



无凝固剂乳酸菌发酵豆腐贮藏稳定性研究

乔支红¹, 许荣华¹, 朱莉¹, 朱运平²

(1. 北京联合大学 旅游学院, 北京 100101; 2. 北京工商大学 食品与健康学院/北京市食品添加剂工程技术研究中心, 北京 100083)

摘要:为了探究乳酸菌发酵对新型无凝固剂发酵豆腐贮藏过程的影响规律及其机制, 本研究以卤水豆腐为对照, 对比分析两种豆腐在不同贮藏温度条件下微生物、色泽、pH 等指标变化, 通过流式细胞仪分析乳酸对豆腐腐败菌膜电位的影响, 探讨乳酸菌发酵豆腐具有较长保质期的机制。结果表明: 无凝固剂乳酸菌发酵豆腐在 4、10 和 25 °C 可分别贮藏 14、5 和 2 d, 均比卤水豆腐相应延长 2 d 左右; 10 °C 贮藏过程中, 其乳酸菌及芽孢菌数明显低于对照, pH、颜色变化均慢于对照; 无凝固剂乳酸菌发酵豆腐在制作过程中的脑花及成型产品中的芽孢菌数明显低于对照, 豆腐的有机酸尤其是乳酸的含量是对照的 3 倍; 乳酸对屎肠球菌膜电位的影响较大, 可延缓屎肠球菌的生长繁殖。

关键词: 乳酸菌发酵豆腐; 无凝固剂; 贮藏稳定性; 腐败微生物; 有机酸; 膜电位

Research on Storage Stability of Coagulant-Free Tofu Based on Lactic Acid Bacteria Fermentation

QIAO Zhi-hong¹, XU Rong-hua¹, ZHU Li¹, ZHU Yun-ping²

(1. Tourism College, Beijing Union University, Beijing 100101, China; 2. School of Food and Health, Beijing Technology and Business University/Beijing Engineering and Technology Research Center of Food Additives, Beijing 100083, China)

Abstract: In order to investigate the influence and its mechanism of lactic acid bacteria fermentation on the new type of coagulant-free fermented tofu during storage, this study used brine bean curd as a control to compare and analyze the changes of microorganism, color, pH and other indexes of the two kinds of bean curd at different storage temperatures. The influence of lactic acid on the membrane potential of spoilage bacteria of bean curd was analyzed by flow cytometry, and the mechanism of long shelf life of fermented bean curd by lactic acid bacteria was discussed. The results showed that the fermented bean curd by lactic acid bacteria could be stored at 4, 10 and 25 °C for 14, 5 and 2 d, respectively, which were about 2 d longer than that of brine bean curd. During storage at 10 °C, the number of lactic acid bacteria and spore were significantly lower than that of the control, and the change of pH and color were slower than that of the control. The number of spore in the brain and molded products of bean curd without coagulant were significantly lower than that of the control, and the content of organic acids, especially lactic acid in bean curd was 3 times than that of the control. Lactic acid has a great influence on the membrane potential of *Enterococcus faecium*, and can delay the growth and reproduction of *Enterococcus faecium*.

Keywords: Fermented tofu by lactic acid bacteria; Coagulation-free; Storage stability; Spoilage microorganism; Organic acid; Membrane potential

随着人们生活水平的提高, 消费者对于食品的要求早已从饱腹转向了较高营养性及安全性的要求, 因此, 营养价值高且绿色健康的食品受到极大青睐。经过大量的研究实践, 乳酸菌及其生理功能已逐渐被人们熟知, 其应用极其广泛, 已被公认为安全绿色的食品添加剂^[1], 乳酸菌发酵产品也越来越受到人们的喜爱。发酵技术是一种具有悠久历史的食品加工防腐方法。它主要是依靠有益微生物发酵产生的具有抑菌特性的生物活性成分有效抑制食品中腐败微生物的生长。乳酸菌的防腐保鲜特性早已经研究证实, 且被认为是保护性发酵剂^[2-3], 对其延长食品保质期和保证食品安全方面的研究及应用较多, 如乳制品^[4]、果蔬菜制品^[5]、焙

烤制品^[6]、肉制品^[7]及豆浆^[8]。

豆腐以大豆为原料加工制作而成, 含有丰富的营养成分及生理功能成分, 是植物食品中的“精品”, 深受全世界消费者的喜爱。然而, 豆腐是易腐食品, 其全球流通极大受限。于是, 有研究者尝试以豆腐作为乳酸菌的载体, 研制新型发酵豆腐, 如 Wang 等^[9]以保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌为豆浆发酵剂, 添加了食用胶、可溶性淀粉, 探索新型乳酸菌发酵豆腐的工艺参数。在探索乳酸菌发酵豆腐工艺的基础上, 也有研究者探索了乳酸菌在豆腐防腐保鲜方面的作用。Chen 等^[10]在灭菌豆浆中添加了 1 株产细菌素的希腊魏斯氏菌 D1501, 结合 MTG (微生物谷胺酰胺转氨酶) 研制出一种新型的活性

收稿日期: 2021-05-16

基金项目: 国家自然科学基金(31771960); 人才培养质量建设——一流专业建设—食品科学与工程(19002020119); 科技服务创新能力建设项目(122139918290104223)。

第一作者: 乔支红(1976—), 女, 博士, 讲师, 主要从事大豆加工理论与应用研究。E-mail: qiaozhihong@ buu. edu. cn。

通讯作者: 朱运平(1980—), 女, 博士, 教授, 主要从事食品生物技术研究。E-mail: zhuyup@ th. btbu. edu. cn。

乳酸菌豆腐,且发现其可有效延长豆腐的保质期。Diana 等^[11]以干酪乳杆菌和嗜酸乳杆菌为豆浆发酵剂,以盐卤为凝固剂,研制了一种新型的乳酸菌发酵豆腐,发现乳酸菌可通过产生乙酸、柠檬烯及苯甲醇等物质抑制腐败菌,从而延长豆腐保质期。

