

变质豆浆中腐败微生物的分离与初步鉴定*

汪立平 张庆华 赵勇** 陈有容 齐凤兰 张闻

(上海水产大学 上海 200090)

摘要: 从5种变质豆浆中分离得到3株腐败菌株 S₁、S₂ 和 S₃。3株菌均能在 1 × 10⁵ Pa、30 min 杀菌条件下和添加 300mg/kg Nisin 杀菌条件下存活。对分离菌株进行了菌落形态、生理生化特征和 16S rDNA 序列分析, 鉴定结果表明3株菌均为革兰氏阴性细菌, 分别为地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)和短芽孢杆菌(*Brevibacillus borstelensis*)。GenBank 登录号为 EF439666 ~ EF439668。

关键词: 豆浆 腐败微生物 分离 鉴定 生理生化特征 16S rDNA

中图分类号: TS214.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(2007)04-0621-04

Separation and Preliminary Identification of Spoilage Organisms in Transmutative Soy Milk*

WANG Li-Ping ZHANG Qin-Hua ZHAO Yong** CHEN You-Rong QI Feng-Lan ZHANG Wen

(Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090)

Abstract: In this paper, three spoilage organisms were separated from five transmutative soy milks, and all the three spoilage bacteria could survive condition of both 1 × 10⁵ Pa, 30min and 300mg/kg Nisin. Morphology character, physiological and biochemical characteristics, and a phylogenetic analysis based on 16S rDNA gene sequences reveal that these three strains are *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus* and *Brevibacillus borstelensis* respectively. GenBank accessions for these three strains are EF439666-EF439668.

Key words: Soy milk, Spoilage organisms, Isolation, Identification, Physiological and Biochemical Characteristics, 16S rDNA

大豆不含胆固醇,富含的优质蛋白质和脂肪占60%以上,其中的大豆皂甙、大豆磷脂、大豆异黄酮等有较强的生理活性^[1]。豆浆保留了大豆中绝大部分营养成分和生理活性物质,是深受中国百姓喜爱的饮品,但由于营养丰富,腐败微生物极易在其中生长繁殖,致使豆浆保质期较短,该问题已成为制约豆浆大规模产业化的瓶颈之一。迄今为止,有关豆浆中腐败微生物的报道甚少^[2],本研究对变质豆浆中的腐败微生物进行了分离,并研究了常用灭杀方式对腐败微生物的灭杀效果,最后对腐败微生物进行了初步鉴定,以期优化工业化豆浆的保质方法提供一定理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验用豆浆:自制豆浆;市售东北圆形小颗

粒黄豆,放入90℃水中浸泡45min。将保温后的黄豆按100g黄豆加700mL H₂O的比例分批用豆浆机榨生豆浆加热煮熟备用。市售豆浆:从易初莲花超市购买4种品牌当天生产的商品鲜豆浆。

1.1.2 培养基:营养琼脂培养基,分离细菌及测定细菌菌落总数;肉汤培养基^[3]培养腐败细菌种子;孟加拉红培养基,加入50μg/mL青霉素抑制细菌生长,分离酵母及测定酵母菌落总数;高盐察氏培养基,分离霉菌及测定霉菌菌落总数。以上培养基均购于上海市疾病预防控制中心,中国腹泻病控制上海试剂供应研究中心。

1.1.3 主要试剂:乳酸链球菌素 Nisin,生物活性1000IU/mg(丹尼斯克公司友情赠送);少量细菌组DNA抽提试剂盒 W6511 购于上海华舜生物工程公司;通用型PCR试剂盒购于鼎国生物技术公司。

*上海市教育基金会及上海科技成果转化促进会资助项目;
上海市重点学科建设资助项目(No. T1102);上海市教委青年基金项目(No. 04KC13)。

**通讯作者 Tel: 021-65710331 E-mail: yzhao@shfu.edu.cn

收稿日期: 2006-07-19, 修回日期: 2007-04-11

1.2 测定方法

1.2.1 变质豆浆中腐败微生物的分离与初步确定:

(1)市售豆浆中腐败微生物的分离方法。将未开包装的市购豆浆在 37℃ 放置约 7d 至豆浆盒鼓起得到变质豆浆。无菌状态下取出 0.2mL 变质豆浆样品适当稀释,分别在细菌、酵母、霉菌分离培养基上划线分离。(2)自制豆浆中腐败微生物的分离方法。将自制新鲜豆浆在无菌操作台上装入已灭菌的 250mL 三角瓶中,密封条件下 37℃ 放置约 7d。无菌状态下取出 0.2mL 变质豆浆样品适当稀释,分别在细菌、酵母、霉菌分离培养基上划线分离。(3)腐败细菌产生异味的感官评定方法。将分离的腐败细菌在 37℃ 肉汤培养基中培养 24h 作为种子。自制豆浆进行二次杀菌(1 × 10⁵ Pa 30min, 37℃ 培养 24h, 二次杀菌 30min, 下同),在 100mL 二次杀菌的自制豆浆中接种 1mL 腐败细菌种子,并以未杀菌的自制鲜豆浆作为对照。将接种后的豆浆及对照豆浆样品在 37℃ 培养 5d,由 10 人组成的感官评定小组评定各种腐败微生物所产生的异味。

