

# 变质豆浆中腐败微生物的分离及其灭杀条件研究<sup>\*</sup>

汪立平 陈有容 齐凤兰

(上海水产大学食品学院, 上海 200090)

**摘要** 对5种变质豆浆中的腐败微生物进行了分离,并对所分离的腐败微生物进行了感官实验,发现变质豆浆中的主要腐败微生物是三株细菌,而酵母、霉菌未检出。以二次灭菌的豆浆为培养基,通过正交实验确定了三株细菌中的最难杀灭细菌的有效灭菌方法:121℃下灭菌30min,同时添加300mg/kg Nisin,该灭菌条件可使豆浆在37℃下贮存30天时细菌菌落未检出,但继续贮存至45天时,细菌菌落数超过100 cfu/mL。

**关键词** 豆浆;腐败微生物;正交实验;灭菌方法

**中图分类号** T S214.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2006)03-0254-05

豆浆是豆制品的主要形式之一,它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。但是由于豆浆营养丰富,腐败微生物极易在其中生长繁殖,致使豆浆保质期较短,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<sup>[3]</sup>,本研究对变质豆浆中的腐败微生物进行了初步分离,并试图以杀灭所分离腐败菌中最难杀灭的一株腐败微生物为研究对象,确定鲜豆浆的较好杀菌方式,以期为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:市售东北黄豆(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:700mL水的比例分批用豆浆机榨得生豆浆。将生豆浆于锅中加热煮沸备用,为防止“假沸”现象,需将豆浆煮沸三次为煮熟。

市售豆浆:从超市购买4种品牌当天生产的商品鲜豆浆,依次编号为1号豆浆、2号豆浆、3号豆

浆、4号豆浆。

#### 1.1.2 培养基

营养琼脂培养基(试剂盒),分离细菌及测定细菌菌落总数。肉汤培养基<sup>[4]</sup>培养腐败细菌种子。孟加拉红培养基(试剂盒),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(现配),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 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。

### 1.2 测定方法

#### 1.2.1 变质豆浆中腐败微生物的分离方法

##### A. 市售豆浆中腐败微生物的分离方法

将未开包装的市购1、2、3、4号豆浆,在37℃恒温箱内放置约7d,直至豆浆盒鼓起得到变质豆浆。在无菌状态下,取出0.2mL变质豆浆样品适当稀释,分别在细菌、酵母、霉菌分离培养基上进行划线分离。

##### B. 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杀菌的

<sup>\*</sup> 收稿日期:2006-02-27

基金项目: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(T1102)

作者简介:汪立平(1968-),女,博士,主要从事豆制品、饮料酒的科学和技术研究。E-mail:lpwang@shfu.edu.cn

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。

250mL 三角瓶中, 密封条件下, 在 37℃恒温箱内放置约 7 d, 使其变质。在无菌状态下, 取出 0. 2mL 变质豆浆样品适当稀释, 分别在细菌、酵母、霉菌分离培养基上进行划线分离。

1. 2. 2 革兰氏染色

按照常见细菌系统鉴定手册执行<sup>[4]</sup>。

1. 2. 3 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》<sup>[5]</sup> 执行。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》<sup>[5]</sup> 执行。

1. 2. 4 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, 121℃, 30min, 37℃培养 24h, 121℃二次杀菌 30min。在 100mL 二次杀菌的自制豆浆中接种 1. 0mL 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℃条件下培养 5d, 使其变质, 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. 5 腐败微生物灭杀条件的确定

首先, 以 37℃培养的 24h 肉汤培养基腐败细菌作为种子, 接种 1%至二次杀菌的自制豆浆, 自制豆浆二次杀菌的方法同 1. 2. 4; 然后, 以 121℃条件下的灭菌时间、Nisin 添加量两个因素三水平对接种后的豆浆样品进行正交实验<sup>[6]</sup>, 所有样品在 37℃条件下培养, 分别于第 5、15、30、45d 测定样品中腐败微生物的数量, 从而确定腐败微生物的灭杀条件。正交实验中, 灭菌时间分别为 15min、20min 和 30min, Nisin 在豆浆中的最终浓度分别为 100 mg/kg、150mg/kg 和 300mg/kg, 对照样品为未接种腐败细菌的二次灭菌豆浆。

