

微生物在大豆籽粒中的分布及其对豆制品加工的影响

柳 玉, 郭顺堂

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要 针对豆制品实际加工过程中大豆中微生物洗不掉、除不去的问题进行了分析, 采用表面消毒法和减压辅助消毒后大豆中细菌的检出率和细菌总数的测定证明了细菌主要附着于大豆籽粒最外层的柱状细胞以及外皮的气孔内部, 而大豆子叶内部未检测到细菌的存在; 并参照实际生产中的水洗和脱皮进一步说明了细菌与大豆柱状细胞的结合力较强且加工过程中易产生交叉污染, 因此很难通过水洗和脱皮除去, 最后通过组织分离培养法从大豆表皮中分离出了可能导致豆制品腐败的微生物并与豆浆中腐败菌进行了形态学方面的观察和比较, 确定了原料中携带的造成豆制品腐败的主要微生物为芽孢杆菌。

关键词 大豆; 微生物; 分布; 腐败

中图分类号 TS 214.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)04-0578-05

DISTRIBUTION OF MICROORGANISM IN SOYBEAN GRAIN AND ITS EFFECTS ON THE PROCESS OF SOYBEAN PRODUCTS

LIU Yu, GUO Shun-tang

(Food Science and Nutritional Engineering College of China Agricultural University, Beijing, 100083)

Abstract Considering the problem that the microorganism could not be washed off during the industrial process of soybean products, this study focused on the distribution of microorganism in soybean grain. By using the surface and the vacuum degasification sterilization, measuring the soybean bacterial detection rate and the total bacterial numbers, it was demonstrated that the bacterial mainly attached on the outside surface of the soybean grain as well as the blowhole, at the same time the endophytic bacterial failed to be detected in the soybean cotyledon. After cleaning and dehulling according to the method of industrial process, it showed that the binding force of the microorganism with the soybean surface was apparent. And the study also revealed that the microorganism causing spoilage of soybean products is mainly the spore bacillus which exists in surface of the raw soybean.

Key words Soybean; Microorganism; Distribution; Spoilage

以大豆为原料制作的豆制品以其具有的高营养、低胆固醇等特点而深受广大消费者的喜爱。但长期以

收稿日期: 2007-04-28

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)(2006AA102328)

作者简介: 柳玉(1982-), 男, 硕士研究生, 研究方向为蛋白质加工与利用。

通讯作者: 郭顺堂, 教授, 博士生导师。E-mail: shuntang@cau.edu.cn

来,豆制品保质期短、卫生条件难以控制一直是困扰豆制品研究者和制约豆制品行业发展的难题。

我国豆制品厂使用的大豆原料是直接收获后未加特殊处理的,因此大豆原料中携带大量的土壤微生物,数量和种类几乎不可计数^[1]。在豆制品加工过程中,加热煮浆能杀死大部分微生物,但加热过度会使豆乳粘度升高,使之与凝固剂不能很好混合而得不到应有硬度的凝固物^[2]。加热后残存的微生物会随其后的加工环节进入终产品中,因此原料中的初始菌数以及加热方式直接影响着豆制品的卫生安全与货架期。

日本学者^[2]利用扫描电镜观察了大豆种皮表面的微观形态并指出,印象中平坦光滑的大豆表面放大后到处是坑坑凹凹,这个凹陷的深度一直延伸到表皮栅状细胞的底部,但没有到达子叶,这个凹槽就是常被称为气孔的结构。就目前的研究来看,还无人对微生物在大豆中的分布部位、结合特性及其对豆制品生产的影响做过研究。

以表面消毒后的大豆中微生物的检出率以及稀释平板计数的方法分析微生物在大豆中的分布及其对清洗、脱皮等加工步骤的影响,并采用组织分离培养及稀释划线分离法分离出了原料大豆中存在的可能导致豆制品腐败的微生物并进行了形态学上的描述,以期对豆制品的加工和卫生控制提供可参考的依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验材料 吉林 30 号大豆采集地点:吉林省公主岭市,土壤类型:薄层黑土。