1.2.2 豆浆中主要腐败微生物的杀灭效果研究:

(1)腐败微生物数量的测定方法。细菌数量根据菌落形态,按照 GB/T4789.2-2003《食品卫生微生物学检验菌落总数测定》^[4]进行。霉菌和酵母数量按照 GB/T 4789.15-2003《食品卫生微生物学检验霉菌和酵母数测定》^[4]进行。(2)不同杀菌方式对豆浆中主要腐败微生物的杀灭效果。分别以 37℃ 培养 24h 的肉汤培养基腐败细菌作种子,接种 1% 到二次杀菌的自制豆浆及含有 100mg/kg、150mg/kg 和 300mg/kg 乳酸链球菌素的自制豆浆中,其中接种后的不含有乳酸链球菌素自制豆浆分别在 1 × 10⁵ Pa 杀菌 15min、20min 和 30min,并以二次杀菌的自制豆浆不接种腐败细菌作为对照样品。所有样品放置于 37℃ 培养箱中,于第 35d 取样测定其中的细菌总数。

1.2.3 腐败菌的初步鉴定:生理生化实验参照文献 [5] 进行。16S rDNA 测序和系统发育分析参照文献 [6] 进行。

2 结果与讨论

2.1 豆浆中主要腐败微生物的分离与初步确定

2.1.1 主要腐败微生物的分离和部分特性比较 4 个市购鲜豆浆样品及一个自制豆浆样品在 37℃ 放置 7d 后,感官上有相似的腐败气味,按照 1.2.1 分别

分离其中的细菌、酵母、霉菌时发现,5 个样品中均有 3 种细菌存在,未检出酵母、霉菌,初步判断变质豆浆中的主要腐败微生物为 3 种细菌,分别编号为 S₁、S₂ 和 S₃,它们在营养琼脂培养基中的形态及相对数量如表 1 所示。

表 1 腐败细菌的形态及相对数量

细菌序号	形态	菌落直径 (mm)	相对数量
S ₁	表面长有白色绒毛,边缘呈不规则圆形	5	+
S ₂	白色,表面无绒毛,如同白色液滴	1~2	+++
S ₃	黄色,表面无绒毛,如同黄色液斑	20~30	++

注: + 越多说明该种细菌数量越多。

2.1.2 主要腐败微生物异味的感官评定:按照 1.2.1 中(3)方法, S₁ 细菌产生轻微的似酱油味, S₂ 细菌有浓重的酸败味,而 S₃ 细菌仅淡薄的酸败味。3 种接种单株腐败细菌的变质豆浆混合后的气味与对照豆浆样品相似,是豆浆变质时所产生的典型腐败味道,结合 2.1.1 结果可以进一步说明,该 3 种细菌是导致豆浆产生腐败味的主要微生物,其中 S₂ 细菌是使变质豆浆产生腐败味的主要微生物。

2.2 部分杀菌方式对腐败细菌的杀灭效果研究

食品杀菌是延长保质期的有效方法,通常用于食品杀菌的方法有热力杀菌技术和生物杀菌剂技术^[7-8]。本文按照 1.2.2 中(2)方法研究了该两种杀菌方式对主要腐败微生物的杀菌效果。结果表明,空白样品中没有检测到腐败细菌,接种后的样品中均能检测到与种子细菌形态相对应的细菌,即 3 株腐败细菌均能在 1 × 10⁵ Pa, 30min 杀菌条件下和添加 300mg/kg Nisin 杀菌条件下存活。接种后的样品中菌体数量如图 1 所示。

从图 1 可以看出,在 1 × 10⁵ Pa, 杀菌时间分别为 15min、20min 和 30min 的相同高温杀菌条件下,杀菌后的样品在 37℃ 放置 35d 后, S₁ 细菌样品中的菌体数量明显多于 S₂ 细菌样品,为 S₂ 样品中的 1.4 ~ 2.0 倍,而 S₂ 样品中菌体数量多于 S₃ 样品的菌体数量,为 S₃ 样品中的 1.6 ~ 1.9 倍,该结果说明在 1 × 10⁵ Pa 杀菌条件下 S₁ 细菌最难被杀灭, S₂ 细菌其次, S₃ 细菌最容易被杀灭。

