

碎鲜辣椒发酵制品发酵用乳酸菌的 选育与接种发酵试验

邓放明, 李罗明, 尹 华, 刘素纯, 赵玲艳, 彭凤祥, 夏延斌
(湖南农业大学食品科学技术学院, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 本试验选育了两株碎鲜辣椒发酵制品接种发酵用乳酸菌(*Lact.chili.6* 和 *Lact.chili.8*), 经接种与低盐发酵实验证明: *Lact.chili.6* 和 *Lact.chili.8* 产酸速度快, 抑制杂菌能力强, 产品中亚硝酸盐含量低, 发酵后期产品酸度稳定, 低食盐含量(10% 以下)发酵产品的保藏期能显著延长。

关键词: 辣椒; 发酵; 乳酸菌; 分离选育; 接种; 亚硝酸盐; 保藏期

Isolation and Selection of *Lactobacillus* Strains for Fermented Piece of Broken Verdure Chili and Inoculation Fermentation Experiment

DENG Fang-ming, LI Luo-ming, YIN Hua, LIU Su-chun, ZHAO Ling-yan,
PENG Feng-xiang, XIA Yan-bin

(College of Food Science and Technology, Huanan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: In this test 2 *Lactobacillus* strains (named *Lact.chili.6* and *Lact.chili.8*) were isolated, selected and adapted to fermented piece of broken verdure chili. The results of *Lact.chili.6* and *Lact.chili.8* showed that with obvious lactic acid productivity, inhibition effect to corruptive microbes, low nitrite content in product, steady acidity in fermentation anaphase and the storage life of product was obviously prolonged in low salt content by inoculation fermentation.

Key words: chili; fermentation; *Lactobacillus*; isolation and selection; inoculation; nitrite; storage life

中图分类号: TS261.15

文献标识码: B

文章编号: 1002-6630(2005)03-0106-04

碎鲜辣椒发酵制品俗称剁辣椒, 是湖南一种颇具特色的传统食品和调味品, 是发酵辣椒制品的典型代表, 它既保留了新鲜红辣椒的形态、脆度、辣味和色泽, 又具有发酵辣椒制品特有的风味、香气和保健作用; 既可直接食用, 又是调味佳品。其传统加工方法是新鲜红辣椒经去蒂、洗涤、晾干、破碎后, 加食盐、料酒等拌料, 再入坛腌制。传统加工方法由于主要是利用乳酸菌的自然发酵和食盐保存作用进行加工, 因此, 存在诸多问题, 一是产品品质难控制, 加工初期如气温较高, 由于杂菌繁殖, 产品不仅风味不正, 而且易变色和丧失脆度, 特别是大批量生产时, 这一问题更为突出; 二是产品保存期短, 为了确保良好的风味, 一般剁辣椒加工时, 添加约 10% 的食盐, 但产品的保质期只有 1 个月左右, 不适于工业化生产对原料保存的要求, 更不能满足市场对产品保质期的要求。因此,

湖南的这一传统特色风味食品, 一直局限于家庭制作。近年来, 人们利用高盐(食盐含量 20% 以上)腌制法腌制辣椒, 虽然可保留住辣椒的色泽、辣味和脆度, 但是产品不仅没有发酵辣椒制品特有的风味、香气和保健作用, 而且加工和食用前必须经过脱盐处理, 这样不仅增加生产成本, 而且造成环境污染。为了开发碎鲜辣椒发酵制品系列食品, 我们分离选育了其优良乳酸菌种, 并进行其人工接种与低盐发酵实验。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 乳酸菌种分离源 以湖南省传统发酵的剁辣椒、泡菜和辣椒酱为分离源, 分离乳酸菌菌种。

1.1.2 用于乳酸菌分离与培育的培养基

收稿日期: 2004 - 03 - 02

基金项目: 农业部 948 项目(2003-T18); 科技部重大科技攻关项目(2001BA535C-09)

作者简介: 邓放明(1962-), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品科学。

培养基1: 蛋白胨 10g; 酵母提取物 5g, 牛肉膏 10g; 吐温 80ml; K_2HPO_4 2g; 蔬菜汁 200ml, 蒸馏水 800ml, 琼脂 20g。用于乳酸菌分离、活化。