1.1.2 主要试剂 营养琼脂培养基(试剂盒),分离细菌及测定细菌总数。其他试剂均为分析纯。

1.1.3 主要实验仪器 千分之一电子天平(GF-300,ND,JAPAN);循环水真空泵(SHI-Ⅲ,上海亚荣生化仪器厂);水浴恒温磁力搅拌器(SHJ-A,金坛市华峰仪器有限公司);电热手提压力蒸汽灭菌器(SYQ.DSX-280,上海申安医疗器械厂);超净工作台(VD-650,苏州净化设备有限公司);Philip 搅拌机(HR2860,珠海飞利浦家用电器有限公司);恒温培养箱(HZQ-100,哈尔滨东联电子技术开发有限公司);光学显微镜(XSZ-G,重庆光学仪器厂)。

1.2 实验方 法

1.2.1 不同消毒方式处理后大豆中细菌检出率的测定

(A)大豆原料中细菌检出率的测定参考《粮油食品微生物学检验》微生物分析技术中所述的方法^[4],在无菌操作台中用灼烧后冷凉的镊子取原料大豆均匀地点植于营养琼脂平板表面,并微压使大豆紧附营养琼脂平板,每 90 mm 平皿点植 10 粒。将点植好的平板置于 37℃ 的恒温培养箱中,48 h 后观察样品周围长出菌落的大豆粒数。按如下所述的公式计算样品的检出率:

$$\text{细菌检出率} = \frac{\text{检出菌落的粒数}}{\text{种植培养的总粒数}} \times 100\%$$

实验重复 3 次,取 3 次重复的平均值作为样品中细菌的检出率。

(B)次氯酸钠和升汞消毒后大豆中细菌检出率的测定 将粮粒放入盛有 1%(w/w)次氯酸钠溶液的小三角瓶中,浸泡处理 3 min,然后在灭菌的生理盐水中洗涤 3 次,再用无菌水冲洗 7 遍;

将粮粒放入盛有 0.1%(w/w)升汞溶液的小三角瓶中,浸泡处理 3 min,然后在灭菌的生理盐水中洗涤 3 次,再用无菌水冲洗 7 遍。

按(A)中所述方法及计算公式分别检测次氯酸钠和升汞消毒处理后大豆中细菌的检出率。

(C)减压辅助消毒后大豆中细菌检出率的测定 次氯酸钠及升汞的消毒浓度与(B)中相同,消毒过程中将三角瓶转移至连有真空泵的干燥皿内进行抽真空,当真空表显示的真空压达到 0.09 MPa 时开始计时,处理时间均为 3 min,测定减压辅助消毒后样品中细菌的检出率。

(D)大豆内部组织中带菌率的测定 将预先经升汞消毒并清洗后的大豆用无菌手术剪刀剪碎,用小镊子取大豆的子叶组织点植于营养琼脂平板表面,测定大豆子叶中的带菌率。

1.2.2 不同消毒方式处理后大豆中细菌总数的测定 称取 10 g 大豆 4 份按 1.2.1 中的方法分别进行消毒处理,将消毒后的大豆与 90 mL 无菌生理盐水一同置于 Philip 搅拌机中打碎制成样品悬液,将悬液按梯度稀释法制成不同浓度,按 GB/T4789.2-2003《食品卫生微生物学检测菌落总数测定》^[5]测定不同消毒法处理后大豆中的细菌总数。

1.2.3 大豆清洗及去皮后大豆中细菌及芽孢总数的测定

(A)大豆原料一次清洗及干法脱皮后细菌及芽孢总数的测定一次清洗:将 10 g 大豆原料用 90 mL 无菌水振荡清洗 3 遍;干法脱皮:以止血钳固定住大豆,以刀片和尖头小镊子剥除大豆表皮。按 1.2.2 中方法将上述样品制成不同浓度的样品悬液并检测其中的细菌及芽孢总数,其中芽孢总数的测定参照原料奶中芽孢总数的测定方法^[6]。

(B)浸泡后大豆二次清洗及湿法脱皮后细菌及芽孢总数的测定大豆浸泡:将 10 g 大豆经(A)中方法进行清洗后,转移至盛有 30 mL 无菌水的小三角瓶中密封于 25℃ 恒温培养箱内浸泡 12 h;二次清洗:将浸泡后的大豆以 90 mL 无菌水清洗 3 遍;湿法脱皮:将经过二次清洗的大豆用无菌纱布吸去余水,用小镊子剥除表皮。以上获得的样品经打碎制成样品悬液并稀释成不同梯度后测定其中细菌和芽孢总数。