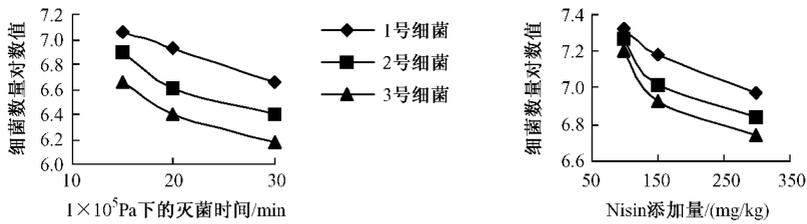


图1 不同杀菌方式对腐败细菌的杀灭效果比较

注:所有样品均在 37℃ 放置 35d。

从图 1 还可以看出,在 Nisin 添加量分别为 100mg/kg、150mg/kg、300mg/kg 的相同条件下, S_1 细菌样品中的菌体数量多于 S_2 样品,为 S_2 样品中的 1.1~1.4 倍,而 S_2 样品中菌体数量多于 S_3 样品,为 S_3 样品中的 1.1~1.3 倍,而且,这种菌体数量的差别随着 Nisin 添加量的增加而增大,当 Nisin 添加量少于 100mg/kg 时,3 株细菌被抑制的程度无明显区别, S_1 、 S_2 、 S_3 细菌菌体数量比为 1.3:1.2:1.0,当 Nisin 添加量为 150mg/kg~300mg/kg 时,3 株细菌被抑制的程度区别明显, S_1 、 S_2 、 S_3 菌体数量比为 1.7:1.3:1.0。根据该现象可以认为, S_1 细菌最耐 Nisin 抑制, S_2 细菌其次, S_3 细菌最容易被抑制。

2.3 腐败菌的鉴定

2.3.1 生理生化特征:由于 3 株腐败菌均能在 1×10^5 Pa、30min 严格杀菌条件下存活,所以该 3 株细菌可能为芽孢杆菌,本实验参照文献[5]芽孢杆菌鉴定表中规定的相关测定项目,对分离的 3 株细菌进行了生理生化特征鉴定,结果见表 2。

分析表 1 的菌落形态和表 2 的生理生化特征结果,并参考文献[5]芽孢杆菌鉴定表,可初步确定 S_1 、 S_2 和 S_3 分别为地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)和短芽孢杆菌(*Brevibacillus borstelensis*)。

2.3.2 16S rDNA 的序列分析按照 1.2.3 中(2)对 3 株腐败细菌进行了 16S rDNA 部分测序和系统发育分析,分析结果表明(图 2), S_1 (16S rDNA 测序长度为 1415 bp)是一株类似于地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis* CICC 10219(A Y786999)的细菌,与其相似性为 99.79%, S_2 (16S rDNA 测序长度为 1424 bp)是一株类似于短小芽孢杆菌 *Bacillus pumilus* JH3 (DQ232733)的细菌,与其相似性为 99.15%, S_3 (16S rDNA 测序长度为 1383 bp)是一株类似于短芽孢杆菌 *Brevibacillus borstelensis* R-16402(AJ586382)的细

菌,与其相似性高达 100%。3 株细菌的 GenBank 登录号为 EF439666~EF439668。

表 2 3 株腐败细菌的生理生化特征

	S_1	S_2	S_3
菌体			
宽度(μm)	0.6~0.8	0.6~0.7	0.73
长度(μm)	1.5~3	2~3	2.2
革兰氏反应	-	-	-
孢子一侧的易着色体	-	-	-
运动性	+	+	+
生长温度($^{\circ}\text{C}$)			
最高	55	50	45
最低	15	10	10
产酸			
阿拉伯糖和木糖	+	+	-
甘露醇	+	+	+
淀粉水解	+	-	-
生长			
0.02% 叠氮化物	-	-	-
0.001% 溶菌酶	+	+	-
7% NaCl	+	+	-
沙氏葡萄糖肉汤	+	+	+
V.P. 肉汤碱性反应	+	+	+
$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$	+	-	+
酪素分解	-	+	-
酪氨酸分解	-	-	-

注: + 阳性或能够利用, - 阴性或不能利用。

3 结论

本实验通过对 5 种变质豆浆中腐败微生物的研究得出以下结论:使豆浆变质的主要腐败微生物为 3 种革兰氏阴性细菌;对 3 种细菌所产生的腐败气味进行感官评定发现, S_2 细菌是变质豆浆产生腐