近年来有关引起豆腐腐败微生物的研究较多,有研究表明,引起豆腐腐败变质的微生物存在多样性,其腐败菌属的多样性与生产场所、贮藏温度、品种及制作方法均有一定的相关性,但多数研究表明,引起豆腐腐败变质的微生物主要有芽孢杆菌属和乳酸杆菌属^[12-14]。另外,豆腐发生腐败变质时,首先是发酸,进而发黏、发臭,因此,酸味最能代表豆腐贮藏过程中新鲜度的变化,除此之外就是豆腐的颜色。有关食品腐败变质的速率除与食品中初始菌浓度有关外,还与食品本身的基质有关。多数研究表明有机酸能抑制食品腐败菌的生长,如姜春新等^[15]研究发现柠檬酸和乙酸对致腐假单胞菌生物被膜有一定的影响作用,从而抑制假单胞菌的生长。目前有关腐败菌、致病菌抑制机理的研究多数通过观察抑制剂对微生物膜电位的影响而揭示^[16]。膜电位是微生物细胞膜内外两边的电位差,它是反映菌体细胞代谢和生命活力的重要指标,作为质子动力学的元素之一,对 ATP 的产生及细胞功能具有重要意义^[17]。具有完整细胞质膜的代谢活性细菌的细胞膜上有典型的电势差异。DiOC₂(3) (3,3'-Diethyloxacarbocyanine Iodide) 是一种膜电位探针,可通过流式细胞仪检测,根据发射波长荧光信号比来分析细菌活力,其检测细菌活力的原理是 DiOC₂(3) 在所有细菌细胞内发绿色荧光,由于更高的膜电位引起染料分子发生自聚作用,使得染料的荧光往红色发射波长处迁移,红色荧光强度增高,此时红色/绿色荧光信号比高,若细胞膜电位破坏,会导致红色荧光强度降低,此时红色/绿色荧光信号比降低。

本课题前期利用酸浆中筛选到的融合魏斯氏菌 S15 (*Weissella confusa*),在不添加任何凝固剂的情况下,通过对发酵豆浆进行适当的二次加热,成功获得一种基于乳酸菌发酵的新型无凝固剂发酵豆腐^[18]。本研究以卤水豆腐为对照,选择了豆腐生产加工、运输及销售过程中所处的 3 个常见温度 (25, 10 和 4 ℃),模拟盒装北豆腐包装工艺,观察两种豆腐细菌菌落总数随着贮藏时间延长的变化情况,根据菌落总数的变化预测豆腐的保质期,进而反映豆腐的贮藏性。由于豆腐销售过程中,常放置于 10 ℃ 左右的冷藏货架上销售,因此,本研究选用 10 ℃ 贮藏温度,详细研究在此温度贮藏时两种豆腐中乳酸菌数和芽孢菌数、感官色泽及 pH 的变化,旨在分析

发酵豆腐销售状态下的贮藏性。同时,通过研究两种豆腐的有机酸含量及生产过程中芽孢菌数和乳酸菌数的变化、乳酸对豆腐腐败菌(屎肠球菌、蜡样芽孢杆菌)膜电位的影响,初步探讨乳酸菌发酵豆腐保质期长的机理,旨为进一步推进新型乳酸菌发酵豆腐的实际生产及生物防腐保鲜技术在豆腐保鲜上的应用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆(中黄 13),购于北京农业科学院谷物研究所,常温贮藏。氯化镁(MgCl₂·6H₂O)购于北京二商希杰食品有限责任公司;三氯乙酸(TCA)、氢氧化钠(NaOH)、磷酸氢二钠(Na₂HPO₄)、柠檬酸等均为分析纯,购于北京化学试剂公司;乳酸(L-lactic acid),食用级,购于河南星汉生物科技有限公司;MRS 乳酸菌培养基、营养琼脂培养基,购于北京陆桥技术有限责任公司;DiOC₂(3) (3,3'-diethyloxacarbocyanine iodide) 购自美国 Sigma-Aldrich 试剂公司(St. Louis Mo, USA);EDTA-二钠和二甲基亚砷(dimethylsulphoxide, DMSO),均为分析纯,购自北京化学试剂公司。

1.2 主要仪器与设备

FSM-100 分离式磨浆机,沈阳市第三机械制造有限公司;通电加热设备,日本 Frontier Engineering 公司;BK-41 循环恒温水浴锅,日本 Yamato 公司;101A 电热鼓风干燥箱,上海市实验仪器总厂;YMQ. L31. 4000 高压灭菌锅,北京将台医疗设备厂;无菌操作台,北京半导体设备一厂;F-23 pH 计,日本堀场制作所;SK-M 均质机,日本协力理工;HPS-250 低温培养箱,哈尔滨市东明医疗仪器厂;CR300 色彩色差计,日本 MINOLTA;756MC 紫外分光光度计,上海分析仪器厂;TCL-16C 台式离心机,上海安亭仪器厂;流式细胞仪,美国 BD 公司。

1.3 方法

1.3.1 豆浆发酵剂制备 融合魏斯氏菌 S15 活化:用无菌吸管吸取 4 mL 配制好的 MRS 液体培养基于试管中,塞好棉塞,121 ℃、20 min 灭菌;冷却至 37 ℃,以无菌方式接种甘油保存菌种;在 37 ℃ 保温培养 24 h;以 2% 的接种量接入新的灭菌 MRS 液体培养基中,37 ℃ 培养 12 h,调整菌液浓度至 1.0 × 10⁷ CFU·mL⁻¹ (OD₆₀₀ = 1.0)。以 2% 的接种量接入 4 mL 灭菌豆浆中,豆浆中菌浓度为 8.0 × 10⁵ CFU·mL⁻¹,于 37 ℃ 保温培养 12 h,连续培养 2 次,用作种子发酵剂。

扩大培养:将已活化好的试管菌种以无菌操作方式按 2% 的接种量接入装有 100 mL 的灭菌豆浆

的三角瓶中,放入恒温培养箱中培养 12 h 后豆浆凝固。取出放入 0~5℃ 的冰箱中以备用。

1.3.2 豆腐制备 豆浆制备:将原料进行精选、除杂后,准确称取 500 g 大豆,清洗后用相当于大豆(重量比)3 倍的自来水于室温(25~28℃)浸泡 8~10 h;沥干后,用相当于大豆干重 8 倍的自来水于离心磨浆机中进行磨浆,将所得豆浆用 120 目滤布过滤得生豆浆,然后用通电加热设备,以 $1.81\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$ 的加热速率将生豆浆加热至 95℃,保持 5 min,得熟豆浆,备用。分别检测生豆浆和熟豆浆中乳酸菌数及芽孢菌数。

卤水豆腐制备:量取 1 000 mL 熟豆浆于不锈钢盆中,冷却到 80℃,将盆放入 80℃ 的恒温水浴中,然后将 30 mL $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化镁溶液缓慢加入熟豆浆中,并轻轻搅拌,直至豆浆凝固物出现,保温静置 20 min 后破脑压制。用 $11\text{ cm}\times 7\text{ cm}\times 6\text{ cm}$ ($L\times W\times H$)的底部与四周有孔的塑料敞口容器(内铺有纱布作为豆腐包布)作为成型盒,然后用 2.6 kg 方形铁块压制 15 min,即得卤水豆腐。将豆腐迅速放于超净台中,以备微生物分析用。分别取破脑前的凝固物及成型后的豆腐用于检测乳酸菌数及芽孢菌数。成型后的豆腐一部分用于检测有机酸含量,一部分用于贮藏试验。