1.2.4 大豆原料中及不同加工处理后腐败微生物的分离与形态学观察参考方中达^[7]著作中所述方法分别取大豆表皮和子叶,采用营养琼脂进行组织中细菌的分离。不同加工处理后腐败菌的分离:将经过一次清洗、干法脱皮、二次清洗和湿法脱皮后的大豆分别用 90 mL 无菌水打碎制成的样品液密封于 250 mL 三角瓶中,在沸水浴中加热,样品中心温度超过 90℃ 保持 10 min(以装有 90 mL 水的三角瓶作为温度对照),加热后的样品迅速冷却后置于 37℃ 恒温培养箱内培养 24 h 使不同样品液发生腐败,采用稀释涂布和划线分离纯化其中的腐败菌。

菌落形态描述参考《食品微生物学实验技术》^[8]。革兰氏染色参照《常见细菌系统鉴定手册》^[9]。芽孢染色参照改良的 Schaeffer 和 Fulton 氏染色法^[10]。

1.2.5 数据处理 所有数据导入 Microsoft office excel 2003,细菌及芽孢总数进行以 10 为底对数处理,单位表示为 $\log \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$,最终结果以均值±标准偏差($\bar{X} \pm \text{SD}$)表示,差异性采用单因素方差分析进行比较。

2 结果与分析

2.1 微生物在大豆籽粒中的分布情况

2.1.1 微生物在大豆籽粒中的分布部位 检出率常用来评价粮粒受微生物污染的程度,而经不同消毒方式处理后粮粒的检出率则可以反映出微生物

在粮粒中的分布部位情况。经不同试剂及辅助方法消毒后大豆中细菌检出率呈现出一定的差异,结果见表 1。

表 1 不同消毒方式处理后大豆中细菌的检出率

Table 1 Bacterial detection rate of soybean by different sterilization treatment

处理方式 Treatment	点植数 Planted number	检出数 Detected number	平均带菌率(%) Average bacterial detection rate	差异显著性 Differential significance
原粮(CK)	30	30	100	a
次氯酸钠	30	17	56.67	b
升汞	30	82	6.67	c
次氯酸钠+ 真空脱气	30	3	13.33	d
升汞+真空脱气	30	2	16.67	d
内部组织	30	0	0	d

注:差异显著性中不同的字母代表有显著性差异($P < 0.05$)。

Note: Different letters indicate significant difference.

从表 1 中的数据可以看出,未经任何处理的 30 粒大豆周围均有菌落生长,带菌率为 100%。经 1% 的次氯酸钠和 0.1% 升汞消毒后,尽管检出率有了显著性的降低,但从其平均带菌率(次氯酸钠处理后为 56.67%、升汞处理后为 26.67%)来看,尽管升汞溶液的杀菌效果显著强于次氯酸钠溶液($P < 0.05$),但两者的带菌率仍然较高,说明仍有部分微生物存在于大豆中,即使经过强杀菌剂升汞的处理这些微生物仍然存在。经减压脱气辅助杀菌后的大豆中细菌的检出率均较低,且次氯酸钠和升汞间无显著性差异,说明借助真空脱气产生的负压,杀菌剂能进入大豆表皮的气孔中并杀死存在于其中的微生物。尽管有国外学者^[11]从不同生长期的大豆中分离出了大豆内生菌,通过 16S rDNA 扩增序列分析归类为假单胞菌和肠杆菌并研究了两种内生菌对大豆生长的促进作用,但此次在公主岭市收获的吉林 30 号大豆的籽粒中并未分离到内生菌,内部组织的检出率为 0,可认为在吉林 30 大豆子叶中无细菌栖息。

2.1.2 微生物在大豆籽粒中的分布量分析 菌落总数可以直接评价微生物在大豆籽粒中分布量的情况,经不同杀菌处理方式后大豆中的细菌总数结果见表 2。结果表明次氯酸钠消毒处理与升汞消毒处理显示了显著的差异性,这与两种杀菌剂不同的杀菌机理及杀菌效率有关。在真空脱气结合升汞杀菌的大豆中, 10^{-1} 的样品悬液在营养琼脂平板中

未有菌落生长,说明0.1%的升汞溶液达到了杀灭大豆中微生物的理想效果,因此微生物在大豆中的分布量以升汞溶液处理后的样品为分析对象。未经负压辅助的升汞不能进入大豆的气孔中,因此未经负压辅助杀菌后大豆中的细菌总数即为存在于大豆气孔中的细菌总数。在本次实验选取的吉林30大豆中,表皮和气孔中总的细菌数量的对数值为6.72,而存在于大豆气孔中的细菌总量的对数值为4.32,大豆皮层内部未检测到细菌存在。

表2 不同消毒方式处理后大豆中的细菌总数

Table 2 Total bacterial numbers of soybean by different sterilization treatment

处理方式 Treatment	细菌总数(log cfu · g ⁻¹) Total bacterial numbers	差异显著性 Differential significance
原粮(CK)	6.72±0.04	a
次氯酸钠	5.62±0.12	b
升汞	4.32±0.07	c
次氯酸钠+真空脱气	3.83±0.04	d
升汞+真空脱气	—	—

注:表中“—”表示未检出。

Note: “—” indicate no bacterial strain was detected.

