

- Microbiol, 1995, 33(9):2233-2239.
- [14] Lukinmaa S, Takkunen E, Siitonen A. Molecular epidemiology of *Clostridium perfringens* related to food-borne outbreaks of disease in Finland from 1984 to 1999 [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(8):3744.
- [15] 贾爱卿, 袁子彦, 何永龙, 等. 副猪嗜血杆菌广东分离株 MLST 分型研究 [J]. 中国预防兽医学报, 2014, 36(1):23-26.
- [16] MENG Q, BAI X, ZHAO A, et al. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from healthy pigs in China [J]. BMC Microbiol, 2014(15):5.
- [17] DAI L, LU L M, WU C M, et al. Characterization of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* isolates from chickens in China between 2001 and 2006 [J]. FEMS Microbiol Lett, 2008, 286(2):178-183.
- [18] 李琳. 鸡源大肠杆菌耐药性流行趋势及  $\beta$ -内酰胺酶基因分布特征研究 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2009.
- [19] 白莉, 郭云昌, 董银苹, 等. 我国食品中大肠埃希菌 O157 耐药及 PFGE 分子分型特征分析 [J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(5):422-428.
- [20] 余婷, 安慧慧, 吴聪明, 等. 奶牛乳房炎分离大肠杆菌的耐药性及脉冲场凝胶电泳分型研究 [J]. 中国兽医杂志, 2013, 49(9):6-11.

## 论著

# 高通量测序法对 7 种发酵豆腐细菌组成的比较研究

金林毅<sup>1</sup>, 黄飞<sup>2</sup>, 田浩<sup>2</sup>, 王芸<sup>2</sup>, 张晓君<sup>2</sup>

(1. 上海市七宝中学, 上海 201101; 2. 上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240)

**摘要:**目的 研究不同发酵豆腐的细菌菌群组成, 了解此类产品的食品安全风险。方法 从市场收集 4 个省份生产的 7 个品牌的发酵豆腐样品, 并从中提取 DNA, 对 16S rRNA 基因的 V3 区进行 PCR 扩增, 通过高通量测序和序列分析了解样品的细菌组成特征。结果 各样品获得序列数平均为 4 307 条。序列分析结果表明 7 种样品中厚壁菌门、变形菌门、拟杆菌门和梭杆菌门约占全部细菌的 97.4%; 各样品在门水平上为 4~13 类, 在属水平上, 样品的菌群组成复杂, 大多数样品的细菌菌属都在 10 类以上, 并发现样品的菌群组成与地域性和制作工艺密切相关; 另外, 部分样品检出较高丰度的克雷伯菌属、沙门菌属、克罗诺杆菌属等致病菌, 及弧菌属、肠杆菌属和变形杆菌属等潜在有害菌属。结论 产地和工艺对豆腐中的细菌具有明显的影响, 现有发酵豆腐的生产模式造成产品病原菌的过度繁殖, 产品存在食品安全风险。

**关键词:** 发酵豆腐; 16S rRNA 基因测序; 食源性致病菌; 食品安全

中图分类号: R155.5; S432.4<sup>+</sup>2; TS214 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2015)02-0114-06

DOI: 10.13590/j.cjfh.2015.02.004

## The comparison of bacterial compositions of seven types of fermented tofu using high-throughput sequencing technology

JIN Lin-yi, HUANG Fei, TIAN Hao, WANG Yun, ZHANG Xiao-jun

(Qibao High School, Shanghai 201101, China)

**Abstract: Objectives** Fermented tofu is a type of traditional Chinese food. The aim of this study was to compare the bacterial composition and its effect on the quality and safety of fermented tofu. **Methods** The total DNA was directly extracted from seven brand of fermented tofu samples produced in four provinces. The V3 region of 16S rRNA gene were amplified, and PCR products were mixed for pyrosequencing. **Results** According to the analysis of the sequences, Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes and Fusobacteria were predominant, accounting for 97.4% of all the bacteria. In terms of genus, most types of the fermented tofu had more than 10 genus members. It was also found that the composition of bacterial communities related to the geographic location and the production processes of fermented tofu. On the other hand, bacterial communities in some of fermented tofu showed relatively high abundance of pathogen or opportunistic pathogen, such as *Klebsiella*, *Salmonella*, *Cronobacter*, *Vibrio*, *Enterobacter* and *Bacteroidetes*. **Conclusion** These results suggested

收稿日期: 2014-08-05

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(21177086); 上海市国际合作项目(12230706800)

作者简介: 金林毅 男 学生 研究方向为食品微生物学 E-mail: 980880480@qq.com

通讯作者: 张晓君 男 研究员 研究方向为微生物生态学 E-mail: xjzhang68@sjtu.edu.cn

that the existing fermented tofu production model needed to be updated, and some products might have a risk of food safety.

