市售臭豆腐中菌种的分离及生化鉴定

何理，吴晖
（华南理工大学轻工与食品学院，广东广州 510640）

摘要：本实验通过对市售臭豆腐发酵卤水中细菌多样性分析，分离纯化其中的各种菌株，后对其进行生化鉴定和食用安全性验证试验，从中筛选出适合安全食用的臭豆腐发酵的菌株。结果发现，市售臭豆腐卤水存在多种微生物，它们是乳酸菌（其中包括短乳杆菌、棒状乳杆菌扭曲亚种和植物乳杆菌）、芽孢杆菌（其中有巨大芽孢杆菌、环状芽孢杆菌）、假单胞菌、弧菌未知种。通过安全性试验的菌种有 4 种，分别为植物乳杆菌、假单胞菌、环状芽孢杆菌以及棒状乳杆菌扭曲亚种。

关键词：臭豆腐；菌种分离；有害微生物；食用安全性验证

文章篇号：1673-9078(2012)8-952-955

Separation and Biochemical Identification of the Strains in Commercial Fermented Stinky Tofu

HE Li, WU Hui
(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In this experiment, the strains were separated from commercial fermented stinky tofu, and their biochemical properties were identified. the appropriate safe strains were selected for production of fermentation stinky tofu. Lactic acid bacteria (including *Lactobacillus breris*, *Lactobacillus coryniformis* subsp. *Torquens* and *Lactobacillus plantarum*), *Bacillus* (including *Bacillus megaterium* and *Bacillus circulans*), *Pseudomonas* and *Vibrio* were separated from the commercial fermented stinky tofu. Among the seperated strains, only four strains (*Lactobacillus plantarum*, *Pseudomonas*, *Bacillus circulans* and *Lactobacillus coryniformis* subsp. *Torquens*) were considered as safe candidates after determination of their haemolytic exotoxin-producing or lecithase-producing capabilities

Key words: fermentation type stinky tofu; strain separation; harmful microorganism; food security test

臭豆腐具有悠久的历史，从魏代到明清时代均有大量史料记载[1]。大豆是高营养价值的蛋白资源[2]，含有人体所需要的 10 多种氨基酸，经传统发酵制成的臭豆腐因蛋白分解比较彻底而使氨基酸含量更加丰富，含有多种人体必需的氨基酸[3]，尤其是含有较多的丙氨酸，赋予了臭豆腐独特的甜味和酯香味。臭豆腐中维生素 B12 的含量居常见食品之冠[4]，对老年痴呆症有良好的预防效果。目前，人们对臭豆腐的工艺、风味、营养方面已经有了较多的研究，但是对该产品的食用安全性研究较少[5~8]。由于受臭豆腐传统生产工艺的约束和实际情况的限制，市售臭豆腐生产中安全隐患仍然存在，如：发酵过程中有害微生物的污染，发酵菌种安全性等。本实验通过对市售臭豆腐发酵卤水中细菌多样性分析，分离纯化其中的各种菌株，后对其进行生化鉴定和食用安全性验证试验，从中筛选出适合安全食用的臭豆腐发酵的菌株。

收稿日期：2012-04-05
基金项目：教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目（NECT-06-0746）
作者简介：何理（1987-），硕士生，专业为食品质量与安全
通讯作者：吴晖，教授，博士生导师，研究方向：食品安全与天然产物化学

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料

臭豆腐发酵浸泡液(俗称卤水)购自街摊炸臭豆腐小贩。

1.1.2 试剂与培养基（以下原料均为实验室提供）：

结晶紫染色液，卢哥尔氏碘液，蕃红染色液，石炭酸复红染色液，孔雀绿染色液，牛肉膏蛋白胨培养基，甘露醇卵黄多粘菌素琼脂培养基。

1.1.3 仪器设备

生化培养箱 SPX-250BS-Ⅱ，上海新苗医疗器械制造有限公司；冰箱 SIEMENS-KK287-5871，西门子博西华家用电器有限公司；电子天平 NEWJC，常州市幸运电子设备有限公司；生物显微镜 OLYMPUS，日本奥林巴斯株式会社；高压灭菌锅 BJ-3002，北京金辉盛业科技有限公司；离心机 LD5-2A，北京医用离心机厂；显微镜测微尺，国营上海医用光学仪器厂；