培养基2: 蛋白胨 10g; 酵母提取物 5g, 牛肉膏 10g; 吐温 80ml; K_2HPO_4 2g; 蔬菜汁 200ml, 蒸馏水 800ml, 用于乳酸菌增殖培养。

培养基3: MRS 培养基: 蛋白胨 10g; 酵母提取物 5g; 柠檬酸二铵 2g; 葡萄糖 20g; 牛肉膏 10g; 吐温 80ml; K_2HPO_4 2g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.58g; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.25g; 蒸馏水 1000ml; pH6.4, 用于乳酸菌保存及计数。

培养基4: 2% 蔗糖, 0.5% 蛋白胨, 10% 大豆粉, 0.5% 玉米浸提液, 0.5% 的磷酸二氢钾。该培养基配方为反复试验后确定。用于发酵液扩大培养。

其他用于生理生化检测的培养基: 过氧化氢酶培养基、硝酸盐利用培养基、酪素水解培养基、明胶液化培养基、吲哚反应和 H_2S 试验培养基。

1.1.3 辣椒 湖南省醴陵市贺家桥乡产新鲜红椒(牛角椒)。

1.2 方法

1.2.1 乳酸菌的分离、筛选及保存方法

取自然发酵蔬菜的汁→于培养基1上进行平板划线分离→35℃倒置培养2~4d→挑取有溶钙圈的单菌落染色、镜检→革兰氏染色分离(阳性杆菌单菌落)→反复在培养基1上纯化筛选→在培养基2上增殖培养→在培养基3上试管穿刺低温保存

1.2.3 乳酸菌产酸能力检测方法

将乳酸菌接种于液体发酵培养基(培养基2)中, 在35℃下静置培养, 定时取样测定发酵液的pH值和波长680nm下的光密度(OD)值。

1.2.4 乳酸菌抑菌能力检测方法

取MRS液体培养基, 分别接种相关菌株, 35℃静置培养20h, 3000r/min离心20min去除菌体细胞, 取上清液用碱中和至pH5.0以消除抑菌试验中有机酸的影响。以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和植物乳杆菌为指示菌, 将指示菌活化, 菌体细胞与融化至50℃的固体培养基混合后倒平板, 用牛津杯法测定发酵液对指示菌的抑制作用。采用pH5.0的乳酸和以胰蛋白酶处理过的发酵液做对照。

1.2.5 辣椒发酵试验

取市售新鲜红辣椒, 洗净, 晾干、剁碎, 拌上10%的食盐, 人工接种发酵液后(接种量3%左右)或不接种(靠残留在辣椒中的天然乳酸菌发酵)入坛密封, 在室温(25℃左右)下发酵, 定期取样进行感官评定、酸度和亚硝酸盐含量测定。

1.2.6 辣椒发酵品保存试验

采用不同发酵方式生产的剁辣椒分别在北方低温环境(5~10℃)、南方地下室(15℃)和冷库(0~4℃)等条件下进行了贮藏试验, 定期取样进行感官评定。

1.2.7 亚硝酸盐含量测定 按国家标准方法检测(GB/T5009.33-1996)。

2 结果与讨论

2.1 分离乳酸菌菌株形态鉴定及其生理生化特征

从各种蔬菜发酵制品中分离、选育, 得到15个菌株, 从对比该15个菌株的发酵产酸性能、制品风味与脆度以及亚硝酸盐含量等指标来看, 有两个菌株比较理想(分别标为*Lact.chili.6*和*Lact.chili.8*)。选育得到的比较理想的这两个菌株通过扩大培养, 性能稳定, 从其显微照相图(图1)可初步判断为杆状菌, 结合其形态特征和生理生化特征(表1), 查阅Bergey氏细菌鉴定手册, 可知两株菌均为乳酸杆菌属。