**Key words:** Fermented tofu; 16S rRNA gene sequencing; foodborne pathogens; food safety

我国地域广阔,许多地方都有极具地域特色的发酵豆腐(如臭豆腐),这些发酵豆腐的生产工艺及其相关产品历史悠久,风味独特,一直以来受到人们普遍青睐<sup>[1]</sup>。如北京有王致和臭豆腐,江浙有苋菜梗臭豆腐,湖南有火宫殿臭豆腐,安徽有徽州毛豆腐等。

传统发酵豆腐的制作方式多为开放式制作法:江浙的苋菜梗臭豆腐和湖南长沙的火宫殿臭豆腐是将各种不同的蔬菜单独或组合,置于自然环境中任其腐败发臭得到臭卤水后,再将豆腐块泡入其中,继续发酵制成的<sup>[2]</sup>,其具发酵作用的微生物主要来自于卤水原料中,所以发酵风味会因卤水原料不同而有所改变,品质无法稳定控制;王致和臭豆腐和徽州毛豆腐都是直接对豆腐进行发酵,其制作工艺是毛霉型臭豆腐的制作工艺<sup>[3]</sup>。

然而,发酵豆腐在食品卫生和品质稳定性方面确实存在很多不确定性。研究这些传统发酵豆腐的菌群组成,对于评价、改良和弘扬我国古老的食品加工方式具有积极意义,不仅可以稳定传统的发酵工艺,为豆腐发酵的生产工艺从祖传方式向标准化生产的转化提供依据,还对其食品安全的评价具有重要价值。为此,本课题组收集了来自4个不同省份产地7种品牌的发酵豆腐产品,直接从发酵豆腐样品中提取DNA,通过对细菌16S rRNA基因V3区PCR扩增产物的454焦磷酸法的高通量测序,对发酵豆腐中的细菌菌群进行分析和比较研究,了解其中起优势作用的菌群组成,并初步评估这些传统食品是否存在安全风险。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品来源

商场购买袋装发酵豆腐“XYCDF”、“QMCDF”、“CMCDF”、“ZMCDF”、湖南农家制作“HGDCDF”和“LJCDF”、安徽农家制作“MDF”各1种,表1为发酵豆腐相关信息。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

荧光化学发光分析仪、水平电泳槽均购自美国Bio-Rad,PCR仪(Veriti™ Dx,美国ABI),凝胶成像系统(Tanon 3500,上海天美有限公司),454 Titanium FLX+测序仪(瑞士Roche),台式高速冷冻离心机。

RNA酶(R4875,美国Sigma,RNase)、DNA纯化

表1 发酵豆腐编号及相关信息

Table 1 Number of fermented tofu and their background information

发酵豆腐名称	编号	产地	配料
XYCDF	SH-1	上海	大豆、蔬菜
QMCDF	SH-2	上海	大豆、米苋梗发酵肉
CMCDF	ZJ-1	浙江	大豆、霉苋菜梗汁
ZMCDF	ZJ-2	浙江	大豆
HGDCDF	HN-1	湖南	冬笋、香菇、曲酒、浏阳豇豉的卤水
LJCDF	HN-2	湖南	发酵咸菜汁
MDF	AH-1	安徽	祖传酸水

试剂盒(中国台湾旭基公司)、DNA聚合酶Pfx DNA polymerase(美国Invitrogen)、PCR产物回收试剂盒(英国Geneaid)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 样品前处理