无凝固剂发酵豆腐:量取 1 000 mL 刚加热好的熟豆浆于灭菌的 1 000 mL 大三角瓶中,立即用无菌封口膜封口;将三角瓶放于冷水盆中冷却至 37℃ 左右,于超净台中以无菌操作方式按 2% 的接种量将扩大培养好的豆浆发酵剂接入冷却豆浆中,于 37℃ 恒温培养箱中培养 3~6 h;取出三角瓶,将发酵豆浆倒入通电加热设备中,95℃ 加热 5 min;将加热好的豆浆凝固物按照卤水豆腐的压制成型方法压制,即得无凝固剂发酵豆腐。分别检测发酵豆浆、通电加热后的豆浆凝固物及成型豆腐的乳酸菌数及芽孢菌数。成型后的豆腐一部分用于检测有机酸含量,一部分用于贮藏试验。

1.3.3 豆腐贮藏试验 两种豆腐分别按照各自的生产工艺制备 3 块,每一块分切成 3 份,分别装于无菌大烧杯中,大烧杯中加入无菌水直至淹没豆腐,烧杯用保鲜膜封口(模拟盒装北豆腐),各样品以 3 份为一组分别放于 25、10 和 4℃ 冰箱贮藏。每天取样 1 次,检测豆腐样品的细菌菌落总数、乳酸菌数及芽孢菌数,共检测 9 d;每隔 1 d 取样 1 次,检测豆腐样品的 pH、颜色,共检测 7 次。

1.4 测定项目与方法

1.4.1 细菌总数、乳酸菌数及芽孢菌数 参照 GB4789.2-2016^[19]方法检测细菌菌落总数。

参照 GB4789.35-2016 方法^[20]检测乳酸菌数。

芽孢菌数检测方法:取 2.0 g 豆腐及 1 mL 浸泡水用无菌研钵研碎,然后加入无菌生理盐水进行适当稀释,将稀释好的样品液于 80℃ 水浴 10 min,取 0.1 mL 处理液涂布于营养琼脂,于 37℃ 培养 24 h 后计数。每个样品 3 个稀释度,每个稀释度 3 个平行。结果均以 $\text{Log CFU}\cdot\text{g}^{-1}$ 计算。

1.4.2 pH 准确称取 5 g 豆腐样品,加入 25 mL 去离子水,然后于高速均质机均质后直接用 pH 计测定 pH^[21]。每个样品测定 3 次,取平均值。

1.4.3 豆腐颜色 采用色彩色差计测定豆腐的颜色。L(0 表示黑色;100 表示白色),值越大表示颜色越亮;a(+a 表示红色;-a 表示绿色);b(+b 表示黄色;-b 表示兰色)。测定之前,仪器用 $L=97.30$, $a=0.04$ 和 $b=1.65$ 标准板进行校正。每个样品测定 3 个点,取平均值。

1.4.4 有机酸含量 准确称取 1.000 g 豆腐冻干粉,加入 5 mL 无水乙醇,于 35℃ 水浴振荡提取 30 min, $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,取出上清并将其中的无水乙醇于 60℃ 水浴挥发掉,再于残渣中加入 1 mL 流动相[1% 乙腈- $0.02\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸氢二铵(pH2.7)],用 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤,滤液用于 HPLC 检测。

HPLC 检测:柱子为 C_{18} 色谱柱($25\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$,Dikma 公司)。液相分析条件:流动相,1% 乙腈- $0.02\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸氢二铵(pH2.7);流速, $0.4\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;柱温,30℃;检测波长,214 nm;上样量,10 μL 。

1.4.5 腐败菌膜电位 参照 Novo 等方法^[22],将蜡样芽孢杆菌、屎肠球菌在 37℃ 培养至对数后期,稀释一定倍数,加入不同浓度乳酸溶液,使初始菌数为 $1.0\times 10^6\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。设置不加乳酸的空白对照组。所有样品在 37℃ 下培养 1 h,吸取 1 mL 样品于 1.5 mL 离心管内, $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,去除上清液,菌体用含 $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MEDTA- Na^{2+} 的 PBS 缓冲液重悬。在每个离心管内加入 10 μL $3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $\text{DiOC}_2(3)$ (用 DMSO 配置),常温下染色,30 min 内上机检测。

$\text{DiOC}_2(3)$ 在 488 nm 下被激发,绿色荧光通过 20 nm 带宽、530 nm 波段的滤光器进行检测,红色荧光通过 19 nm 带宽、610 nm 波段的滤光器进行检测。

结果判断:用 Cellquest 软件分析数据,求出不同浓度乳酸溶液处理样品所对应的荧光强度,通过各样品的 $\text{DiOC}_2(3)$ 红色与绿色荧光的比率进行评价。

1.5 数据分析

所有试验均重复 3 次,采用 SPSS 17.0 进行数

据统计,数值以均值 ± 标准差表示,以标准差标注误差线。

2 结果与分析

2.1 豆腐贮藏过程中的特性分析

2.1.1 不同贮藏温度下豆腐中菌落总数的变化
如图 1 所示,3 个温度下两种豆腐的贮藏时间明显不同($P < 0.001$)。低温贮藏时,随着贮藏时间的延长,豆腐中菌落总数增长速度较慢,保质期相对较长。卤水豆腐在 4 ℃ 贮藏 12 d 左右,菌落总数达 1.0×10^6 CFU·g⁻¹;而发酵豆腐相比卤水豆腐贮藏延长 2 d 后,即贮藏 14 d 左右菌落总数达到 1.0×10^6 CFU·g⁻¹。本研究根据广东省食品安全地方标准 (DBS 44/006-2016)^[23],非预包装即食食品中的第三类食品菌落总数限量探讨发酵豆腐的贮藏性。若食品中菌落总数 ≤ 1.0×10^6 CFU·g⁻¹,食品卫生