2 结果与分析

2. 1 豆浆中主要腐败微生物初步确定

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 1 个自制豆浆样品在 37℃恒温箱内放置 7d 后, 感官上有相似的腐败气味, 按照 2. 2. 1 分别检测其中的细菌、酵母、霉菌数量发现, 5 个样品中均有三种细菌存在, 而酵母、霉菌未检出, 由此可以初步判断变质豆浆中的主要腐败微生物为三种细菌。这三种细菌在营养琼脂培养

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

Table 1 Morpha and relative amount of putrid bacteria in transmutative soy milk

细菌序号 Strain No.	菌落形态 Colony morpha	菌落直径 Colony diameter (mm)	相对数量 Relative amount
1	表面长有白色绒毛, 边缘呈不规则圆形	5	+
2	白色, 表面无绒毛, 如同白色液滴	1 – 2	+++
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。  
Note: the more "+", the more amount of flora.

革兰氏染色结果表明, 三种细菌均为革兰氏阴性菌。

2. 1. 2 主要腐败微生物异味的感官评定

按照 1. 2. 3 方法, 1 号细菌产生轻微的似酱油味, 2 号细菌有浓重的酸败味, 而 3 号细菌仅淡薄的酸败味。将三种接种单株腐败细菌的变质豆浆混合后, 气味与对照豆浆样品相似, 形成了豆浆变质时所产生的典型腐败味道, 由此结合 2. 1. 1 结果可以进一步说明, 该三种细菌是导致豆浆产生腐败味的主要微生物, 其中 2 号细菌是使变质豆浆产生腐败味的主要微生物。

2. 2 腐败微生物的灭杀条件研究

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、臭氧杀菌技术、辐照杀菌技术、远红外线杀菌技术、紫外线杀菌技术、磁力杀菌技术、高压电场脉冲杀菌技术、超声波杀菌技术、脉冲强光杀菌技术、超高压杀菌技术、过滤除菌技术、生物杀菌剂技术, 其中热力杀菌是应用较广泛的杀菌技术<sup>[7、8]</sup>, 而生物杀菌剂技术由于安全、使食品营养成分损失少, 正在成为人们新的研究热点, 并有巨大的应用潜力<sup>[9、10]</sup>。因此, 本文研究了该两种杀菌方式对主要腐败微生物的杀菌效果, 预备实验表明, 以 1. 2. 4 方法制备的二次杀菌豆浆为培养基, 分别接种 1%2. 1. 1 分离的三株腐败细菌, 然后在 121℃条件下的分别灭菌 15min、20min 和 30min, 或者在培养基中分别添加 100 mg/kg、150mg/kg 和 300mg/kgNisin, 放入 37℃恒温培养箱中培养 35d 时, 在所有样品中均能检测出与种子菌落形态相一致的细菌, 且 1 号细菌数量明显多于 2 号、3 号细菌, 高达  $4.5 \times 10^6 - 2.1 \times 10^7$ cfu/mL, 远超过我国规定的 GB16322 – 2003 植物蛋白饮料卫生标准<sup>[5]</sup>, 该标准规定保质期内植物蛋白饮料菌落总数应小于等于 100cfu/mL。该项实验结果表

表 2  $L_9(3^2)$  正交试验因素水平表

Table 2 The factors and levels of the $L_9(3^2)$ orthogonal experiment		
水平 Level	灭菌时间 Sterilization time 121 °C( min)	Nisin 浓度 Nisin concentration ( mg /kg)
1	15	100
2	20	150
3	30	300