取5g发酵豆腐于已灭菌的含有5g玻璃珠的50ml离心管中,向离心管中添加25ml 0.1 mol/L PB缓冲液,充分涡旋振荡5min,冰浴5min,重复3次。采用差速离心的方法,100×g、200×g、300×g各5min,400×g、500×g、600×g各3min,将上层乳浊液移入新的50ml离心管中,梯度离心,700×g、800×g各2min,上层清液再移入新的离心管中,分装1ml/管于1.5ml EP管中,11 000×g离心20min。弃上清,30%生理盐水甘油重悬沉淀,-20℃冻存。

#### 1.2.2 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取DNA

取2管分装有1ml经前处理的样品(相当于0.2g湿样品)的EP管,11 000×g离心15min,弃上清,合并两管沉淀。沉淀中加567μl TE缓冲液,吹打重悬沉淀物。加30μl十二烷基磺酸钠和3μl蛋白酶K(20mg/ml)混匀,56℃温浴1h。加100μl 5mol/L NaCl,充分混匀,加80μl CTAB/NaCl溶液混匀,65℃温育10min,每管取约390μl入新的EP管,加入390μl氯仿-异戊醇(24:1,V/V)颠倒混匀12 000×g离心15min,上层水相移入新的EP管中,加入195μl Tris苯酚和195μl氯仿-异戊醇颠倒混匀12 000×g离心15min,上层水相移入新的EP管中,重复加入氯仿-异戊醇尽量除去蛋白。取冰乙醇1ml加入EP管,-20℃过夜。13 000×g 4℃离心30min,收集DNA沉淀,溶于30μl无菌水中,加入1.5ml RNase(10mg/ml)。37℃金属浴30min,-20℃保存。

#### 1.2.3 样品16S rRNA基因V3区的扩增、纯化与测序

Picogreen 荧光染料法测定 DNA 样品浓度。PCR 正向引物序列为: CTATGCGCCTTGCCA GCCCCTCAGXXXXXXXXXXATTACCGCGGCTGCT GG(十位 X 代表标签序列),本研究使用包含不同标签序列的上游引物区分不同的样品,测得的序列将根据此标签序列分配到不同的样品中。所有样品扩增使用相同的下游引物<sup>[4]</sup>,序列为: CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTACGCTGTCTCC TACGGGAGGCAGCAG。扩增片段长度大约为 270 ~ 290 bp。

PCR 反应体系为: 2.5  $\mu$ l 10  $\times$  Buffer, 0.5  $\mu$ l 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 3  $\mu$ l 2 mmol/L dNTPs, 上下游引物各 0.5  $\mu$ l, 0.2  $\mu$ l Pfx DNA polymerase。PCR 程序为: 94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94  $^{\circ}$ C 1 min, 65  $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 每 2 个循环退火温度降低 1  $^{\circ}$ C, 共 20 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 8 min。

PCR 扩增后的产物按 PCR 产物回收试剂盒说明书进行纯化。纯化产物测定浓度后, 每种样品取 60 ng 混和为一种样品, 混合后的样品以 1.2% 琼脂糖凝胶进行电泳, 并在紫外灯照射下割取 PCR 扩增条带, 经 PCR 产物回收试剂盒纯化的产物测定浓度后, 进行单链筛选和乳化 PCR 扩增, 并在 GS FLX 平台上进行 454 焦磷酸测序<sup>[5]</sup>。

#### 1.2.4 序列分析

454 序列处理及后续数据分析采用一定的质控标准, 去掉低质量的序列, 并将其分配至每种样品

中。得到的高质量的序列与 Greengene 数据库<sup>[6]</sup> 比对, 去除与已有的序列比对的最小长度 < 100 bp, 相似度 < 75% 的序列。然后计算距离矩阵, 根据序列的相似性划分可操作性分类单元 (OTU), 最后将 OTU 的数据进行进一步的分析, 包括多样性评估、系统发育分析和统计分析。统计分析包括 UniFrac 法和主成分分析 (PCA) 法, 主要细菌类型的热图是根据 OTU 数据用 PCA 法以 Matlab R2010b 软件绘制。

