

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2012)01-0119-05

Isolation and Preliminary Identification of Specific Spoilage Organisms from Traditional Soybean Products White Bean Curd and Bean Curd

OU Jie¹, LI Xiao-bei¹, HU Jie-yun², CHEN Ping², LIN Lu², YAN Wei-ling²

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Shanghai Food Research Institute, Shanghai 200235, China)

Abstract: The spoilage organisms in white bean curd and bean curd during storage period were isolated and identified in this experiment. Nineteen strains obviously different in morphology were screened out, and the gram staining and their physical and chemical characteristic were identified using the method of pure culture. DNA were extracted from the pure culture of bacterium and yeast, and amplified the 16S rDNA and 26S rDNA; PCR products were sequenced and the results were identified and compared with the closest known sequences from NCBI to determine the various bacteria and yeast respective genus. The pure culture of mould were dyed to review the conidium morphology to indentify the genus of the strains. Results indicated that the common dominant spoilage organisms in the white bean curd and bean curd were *Staphylococcus caseolyticus*, *Bacillus subtilis*, *Acinetobacter johnsonii*, *Pediococcus pentosaceus*; *Pichia guilliermondii*, *Trichosporon cutaneum*; *Penicillium cyclopium*, *Penicillium toxicarum* Miyake. In addition, *Candida zeylanoides* was specific organism in white bean curd, and *Pseudomonas luteola* and *Trichosporon cutaneum* in bean curd.

Key words: Traditional soybean products; Specific spoilage organism; 16S rDNA; 26S rDNA; Isolation and identification

白干是点脑成豆腐花以后直接灌模压榨、脱模晾制的产品;薄百叶是点脑成豆腐花以后经破脑、浇制、压榨、脱布而成的产品,由于豆制品中含有丰富的蛋白质、水分、碳水化合物和脂肪^[1],因此容易滋生微生物腐败变质,导致其保质期很短。豆制品中微生物的大量繁殖,产生发酸、发黏和恶臭等不好的气味。目前国内外已有一些关于对豆浆^[2]、非发酵豆制品^[3-6]和发酵豆制品^[7]中腐败菌的报道,这些报道集中于研究优势细菌及其来源。该文利用传统纯培养方法和分子生物学方法分离并鉴定

导致豆制品腐败的优势腐败微生物,为进一步研究豆制品保质期及提高其安全性提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

白干、薄百叶均购于上海某豆制品厂,均为当天产品。从产品下线到取样分析不超过1 h,样品存放于灭菌自封袋中,置于保温箱中运回实验室。无菌包装后放置于25℃贮藏3 d。

营养琼脂培养基、MRS培养基、马铃薯葡萄糖

收稿日期:2011-11-06

基金项目:上海市科学技术委员会应用技术开发专项资金支撑项目(2010-119)。

第一作者简介:欧杰(1964-),男,副教授,研究方向为食品生物技术。E-mail:jou@shou.edu.cn。

通讯作者:严维凌(1967-),男,教授,高级工程师,研究方向为食品生物技术。E-mail:yanwling@hotmail.com。

琼脂培养基(PDA)、孟加拉红培养基;营养肉汤、MRS肉汤、WORT肉汤基础均购于北京路桥技术有限公司。

Biospin 细菌基因组 DNA 提取盒(杭州博日科技有限公司);UNIQ-10 柱式酵母基因组抽提试剂盒、PCR 扩增引物(上海生工生物工程技术有限公司);生理生化试验试剂(杭州天和微生物制剂有限公司)。