明,一次高温杀菌及添加 Nisin 的单一杀菌方式均不能有效杀灭豆浆中的腐败细菌,变质豆浆中常见腐败细菌中的 1 号细菌最难以被灭杀,因此,本实验

表 3 1 号腐败细菌对豆浆保质期的影响

Table 3 Effect of putrid bacterium No. 1 on the validity of soy milk					
实验号 Sample No.	灭菌时间 Sterilization time 121 °C( min)	Nisin 浓度 Nisin concentration ( mg /kg)	第 5 天菌落总数 Colony amount on the 5th day ( cfu/mL)	第 15 天菌落总数 Colony amount on the 15th day ( cfu/mL)	第 30 天菌落总数 Colony amount on the 30th day ( cfu/mL)
1	15	100	202	481	837
2	15	150	78	124	496
3	15	300	31	62	450
4	20	100	93	140	140
5	20	150	31	47	155
6	20	300	16	31	62
7	30	100	/	/	/
8	30	150	/	/	/
9	30	300	/	/	/
对照 Control	/	/	/	/	/

注: 1. 培养温度为 37℃; 2 “/”表示未检测出细菌。  
Note: 1. Cultivation temperature was 37℃; 2. “/”indicated no bacterium strain was detected.

根据我国 GB16322 – 2003 植物蛋白饮料卫生标准<sup>[5]</sup>, 保质期内植物蛋白饮料菌落总数应小于等于 100cfu/mL。从表 3 的试验结果来看, 对照样品在整个贮存过程中未检出细菌, 在 37℃贮存 5d 时, 所有样品中仅 1 号样品中细菌总数超过 100cfu/mL, 达到 202cfu/mL, 4 号样品中细菌总数接近 100cfu/mL, 达到 93cfu/mL, 而 7、8、9 号样品中没有检测出细菌, 该现象说明, 样品灭菌 15min 以上、Nisin 添加量 150 mg/kg 以上, 可使豆浆保质期达到 5d, 样品灭菌 30min 以上、Nisin 添加量 100mg/kg 以上, 在 37℃条件下的 5d 内, 1 号细菌可以被完全抑制; 从表 3 还可以看出, 样品在 37℃贮存 15d 时, 1、2、4 号中细菌总数超过 100cfu/mL, 分别达到 481、124、140cfu/mL, 3、5、6 号中细菌总数少于 100cfu/mL, 分别为 62、47、31cfu/mL, 而 7、8、9 号样品中仍然没有检测出细菌; 样品在 37℃贮存 30d 时,

以 1 号细菌为对象, 设计正交实验进一步研究一次高温杀菌和添加 Nisin 复合因素对豆浆中腐败细菌的杀灭效果, 具体操作按 1. 2. 5、表 2 进行, 实验结果如表 3、表 4 所示。

2. 2. 1 豆浆中 1 号腐败细菌对豆浆保质期的影响

为了研究 1 号腐败细菌对豆浆保质期的影响, 按照 1. 2. 5, 本实验跟踪测定了正交实验样品中各种杀菌方式对 1 号腐败细菌的杀菌效果, 测定了所有样品放置在 37℃恒温箱内第 5d、15d 和 30d 中的细菌数量。结果如表 3 所示。

9 个样品中已有 1 ~ 5 号 5 个样品中细菌总数超过 100cfu/mL, 细菌总数依次达到 837、496、450、140、155cfu/mL, 6 号样品中细菌总数仍然少于 100cfu/mL, 为 62cfu/mL, 而 7、8、9 号样品中仍然没有检测出细菌。表 3 说明, 通过同时控制一次 121℃高温杀菌时间及添加 Ninsin 浓度, 可将 37℃下不同贮存期豆浆中的 1 号腐败细菌数量控制在 100cfu/mL 以下, 从而使豆浆的保质期分别达到在 5、15、30d 及 30d 以上。

2. 2. 2 豆浆中 1 号腐败细菌杀灭方式的优化

为了优化 1 号腐败细菌杀灭方式, 从而优化豆浆的杀菌方式, 按照 1. 2. 5, 将进行正交实验的样品在 37℃条件下贮存 45d, 测定其中的细菌总数, 得到表 4 的实验结果。