## 2 结果

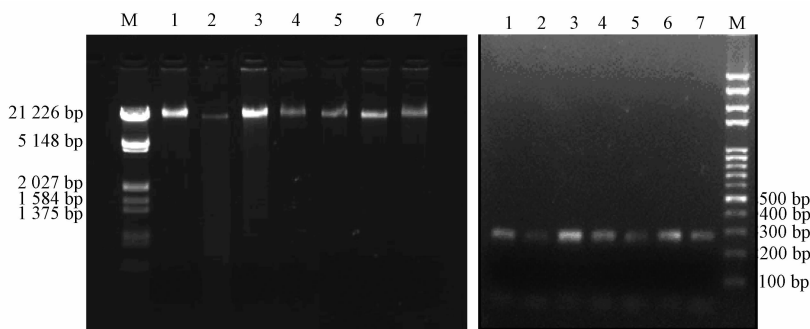
### 2.1 DNA 提取、16S rRNA 基因的扩增与测序

各样品提取的 DNA 量如表 2 所示。16S rRNA 基因扩增的 DNA 片段大小在 270 ~ 290 bp 之间, DNA 提取与扩增结果的电泳图见图 1。7 种样品共测得 30 147 条序列, 其中每种样品的测序量见表 2。平均每份样品测序量为 4 307 条。

表 2 7 种发酵豆腐 DNA 提取量和测序量

Tablet 2 Quantity of DNA extracted from 7 types of fermented tofu and sequence numbers

样品名称	DNA 提取量/ng	测序量/条
SH-1	396	3 247
SH-2	246	3 608
ZJ-1	564	4 509
ZJ-2	270	5 453
HN-1	292	2 621
HN-2	288	5 078
AH-1	222	5 631



注: M: Marker; 1: SH-1; 2: SH-2; 3: ZJ-1; 4: ZJ-2; 5: HN-1; 6: HN-2; 7: AH-1

图 1 7 种发酵豆腐提取的 DNA (左) 和 16S rRNA 基因扩增 (右) 电泳图

Figure 1 Electrophoresis analysis of DNA extraction and PCR of 16S rRNA gene

### 2.2 7 种发酵豆腐样品细菌组成的比较

7 种发酵豆腐样品中的总体细菌组成较为复杂, 多达 15 个门的细菌, 但其中厚壁菌门 (Firmicutes)、变形菌门 (Proteobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和梭杆菌门 (Fusobacteria) 细菌分别约占 40.5% (12 204/30 147)、30.9% (9 327/30 147)、23.0% (6 922/30 147) 和 3.0% (901/30 147), 共计占全部细菌的 97.4% (29 354/30 147)。

7 种发酵豆腐中优势属的细菌丰度信息热图

见图 2。由图 2 可知, ZJ-1 和 ZJ-2 样品的组成最为接近, 而 SH-1 与 SH-2, HN-2 与 AH-1 的组成相对比较相似。

根据各种样品中细菌 OTU 类型的丰度值进行的主成分分析, 进行不同样品在细菌 OTUs 组成上差异的比较, 见图 3。由图 3 可知, 发酵豆腐产地的差异对其细菌菌群的影响最大, 相同产地的发酵豆腐的菌群组成相似, 尤其是产地为浙江的两个品牌产品的菌群组成极为相似。另外, 浙江的发酵豆腐

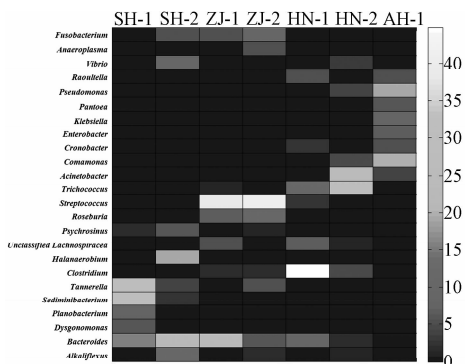
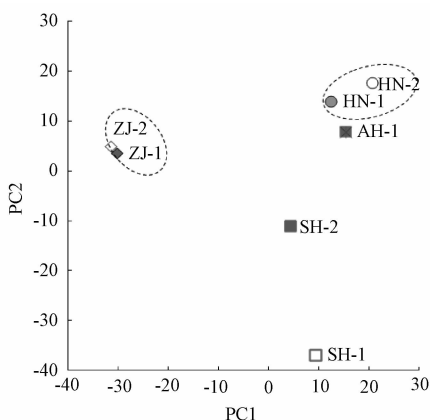


