

自然发酵腐与人工接种发酵腐乳的 微生物比对研究

汪红梅, 许晓琳*

(杭州海润泰合检测技术有限公司, 杭州 310004)

摘 要: **目的** 分析自然发酵腐乳与人工接种发酵腐乳两者微生物种类及可能产生的安全隐患, 并对腐乳的生产环节中易产生的杂菌提出改进方案。**方法** 利用传统的微生物分离鉴定方法, 依据 SB/T 10170-2007 行业标准及食品安全国家标准食品微生物学检验等方法对影响腐乳中微生物的几个安全性指标和致病菌进行检测。**结果** 通过 2 种方式培育的毛霉腐乳, 其微生物含量和种类对比性很强, 自然发酵腐乳的方式其细菌含量高, 致病菌中金黄色葡萄球菌和沙门氏菌也均有检出, 其他致病菌也存在很大的风险。选用人工接种发酵的腐乳其可培养出的微生物种类少, 致病菌也未检出。**结论** 选用人工接种发酵的腐乳较自然发酵的腐乳安全性高, 更符合市场需求。

关键词: 腐乳; 微生物; 杂菌控制

Microbial comparison between natural fermented sufu and artificial inoculation fermented sufu

WANG Hong-Mei, XU Xiao-Lin*

(Hangzhou Harrens-TH Inspection Testing & Technology Co., Ltd., Hangzhou 310004, China)

ABSTRACT: Objective To compare the microbial flora of natural fermented Sufu with that of artificial inoculation fermented sufu, and analyze the types of microorganisms and potential safety hazards, in order to put forward the improvement scheme of how to control the impurities easily produced in the production of sufu. **Methods** Traditional methods of microbial isolation and identification were used, and several safety indicators and pathogenic bacteria affecting microorganisms in sufu were detected by SB/T10170-2007 industry standard and national food safety standard of food microbiology test method. **Results** Mucor sufu cultured by 2 kinds of methods had a strong correlation between microbial content and species. The natural fermentation method had a high bacterial content. Staphylococcus aureus and Salmonella were also detected in pathogenic bacteria. Other pathogenic bacteria also had a great risk. Artificial inoculation and fermentation of sufu could produce fewer kinds of microorganisms, and pathogenic bacteria had not been detected. **Conclusion** The artificial inoculation and fermentation of sufu is safer than the natural fermentation of sufu, which better meets the market demand.

KEY WORDS: sufu; microorganism; bacterial control

*通讯作者: 许晓琳, 助理工程师, 主要研究方向为食品安全检测。Email: Nikixu@harrens.com

*Corresponding author: XU Xiao-Lin, Assistant Engineer, Hangzhou Harrens-TH Inspection Testing & Technology Co., Ltd., Hangzhou 310004, China. E-mail: Nikixu@harrens.com

1 引 言

腐乳是中国传统发酵的大豆制品之一, 迄今已有一千五百多年的历史。目前, 腐乳可分为青方、红方、白方 3 大类^[1]。在中国有代表性的豆腐乳有 6 种, 包括白菜腐乳、大块红腐乳、玫瑰腐乳、白油腐乳、红油腐乳、桂林腐乳(白腐乳的代表), 深受国内外广大消费者喜爱。随着社会的进步, 人们对大豆发酵制品进行了深入的研究, 同时也被国内外研究学者认可和推荐。

我国很多地区仍喜欢自己制作腐乳, 以毛霉腐乳为典型代表, 毛霉是我国豆腐乳生产使用量最大, 覆盖面最广的生产菌种, 约占豆腐乳菌种的 90%~95%^[2]。毛霉均为低温毛霉^[3], 广泛分布于土壤、空气或食品中。制作上仍然是传统发酵工艺, 工艺流程为浸泡→磨浆→煮浆→点浆→成坯→发酵→晾晒→清洗→拌料→腌制→包装→检验→出厂, 这种开放式生产的腐乳微生物种类多, 难以控制, 存在潜在的风险。

我国腐乳的生产历史悠久, 但工业化发展较慢。目前, 国内很多企业都实现了全年生产, 多品种生产, 产品远销海内外, 产业链全面扩大。我国腐乳业已初步步入工业化和现代化生产的轨道。

而国外发酵食品行业已经发展到很高的水平, 彻底告别了自然发酵的历史^[4], 其工艺全部实现了标准化和自动化, 其产品品质深受广大消费者亲赖。

自 20 世纪 60 年代以来, 国内外学者就开始研究各种传统的大豆制品^[5], 其中在霉豆腐的研究领域, 已有很多著名的期刊论文的研究报道, 也有了成熟的现代生产技术。