2.2 微生物在大豆籽粒中的分布对不同加工环节中微生物指标的影响

在豆制品的加工过程中,需要对大豆进行清洗以除去原料中携带的泥土等杂质,而在豆奶加工过程中还需要对大豆进行脱皮处理以实现豆奶较好的色泽。那么,微生物在这些加工环节中会发生何种变化呢,表3显示了大豆前处理过程中一次清洗和干法脱皮后的微生物变化情况。

表3 一次清洗及干法脱皮后大豆中细菌及芽孢总数

Table 3 Total bacterial and spore number count of soybean after the first cleaning and dry-dehulling

处理方式 Treatment	细菌总数(log cfu · g ⁻¹) Total bacterial number	芽孢总数(log cfu · g ⁻¹) Total spore number
原粮(CK)	6.72±0.04	a1.26±0.24a
一次清洗	6.48±0.07	b1.30±0.30a
干法脱皮	6.16±0.03 c	1.16±0.28a

由表3中数据可以看出,尽管经过3遍无菌水的振荡清洗,大豆中的菌落总数有了显著性降低($P < 0.01$),但下降程度仅为0.24个对数单位,此结果说明除存在于气孔中的微生物难于除去外,附于大豆表皮最上层的柱状细胞中的微生物结合能力也较强,通过

单纯的水洗很难将其除去,工厂清洗过程中加入去污剂可能会对表面菌的去除有一定的帮助。经干法脱皮的大豆中细菌含量也呈现了很高的水平,细菌总数对数值为6.16,结合前部分的数据(子叶内部无细菌检出)可以认为,尽管本次实验中剥皮用的镊子和小刀每次都经过灼烧杀菌,但仍避免不了种皮对大豆子叶的污染,工厂中一般采用闪蒸法进行干法脱皮,交叉污染的可能性会更大。从表3中数据还可以看出,原料大豆中芽孢总数含量较低且在一次清洗和干法脱皮过程中也不会发生显著性的变化。

表4 二次清洗及湿法脱皮对大豆中细菌芽孢总数

Table 4 Total bacterial and spore number of soybean after the second cleaning and wet-dehulling

加工方式 Treatment	细菌总数/log cfu · g ⁻¹) Total bacterial number	芽孢总数/log cfu · g ⁻¹) Total spore number
浸泡后大豆(CK)	7.16±0.03 a	1.30±0.43a
二次清洗	7.13±0.04 a	1.39±0.12a
湿法脱皮	7.12±0.06 a	1.15±0.21a

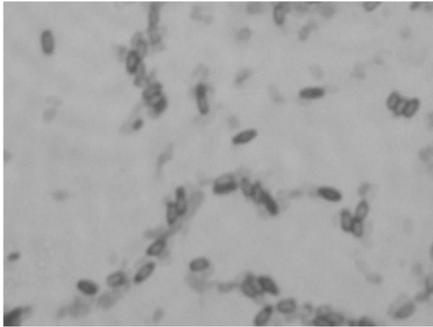
在豆制品加工过程中,浸泡的主要目的是使大豆中的细胞吸水膨胀,进而在磨浆的过程中提高蛋白的溶出率,而二次清洗的目的在于除去一次清洗过程中未能除去而在浸泡过程中溶出的部分杂质,湿法脱皮是为了让豆制品获得更好的色泽及口感。本实验以25℃恒温密封浸泡大豆的方法模拟了工厂常采用的常温浸泡大豆,从表4中反映的结果可以看出,浸泡后的大豆中细菌总数上升至7.16个对数单位,比一次清洗后上升了0.68个对数单位,工厂若能采用低温浸泡大豆的方法可以在一定程度上降低浸泡过程中微生物的增长。实验过程中发现浸泡大豆的水较为混浊,混浊物除溶出的部分色素外主要为泥土等杂质,经过二次清洗,第3遍的洗豆水变得澄清,但经过二次清洗的大豆中的细菌和芽孢数量均未发生显著的变化。湿法脱皮前后细菌和芽孢数量也未发生显著性变化。由于在浸泡过程中,大豆表皮能使水分子透过,但细菌却不能穿过皮层到达子叶中,因此可以说明大豆表皮中的微生物仍牢牢附着于大豆表皮的柱状细胞中经二次清洗也不能将其除去,而湿法脱皮的大豆中的微生物则主要来源于脱皮过程中的交叉污染。