图 2 7 种发酵豆腐中优势细菌属的热图(丰度 >5%)

Figure 2 Heatmap of predominant bacterial genera in seven fermented tofu



注:左图为主成分 1(PC1)与主成分 2(PC2)作图;右图为主成分 1(PC1)与主成分 3(PC3)作图

图 3 7 种发酵豆腐样品的细菌组成的主成分分析(PCA 法)

Figure 3 Principal component analysis of bacterial composition in seven fermented tofu

成分为蛋白质,含量达 50% 以上<sup>[7]</sup>,在发酵过程中,蛋白质被大量微生物利用,分解成多肽和氨基酸。氨基酸含量越高,发酵豆腐的鲜味越浓。同时,微生物在发酵过程中产生脂肪酶,将豆腐中含有的粗脂肪降解成游离脂肪酸,作为菌体发酵的碳源。因此,发酵豆腐的化学组成变化,与微生物产生的酶的作用密不可分。而发酵豆腐的独特风味,如香味、臭味、酸味,也是多种微生物发酵体系的产物引起的,包括烃类、醇类、酯类、醛类、酮类、酸类等上百种挥发性化学成分<sup>[1]</sup>。发酵豆腐的色泽变化,也是微生物发酵的结果。因此,不同的微生物会形成不同的风味。

对不同地方的发酵豆腐曾有研究的报道,卢义伯等<sup>[8]</sup>从取自南京农家制作的臭豆腐发酵乳中分离筛选出一种优势菌种,并鉴定为荧光假单胞菌;郭华等<sup>[9]</sup>从湖南特色臭豆腐分离出奈瑟菌属和环状芽胞杆菌属细菌。虞镇激等<sup>[10]</sup>从绍兴臭豆腐卤液中分离出芽胞杆菌属、乳酸菌属细菌和酵母菌、霉菌。在有些生产工艺中,霉菌类也发挥着重要的作用,对产品的风味作用较大。

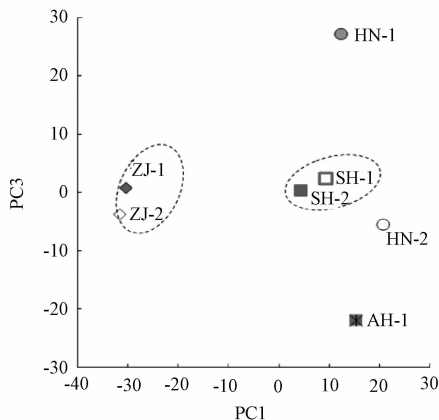
元基因组学(metagenomics)方法不依赖于培养

的细菌菌群结构与其他产地的差异最大,在主成分 1 的轴上的距离最远。

7 种样品中至少在 1 种样品中丰度 >5% 的优势细菌属及其在各样品中的丰度见表 3。由表 3 可知不同菌属的细菌在各个样品中的丰度有差异,部分样品中丰度很高的细菌,在其他样品中未检出,如沉积杆菌属(*Sediminibacterium*)、坦氏菌属(*Tannerella*)、盐厌氧菌属(*Halanaerobium*)等属的细菌。

### 3 讨论

发酵豆腐在生产过程中,起始的豆腐胚中主要



而对样品中的微生物群落组成进行研究,为研究环境中 99% 至今无法进行纯培养的微生物提供了一把金钥匙<sup>[11]</sup>。454 焦磷酸测序已被广泛应用于研究微生物群落结构<sup>[12-13]</sup>,并在土壤、水体、人体和食品等样品的分析中得到广泛应用<sup>[13]</sup>。本文采用了元基因组学的方法对 7 种不同地域的发酵豆腐的细菌菌群组成进行比较分析。可更加全面地分析发酵豆腐的细菌组成特征。但限于长度较短,V3 区的分析无法实现将大部分的细菌分类到种的水平。因此,应用更强大的测序能力,测定更长片段的方法最近也在发展中,如通过 Illumina Miseq 平台对 V3-V4 区进行测序等,今后在此方面将会有改善。

本研究结果表明,7 种发酵豆腐属水平的细菌菌群组成均非常复杂,它们的细菌菌属都在 10 类以上,说明发酵豆腐在生产过程中,参与的细菌菌属非常多。臭豆腐发酵作为一个微生态发酵体系,其菌群组成与地域性、制作工艺有关系,相同地域的发酵豆腐菌群组成相似性高于不同地域或不同工艺的发酵豆腐的菌群。