腐乳整个生产环节中都对产品进行加热灭菌处理, 靠汤汁中的盐分和酒抑制各种微生物。环境中的微生物都会对整个腐乳坯发酵环节产生影响, 最终成品经常存在产气、变红、长白点等难题, 这些质量问题的产生与腐乳发酵期间微生物的发酵有着直接或间接的关系, 对发酵物中微生物的种类、代谢产物及途径等方面的研究具有重要的意义。

本研究对自然发酵腐乳与人工接种发酵腐乳 2 种工艺制作的成品, 对常规微生物菌群进行比对分析, 重点研究两者在最终成品中存在的微生物种类和含量。从而在现代化生产环节中抓住微生物的关键控制点, 提出可实施的改进方案, 不断提高我国的腐乳品质, 在激烈的市场竞争下求得突破与发展。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

2.1.1 试验材料

豆腐购于杭州祖名食品厂。

2.1.2 仪器与设备

SHP-160 型恒温生化培养箱(上海三发科学仪器有限公司); YXQ-LS-75SII 立式压力蒸汽灭菌锅(上海博迅实业有限公司医疗设备厂); HH-S21-6S 数显电热恒温水浴锅(上海跃进医疗器械有限公司); BSC-1600IIA2 生物安全柜(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司); XSP-35-1600X 生物显微镜(Phenix 江西凤凰生物显微镜)。

2.1.3 商品化培养基

PCA 琼脂、Baird-Parker 琼脂、BHI 肉汤、缓冲蛋白胨水(BPW)、SC 增菌液、TTB 增菌液、XLD 琼脂、沙门显色培养基、MYP 琼脂(青岛海博生物技术有限公司); VRBA 琼脂、BGLB 肉汤(北京陆桥技术股份有限公司)。

2.1.4 商品化生化试剂盒和血清

沙门氏菌生化试剂盒、蜡样生化试剂盒(北京陆桥技术股份有限公司); 沙门氏菌(O 价, H 价血清, 宁波天润生物药业有限公司); 兔血浆(青岛海博生物技术有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 样品前处理

取出厂豆腐, 将其切成均匀的小方块, 放置在腐乳发酵培育室(本试验地为浙江省某腐乳厂), 分别选用 2 种方法发酵豆腐坯, 隔开进行前期培菌, 再经过拌坯、后发酵得到成品, 装罐, 备用。全过程为期 7 d (2019 年 4 月 1~7 日)。室内温度: 10~25 °C, 湿度: 60%~90%。本次试验样品自然发酵法的成品腐乳, 编号为 A; 人工纯菌种接种发酵的成品腐乳, 编号为 B。

其中样品编号 A 中的豆腐有一小部分已在前期发酵(培菌)中产生了“黄衣”^[6], 毛霉菌丝生长稀少, 有的不长, 产生氨味, 坯子发粘。样品编号 A 在整个前期发酵过程中毛霉菌生长比较缓慢, 毛霉菌丝灰白色, 生长短而疏。

2.2.2 样品测定

(1) 菌落总数测定

菌落总数主要作为判别食品被污染程度的标志之一, 依据 GB 4789.2-2016 方法^[7]测定腐乳中的菌落总数, 所得结果只包含一群嗜中温需氧菌的总数, 从食品卫生观点来看, 食品中菌落总数越多, 说明食品质量越差, 病原菌污染的可能性越大, 反之, 病原菌污染的可能性就会降低。称取 25 g 腐乳加入 225 mL 灭菌生理盐水中, 制成 1:10(m:V)稀释液, 按 1:10 比例, 把试样稀释到 10⁻², 每个稀释度吸取 1 mL 加入 9 cm 的无菌平皿中, 同时做好平行样, 倒入 45~50 °C 左右的灭菌好的 PCA 培养基, 混匀。36 °C 培养 48 h, 计数。

(2) 大肠菌群测定(VRBA 平板计数)

大肠菌群主要来源于人畜粪便, 故以此作为粪便污染指标来评价食品的卫生质量, 具有广泛的卫生学意义。反映了食品是否被粪便污染, 同时间接地指出食品是否有肠道致病菌污染的可能性。依据 SB/T 10170-2007 行业标

准中^[8]卫生指标参照的 GB 2712-2014 豆制品标准^[9]对大肠菌群的检测要求试验,依据 GB 4789.3-2016 中第二法大肠菌群平板计数法操作^[10],A、B 各选取 5 份样品。

(3) 金黄色葡萄球菌测定(第二法 平板计数法)

葡萄球菌在自然界分布极广,葡萄球菌属至少有 30 个种,而金黄色葡萄球菌在临床上是重要的代表之一,也是人类主要的致病菌。在食品中可产生肠毒素,食后能引起食物中毒,是食品卫生的一种潜在危险。依据 GB 29921-2013 食品中致病菌的限量^[11],执行 GB 4789.10-2016 第二法操作^[12]。A、B 各选取 5 份样品。