状况是满意的,意味着食品的贮藏性较好,保质期较长;若食品中菌落总数 ≥ 1.0×10^7 CFU·g⁻¹,食品卫生状况是不合格的,意味着食品的贮藏性不好,且保质期也较短;若食品中菌落总数处于两者之间,食品卫生状况虽不能满意,但尚可接受,保质期相对较短。研究结果显示,高温贮藏时,豆腐贮藏期显著缩短,卤水豆腐在 10 ℃ 贮藏 3 d 左右,其菌落总数达食品卫生状况满意最大限 1.0×10^6 CFU·g⁻¹,而发酵豆腐相比卤水豆腐贮藏延长 2 d,即 5 d 左右时达到食品卫生状况满意最大限;贮藏温度为 25 ℃ 时,卤水豆腐贮藏 1 d 时,菌落总数即达到食品卫生状况不合格最低限 1.0×10^7 CFU·g⁻¹,因此,对于新鲜的卤水豆腐,若在高温下放置时间超过 6 h,即可出现酸味。与卤水豆腐相比,发酵豆腐贮藏 2 d 左右,其菌落总数才达到食品卫生状况满意最大限 1.0×10^6 CFU·g⁻¹。

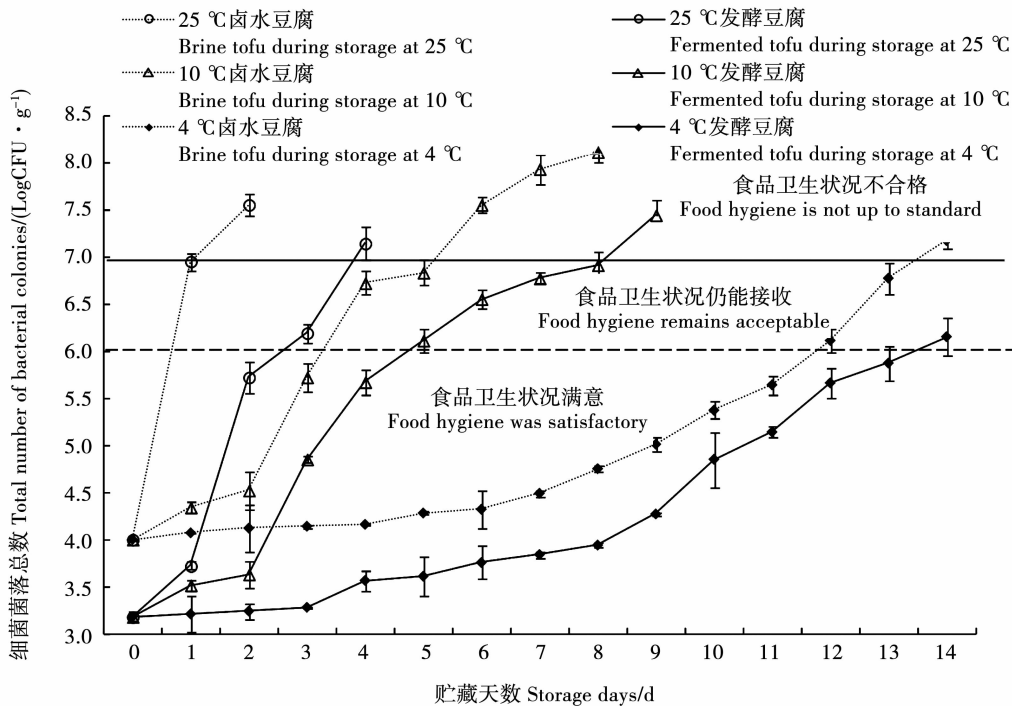


图 1 不同贮藏温度下豆腐中细菌菌落总数变化分析

Fig. 1 The analysis on the total bacterial counts of tofu during storage at different temperatures

2.1.2 贮藏过程中主要腐败菌变化 如图 2 所示,卤水豆腐中芽孢菌的初始菌数明显高于乳酸杆菌数,两种豆腐在贮藏过程中,随着贮藏时间的延长乳酸杆菌数逐渐增加,而芽孢菌数虽缓慢增加但变化不大。两种豆腐从贮藏第 3 天开始乳酸杆菌数增加较明显。本研究模拟盒装北豆腐包装工艺,生产最后一道工序即是包装灭菌,灭菌前豆腐装于盒中并在盒中注入水,封膜后再进行热杀菌处理,使得盒中豆腐基本处于类似于无氧的环境,乳酸杆菌属大部分属于厌氧或兼性厌氧菌,而芽孢杆菌属大部分属于严格好氧菌,只有少部分产荚膜的菌属于兼

性厌氧菌。因此,随着贮藏时间的延长,豆腐中乳酸杆菌数增加较快,而芽孢菌数增加缓慢。由此可知,豆腐腐败前期发酵主要是由乳酸菌引起的。这也是导致两种豆腐在第 3 天细菌菌落总数增加的主要原因,使得卤水豆腐菌落总数在 10 ℃ 贮藏 3 d 时达到食品卫生状况满意最大限 (1.0×10^6 CFU·g⁻¹),进而导致豆腐保质期缩短。从图 2 也可以明显看出,发酵豆腐初始的乳酸杆菌数及芽孢菌数显著低于卤水豆腐 ($P < 0.001$)。因此,在整个贮藏过程中,发酵豆腐的乳酸杆菌及芽孢菌数都明显低于对照。这将很有利于发酵豆腐保质期的延长。

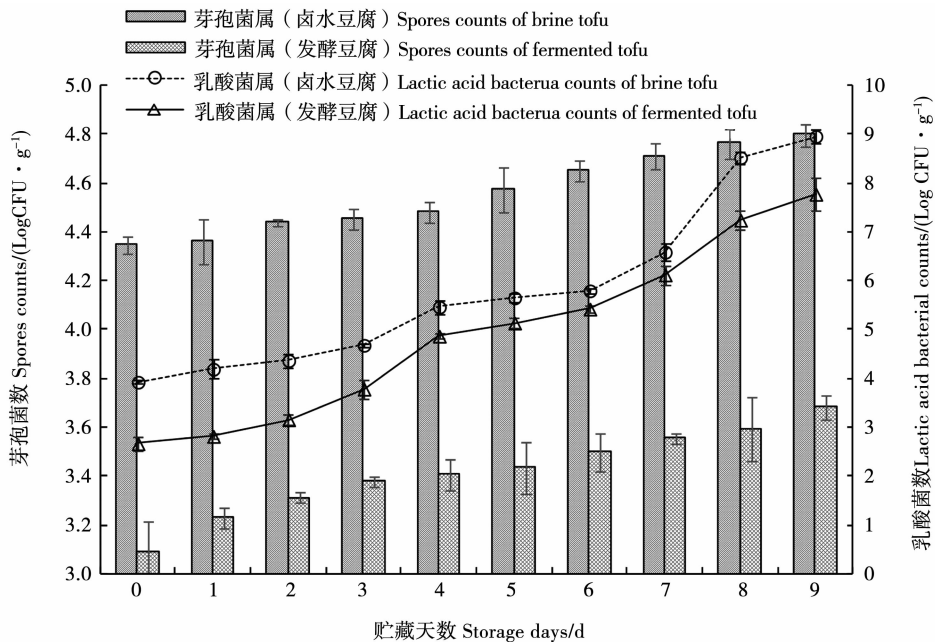


图2 10 °C贮藏过程中豆腐乳酸菌数和芽孢菌数变化分析

Fig.2 The analysis on the lactic acid bacteria and spores counts of tofu during storage at 10 °C