Lact.chili.8 显微照相图
Micrograph of *Lact.chili.8*



Lact.chili.6 显微照相图
Micrograph of *Lact.chili.6*

图1 两株乳酸菌显微照相图

Fig. 1 The micrograph of *Lact.chili.8* and *Lact.chili.6*

2.2 *Lact.chili.6* 和 *Lact.chili.8* 产酸能力的测定

将*Lact.chili.6*和*Lact.chili.8*接种于液体发酵培养基(培养基2)中, 在35℃下静置培养, 定时取样测定发酵液的pH值和波长680nm下的光密度(OD)值。试验结果(图2)显示, *Lact.chili.6*和*Lact.chili.8*菌株的产酸速度和OD值增加较快, 明显高于其他乳酸菌(未在图中显示), 其中*Lact.chili.8*菌株在接种后2d内pH值就降到4.3, OD值在不到2d时间内就增加到0.5, 其产酸能力和繁殖速度优于其它菌株, 而且在发酵后期, 其pH值

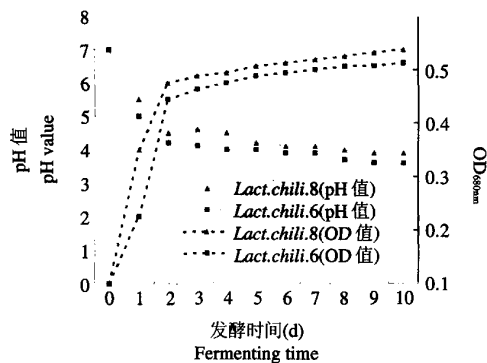


图2 培养时间与产酸量和OD值的关系

Fig. 2 The relationships among culture time and acid output of *Lactobacillus* and value of OD

变化较小,可抑制产品的过渡酸化。在工业化生产中,产酸能力强且繁殖速度和产酸速度较快的乳酸杆菌可以迅速抑制其他杂菌的生长。

2.3 *Lact.chili.6* 和 *Lact.chili.8* 的抑菌试验

为了解选育的两个优良菌株对杂菌特别是腐败菌的抑制能力,我们做了抑菌试验。取 MRS 液体培养基,分别接种相关菌株,35℃静置培养 20h,3000r/min 离心

表1 筛选菌的基本形态学和生理特征

Table 1 The character of basic shape and physiology of selected <i>Lactobacillus</i>		
基本特征	菌株	
	<i>Lact.chili.6</i>	<i>Lact.chili.8</i>
菌苔颜色	乳白色	乳白色
菌落直径(mm)	1.5-2.0	2.5-3.0
菌苔形状	念珠状	乳头状
表面状态	微粗糙不透明	光滑不透明
生长层面	表面和培养基内部	同 <i>Lact.chili.6</i>
穿刺培养特征	沿穿刺线生长,不扩散	同 <i>Lact.chili.6</i>
菌体形状	短链杆菌	链杆菌
菌体大小(μm)	1.5 × 1	2 × 1
鞭毛	无	无
芽孢	无	无
革兰氏染色	阳性	阳性
接触酶试验	—	—
硝酸盐利用	—	—
酪素水解	—	—
明胶液化	—	—
吲哚反应	—	—
H ₂ S 产生	—	—

注:“—”:阴性或没有反应。

20min 去除菌体细胞,取上清液用碱中和至 pH5.0 以消除抑菌试验中有机酸的影响。

以植物乳杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌为指示菌,将指示菌活化,菌体细胞与融化至 50℃ 的固体培养基混合后倒平板,用牛津杯法测定发酵液对指示菌的抑制作用。采用 pH5.0 的乳酸和以胰蛋白酶处理过的发酵液做对照。结果如表 2 所示。

表2 发酵液的抑菌作用

Table 2 Effect of fermented liquor of *Lactobacillus* on checking growth of bacterium

处理溶液(pH5)	指示菌		
	大肠杆菌	植物乳杆菌	金葡萄
植物乳杆菌发酵液	—	—	+
植物乳杆菌发酵液(胰酶处理)	—	—	—
发酵乳杆菌发酵液	—	—	+
发酵乳杆菌发酵液(胰酶处理)	—	—	—
<i>Lact.chili.6</i> 发酵液	—	+	+
<i>Lact.chili.6</i> 发酵液(胰酶处理)	—	—	—
<i>Lact.chili.8</i> 发酵液	—	+	+
<i>Lact.chili.8</i> 发酵液(胰酶处理)	—	—	—
乳酸	—	—	—