(4) 沙门氏菌测定

沙门氏菌属是肠杆菌科中最重要的病原菌属,广泛分布于自然界,寄生在人类和动物的肠道中。沙门氏菌可引起人类食物中毒或败血症。依据 GB 29921-2013 食品中致病菌的限量,执行 GB 4789.4-2016 操作^[13]。A、B 各选取 5 份样品,定性,不得检出。

(5) 蜡样芽孢杆菌测定

蜡样芽孢杆菌在自然界的分布比较广泛,空气、土壤、尘埃、水及腐生的植物中均有存在。食品中蜡样芽孢杆菌的来源,主要为外界所污染。若食品在加工、贮运、销售过程中不注意卫生,该菌就会在食品中大量污染传播。当摄入的食品每克中蜡样芽孢杆菌的活菌数在百万以上时,可导致食物中毒。它涉及的食品种类较多,包括乳类食品、肉类制品、蔬菜、汤汁、豆芽、甜点和米饭等,因此,检测食品中蜡样芽孢杆菌具有重要的卫生学意义。采用 GB 4789.14-2014 测定^[14],用生化试剂盒验证和确认。

3 结果与分析

3.1 菌落总数

分别将 2 组样品 A、B 用国标方法测定,其结果显示样品 B 的参数优于样品 A,见表 1。

表 1 腐乳细菌总数测定结果
Table 1 Results of total number of bacteria in sufu

样品编号	10 ⁻¹	10 ⁻²	结果/(CFU/g)
A	多不可计	86	8600
B	31	5	310

3.2 大肠菌群

分别将 2 组样品 A、B 用国标方法,各选取 5 份测定,其结果显示样品 A 中大肠菌群有检测,有肠道致病菌污染的可能,影响腐乳的质量。见表 2。

3.3 金黄色葡萄球菌

从表 3 得知,样品 B 明显优于样品 A,可以很大程度

降低金黄色葡萄球菌的潜在风险。

3.4 沙门氏菌

沙门氏菌检测结果如表 4,样品 A 有沙门氏菌污染,说明在发酵过程存在着病原菌污染的高风险性。

表 2 大肠菌群测定结果
Table 2 Test results of coliforms in sufu

样品编号	10 ⁻¹	10 ⁻²	结果/(CFU/g)
A-1	3	0	30
A-2	0	0	<10
A-3	1	0	10
A-4、5	13	0	0
B-1、2、3、4、5	0	0	<10

表 3 金黄色葡萄球菌测定结果
Table 3 Determination of *Staphylococcus aureus*

样品编号	10 ⁻¹	10 ⁻²	结果/(CFU/g)
A-1	2	0	20
A-2、3	0	0	<10
A-4	1	0	10
A-5	0	0	<10
B-1、2、3、4、5	0	0	<10

表 4 沙门氏菌测定结果
Table 4 Test results of *Salmonella*

样品编号	结果/(CFU/25 g)
A-1	检出
A-2、3、4、5	未检出
B-1、2、3、4、5	未检出

3.5 蜡样芽孢杆菌

结果如下表 5: 样品 A、B 都有芽孢杆菌的存在,但样品 B 结果优于样品 A。

表 5 蜡样芽孢杆菌测定结果
Table 5 Results of *Bacillus cereus*

样品编号	10 ⁻¹	10 ⁻²	结果/(CFU/g)
A	240	11	2400
B	13	0	130

4 讨 论

4.1 腐乳生产过程中的常规微生物杂菌种类

腐乳生产过程中容易产生的主要有细菌、霉菌和酵母

3 大类杂菌^[15]。腐乳毛霉培养过程最容易伴生杂菌, 控制不当就会出现“黄衣”、红点、氨味、坯子发黏、毛霉生长稀疏等异常情况, 轻微的造成产品色泽不好、易破损、味道发苦, 严重时腐乳毛霉无法生长, 干坯不能使用。

4.2 腐乳生产过程中的微生物致病菌

由成品豆腐乳或在发酵过程中检出的微生物种类十分繁多, 从腐乳中分离出的微生物多达 16 种^[16], 它们之中不乏高产各种酶或氨基酸的有益菌, 同时也可能存在一些引起致病菌的菌类, 如金黄色葡萄球菌、沙门氏菌等。以 Han 等^[17]对致病菌的研究为依据, 本课题选取了腐乳中沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌。以上 3 种病原菌的检测数据进行分析比对, 其结果显示, 采用自然发酵制作腐乳的传统方法对食品微生物存在着不可控的高危险性, 影响腐乳的质量卫生安全。

4.3 存在问题, 解决措施

在自然发酵生产制作腐乳的条件下, 微生物种类多、污染严重的原因主要有如下几点: (1) 培育豆腐坯的空间微生物杂菌多; (2) 温湿度不能控制, 对毛霉菌发酵需要的最适条件受限; (3) 配料中选用的辣椒粉、香辛料, 都是散装采买的, 也未经杀菌, 存在着微生物污染的风险; (4) 工人对腐乳制作过程中的食品卫生问题未受重视。