超净工作台 SW-CJ-2FD，瑞风净化工程有限公司。

酒精灯、接种环、培养皿、试管、吸管、三角瓶、玻璃刮铲、玻璃珠、牛皮纸、不锈钢桶、塑料桶等器具。

1.2 试验方法

1.2.1 市售臭豆腐卤水中发酵菌株的分离纯化及其菌落特征和个体形态观察

配制牛肉膏蛋白胨培养基，同时配制 9 mL 生理盐水试管若干支及 225 mL 生理盐水于 500 mL 三角瓶中加入适量玻璃珠 121 ℃，30 min 灭菌，冷却后倒置平板。用无菌操作方法吸取 25 mL 臭豆腐的发酵浸泡液，放入装有玻璃珠和 225 mL 无菌生理盐水的锥瓶中，振摇 30 min，使菌体充分分散，再用生理盐水依次稀释，从 10 倍递增稀释法至 10^{-4} 倍。然后用稀释平板混菌法分离纯化臭豆腐卤水中的发酵菌株，置于 36 ℃恒温培养 24 h，选取形态不同的单菌落进行划线培养。再次观察并对菌落形态不同的菌进行后续鉴定。

将形态不同的单菌落平皿分别编号，观察平皿上不同菌株的菌落形态特征并做及时记录与拍照。同时，以接种环从不同编号的平皿挑取形态不同的单菌落的菌体制片，作革兰氏染色和芽孢染色在 10×100 倍的显微镜(油镜)下观察，并及时记录与拍照结果。同时用测微尺随机测量 20 个菌体的大小，求出平均值。

1.2.2 菌株生化鉴别试验

按照文献所述方法进行革兰氏染色、芽孢染色、耐渗透压试验、生长温度的测定、淀粉水解试验、接触酶试验、石蕊牛奶凝固试验、明胶液化试验、过氧化酶试验、乳糖发酵产酸试验、乳糖发酵产气试验、甲基红试验、v-p 试验及硫化氢试验。

1.2.3 菌株食用安全性验证试验

将已分离纯化的不同臭豆腐发酵菌种分别接种于血平板琼脂和甘露醇卵黄多粘菌素琼脂培养基上，验证所分离纯化的臭豆腐发酵菌种是否产生溶血性毒素和毒性酶类-卵磷脂酶，即 α-毒素，同时以实验室提供的蜡样芽孢杆菌和溶血菌链球菌作对照，以剔除有可能产生有害毒素的微生物菌株。

2 结果及分析

2.1 臭豆腐发酵菌株菌落特征和个体形态特征观察结果

表 1 和表 2 分别显示了 20 个随机菌落的菌落特征和菌体形态。

2.2 臭豆腐发酵卤水中发酵菌株的生化鉴定结果

取 ST1、ST2、ST3、ST5、ST8、ST13、ST14、ST17、ST18 及 ST20 菌株做生化鉴定试验，其结果见表 3，表中“+”为阳性，“-”为阴性。