从表 4 可以看出, 含 1 号腐败细菌的样品经过表 2 的各种灭菌方式, 在 37℃恒温箱中放置

45d 后, 其中的 1 号腐败细菌数量为  $1.6 \times 10^3 \sim 6.4 \times 10^6$  cfu /mL, 均超过 100cfu/mL, 说明 1. 2. 5 正交

表 4 正交实验结果

Table 4 The results of the orthogonal experiment

实验号 Sample No.	灭菌时间 Sterilization time 121℃ (min)	Nisin 浓度 Nisin concentration (mg /kg)	菌落总数 M Colony amount M (cfu /mL)	M 对数值 M Logarithm (Log10M)
1	15	100	$6.4 \times 10^6$	6.80
2	15	150	$5.7 \times 10^6$	6.76
3	15	300	$5.0 \times 10^6$	6.70
4	20	100	$2.5 \times 10^6$	6.39
5	20	150	$2.0 \times 10^6$	6.30
6	20	300	$1.9 \times 10^6$	6.27
7	30	100	$7.8 \times 10^3$	3.89
8	30	150	$3.1 \times 10^3$	3.49
9	30	300	$1.6 \times 10^3$	3.19
对照 Control	/	/	/	/
I 之和 SUM I	18.73	15.56	/	/
II 之和 SUM II	17.44	15.03	/	/
III之和 SUM III	9.05	14.63	/	/
极差 R	9.69	0.93	/	/

注: 1. 培养温度为 37℃; 2. “/”表示未检测出细菌。  
Note: 1. Cultivation temperature was 37℃; 2. “/”indicated no bacterium strain was detected.

实验的所有杀菌方式均不能保证豆浆在 37℃下的保质期达到 45d<sup>[3]</sup>, 但 121℃灭菌 30min、Nisin 浓度 300mg /kg 是 1 号腐败细菌最佳杀灭方式。

从表 4 还可以看出, 灭菌时间和 Nisin 添加量的极差 R 分别为 9.69、0.93, 说明在灭菌时间和 Nisin 浓度两因素中, 灭菌时间是影响 1 号腐败细菌被杀灭效果的主要因素, Nisin 添加量是次要因素, 这可

能是因为 1 号腐败细菌是革兰氏阴性菌, 而 Nisin 仅对革兰氏阳性菌有较强的抑制作用。

根据表 4 描绘正交实验结果的因素趋势图, 可以直观地看出正交实验中两种因素水平是否需要延伸继续进行试验, 正交实验结果表 4 对应的因素趋势图如图 1 所示。

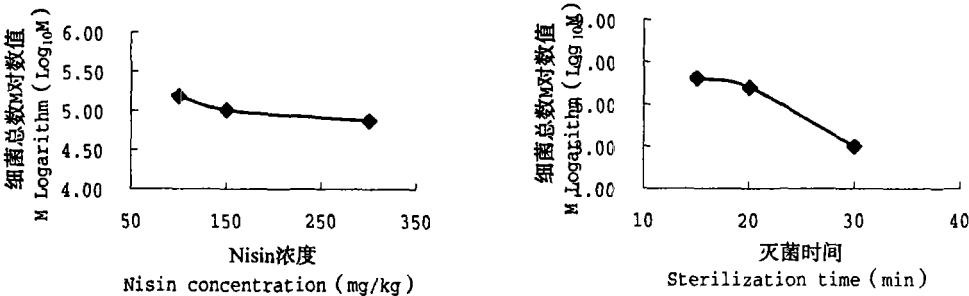


图 1 121℃下灭菌时间及 Nisin 浓度因素趋势图

Fig. 1 Trend chart of sterilization time under 121℃ and Nisin concentration of orthogonal experiment

从图 1 可以看出, 灭菌时间从 15min 增加到 30min, Nisin 浓度从 100mg /kg 增加到 300mg /kg 时, 样品中细菌数量均增多, 但与增长灭菌时间相比, 随着 Nisin 浓度的增加, 样品中细菌数量增多量较少, 如果希望再进一步降低样品中细菌数量, 可取灭菌时间高于 30min, Nisin 浓度高于 300mg /kg 继