为了提高腐乳的质量, 降低微生物污染, 总结了一些有效的方法和思路, 如下:

a. 选用纯菌种发酵技术代替自然发酵技术。

b. 加强原辅料、生产用具、容器的清洁杀菌工作, 可采用沸水烧煮杀菌。

c. 注意工厂流水线上的环境卫生及杀菌设施。

d. 提高生产过程的控制技术, 对发酵过程中温湿度及通气等环境条件的变化、微生物菌群变化加以调控。

5 结 论

腐乳作为一种发酵豆制品, 其营养丰富、风味独特, 深受人们的喜爱和推崇。但腐乳的质量安全, 特别是微生物污染还面临残酷的现实。

本研究分析了 5 种微生物的检测结果显示, 选用人工接种发酵制成的腐乳安全性高, 但因开放式发酵工艺和现代工厂的设备都存在微生物交叉污染的高风险, 仍需在生产过程中注意微生物的控制。

参考文献

- [1] 吕田. 南货北植之精品[J]. 中国食品, 2013, (18): 88-89.
Lv T. High-quality goods from south to north [J]. China Food, 2013, (18): 88-89.
- [2] 蒋芳芳, 刘嘉, 蒋立文. 腐乳品质改善的研究进展[J]. 中国酿造, 2011,

30(11): 1-4.

Jiang FF, Liu J, Jiang LW. The research progress of sufu quality improvement [J]. China Brew, 2011, 30(11): 1-4.

- [3] Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC. Introduction to food and airborne fungi (7th edition) [M]. Netherlands: Centraal Bureau Voor Schimmelcultures-Utrecht, 2004.
- [4] Niu TJ, Ma Y. Exploitation and utilization of microbial resources in Chinese traditional fermented soybean products [J]. China Brew, 2005, (2): 1-5.
- [5] 刘庆玮. 豆腐乳研究的历史和现状[J]. 中国调味品, 1988, (2): 9.
Liu QW. History and current situation of tofu research [J]. Chin Cond, 1988, (2): 9.
- [6] 马国安. 腐乳生产过程中微生物的污染与防治[J]. 中国调味品, 2000, (2): 9-11.
Ma GA. Microbial pollution and prevention in sufu production [J]. Chin Cond, 2000, (2): 9-11.
- [7] GB 4789.2-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定[S].
GB 4789.2-2016 National food safety standard-Food microbiological inspection-Determination of total colony number [S].
- [8] SB/T 10170-2007 中华人民共和国国内贸易行业标准 腐乳[S].
SB/T 10170-2007 Standard for domestic trade industry of the People's Republic of China-Sufu [S].
- [9] GB 2712-2014 食品安全国家标准 豆制品[S].
GB 2712-2014 National food safety standard-Soybean products [S].
- [10] GB 4789.3-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群测定 平板计数法[S].
GB 4789.3-2016 National food safety standard-Food microbiology inspection-Coliform detection-Plate counting method [S].
- [11] GB 29921-2013 食品安全国家标准 食品中致病菌限量[S].
GB 29921-2013 National food safety standard-Limit of pathogenic bacteria in food [S].
- [12] GB 4789.10-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验 平板计数法[S].
GB 4789.10-2016 National food safety standard-Food microbiology inspection-Staphylococcus aureus inspection-Plate counting method [S].
- [13] GB 4789.4-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验 [S].
GB 4789.4-2016 National food safety standard-Food microbiology inspection-Salmonella inspection [S].
- [14] GB 4789.14-2014 食品安全国家标准 食品微生物学检验 蜡样芽孢杆菌检验[S].
GB 4789.14-2014 National food safety standard-Food microbiology examination of *Bacillus cereus* [S].
- [15] 朱立雄, 蔡欣. 腐乳毛霉培养条件及工艺探讨[J]. 中国酿造, 2014, (10): 123-126.
Zhu LX, Cai X. Discussion of culture conditions and technology of mucor

sufu [J]. China Brew, 2014, (10): 123–126.

- [16] 彭湘屏, 卢红梅. 腐乳研究新进展[J]. 江苏调味副食品, 2009, 26(4): 10–14.

Peng XP, Lu HM. New progress of research on sufu [J]. China Cond, 2009, 26(4): 10–14.

- [17] Han BZ, Rombouts FM, Nout MJR. A Chinese fermented soybean food [J]. Int J Food Microbiol, 2001, 65(1-2): 1–10.

(责任编辑: 苏笑芳)

作者简介



汪红梅, 助理工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: Miawang@harrens.com



许晓琳, 助理工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: Nikixu@harrens.com