Analys BagMixer 400 VW 型均质器(法国, Interscience);Eppendorf AG 22331 Hamburg PCR 仪(Eppendorf);FR-980A 生物电泳图像分析系统(上海复日科技有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 优势腐败菌的分离、纯化和保存 白干、薄百叶于 25℃ 贮藏 3 d 后,出现发酸发粘等感官变化。无菌操作各取 25 g,放入装有 225 mL 无菌生理盐水的灭菌拍击袋中,拍击器震荡 2 min(拍击速度为 8 次·s⁻¹),制成 1:10 的样品匀液,从该样品匀液中吸取 1 mL,加入 9 mL 无菌生理盐水的试管中,充分混匀,制成 1:100 的样品匀液,按此法依次梯度稀释。分别从稀释度为 10⁻⁸ 的样品匀液中取 100 μL 置于营养琼脂、MRS 培养基上,用无菌涂布棒涂布均匀后置于 37℃ 培养 24 h,从稀释度为 10⁻⁷ 的样品匀液中取 100 μL 置于 PDA、孟加拉红培养基上,涂布均匀后置于 25℃ 培养 24~28 h。从培养皿中分别挑取菌落形态有差异的细菌、乳酸菌、酵母菌和霉菌单菌落,其中细菌、乳酸菌、酵母菌反复划线纯化后斜面保藏备用,霉菌用接种针挑取极少量的孢子,点植于孟加拉红培养基上,培养 5 d 左右后观察菌落特征。

1.2.2 细菌优势菌种鉴定 参照《微生物学实验》(第三版)^[8]进行革兰氏染色、芽孢染色。参照《常见细菌系统鉴定手册》^[9]作部分生理生化鉴定。将细菌、乳酸菌单菌分别接种到 LB 肉汤、MRS 肉汤增菌 48 h 左右,制成 10⁸~10⁹ cfu·mL⁻¹ 的菌悬液,用 Biospin 细菌基因组 DNA 提取盒直接提取 DNA。参考《现代分子生物学实验技术》^[10]进行活化菌的 16S 全长序列的 PCR 扩增。

PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后,送上海生工生物工程有限公司进行 PCR 产物测序,将测序获得的 16S rDNA 序列在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对分析,获得与每条序列亲缘关系最近的序列信息。

1.2.3 酵母菌优势菌种鉴定 参照《微生物学实验》^[8]进行染色,显微镜下观察酵母菌形态。将单

菌接种到 WORT 肉汤基础增菌 48 h 左右,制成 10⁸~10⁹ cfu·mL⁻¹ 的菌悬液,用 UNIQ-10 柱式酵母基因组抽提试剂盒提取单菌 DNA。参考《现代分子生物学实验技术》^[10]进行活化菌的 26S 全长序列的 PCR 扩增。

PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后,送上海生工生物工程有限公司进行 PCR 产物测序,将测序获得的 26S rRNA 序列在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对分析,获得与每条序列亲缘关系最近的序列信息。

1.2.4 霉菌优势菌种初步鉴定 参照《微生物学实验》^[8],显微镜下观察孢子繁殖的形态。

2 结果与分析

2.1 细菌优势菌株鉴定

挑取优势细菌共 9 株,其中白干中 4 株,薄百叶中 5 株(分别命名为 L₁₋₁~L₁₋₄ 和 L₂₋₁~L₂₋₅),详细记录基本特征(表 1);9 株活化细菌进行 16S 全长序列的 PCR 扩增后,得到重复性好且稳定、清晰的特异条带,片段大约 1 500 bp(图 1)。将测定的序列与 BLAST 同源序列比对,其与 GenBank 中最接近细菌的同源性为 98%~99%,可以确定 L₁₋₁ 和 L₂₋₃ 是葡萄球菌属中的溶酪葡萄球菌(*Staphylococcus caseolyticus*),L₁₋₂ 和 L₂₋₁ 是芽孢杆菌属中的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),L₁₋₃ 和 L₂₋₂ 是不动杆菌属中的约翰逊不动杆菌(*Acinetobacter johnsonii*),L₁₋₄ 和 L₂₋₅ 是片球菌属中的戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*),L₂₋₄ 是假单胞菌属(*Pseudomonas sp.*)。参照 GenBank 对比结果,做相应的生理生化实验(表 2),得出与 16 S,rDNA 鉴定方法中一致的结果,结合生理生化实验,可以得出 L₂₋₄ 是假单胞菌属中的浅黄假单胞菌(*Pseudomonas luteola*)。