2.1.3 贮藏过程中豆腐 pH 变化 如图3所示,随着贮藏时间的延长,两种豆腐的 pH 均呈逐渐下降趋势,豆腐的酸味也越来越明显。发酵豆腐 pH 在贮藏前4 d 变化不大,而对照贮藏4 d 后 pH 下降幅度增大,这与豆腐中乳酸菌数大量增加(图2)有直接关系,两种豆腐酸味均不明显,但发酵豆腐菌落总数在食品卫生状况满意范围内,卤水豆腐菌落总数在可接受范围内(图1)。贮藏6~8 d 后,卤水豆腐 pH 下降较大,豆腐出现明显酸味,其菌落总数达不合格范围(图1)。且贮藏8 d 后, pH 下降较缓,豆腐略有些臭味。

发酵豆腐在贮藏6~8 d 时 pH 有缓慢下降趋势,豆腐出现轻微酸味,其菌落总数在食品卫生状况可接受范围内(图1)。贮藏8 d 后 pH 下降较明显,且豆腐酸味加强,菌落总数达不合格范围(图1),但豆腐未出现臭味。

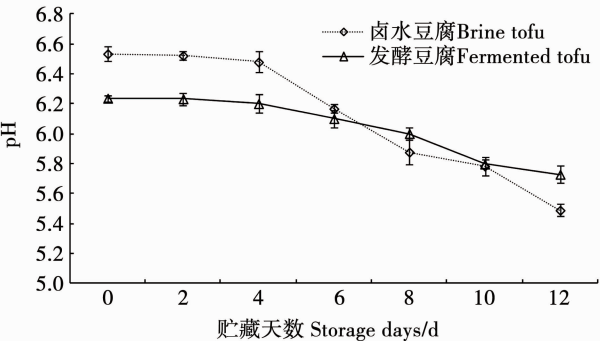


图3 10 °C贮藏过程中豆腐 pH 变化

Fig.3 The analysis on the pH value of tofu during storage at 10 °C

2.1.4 贮藏过程中豆腐色泽的变化 如图4a所示,豆腐贮藏过程中两种豆腐的 L 值随着贮藏时间

的延长而逐渐下降,说明豆腐的颜色逐渐变暗,发酵豆腐 L 值的下降速度显著低于对照。如图4b所示,贮藏过程中两种豆腐的 a 值逐渐上升,尤其卤水豆腐在贮藏6 d 后 a 值上升加快,而发酵豆腐 a 值上升较缓慢。a 值越接近正值,说明豆腐的颜色越接近红色,与实际生活中豆腐发生腐败后所见到的颜色一致。如图4c所示,随着贮藏时间延长,豆腐 b 值逐渐上升,说明豆腐的黄色越来越深。发酵豆腐 b 值变化速度相对于卤水豆腐来说,与 L、a 值的变化规律相近。以上贮藏过程中发酵豆腐的颜色变化进一步证实发酵豆腐贮藏性较好,保质期比普通卤水豆腐长。

2.2 基于乳酸菌发酵的无凝固剂发酵豆腐延长保质期的机制分析

2.2.1 豆腐制作过程中芽孢菌和乳酸菌含量变化

如图5所示,生豆浆中的芽孢菌及乳酸菌数均达到 1.0×10^6 CFU · g⁻¹ 以上,且芽孢菌数高于乳酸菌数。生豆浆经过 95 °C、10 min 煮浆工序,可将大部分不耐热的微生物杀死,熟豆浆中的芽孢菌数及乳酸菌数为生豆浆的 1% 左右。

由图5a可知,熟豆浆冷却后接入乳酸菌发酵后,发酵豆浆中的乳酸菌数量为熟豆浆的 2.4 倍,除熟豆浆本身的乳酸菌外,大部分是接入的乳酸菌。

由图5b可知,发酵豆腐发酵豆浆中的芽孢菌数比熟豆浆下降 22%。芽孢菌属一般都较耐热,然而有部分芽孢菌其耐热性会受到食品本身性质的影响,如 pH、脂肪、蛋白质及糖。乳酸菌发酵后使豆浆酸度下降至 pH5.8^[18],因此,抑制了芽孢菌的生长,使发酵后豆浆中的芽孢菌数量减少。