菌群分析结果中,7 种发酵豆腐样品中都含有拟杆菌属(*Bacteroides*)和梭菌属(*Clostridium*)。拟

表3 发酵豆腐样品中优势细菌菌属及其在各样品中的丰度(%)  
Table 3 Abundance of predominant bacteria in seven fermented tofu samples

门	属名	发酵豆腐						
		SH-1	SH-2	ZJ-1	ZJ-2	HN-1	HN-2	AH-1
拟杆菌门 (Bacteroidetes)	碱曲菌属 ( <i>Alkaliflexus</i> )	0.2	11.2	0.6	1.6	—	0.8	—
	拟杆菌属 ( <i>Bacteroides</i> )	15.7	21.2	21.8	6.1	8.6	1.9	0.1
	<i>Dysgonomonas</i> *	5.9	0.4	0.04	—	—	—	0.02
	游动杆菌属 ( <i>Planobacterium</i> )	7.4	0.4	—	—	—	—	—
	沉积杆菌属 ( <i>Sediminibacterium</i> )	29.2	2.1	0.02	—	—	—	—
	坦氏菌属 ( <i>Tannerella</i> )	30.7	4.1	0.2	5.4	—	—	—
厚壁菌门 (Firmicutes)	梭菌属 ( <i>Clostridium</i> )	0.03	0.1	1.9	1.7	44.8	4.6	0.3
	盐厌氧菌属 ( <i>Halanaerobium</i> )	0.5	19.0	—	—	—	—	—
	螺毛菌科 ( <i>Lachnospiraceae_incertae_sedis</i> )	—	0.1	5.1	0.6	6.7	0.9	0.1
	冷弯菌属 ( <i>Psychrosinus</i> )	2.0	6.0	0.3	1.1	—	—	—
	罗斯菌属 ( <i>Roseburia</i> )	—	—	6.4	10.9	0.3	0.04	0.1
	链球菌属 ( <i>Streptococcus</i> )	0.03	0.3	37.9	40.7	2.4	0.6	—
	束毛球菌属 ( <i>Trichococcus</i> )	—	—	1.0	0.3	11.2	28.6	—
	不动杆菌属 ( <i>Acinetobacter</i> )	0.1	—	—	0.2	0.6	25.4	3.8
变形菌门 (Proteobacteria)	丛毛单胞菌属 ( <i>Comamonas</i> )	0.03	0.6	—	0.1	0.1	4.8	20.1
	克罗诺杆菌属 ( <i>Cronobacter</i> )	—	—	—	0.1	2.6	0.7	5.2
	肠杆菌属 ( <i>Enterobacter</i> )	—	—	—	—	0.2	0.1	6.76
	克雷伯菌属 ( <i>Klebsiella</i> )	—	0.1	—	—	—	0.2	7.8
	泛生菌属 ( <i>Pantoea</i> )	—	—	—	—	0.1	0.1	6.0
	假单胞菌属 ( <i>Pseudomonas</i> )	0.03	—	—	0.02	—	3.5	19.3
	柔特勒菌属 ( <i>Raoultella</i> )	—	0.1	—	0.1	5.4	—	5.6
	弧菌属 ( <i>Vibrio</i> )	0.2	8.4	0.2	0.02	—	2.9	—
柔膜菌门 (Tenericutes)	厌氧原体属 ( <i>Anaeroplasm</i> )	0.1	—	0.4	5.6	—	—	—
梭杆菌门 (Fusobacteria)	梭杆菌属 ( <i>Fusobacterium</i> )	0.2	5.0	5.1	8.4	0.1	0.4	—