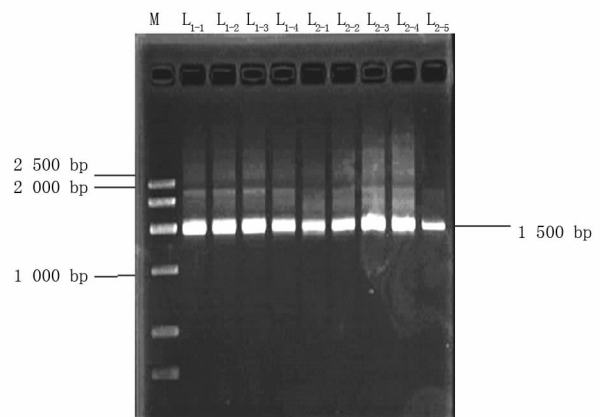


图 1 菌株的 16 S rDNA 电泳图谱

Fig. 1 PCR amplification of 16S rDNA

表 1 白干、薄百叶中优势细菌特征

Table 1 The properties of dominant bacteria in white bean curd and bean curd


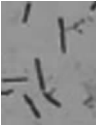

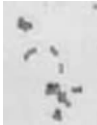




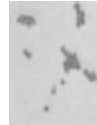
特征 Character	L ₁₋₁	L ₁₋₂	L ₁₋₃	L ₁₋₄	L ₂₋₁	L ₂₋₂	L ₂₋₃	L ₂₋₄	L ₂₋₅
培养基 Medium	LB	LB	LB	MRS	LB	LB	LB	LB	MRS
形状 Shape	球菌	杆菌	杆菌	球菌	球菌	杆菌	球菌	杆菌	球菌
革兰氏染色 Gram staining	G ⁺	G ⁺	G ⁻	G ⁺	G ⁺	G ⁻	G ⁺	G ⁻	G ⁺
细菌形状 Bacterium's shape 100 × 10									
芽孢 Spore	无	有	无	无	有	无	无	无	无
菌落形态 Colony morphology	圆	椭圆	扩展	扩展	椭圆	扩展	扩展	扩展	圆
菌落颜色 Colony color	乳白色	乳白色	乳白色	乳白色	乳白色	白色	乳白色	金黄色	白色
菌落隆起度 Colony degree of uplift	凸起	低凹	凸起	低凹	低凹	低凹	低凹	低凹	凸起
菌落边缘形状 Colony edge shape	整齐	不整齐	整齐	整齐	不整齐	整齐	整齐	整齐	整齐
菌落表面状态 Colony surface state	光滑	不光滑	光滑	光滑	不光滑	光滑	光滑	光滑	光滑
菌落光泽 Colony luster	有光泽	有光泽	有光泽	无光泽	有光泽	有光泽	有光泽	有光泽	有光泽
菌落干湿 Colony of wet and dry	湿润	湿润	奶油	奶油	湿润	奶油	奶油	奶油	湿润
菌落透明度 Colony degree of transparency	不透明	不透明	不透明	半透明	不透明	半透明	不透明	半透明	不透明