表 1 菌落特征

Table 1 Colony morphology characteristics

菌号	菌落形态特征
ST1	乳白色圆型菌落,菌落较大,表面湿润,边缘整齐,中间凸起,透明状
ST2	灰白色菌落,菌落较大,表面干燥,边缘不整齐,菌面平整,不透明
ST3	无色圆型菌落,菌落较小,表面湿润,边缘整齐,中间凸起,透明状
ST4	白色圆型菌落,菌落较大,表面湿润,边缘整齐,菌面平整较薄,不透明
ST5	乳白色圆型菌落,菌落较大,表面湿润,边缘整齐,中间凸起,透明状
ST6	无色不定型菌落,菌落较大,表面湿润,边缘整齐,中间凸起,透明状
ST7	乳白色圆型菌落,菌落较大,不定型,中间凸起,透明状
ST8	灰白色圆型菌落,菌落较小,表面干燥,边缘整齐,菌面平整,不透明
ST9	乳白色圆型菌落,菌落较大,表面湿润,边缘整齐,中间凸起,不透明
ST10	灰白色不定型菌落,表面湿润,边缘整齐,中间凹陷,不透明
ST11	米黄色不定型菌落,菌落较小,表面干燥,菌面平整,不透明
ST12	白色圆型菌落,菌落较大,表面湿润,边缘整齐,菌面平整较薄,不透明
ST13	白色圆型菌落,菌落较小,表面湿润,边缘整齐,中间凸起,不透明
ST14	白色圆型菌落,菌落较小,表面湿润,边缘整齐,中间凸起,不透明
ST15	白色圆型菌落,菌落较大,表面湿润,边缘整齐,菌面平整较薄,不透明
ST16	白色圆型菌落,菌落较大,表面湿润,边缘整齐,菌面平台状,不透明
ST17	无色圆型菌落,菌落较大,表面湿润,边缘整齐,中间凸起,不透明
ST18	米黄色不定型菌落,菌落较小,表面干燥,边缘不整齐,菌面平整,不透明
ST19	米黄色不定型菌落,菌落较小,表面干燥,边缘整齐,菌面平整,不透明
ST20	棕红色圆型菌落,菌落较小,表面湿润,边缘整齐,中间凸起,不透明。

表 2 菌体形态

Table 2 Mycelium morphological characteristics

菌种号	革兰氏染色	菌体大小/μm	菌体形状及排列方式	芽孢着生位置	孢囊是否膨大
ST1	G-	1.8×1.2	短小杆菌,分散排列	无	否
ST2	G+	7.8×1.3	长杆菌,链状排列	无	否
ST3	G-	1.8×1.2	短小杆菌,分散排列	无	否
ST4	G-	2.2×1.0	短小杆菌,分散排列	无	否
ST5	G+	7.5×1.3	短小芽孢杆菌,分散排列	中间或顶端	是
ST6	G-	3.0×0.8	短小杆菌,分散排列	无	否
ST7	G-	2.6×1.0	短小杆菌,分散排列	无	否
ST8	G-	3.0×1.0	短小弧菌,分散排列	无	否
ST9	G-	2.2×1.0	短小杆菌,分散排列	无	否
ST10	G-	3.0×1.0	短小弧菌,分散排列	无	否
ST11	G-	4.6×1.0	杆菌,分散排列	无	否
ST12	G-	1.8×1.2	短小杆菌,分散排列	无	否
ST13	G-	5.5×1.0	杆菌,分散排列	无	否
ST14	G-	1.8×1.0	短小杆菌,分散排列	无	否
ST15	G-	3.5×1.0	杆菌,分散排列	无	否
ST16	G-	3.2×1.0	杆菌,分散排列	无	否
ST17	G-	3.2×1.0	杆菌,分散排列	无	否
ST18	G-	3.2×1.0	杆菌,分散排列	无	否
ST19	G+	2.6×1.3	巨大芽孢杆菌,分散排列	中间	否
ST20	G-	3.0×1.3	棒状杆菌,分散排列	无	否

根据表 2~3，归类重复菌落得出从市售臭豆腐发酵卤水中分离培养出了若干种菌种：1 号革兰氏阴性菌未知种、2 号植物乳杆菌、3 号假单胞菌、5 号环状芽孢杆菌、8 号浮菌未知种、13 号短乳杆菌、14 号革兰氏阴性菌未知种、17 号革兰氏阴性菌未知种、19 号巨大芽孢杆菌、20 号棒状乳杆菌扭曲亚种，图 1~10。