注: \* 为该属暂无对应中文名称;—为未检测到该属的细菌;丰度均 >5%

杆菌属作为肠道菌群中的主要细菌,在蛋白质转化中有重要作用;而梭菌属,大多能分解葡萄糖产生CO<sub>2</sub>、乳酸、乙酸、丁酸、乙醇、丁醇等<sup>[14]</sup>,并且部分梭菌属细菌能有效降解纤维素<sup>[15]</sup>,HN-1样品中梭菌属丰度为44.8%,其原料中有富含纤维素的冬笋,梭菌属产的纤维素酶可将纤维素水解成寡糖或单糖;盐厌氧菌属在SH-2样品中丰度达到19.0%,其能在较高盐浓度中生长,能产生乙酸、丙酸、丁酸、己酸、乙醇及硫化氢<sup>[16]</sup>;该样品中还有6.0%的冷弯菌属(*Psychrosinus*),是2008年在南极寒冷环境新发现的细菌属,其代表菌株可以发酵乳酸<sup>[17]</sup>;乳杆菌属能发酵分解糖代谢,终产物中以乳酸为主<sup>[18]</sup>;肠球菌属也是肠道菌群中的主要细菌<sup>[19]</sup>;罗斯菌属(*Roseburia*) 在ZJ-1、ZJ-2中丰度较高分别为6.4%和10.9%<sup>[20]</sup>;假单胞菌属(*Pseudomonas*) 在HN-2和AH-1中丰度较高分别为3.5%和19.3%,它们广泛分布于自然界及正常人皮肤、肠道和呼吸道,能分解蛋白质,分解葡萄糖产酸<sup>[21]</sup>。各地样品的组成具有一些明显的特点,如上海的样品中优势菌属均有拟杆菌属,浙江的样品中优势菌属均有链球菌属,湖南的样品中优势菌属均有毛球菌属,安徽样品中以丛毛单胞菌属和假单胞菌属为主。不

同工艺或产地的发酵豆腐,正因其菌属组成的不同,才产生了独特的风味。

在部分样品中存在较高丰度的致病菌或机会致病菌,在这7种样品中检出属于克雷伯菌属(*Klebsiella*)、沙门菌属(*Salmonella*)、特拉布尔希菌属(*Trabulsiiella*)的细菌,在个别样品中丰度很高,如在AH-1中克雷伯菌为7.8%,其可能为致病菌;个别样品中有高丰度的克罗诺杆菌(*Cronobacter*),该属细菌是常见食源性细菌,可导致婴幼儿的感染,死亡率高;还发现有弧菌属(*Vibrio*)和肠杆菌属(*Enterobacter*)等潜在有害菌属存在,如在SH-2中弧菌属为8.4%。鲁海波等<sup>[22]</sup>对传统发酵豆腐的微生物学指标进行分析,发现大肠菌群超标严重。王龙祥等<sup>[23]</sup>也在发酵豆腐中发现金黄色葡萄球菌、沙门菌、志贺菌3种菌的存在。这说明在现有生产条件下,特别是某些小作坊制作的发酵豆腐,存在一定的食品安全风险。目前发酵豆腐的制作,多利用自然界存在的菌群混合体进行发酵,没有对发酵菌群进行筛选,且制作发酵豆腐的方式周期长,生产方式为开放式培养,发酵条件未严格控制,工艺条件没有标准化,易受到杂菌污染,因而使得产品的质量不易控制。今后可以从发酵菌群控制、生产工

艺条件等方面进行改进,如筛选可以发酵豆腐的有益菌群,并标准化制备生产用菌群,将发酵豆腐制作工艺参数、工艺条件标准化和规范化,规模化生产出高质量、低风险、有独特风味的优质发酵豆腐。