表 2 细菌常见生理生化鉴定

Table 2 Common physiological and biochemical identification of bacteria

生理生化鉴定 Physiological and biochemical identification	L ₁₋₁	L ₁₋₂	L ₁₋₃	L ₁₋₄	L ₂₋₁	L ₂₋₂	L ₂₋₃	L ₂₋₄	L ₂₋₅
接触酶试验 Catalase test	+	+	+	-	+	+	+	+	-
氧化酶试验 Oxidase test	-	-	-	NT	-	-	-	-	NT
葡萄糖 Glucose	NT	+	-	+	+	-	-	+	+
木糖 Xylose	NT	+	NT	NT	+	NT	NT	NT	NT
蔗糖 Sucrose	+	NT	NT	NT	+	NT	NT	NT	NT
甘露糖 Mannose	-	+	NT	+	+	NT	+	+	-
半乳糖 Galactose	+	+	NT	+	NT	NT	+	NT	+
甘露醇 Mannitol	-	+	NT	-	+	NT	-	+	-
乳糖 Lactose	+	NT	NT	NT	NT	NT	+	NT	NT
果糖 Fructose	+	NT	NT	+	NT	NT	+	NT	+
鼠李糖 Rhamnose	NT	NT	NT	+	NT	NT	NT	NT	-
纤维二糖 Cellobiose	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-	NT	NT
海藻糖 Trehalose	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
麦芽糖 Maltose	+	NT	NT	NT	NT	NT	+	+	NT
山梨醇 Sorbitol	NT	NT	NT	-	NT	NT	NT	NT	-
七叶灵 Aesculin	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
明胶液化 Gelati liquefaction	NT	+	-	NT	+	+	NT	NT	NT
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+	NT	NT	+	NT	+	+	NT
柠檬酸盐利用 Citrate utilization	NT	+	+	NT	+	+	NT	NT	NT
丙二酸盐利用 Malonate utilization	NT	NT	+	NT	NT	+	NT	NT	NT
丙酸盐利用 Propionate utilization	NT	-	NT	NT	-	NT	NT	NT	NT
精氨酸双水解酶 Arginine digydrolase	NT	NT	NT	+	NT	NT	NT	+	+
V-P 反应 Voges-Proskauer reaction	-	+	-	NT	+	-	-	NT	NT

+ :大多数(≥90%)菌株为阳性, - :大多数(≥90%)菌株为阴性,NT:未试验。

+ :Most are(≥90%) positive; - :Most are(≥90%) negative;NT:No test.

2.2 酵母菌优势菌株鉴定

根据菌落形态差异挑取酵母菌共6株,其中白干和薄百叶中酵母菌各3株(分别命名为P₁₋₁~P₁₋₃和P₂₋₁~P₂₋₃)。单菌染色后,详细记录其特征(表3)。6株活化酵母菌进行26S全长序列的PCR扩增后,能得到重复性好且稳定、清晰的特异条带,片段大约600 bp(图2)。将序列进行BLAST同源序

列比对,同时参考《常见与常用真菌》^[11]进行鉴定。

可以得知P₁₋₁和P₂₋₂是毕赤氏酵母属中的季也蒙毕赤酵母(*Pichia guilliermondii* sp),P₁₋₂和P₂₋₃是丝孢酵母属中的皮状丝孢酵母(*Trichosporon cutaneum* sp),P₁₋₃是假丝酵母属中的诞沫假丝酵母(*Candida zeylanoides* sp),P₂₋₁是丝孢酵母属中的芸苔丝孢酵母(*Trichosporon brassicae* sp)。

表3 白干和薄百叶中酵母菌特征

Table 3 The properties of yeast in white bean curd and bean curd

特征 Character	P ₁₋₁	P ₁₋₂	P ₁₋₃	P ₂₋₁	P ₂₋₂	P ₂₋₃
菌落形态 Colony morphology	红色,圆形,湿润,表面有光泽,不透明,凸起,边缘整齐。	乳白色,球形,湿润,表面光泽,不透明,凸起,边缘整齐。	乳白色,球形,表面无光泽,不透明,干燥,边缘整齐,中间有褶皱。	白色,球形,湿润,表面有光泽,不透明,凸起,边缘整齐。	深红色,球形,湿润,表面有光泽,不透明,凸起,边缘整齐。	白色,球形,湿润,表面稍有光泽,不透明,凸起,边缘整齐。
显微镜下 酵母菌形态 Yeast morphology under the microscope	球形,直径0.7~0.8 mm,芽殖。	椭圆形,直径0.7~0.9 mm,芽殖。	长条形,直径0.8~1 mm,芽殖。	椭圆形,直径0.8~0.9 mm,产生子囊孢子。	球形,直径0.7~0.8 mm,芽殖。	椭圆形,直径0.7~0.8 mm,芽殖。
40 × 10						