注:“+”:有抑制作用;“—”:没有抑制作用。

由表 2 可知, pH5 的乳酸菌(*Lact.chili.6* 和 *Lact.chili.8*)发酵液可抑制革兰氏阳性菌(金黄色葡萄球菌和植物乳杆菌)的生长。但对革兰氏阴性菌(大肠杆菌)无影响。而 pH5 的乳酸对 3 种指示菌均无抑制作用,可排除发酵液的抑菌作用是由酸引起的可能。胰蛋白酶作用后发酵液的抑菌作用丧失,表明抑菌因子是蛋白质类物质。这与已经报道的乳酸菌素是一种具有杀菌作用的多肽,可以抑制一些革兰氏阳性菌,尤其是抑制一些腐败菌和病原菌的结论是一致的,试验结果也证实 *Lact.chili.6* 和 *Lact.chili.8* 两株乳酸菌确有抑制杂菌的能力。

2.4 辣椒发酵试验

取市售新鲜红辣椒,洗净,晾干、剁碎,拌上 10% 的食盐,人工接种发酵液后(接种量 3% 左右)或不接种(靠残留在辣椒中的天然乳酸菌发酵)入坛密封发酵。在室温(25℃ 左右)发酵至 pH 值达到 4.0 后进行亚硝酸盐测定和感官评定。分组处理方法与结果如下表 3。

从表 3 中可看出,将选育得到的两株菌株(*Lact.chili.6* 和 *Lact.chili.8*),单独或混合接种在辣椒上在发酵

表3 不同菌株对红辣椒发酵制品发酵时间、亚硝酸盐含量和感官品质的影响

Table 3 Effect of different *Lactobacillus* on fermenting time, nitrite content and sense quality of chili

组别	1	2	3	4
接种处理	<i>Lact.chili.6</i>	<i>Lact.chili.8</i>	混合菌种(<i>Lact.chili.6</i> +8)	对照(不接种)
亚硝酸盐含量(mg/kg)	0.15	0.16	0.12	15
发酵时间(d)	10	8	8	20
感官鉴评结果	鲜红色、有酱香、 味鲜、质脆	鲜红色、有酱香、 味鲜、质脆	鲜红色、酱香浓郁、 味鲜、质脆	鲜红色、有酱香、 味鲜、质软

液 pH 值达到 4.0 后, 亚硝酸盐含量均小于 1mg/kg, 以混合菌种(*Lact.chili.6*+*Lact.chili.8*)组合抑制亚硝酸盐效果最好(只有 0.12mg/kg), 而没有人工接种乳酸菌的对照组亚硝酸盐含量高达 15mg/kg。从感官评价结果来看, 接种混合菌种组(3 组)和对照组(4 组)香气略好于 1 组和 2 组, 说明混合接种对产品香气的生成是有利的, 但在保脆方面, 接种乳酸菌的处理明显优于对照。达到理想的感官指标后, 接种 *Lact.chili.6* 菌种(1 组)的需要 10d 左右时间, 接种 *Lact.chili.8*(2 组)与混合接种组(3 组)发酵时间在 8d 左右, 而对照组则在 20d 左右。

2.5 发酵辣椒的保存试验

由于红辣椒的成熟季节比较集中, 辣椒发酵后, 制品能否较长时间的保存其良好的品质是剁辣椒生产中的关节。课题组对采用不同发酵方式生产的剁辣椒分别在北方低温环境(10℃)、南方地下室(15℃)和冷库(0~4℃)等条件下进行了贮藏试验, 结果见图 3。

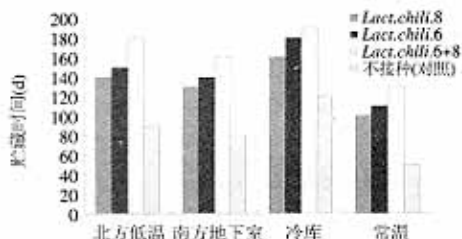


图3 发酵辣椒的保存试验结果

Fig. 3 The shelf life of ferment chili with different *Lactobacillus* on different condition