续实验, 但增长灭菌时间将比增加 Nisin 浓度更有效。

3 结论

本试验通过对 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三种细菌,未检出酵母和霉菌,其中,三种细菌均为革兰氏阴性菌;对三种细菌所产生的腐败气味进行感官评定发现,2号细菌是变质豆浆产生酸败味的主要原因。对最难被121℃高温灭菌杀灭及最难被Nisin抑制的1号细菌研究表明,该细菌的杀灭效果受灭菌时间和Nisin添加量的影响,其中灭菌时间的影响大于Nisin添加量,121℃灭菌30min,并且添加300mg/kg可使该细菌在豆浆中37℃下被抑制30d,但不能超过45d。

为了优化工业化豆浆的保质方法,降低规模化生产豆浆的成本,同时尽可能多地保留豆浆中的营养成分,需要对所分离的腐败细菌进行鉴定,并研究它们在豆浆中的生理生化特性,本研究小组的下一阶段应尝试利用分子生物学手段快速、准确地鉴定所本次实验所分离的腐败细菌,并进一步改进杀灭这些细菌的杀菌方式。

## 参 考 文 献

- 1 周显青.食用豆类加工与利用[M].北京:化学工业出版社,2003,2-6.
- 2 国家食物与营养咨询委员会科技部.大豆产业最新动态与大豆行动计划[M].北京:中国科学技术出版社,2000,9-10.
- 3 李博,李里特,辰巳英三,等.豆腐(豆浆)中屎肠球菌生长的温度预测模型[J].中国农业大学学报,2003,8(2):49-54.
- 4 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001,205-207.
- 5 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)[S].北京:中国标准出版社,2004,256-266.
- 6 吴有炜.试验设计与数据处理[M].江苏:苏州大学出版社,2002:27-31.
- 7 Kwok K C, Liang H H, Niranjana K. Optimizing conditions for thermal process of soy milk[J]. J Agri Food Chem., 2002, 50(17): 4834-4838.
- 8 Gandhi N R, Hackbarth H R, Manxiang C. Soy protein containing imitation dairy compositions and methods of making[P]. US 6984409, 2004.
- 9 刘喜荣,回九珍. Nisin在延长豆奶保质期方面的研究[J]. 食品科学, 2001, 22(9): 82-83.
- 10 曹阳,查思辉,富春江,等.乳酸链球菌素在鲜奶中的应用[J]. 饮料工业, 2004, 7(2): 8-10.

## RESEARCH ON SEPARATION AND STERILIZATION CONDITION OF PUTRID MICROORGANISMS IN TRANSMUTATIVE SOY MILK

Wang Liping Chen Yourong Qi Fenlan

(College of Food Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090)

**Abstract** In this paper, putrid microorganisms were separated from five transmutative commercial soy milk samples. The result indicated that putrid microorganism were mainly consisted of three bacteria, no yeast and mould were detected. With re-sterilized soy milk as medium, by means of  $L_9(3^2)$  orthogonal experiment, sterilization condition for the strongest capacity strain of the three separated bacteria was determined: 121℃ for 30min, 300mg/kg Nisin. With the determined sterilization method, when soy milk stored for 30 days under 37℃, no bacterium was detected, but the amount of bacterium exceeded 100 cfu/mL on the 45th day.

**Key words** Soy milk; Putrid microorganism; Orthogonal experiment; Sterilization condition

(上接第253页)

nodule number reach a maximum at  $16\mu\text{mol/L P}$ . These suggested that nitrate inhibited soybean nodulation so that nitrogen fixed decreased. Therefore, nitrogen concentration of plant in nitrate treatment decreased with P further increased, but that of nitrogen fixation is opposite. The ration of N and P in roots of nitrogen fixation treatment had a significant relationship,  $r = -0.5816^*$ , but that of nitrate treatment was not correlated.

**Key words** Phosphorus; Nitrogen; Nodulation; Soybean