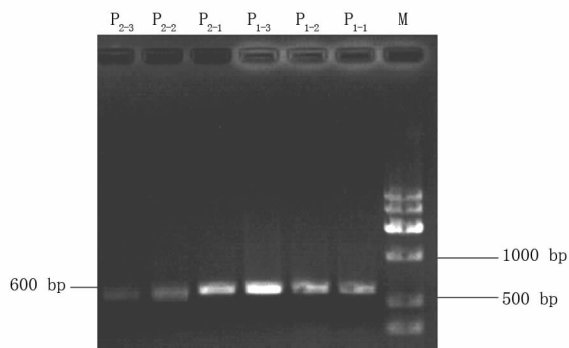


图2 菌株的26S rDNA电泳图谱
Fig.2 PCR amplification of 26S rDNA

2.3 霉菌优势菌株的初步鉴定

观察菌落形态可知,白干和薄百叶中的2株霉菌是相同的(命名为M₁₋₁、M₁₋₂),显微镜下观察孢子繁殖形态,参考《常见与常用真菌》^[11]进行初步鉴定可知,M₁₋₁是青霉属中的圆弧青霉(*Penicillium cyclopium* sp),M₁₋₂是黄绿青霉(*Penicillium toxicarium* Miyake sp)。

3 结论与讨论

白干和薄百叶生产工艺虽有不同之处,但大多数腐败菌是相同的,共有的细菌是溶酪葡萄球菌,

表4 白干中霉菌的特征

Table 4 The properties of mould in white bean curd

特征 Character	M ₁₋₁	M ₁₋₂
菌落形态 Colony morphology		
	7 d后,直径2.0~2.5 cm;初生时,边缘白色,中间逐渐由浅青色变为深青色,中央由乳白色变为褐色;有放射状沟纹和褶皱;菌落质地绒状。	7 d后,直径0.7~1.2 cm;中央不规则褶皱,边缘白色,中间由淡青色变为青绿色;有沟纹,菌落质地绒状。
分生孢子形态 Conidium morphology 40 × 10		

枯草芽孢杆菌, 约翰逊不动杆菌和戊糖片球菌; 共有的酵母菌是季也蒙毕赤酵母, 皮状丝孢酵母; 共有的霉菌是圆弧青霉和黄绿青霉。此外, 白干中优势菌有诞沫假丝酵母; 薄百叶中优势菌有浅黄假单胞菌, 芸苔丝孢酵母。近几年来关于豆制品腐败原因的报道^[2-6]认为, 豆制品的腐败主要是由细菌引起的, 而该实验在经过较大的梯度稀释后分离出白干和薄百叶中的优势腐败菌有细菌、酵母菌和霉菌。

前人对非发酵豆制品中腐败菌的研究表明^[4-6], 引起腐败的优势菌均为芽孢杆菌属。由此可见, 非发酵豆制品中常见优势腐败菌为耐热性芽孢杆菌属, 这是因为在煮浆及热凝固过程可以杀死如假单胞菌、大肠菌群、乳杆菌、无色杆菌及致病性金黄色葡萄球菌等绝大部分主要腐败微生物, 残留的微生物主要源于点脑以后工序的二次污染^[12], 因此认为该文中的枯草芽孢杆菌来源于大豆原料。除约翰逊不动杆菌外, 该文鉴定出的片球菌属和假单胞菌属等^[4]、葡萄球菌属^[5]在已有的豆制品研究中都有报道过, 因此认为这几种细菌普遍分布在非发酵豆制品中。王恒安等^[13]报道过利用 16 S rDNA 序列及进化树分析, 从土壤中分离得到约翰逊不动杆菌。戊糖片球菌广泛存在于青贮料和谷物的浆汁中, 葡萄球菌属、不动杆菌属、假单胞菌属、片球菌属常存在于土壤和水中^[11], 由于这些细菌的不耐热特性, 在煮浆过程中很容易被杀死, 因此认为这些细菌是由煮浆后的生产过程中带入。由于豆制品的生产环境较潮湿, 容易滋生酵母菌和霉菌, 因此生产过程中, 豆制品极易污染上真菌, 因此认为鉴定出的酵母菌和霉菌来源于生产环境。