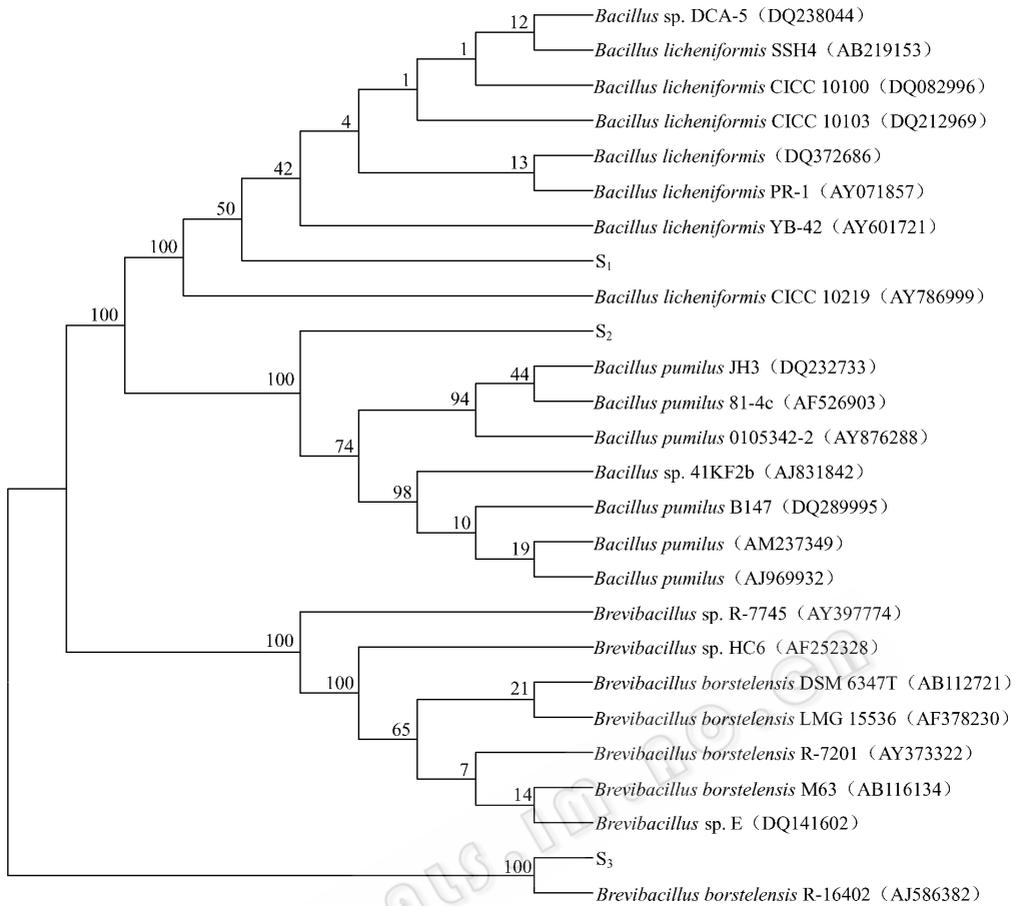


图2 腐败细菌的系统发育分析

败味的主要原因 ;比较不同杀菌方式对 3 种细菌灭杀效果 ,发现 3 株腐败细菌均能在 1×10^5 Pa、30min 杀菌条件下和添加 300mg/kg Nisin 杀菌条件下存活 ,而 S_1 细菌对被杀灭的要求最高、 S_2 细菌其次、 S_3 细菌最低 ;综合腐败细菌的菌落形态、生理生化特征、16S rDNA 序列分析 ,表明 S_1 、 S_2 和 S_3 腐败细菌分别为地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis*、短小芽孢杆菌 *Bacillus pumilus* 和短芽孢杆菌 *Brevibacillus borstelensis*。由于 3 种腐败细菌均为芽孢杆菌 ,因此与传统的一次灭菌相比 ,二次灭菌有可能使豆浆更安全。

致谢 作者衷心感谢丹尼斯克公司赠送乳酸链球菌素 Nisin 样品。

参考文献

[1]周显青. 食用豆类加工与利用. 北京:化学工业出版社,2003, pp.2~6.

[2]李 博,李里特,辰巳英三. 中国农业大学学报,2003, 8 (2):49~54.

[3]东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京:科学出版社, 2001, pp.205~207.

[4]中华人民共和国卫生部卫生监督中心卫生标准处. 中华人民共和国国家标准. 食品卫生国家标准汇编(6). 北京:中国标准出版社,2004, pp.256~266.

[5]R E 布坎南, N E 吉本斯等编. 伯杰细菌鉴定手册(第八版) [M]. 北京:科学出版社,1984 pp.729~735,746~747.

[6]杨 丽,赵宇华,张炳欣,等. 微生物学报,2005,45(6):905~909.

[7]Kwok K C, Liang H H, Niranjan K. J Agri Food Chem. 2002, 50 (17):4834~4838.

[8]刘喜荣,回九珍. 食品科学,2001,22(9):82~83.