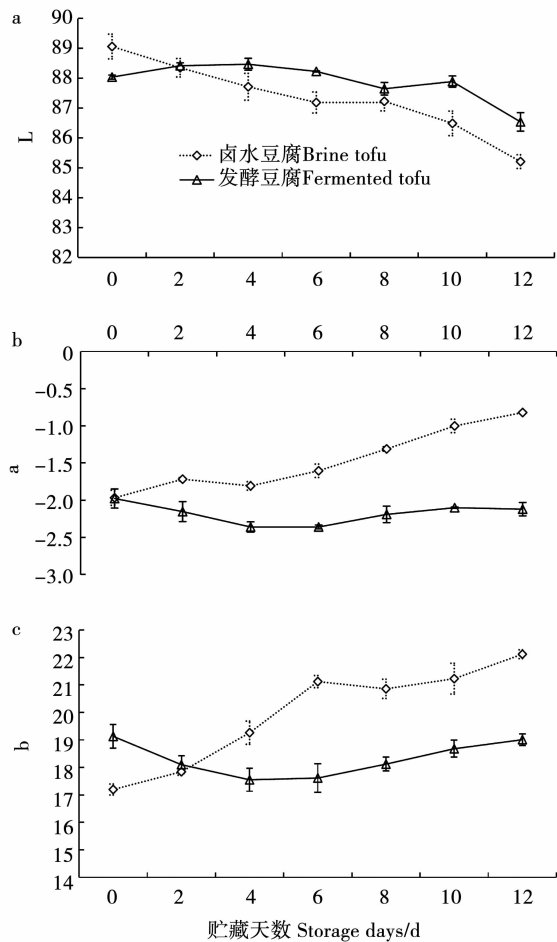


图4 豆腐贮藏过程中豆腐色泽的变化
Fig. 4 The changes of the colour during tofu storage

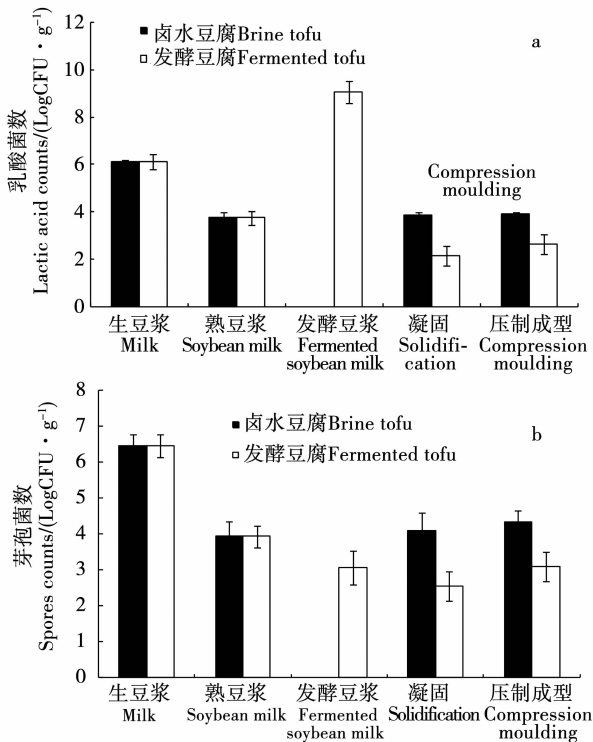


图5 两种豆腐制作过程中乳酸菌 (a) 及芽孢菌 (b) 数量变化分析
Fig.5 The analysis on the variation of lactic acid bacteria (a) and spores (b) counts of tofu during production

2.2.2 两种豆腐中有机酸的含量变化 如图6所示,除草酸外,发酵豆腐中其它有机酸含量均显著高于卤水豆腐,尤其是乳酸、柠檬酸、酒石酸、苹果酸,其含量分别为0.41,0.30,0.32和0.21 mg·g⁻¹。其中乳酸含量最高,是卤水豆腐中乳酸含量的3倍左右。由于发酵豆腐中有机酸含量高于卤水豆腐,因此发酵豆腐贮藏过程中,豆腐中污染的微生物生长速度较缓慢,进而使豆腐腐败变质的速率减慢。

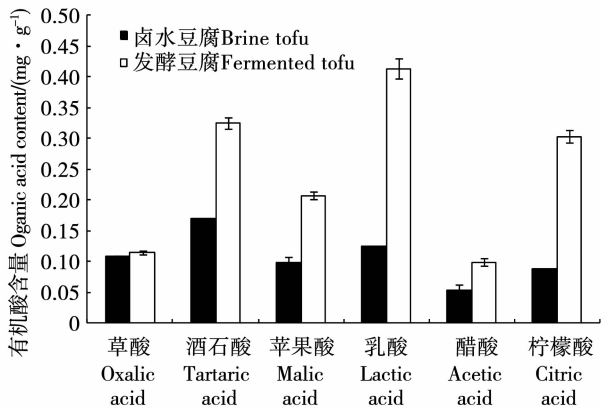


图6 两种豆腐中各有机酸含量的比较
Fig. 6 The organic acid contents of tofu prepared with fermented soymilk and MgCl₂

2.2.3 乳酸对两种豆腐腐败菌膜电位的影响 通常,一个具有完整细胞结构及代谢旺盛细菌的细胞膜内外存在100~200 mV的膜电压差,并且膜内电压比膜外低。如果膜电位降低说明细胞发生了去极化现象,反过来,如果膜电位升高说明细胞发生了超极化现象。如果经过加热、冷冻等处理,细胞膜会被破坏,形成“洞”,使得无机离子可以自由穿越细胞膜,此时膜电位将成为零^[22]。如图7所示,随着乳酸菌浓度的增加,两种腐败菌红色/绿色荧光信号比呈逐渐下降趋势,乳酸浓度越高,红色/绿色荧光信号比越低,说明乳酸对两种腐败菌膜电位有一定影响。

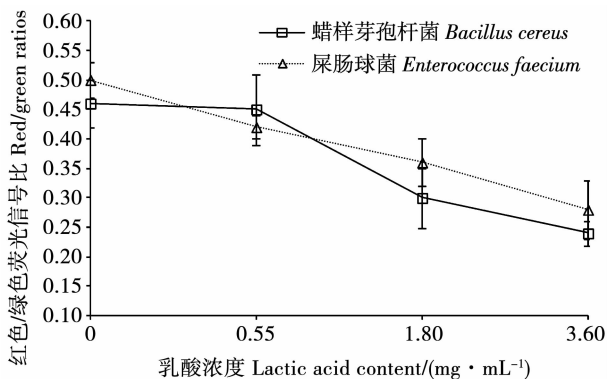


图7 不同乳酸处理浓度下蜡样芽孢杆菌和屎肠球菌红/绿荧光信号比变化分析
Fig.7 The analysis on the red/green ratios of *Bacillus cereus* and *Enterococcus faecium* incubated in different concentration of lactic acid

由图 8 所示,蜡样芽孢杆菌在低浓度乳酸(0.55~1.80 mg·mL⁻¹)处理下,膜电位位移并不大,这说明该菌的细胞去极化不严重,对其生长有影响,但作用不明显,而在高浓度乳酸(3.6 mg·mL⁻¹)处理下其膜电位位移较大,这表明细胞去极化现象严重,可能导致细胞的死亡。

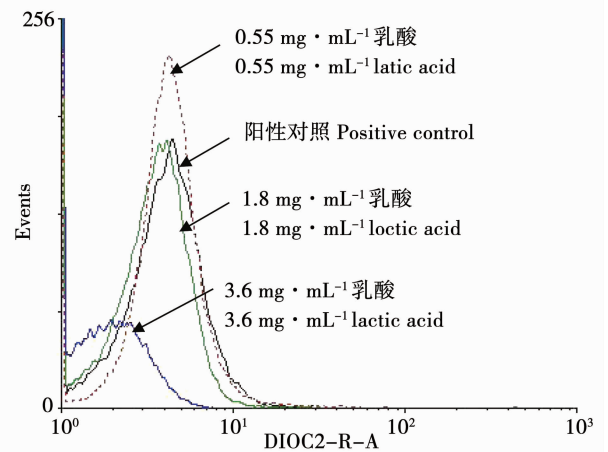


图 8 乳酸对蜡样芽孢杆菌膜电位的影响
Fig. 8 The effect of lactic acid on the membrane potential of *Bacillus cereus*