2.3 大豆表皮及腐败豆浆中主要微生物的形态特征观察与比较

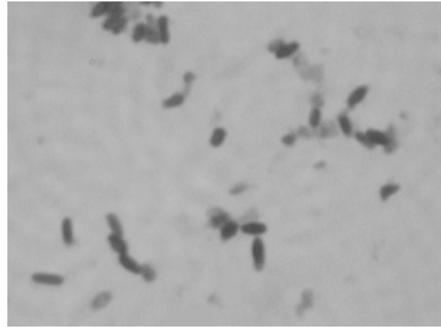
根据菌落形态和染色形态不同,从大豆的表皮

中分离得到了6株细菌,从经不同加工处理37℃密封保存24h自然腐败的豆浆中分离出了1株菌,并对分离的7株细菌进行了菌落形态、革兰氏染色以及其中的疑似芽孢杆菌进行了芽孢染色的观察与比较,发现从表皮中分离的其中一株菌无论从菌落形

态、革兰氏染色菌体形态、芽孢及着生位置均与豆浆中分离的腐败菌相同,其染色形态见图1。豆浆中腐败菌为革兰氏阳性杆菌、产芽孢,来自于大豆原料的表皮中,简单的清洗和脱皮并不能除这些芽孢杆菌而防止豆制品发生腐败。



(a) 腐败菌革兰氏染色形态(×100)
Gram Stained stained morpha of spoilag



(b) 腐败菌芽孢染色形态(×100)
Spore Stained stained morpha of spoilage bacterial

图1 腐败菌染色形态

Fig. 1 Stained morpha of spoilage bacterial

3 结论

3.1 经对吉林30号大豆籽粒中细菌分布部位的分析结果得出,细菌主要存在于大豆籽粒种皮的外表面以及气孔中,子叶中无细菌栖息。其中外表面细菌总数约为6.72个对数单位,气孔中的细菌总数约为4.32个对数单位。

3.2 细菌在大豆表皮的柱状细胞上附着力较强,豆制品加工过程中对原料大豆和浸泡过的大豆进行水洗很难将其除去,而不仅是干法还是湿法脱皮交叉污染都较为严重,很难起到减少大豆中微生物的目的。

3.3 原料中携带的能造成豆制品腐败变质的微生物为芽孢杆菌,主要存在于大豆的表皮中,水洗和脱皮均不能将其除去。

致谢:感谢吉林省农业科学院大豆研究中心王曙明老师提供吉林30号大豆。

参 考 文 献

[1] 谈志新. 我国豆制品安全卫生质量评价[J]. 食品研究与开

发,2002,23(4):79.

[2] 渡边笃二. 豆腐的科学[M]. 北京:中国食品工业协会豆制品专业委员会,2006:19,54.

[3] 中国标准汇编. GB 2711—2003. 非发酵性豆制品及面筋卫生标准[S]. 北京:中国标准出版社,2003

[4] 项琦,万慕麟,周建新. 粮油食品微生物学检验[M]. 北京:中国轻工业出版社,2001:123—125.

[5] 中国标准汇编. GB 4789—2003. 食品卫生检验方法[S]. 北京:中国标准出版社,2003:256—266.

[6] 惠艺. 原料奶中芽孢总数、耐热芽孢数的测定[J]. 中国乳品工业,1998,26(1):36.

[7] 方中达. 植物研究法(第3版)[M]. 北京:农业出版社,1990:123.

[8] 牛天贵. 食品微生物学实验技术[M]. 北京:中国农业大学出版社,2002:36—37.

[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,2001:205—207.

[10] 赵斌,何绍江. 微生物学实验[M]. 北京:科学出版社,2002:42—43.

[11] Kuklinsky—Sobral, J. Araujo, W. L. Mendes, R. et al. Isolation and characterization of soybean—associated bacteria and their potential for plant growth promotion[J]. Environmental Microbiology. 2004, 6(12):1244—1251.