由于储存条件及生产环境的不同导致豆制品中腐败菌有所不同, 对于豆制品中腐败微生物的来源, 目前还没有一致的定论。除枯草芽孢杆菌外, 该实验初步推断出其它优势腐败菌来源于生产环节, 因此下一步将从生产环节中取样验证这些腐败菌的来源, 以期为提高豆制品生产安全性提供指导方向。

参考文献

- [1] 石彦国, 任莉. 大豆制品工艺学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1996: 13-25. (Shi Y G, Ren L. Soybean technology[M]. Beijing: China Light Industry Press, 1996: 13-25.)
- [2] 汪立平, 张庆华, 赵勇. 变质豆浆中腐败微生物的分离与初步鉴定[J]. 微生物学通报, 2007, 34(4): 621-624. (Wang L P, Zhang Q H, Zhao Y. Separation and preliminary identification of spoilage organisms in transmutative soy milk[J]. Microbiology, 2007, 34(4): 621-624.)
- [3] Fouad K E, Hegeman G D. Microbial spoilage of Tofu (soybean curd)[J]. Journal of Food Protection, 1993, 56(2): 157-164.
- [4] Tuitemwong K, Fung D Y C. Microbiological study of Tofu[J]. Journal of Food Protection, 1991, 54(13): 212-216.
- [5] 周先汉, 王亚东, 朱稀霖. 豆制品(茶干)中致腐菌的分离鉴定[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(12): 5379-5380. (Zhou X H, Wang Y D, Zhu X L. Isolation and identification of spoilage microorganisms in soybean products(dried bean curd)[J]. Anhui Agricultural Sciences, 2009, 37(12): 5379-5380.)
- [6] 王敏, 檀建新, 路玲, 等. 非发酵豆制品主要腐败菌的分离鉴定[J]. 中国酿造, 2006, 35(21): 68-70. (Wang M, Tan J X, Lu L, et al. Isolation and identification of the spoilage microorganisms in non-fermented soybean products[J]. China Brewing, 2006, 35(21): 68-70.)
- [7] 孙森, 宋俊梅, 曲静然. 豆豉后发酵过程中微生物菌相的变化[J]. 中国食品添加剂, 2008(2): 139-143. (Sun S, Song J M, Qu J R. The change of microorganisms in the later fermentation of Dou-Chi[J]. China Food Additives, 2008(2): 139-143.)
- [8] 沈萍, 范秀容, 李广武, 等. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999. (Shen P, Fan X R, Li G W, et al. Microbiology experiment[M]. Beijing: Higher Education Press, 1999.)
- [9] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001. (Dong X Z, Cai M Y. Common bacterial identification manual[M]. Beijing: Science Press, 2001.)
- [10] 魏春红, 李毅(译). 现代分子生物学实验技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006. (Wei C H, Li Y (Translated). Experimental techniques of modern molecular biology[M]. Beijing: Higher Education Press, 2006.)
- [11] 中国科学院微生物研究所编写组. 常见与常用真菌[M]. 北京: 科学出版社, 1973. (Chinese Academy of Sciences Institute of Microbiology Compilation Group. Common fungus[M]. Beijing: Science Press, 1973.)
- [12] 符克皇, 李佐雄, 高代平, 等. 延长传统非发酵豆制品保质期的研究进展[J]. 保鲜与加工, 2011, 11(1): 40-43. (Fu K H, Li Z X, Gao D P, et al. Research progress in extending the shelf-life of traditional and non-fermented soybean products[J]. Storage and Process, 2011, 11(1): 40-43.)
- [13] 王恒安, 秦磊, 成志恒, 等. 一株约翰逊不动杆菌的分离与鉴定[J]. 南京农业大学学报, 2004, 27(2): 124-139. (Wang H A, Qin L, Cheng Z H, et al. Identification of an isolate of *Acinetobacter johnsonii*[J]. Journal of Nianjing Agricultural University, 2004, 27(2): 124-139.)