如图 9 所示,随着乳酸浓度的增加,屎肠球菌膜电位相对于对照发生了明显的位移,经过乳酸处理后的屎肠球菌其膜电位逐渐降低,说明细胞发生了去极化现象,且乳酸浓度越高,膜电位位移越大,说明乳酸对细胞膜的破坏程度越严重。

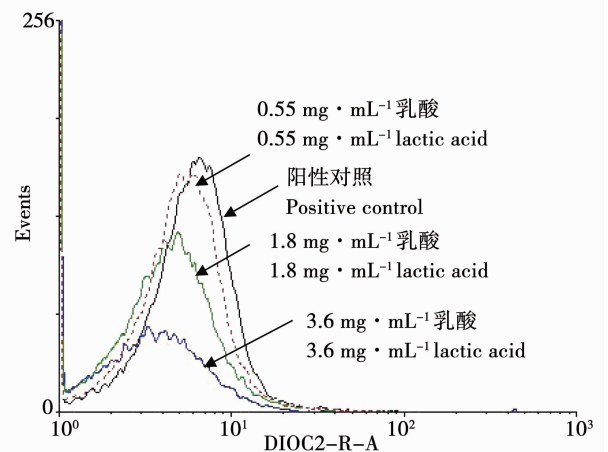


图 9 乳酸对屎肠球菌膜电位的影响
Fig. 9 The effect of lactic acid on the membrane potential of *Enterococcus faecium*

本研究中发酵豆腐中乳酸的浓度达 0.41 mg·g⁻¹(图 6),贮藏过程中对芽孢菌的生长有一定影响,但影响不大,但对屎肠球菌膜电位有一定的影响,可延缓屎肠球菌的生长繁殖,因此,最终引起发酵豆腐腐败变质的菌是芽孢菌。

3 讨论

食品的贮藏温度对其贮藏稳定性有很大影响。食品中细菌菌落总数从一定程度上可以侧面反映

食品的卫生状况及预测食品可贮藏的期限^[24]。过去我国国标(GB2711-1998)中规定散装豆腐在销售过程中菌落总数的限量≤1.0×10⁵CFU·g⁻¹^[25],但目前国标中取消了有关非发酵豆制品中菌落总数的限量。本研究根据广东省食品安全地方标准(DBS 44/006-2016)非预包装即食食品中的第三类食品菌落总数限量(≤1.0×10⁶CFU·g⁻¹)^[23]探讨供试发酵豆腐的贮藏稳定性。

本研究中不同贮藏温度下两种豆腐细菌菌落总数的结果合乎理论分析与实际分析结论。从理论分析角度出发,贮藏温度对微生物的生长繁殖有较大的影响,在一定的贮藏温度范围内,随着温度的升高,微生物在食品中生长繁殖速度较快,导致食品中菌落总数升高,相对贮藏期降低;相反,贮藏温度较低时,微生物在食品中生长繁殖速度降低,食品中菌落总数相应降低,相对贮藏期延长^[26]。从实际角度出发,日常生活中豆腐前期发生腐败变质的典型感官变化为豆腐发酸,从贮藏过程中两种豆腐 pH 变化来看,前期 pH 均呈逐渐下降趋势,进一步研究发现两种豆腐贮藏前期豆腐中的乳酸菌数增长较快,导致 pH 下降,口感发酸。

许多理论研究均表明食物中的初始微生物数量与食物的贮藏性呈显著正相关,食品中初始微生物数量少,其贮藏期相对较长^[24]。在凝固工序中,无凝固剂发酵豆腐是将发酵后的豆浆再经过二次加热后凝固,而卤水豆腐是在冷却至 80℃左右的豆浆中缓慢加入凝固剂(氯化镁)进行凝固。李博^[27]在研究盒装豆腐生产过程中细菌总数的变化时发现豆浆经煮沸后细菌总数显著下降,但当凝固剂加入后,细菌总数又明显上升,说明凝固剂含有大量的微生物。因此,卤水豆腐在凝固阶段又引入了微生物,造成二次污染,导致在此阶段豆花的芽孢菌数及乳酸菌数有所增加,而发酵豆腐避免了在这一环节引入微生物。其次,发酵豆浆经二次加热,又可以杀死大多数不耐热的乳酸菌及部分耐热芽孢菌。最后,由于乳酸菌发酵豆浆产生一定浓度有机酸,使豆浆 pH 下降。Rojo 等^[28]研究发现,许多高耐热性的微生物,在中性时的耐热性最强,随着偏离中性的程度越大,耐热性越低,也就意味着死亡率越大。范文教等^[29]研究发现,以 pH6.6 为临界点,随着 pH 的降低,从豆腐中分离的腐败菌坚强芽孢杆菌菌体的残存菌数明显减少。本研究中豆浆经乳酸菌发酵 3.0~3.5 h 后,pH 会下降至 5.8,偏离豆浆的中性环境(pH6.9),因此在发酵之后对豆浆进行二次加热,一些高耐热性的芽孢菌被杀死,进而使得凝固形成的豆花中的芽孢菌数降低,最终使得压制成型后的发酵豆腐中初始芽孢菌及乳酸菌数量分别比卤水豆腐降低了 29% 和 32%。因此,发酵豆腐的贮藏期相比卤水豆腐有所延长。可以说,凝固环节是无凝固剂发酵豆腐保质期比普通卤水豆腐延长的主要原因。

4 结 论

由于无凝固剂乳酸菌发酵豆腐制作过程中乳酸菌发酵豆浆降低了豆浆 pH 且通过二次加热显著降低了芽孢菌数,并避免了传统点浆凝固环节凝固剂加入引发的二次污染,最终使得豆腐初始菌落总数、芽孢菌数及乳酸菌数显著低于卤水豆腐,同时,由于发酵豆腐中有机酸含量尤其是乳酸的含量显著高于卤水豆腐,乳酸对屎肠球菌有一定的抑制作用,从而,大幅提升了无凝固剂发酵豆腐的保质期。因此,虽然无凝固剂乳酸菌发酵豆腐的保质期受贮藏温度的影响较大,但是无论在何种贮藏温度下,无凝固剂乳酸菌发酵豆腐都具有更好的贮藏稳定性,其保质期均比普通卤水豆腐延长 2 d 左右。

参考文献

[1] 王嘉琪,吕铭守,涂婧,等. 云南建水酸浆豆腐中乳酸菌的生长特性[J]. 食品工业科技,2018,8:90-94. (Wang J Q, Lyu M S, Tu J, et al. Study on growth characteristics of lactic acid bacteria from the acid slurry bean curd of Yunnan Jianshui [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 8: 90-94.)