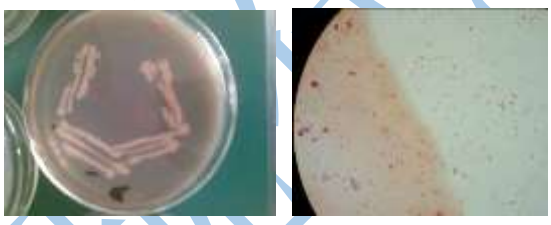


图 1 1 号菌菌落特征和个体形态

Fig.1 Colony and morphology of the strain 1#



图 2 2 号菌菌落特征和个体形态

Fig.2 Colony and morphology of the strain 2#

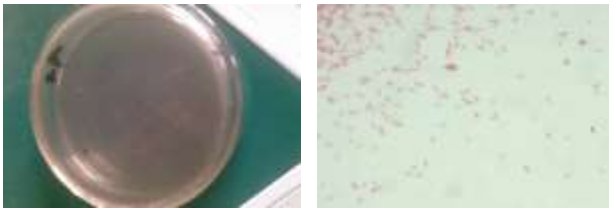


图 3 3 号菌菌落特征和个体形态

Fig.3 Colony and morphology of the strain 3#



图 4 5 号菌菌落特征和个体形态

Fig.4 Colony and morphology of the strain 5#

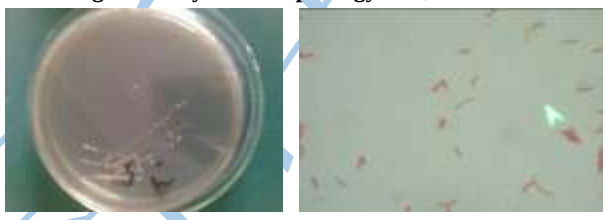


图 5 8 号菌菌落特征和个体形态

Fig.5 Colony and morphology of the strain 8#



图 6 13 号菌菌落特征和个体形态

Fig.6 Colony and morphology of the strain 13#

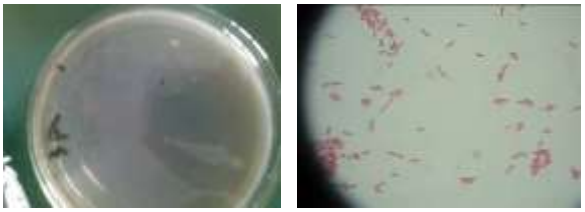


图 7 14 号菌菌落特征和个体形态

Fig.7 Colony and morphology of the strain 14#

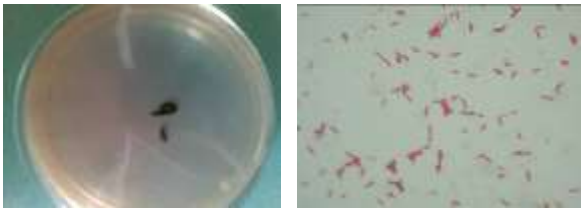


图 8 17 号菌菌落特征和个体形态

Fig.8 Colony and morphology of the strain 17#

表 3 臭豆腐发酵菌株生化鉴定结果

Table 3 Biochemical properties of the strains from fermented stinky tofu

菌号	ST1	ST2	ST3	ST5	ST8	ST13	ST14	ST17	ST19	ST20
革兰氏染色	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+
芽孢染色	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
5% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7.5% NaCl	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-
10% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
12.5% NaCl	-	-	-	-	-	-		-	+	-
15% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	—	+	-
4 ℃	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
20 ℃	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
37 ℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
55 ℃	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
淀粉水解	+	-	-	+	-	-	+	+	-	--
接触酶试验	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
石蕊牛奶凝固	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
明胶液化	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
过氧化酶试验	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
乳糖发酵产酸	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+
乳糖发酵产气	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
甲基红试验	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
v-p 试验	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-
H_2S 试验	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-