## 参考文献

- [1] 李里. 臭豆腐风味产生菌的分离、鉴定及风味产生机理初探[D]. 湖北:华中农业大学,2010.
- [2] 何理. 发酵型臭豆腐生产工艺及营养价值的研究[D]. 广东:华南理工大学,2012.
- [3] 徐睿烜,蒋立文. 南方臭豆腐的研究现状及加工研究进展[J]. 中国酿造,2014,33(3):5-8.
- [4] ZHANG X J, YUE S Q, ZHONG H H, et al. A diverse bacterial community in an anoxic quinoline-degrading bioreactor determined by using pyrosequencing and clone library analysis [J]. Applied Microbial and Biotechnology, 2011, 91(2): 425-434.
- [5] Margulies M, Egholm M, Altman W E, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors [J]. Nature, 2005, 437(7057):376-380.
- [6] DeSantis T Z, Hugenholtz P, Larsen N, et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB [J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(7): 5069-5072.
- [7] 钱虎君,盖钧镒,喻德跃. 大豆豆腐产量、品质及有关加工性状的遗传分析[J]. 中国油料作物学报,2001,23(1):27-30.
- [8] 卢义伯,潘超,祝义亮. 臭豆腐发酵菌种的筛选与鉴定[J]. 食品科学,2007,28(6):246-249.
- [9] 郭华,廖兴华,周建平. 臭豆腐菌种分离鉴定与酿造工艺研究[J]. 食品科学,2004,25(4):109-115.
- [10] 虞镇激,胡会萍,李里特. 浙江绍兴臭豆腐卤液中微生物菌群的分析[J]. 食品工业科技,2012,33(14):183-187.
- [11] 贺纪正,张丽梅,沈菊培,等. 宏基因组学(Metagenomics)的研究现状和发展趋势[J]. 环境科学学报,2008,28(2): 209-218.
- [12] 华蔚颖. 应用454测序技术分析菌群结构的方法学研究[D]. 上海:上海交通大学,2010.
- [13] 吕昌勇,陈朝银,葛锋,等. 微生物分子生态学研究方法的最新进展[J]. 中国生物工程杂志,2012,32(8):111-118.
- [14] 凌代文. 梭菌属的一个新种——产气梭菌[J]. 微生物学报, 1993,33(1):1-6.
- [15] 刘艳. 嗜热厌氧梭菌降解纤维素及产氢特性研究[D]. 山东:山东大学,2010.
- [16] 万波,李安明,赵海,等. 一株厌氧嗜盐菌的鉴定[J]. 微生物学通报,1997,24(3):131-134.
- [17] Sattley W M, Jung D O, Madigan M T. *Psychrosinus fermentans* gen. nov., sp. nov., a lactate-fermenting bacterium from near-freezing oxycline waters of a meromictic Antarctic lake [J]. FEMS Microbiol Lett, 2008, 287(1):121-127.
- [18] 徐寅,陈霞,顾瑞霞. 乳酸菌与臭豆腐品质特性的相关性研究[J]. 中国调味品,2010,10(35):67-69.
- [19] 王晓春,廖延雄. 肠球菌分类的最新研究进展[J]. 江西科学, 1986,4(1):65-70.
- [20] Louis P, Young P, Holtrop G, et al. Diversity of human colonic butyrate-producing bacteria revealed by analysis of the butyryl-CoA:acetate CoA-transferase gene [J]. Environ Microbiol, 2010, 12(2):304-14.
- [21] 卢伯义,潘超,祝义量. 臭豆腐发酵菌种的筛选与鉴定[J]. 食品科学,2007,28(6):246-249.
- [22] 鲁海波,王龙祥,朱海泉,等. 传统臭豆腐的微生物学指标分析[J]. 中国食品卫生杂志,2012,24(4):306-308.
- [23] 王龙祥. 油炸臭豆腐安全性分析与研究[D]. 湖南:中南林业科技大学,2012.

## · 公告 ·

# 国家卫生计生委关于批准 $\beta$ -半乳糖苷酶为食品添加剂新品种等的公告

2015年第1号

根据《中华人民共和国食品安全法》和《食品添加剂新品种管理办法》,经审核,现批准 $\beta$ -半乳糖苷酶为食品添加剂新品种;6-甲基辛醛为食品用香料新品种;氧化亚氮、阿拉伯胶、红曲黄色素、抗坏血酸(维生素C)、迷迭香提取物、二甲基二碳酸盐(又名维果灵)、硫酸铝钾(又名钾明矾)/硫酸铝铵(又名铵明矾)、磷酸、焦磷酸钠、六偏磷酸钠、迷迭香提取物(超临界二氧化碳萃取法)等11种食品添加剂扩大使用范围、用量。

特此公告。

附件1: $\beta$ -半乳糖苷酶食品添加剂新品种

附件2:6-甲基辛醛食品用香料新品种

附件3:氧化亚氮等11种扩大使用范围、用量的食品添加剂

(相关链接:<http://www.moh.gov.cn/sps/s7890/201501/8455dc01b026484ebdef3122808abccd.shtml>)

国家卫生计生委

二〇一五年一月二十三日