从图 3 可见, 利用课题组选育得到的两个菌株单独或混合接种至辣椒中发酵得到的辣椒发酵制品的保存性能明显比对照组好。其中混合接种发酵制品的保存性最佳, 常温下也可保存 130d, 而对照组只能保存 50d。在不同温度环境下进行贮藏, 发酵辣椒制品的保存性有一定的差别, 冷藏发酵辣椒制品的保存期较长, 对照组可达 120d, 采用纯乳酸菌发酵的辣椒制品的保存期可达 190d; 利用北方低温地下室贮藏辣椒制品, 对照组的保存期为 90d, 纯乳酸菌发酵的辣椒制品的保存期可达 170d; 利用南方地下室贮藏辣椒制品, 对照组的保存期为 80d, 纯乳酸菌发酵的辣椒制品的保存期可达 160d。利用地下室贮藏辣椒制品的成本比冷藏的成本低, 因此, 它们是低盐发酵辣椒制品贮藏的有效方法之一。

3 讨论

碎鲜辣椒发酵制品这一湖南的特色传统食品和调味品开发中存在的主要问题是如何在低食盐和低亚硝酸盐含量下, 既保留新鲜红辣椒的形态、脆度、辣味、色

泽和发酵辣椒制品特有的风味、香气和保健作用, 又具有一定的保存期, 以适应工业化生产的需要。

本试验分离选育的两株乳酸菌经培养基培养观察其产酸速度快, 可分泌抑制其他微生物生长的代谢产物, 具有一定抑制杂菌的能力。

将选育的两株乳酸菌通过人工接种, 进行辣椒发酵试验, 产品成熟时所需的发酵时间明显比自然发酵的短, 一方面说明人工接种发酵乳酸菌能迅速成为优势菌, 另一方面说明所选育的乳酸菌具有产酸速度快的特性; 产品中亚硝酸盐含量明显低于自然发酵的产品, 发酵后期酸度较稳定, 在低盐(食盐含量为 10%)条件下, 产品在常温和低温环境中可保藏 130d 和 190d, 保藏期明显比自然发酵的产品长, 这些与选育的两株乳酸菌种能抑制其他微生物生长是紧密相连的, 至于接种乳酸菌发酵和产品中亚硝酸盐含量下降的关系和机理尚待进一步研究; 从感官评价结果来看, 接种混合菌种和自然发酵的产品的香气优于接种单一选育乳酸菌菌种发酵的产品, 说明混合接种对产品香气的生成是有利的, 在产品保脆方面, 接种乳酸菌的处理明显优于自然发酵, 其可能原因是接种乳酸菌后, 乳酸菌快速繁殖抑制了分泌果胶酶的杂菌生长, 因此, 辣椒中果胶物质的分解被抑制。本研究的进行为开发湖南碎鲜辣椒发酵制品这一传统特色风味食品, 使其实现工业化生产奠定了一定的研究基础, 但还有许多理论和技术问题尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] 凌代文. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- [2] 康明官. 中外著名发酵食品生产工艺手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 1997.
- [3] 刘屹峰. 乳酸菌的生理特性和生物学功能[J]. 丹东纺专学报, 2002, 9(2): 5-8.
- [4] 闵华, 袁林峰, 张灿权, 等. 发酵蔬菜乳酸菌的分离及培养基的选择[J]. 江西农业学报, 2002, 24(2): 62-64.
- [5] 王禾, 韩春然, 王金凤, 等. 蔬菜乳酸发酵菌株的筛选及培养条件的研究[J]. 食品科学, 1999, (1): 39-41.
- [6] H P Fleming, et al. Use of Microbial Culture, Vegetable Products[J]. Food Technology, 1981, (35): 84-88.
- [7] 孔庆学, 张东杰. 植物性原料乳酸菌发酵饮料研究进展[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 1998, (4): 64-67.
- [8] 林亲录, 何煜波, 谭兴和, 等. 传统芥菜发酵制品中优势乳酸菌种的分离鉴定[J]. 食品科学, 2003, 24(6): 69-71.
- [9] 段翰英, 李远志, 蒋善友, 等. 泡菜的亚硝酸盐积累问题研究[J]. 食品研究与开发, 2001, 22(6): 15-17.
- [10] 汤务霞. 乳酸菌及其应用[J]. 四川食品与发酵, 2001, 37(4): 33-37.
- [11] 林亲录, 何煜波, 谭兴和, 等. *Lact.3* 和 *Lact.6* 两株选育菌种的发酵性能研究[J]. 食品科学, 2003, 24(7): 79-82.