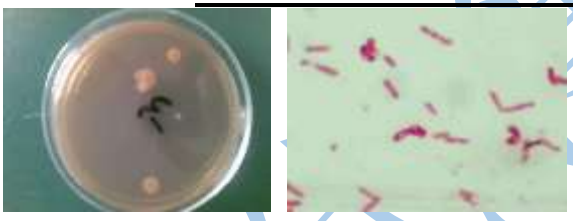


图 9 19 号菌菌落特征和个体形态

Fig.9 Colony and morphology of the strain 19#



图 10 20 号菌菌落特征和个体形态

Fig.10 Colony and morphology of the strain 20#

2.3 市售发酵型臭豆腐卤水中菌株的胞外毒性实验

将编号 ST1、ST2、ST3、ST5、ST8、ST13、ST14、ST17、ST19 及 ST20 菌株分别接种于血平板琼脂和甘露醇卵黄多粘菌素琼脂培养基上，验证所分离纯化的臭豆腐发酵菌种是否产生溶血性毒素和毒性酶类-卵磷脂酶，同时以实验室提供的蜡样芽孢杆菌和溶血菌链球菌作对照，以剔除有可能产生有害毒素的微生物菌株，其结果见表 4，表中“+”为阳性，“-”为阴性。根据表 4 可知：ST2、ST3、ST5、ST20 菌株未产生溶血性毒素和毒性酶类-卵磷脂酶，拟选用于臭豆腐安全性生产发酵的发酵菌株。

表 4 发酵型臭豆腐卤水中菌株溶血性及卵磷脂酶能力比较

Table 4 The haemolytic exotoxin-producing or lecithase-producing capabilities of the separated strains from fermented stinky tofu

菌株	溶血性	卵磷脂酶
ST1	-	+
ST2	-	-
ST3	-	-
ST5	-	-
ST8	+	+
ST13	+	-
ST14	-	+
ST17	-	+
ST19	+	-
ST20	-	-
蜡样芽孢杆菌	+	+
溶血菌链球菌	+	+

3 结论

通过对臭豆腐发酵卤水中细菌多样性分析可知，臭豆腐传统敞口发酵卤水中菌相复杂多样，甚至存在某些致病菌。虽然，由于受多种发酵细菌相互制约、相互影响的作用这些致病菌在发酵卤水中无法形成优势菌种，但仍存在对人体不安全的因素。发酵臭豆腐卤水中存在着乳酸菌：有短乳杆菌、棒状乳杆菌扭曲亚种和植物乳杆菌；芽孢杆菌，其中有巨大芽孢杆菌、环状芽孢杆菌；假单胞菌；弧菌未知种。对菌株的食用安全性验证试验表明 ST2 植物乳杆菌、ST3 假单胞菌、ST5 环状芽孢杆菌及 ST20 棒状乳杆菌扭曲亚种未产生溶血性毒素和毒性酶类-卵磷脂酶，可选用于食用安全性臭豆腐安生产发酵的发酵菌株。

参考文献

[1] 赵玉莲.大豆发酵食品—豆腐乳[J].江苏调味副食品,1997,4:11-14

[2] 李幼筠.腐乳是科学利用大豆的优质食品[J].中国酿造,1997,4:1-2

[3] 马勇.青方腐乳酿造技术研究[J].中国调味品,1996,4:21-23

[4] 郭华,廖兴华,周建平,等.臭豆腐菌种分离鉴定与酿造工艺研究[J].食品科学,2004,4:109-115

[5] Ayhan F. The effect of fermentation parameters on the production of Mucor mieheiacid protease in a chemically defined medium [J]. Chem Technol Biotechno1, 2001, 76: 153-160

[6] Yin Li-jun, Li Li-te, Eizo Tatsumi, et a1. Changes in isoflavone contents and comp - osition of sufu (fermented tofu) during manufacturing [J]. Food Chemistry, 2004, 87: 589-592

[7] Han Beizhong, Frans M R, Robert M J, et a1. Chinese fermented soybean food [J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 65: 1-10

[8] Han Beizhong, Frans M R, Robert M J. Amino acid profiles of sufu, a Chinese ferme- nted soybean food [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2004, 17: 689-698

现代食品科技