[2] Frédéric L, Luc D V. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry[J]. Trends in Food Science & Technology, 2004, 15(2): 67-78.

[4] Adeyemo S M, Awojobi K O, Ogunlusi E D, et al. Biosynthesis of enzymes in fermented foods by lactic acid bacteria and possible use as bio-preservative in fermented milk[J]. Journal of Advances in Biology & Biotechnology, 2018, 19(3): 1-11.

[5] Awojobi K O, Adeyemo S M, Sanusi O O. Biosynthesis of antimicrobial compounds by lactic acid bacteria and its use as biopre-servative in pineapple juice[J]. Frontiers in Science, 2016, 6(1): 8.

[6] Ouiddir M, Bettache G, Salas M L, et al. Selection of *Algerian lactic acid bacteria* for use as antifungal bioprotective cultures and application in dairy and bakery products[J]. Food Microbiology, 2019, 82: 160-170.

[7] Li J P, Yang X Y, Shi G C, et al. Cooperation of lactic acid bacteria regulated by the AI-2/LuxS system involve in the biopreservation of refrigerated shrimp[J]. Food Research International, 2019, 120: 679-687.

[8] Lauková A, Cizliková S. The use of enterocin CCM 4231 in soy milk to control the growth of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of Applied Microbiology, 1999, 87(1): 182.

[9] Wang J M, Liu Q Q, Wang Y Y, et al. Research on soybean curd coagulated by lactic acid bacteria[J]. Springer Plus, 2013, 2(1): 1-10.

[10] Chen C, Rui X, Lu Z, et al. Enhanced shelf-life of tofu by using bacteriocinogenic *Weissella hellenica* D1501 as bioprotective cultures[J]. Food Control, 2014, 46: 203-209.

[11] Diana I S, Maurice N, Claudio M, et al. Fermented tofu: Enhancement of keeping quality and sensorial properties [J]. Food Control, 2013, 34(2): 336-346.

[12] 郑玉玺. 盒装豆腐腐败菌多样性及品质变化研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2018. (Zheng Y X. Study on spoilage bacteria diversity and quality changes in boxed tofu [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018.)

[13] Rossi F, Felis G E, Martinelli A, et al. Microbiological characteristics of fresh tofu produced in small industrial scale and identification of specific spoiling microorganisms (SSO)[J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 70: 280-285.

[14] Lee D Y, Kwon K H, Chai C H, et al. Microbial contamination of tofu in Korea and growth characteristics of *Bacillus cereus* isolates in tofu[J]. LWT - Food Science and Technology, 2017, 78: 63-69.

[15] 姜春新,王雅莹,洪小利,等. 柠檬酸和乙酸对豆腐假单胞菌的抗生物被膜研究[J]. 核农学报, 2021, 35(1): 120-127. (Jiang C X, Wang Y Y, Hong X L, et al. Antibiofilm of citric acid and acetic acid against spoilage related *Pseudomonas* [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2021, 35(1): 120- 127.)

[16] 郭俸钰,陈文学,陈海明,等. 芳樟醇对大肠杆菌的抑菌作用机制[J]. 现代食品科技, 2020, 36(4): 113-118. (Guo F Y, Chen W X, Chen H M, et al. Antibacterial mechanism of linalool against *Escherichia coli* [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(4): 113-118.)

[17] 张赞彬,刘笑宇,姜萍萍,等. 肉桂醛对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌作用及抑菌机理研究[J]. 现代食品科技, 2015, 31(5): 31-35. (Zhang Y B, Liu X Y, Jiang P P, et al. Mechanism and antibacterial activity of cinnamaldehyde against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(5): 31-35.)

[18] 乔支红,许荣华,程永强. 无凝固剂发酵豆腐生产工艺的初探[J]. 食品工业科技, 2014, 35(17): 227-231. (Qiao Z H, Xu R H, Cheng Y Q. Research on the technique of fermentation tofu without coagulant [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(17): 227-231.)

[19] 国家食品药品监督管理局,国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准: GB4789. 2-2016 [S]. (State Food and Drug Administration, State Health and Family Planning Commission. National food safety standards: GB4789. 2-2016 [S].)

[20] 国家食品药品监督管理局,国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准: GB4789. 35-2016 [S]. (State Food and Drug Administration, State Health and Family Planning Commission. National food safety standards: GB4789. 35-2016 [S].)

[21] No H K, Meyers S P. Preparation of tofu using chitosan as a coagulant for improved shelf-life [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2004, 39: 133-141.

[22] Novo D J, Perlmutter N G, Hunt R H, et al. Multiparameter flow cytometric analysis of antibiotic effectson membrane potential, membrane permeability, and bacterial counts of *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus* [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2000, 44(4): 827-834.

[23] 广东省卫生和计划生育委员会. DBS 44/006-2016. 非预包装即食食品微生物限量 [S]. 广东, 2017. (Health and Family Planning Commission of Guangdong Province. DBS 44/006-2016. Microbiological limits for non-prepackaged ready-to-eat food [S]. Guangdong, 2017.)

[24] 王亚伟. 食品卫生与安全 [M]. 北京: 科学出版社, 2011: 15. (Wang Y W. Food hygiene and safety [M]. Beijing: Science Press, 2011: 15.)

[25] 中华人民共和国卫生部. GB2711-1998. 中华人民共和国国家标准, 非发酵性豆制品及面筋卫生标准 [S]. Ministry of Health of the People's Republic of China. (GB2711-1998. National standard of the People's Republic of China, sanitary standard for non-fermented soybean products and gluten [S]. 1999.)

[26] 董明盛,贾英民. 食品微生物学 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2013: 1. (Dong M S, Jia Y M. Food Microbiology [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2013: 1.)

[27] 李博. GDL 豆腐中主要腐败菌的研究及 HACCP 的建立 [D]. 北京: 中国农业大学, 2001. (Li B. Study on the main spoilage bacterium and HACCP of GDL tofu [D]. Beijing: China Agricultural University, 2001.)

[28] Rojo M C, Arroyolópez N, Lerena M C, et al. Effects of pH and sugar concentration in *Zygosaccharomyces rouxii* growth and time for spoilage in concentrated grape juice at isothermal and non-isothermal conditions [J]. Food Microbiology, 2014(38): 143-150.

[29] 范文教,孙俊秀,陈云川,等. 环境因子对豆腐特定腐败菌消长特性的影响 [J]. 食品与机械, 2014, 30(5): 100-102. (Fan W J, Sun J X, Chen Y C, et al. Effect to environmental factors on growth characteristics of specific spoilage bacteria in tofu [J]. Food and Machinery, 2014, 30(5): 100-102.)