

芥菜半干腌制发酵过程中乳酸菌的分离及特性研究

顾振宇, 陈荷凤, 梁新乐, 张卫斌

(杭州商学院食品生物与环境工程学院, 浙江 杭州 310035)

摘 要: 本文主要对芥菜半干腌制发酵过程中不同时期的乳酸菌进行分离鉴定及特性研究, 从中分离出 6 种菌。经形态特征、培养特性和生化试验等鉴定, 结果表明, 这 6 种菌分别为: 肠膜状明串珠菌、发酵乳杆菌、植物乳杆菌、乳酸片球菌、酵母菌和短乳杆菌。并观察了发酵过程中各个时期的主导菌相, 最后得出保证腌制芥菜腌制成功的因素及其最终发酵 pH。

关键词: 腌制芥菜; 乳酸菌; 分离鉴定; 主导菌相

Study on the Isolation and Characteristics of Lactic Acid Bacteria from the Natural Fermentation of Pickling Mustard

GU Zhen-yu, CHEN He-feng, LIANG Xin-le, ZHANG Wei-bin

(Department of Biotechnology and Engineering, Hangzhou University of Commerce, Hangzhou 310035, China)

Abstract: The isolation, definition and characteristics of lactic bacteria in the nature fermentation of pickling mustard were studied. After the identification of shape and culture and biochemistry tests, it was determined that six isolated kinds of lactic acid bacteria were differentiated as *Leuconosioc mesenteroids*, *Lectobacillus fermentum*, *Lectobacillus plantarum*, *Pediococcus cererisias*, Yeast and *Lectobacillus hrevis*. According to their characteristics, the major bacteria of all the natural fermentation process were determined for better quality and optimum conditions.

Key words: pickling mustard; lactic acid bacteria; isolation identification; major bacteria

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630 (2004) 03-0084-03

蔬菜的腌制是我国最古老、最基本和最大众的蔬菜贮藏及加工方式, 生生不息, 世代相传, 沿用至今, 并在实践中得到了丰富和发展, 是我国珍贵的民族遗产的一部分, 是我国历代劳动人民智慧的结晶。

但由于历史等各种原因, 有的品种已失传或面临失传的危险。尤其是一些名特优产品, 是前辈从漫长的实践中勇于探索, 总结出来的宝贵经验, 其中蕴藏着极其高深, 极其奥妙的原理和秘诀, 但往往是知其然而不知其所以然。所以用现代科学技术去揭示其中奥秘, 发展和完善其工艺, 使传统食品由经验管理上升到科学管理, 发扬光大传统特色食品, 意义重大, 任重道远。

半干腌制芥菜就是产于浙江海宁及周边地区的一种传统的民间腌制蔬菜食品。一直以来以手工腌制为主, 产量不高, 其加工原理与其它腌制蔬菜类似, 但加工方法有所不同。由于芥菜是冬季播种, 早春收割后腌制加工, 故这种半干腌制芥菜又称冬菜。由于其产品咸中带酸, 酸中带甜, 香气绵绵,

回味清新, 是深受欢迎的地方传统食品。

本文通过对海宁半干腌制芥菜腌制发酵过程中不同阶段的乳酸菌分离鉴定及各种特性研究, 得出不同腌制阶段主导发酵的乳酸菌菌相及变化规律, 为今后此类传统腌制菜的工业化生产, 提供有价值的科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 样品来源

海宁半干腌制芥菜 (由海宁沛国食品公司提供)

腌制方法: 原料 (新鲜芥菜洗净) → 脱水 (晾晒) → 第一次腌制 (按 3.5%~4% 食盐, 一层菜一层盐压实, 时间 5~7d) → 第二次腌制 (按 7%~8% 食盐, 一层菜一层盐压实, 时间 7~14d) → 取出 (此时为毛熟菜) → 装坛发酵 (将毛熟菜装入坛内, 层层压紧, 棕叶覆盖, 坛口扎紧, 倒扣地面, 让汁液自然渗出) → 存放后熟。

收稿日期: 2003-09-21

作者简介: 顾振宇 (1965-), 男, 高级实验师。

1.1.2 培养基 改良MRS培养基

1.1.3 微量糖发酵管 杭州微生物试剂有限公司出产

1.1.4 生化实验用培养基 按食品卫生检验方法微生物部分国际GB4789.28-94配制

1.1.5 仪器

S.C101-2型鼓风电热恒温干燥箱; S.C303-4型电热恒温培养箱; SZX-ZZP型超净工作台; 高压蒸汽消毒锅; 华日电冰箱; OLYMPUS显微镜; 目镜测微尺; 物镜测微尺; 哈纳笔式酸度计; 碱式滴定管; 强型厌氧盒

1.2 实验方法

1.2.1 检样处理

无菌操作取样品10g, 加无菌水10ml, 在无菌乳钵内捣碎, 制成1:1的检样匀液, 并递增稀释至 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 三

个稀释度。

1.2.2 腌制芥菜中乳酸菌的分离纯化

将稀释匀液各取0.2ml的量, 用L棒涂布于MRS平皿上, 经37℃厌氧培养48h后, 取单个疑似菌落, 继续划线接种MRS平板, 进行纯化培养, 并在MRS半固体培养基保存待用。

1.2.3 腌制芥菜中乳酸菌的需氧试验

将分离纯化后各菌株分别接种高层液体培养基, 37℃静置培养24h后, 观察生长情况。接种管经培养后, 凡液体清亮, 管底大量菌体沉淀(有时管壁点状絮凝)为厌氧菌; 凡液面上层清亮(约1cm), 下层混浊, 管底大量沉淀为微好氧菌; 液体均匀混浊为兼性厌氧; 液体清亮, 液面有菌膜、菌环为好氧菌。

1.2.4 腌制芥菜中乳酸菌的初步鉴定

表1 半干腌制芥菜中菌种分离及特性

菌落形态							液体培养				耐温性			耐盐性			
隆起度	透明度	颜色	大小 (μm)	形态	芽孢	其它	混浊度	底部	管壁	好氧性	20℃	37℃	45℃	5 %	8 %	12 %	15 %
隆起	不透明	乳白	5.94×2.63	长圆形	无	产气	液体清亮	大量沉淀	点状絮凝	厌氧	+	+	-	+	+	-	-
隆起	不透明	乳白	0.63	球形	无	四联球菌	均匀混浊	菌体沉淀	/	兼性厌氧	+	+	+	+	+	-	-
隆起	不透明	灰白	1.10×0.79	豆形	无	链状、有荚膜	均匀混浊	菌体沉淀	/	兼性厌氧	+	+	-	+	-	-	-
隆起	不透明	黄白	3.07×0.57	杆状	无	长短杆	液体清亮	大量沉淀	点状絮凝	厌氧	+	+	+	+	+	-	-
隆起	半透明	乳白	5.06×0.88	杆状	无	有空泡、栅栏状排列	均匀混浊	菌体沉淀	/	兼性厌氧	+	+	-	+	+	-	-
扁平	半透明	乳白	1.69×0.63	杆状	无	细胞成对、栅栏状排列	上层清亮、中层以下混浊	菌体沉淀	/	微好氧	+	+	-	+	+	-	-

续上表

耐酸性			生化试验				发酵糖类											初步鉴定
pH5	pH4	pH3	过氧化氢酶	吲哚	硝酸盐还原	明胶液化	葡萄糖	棉子糖	麦芽糖	蔗糖	乳糖	木糖	甘露醇	山梨醇	pH测定	乳酸度(%)		
+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	5.88	/	酵母菌	
+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	4.05	0.84	乳酸片球菌	
±	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	3.81	0.73	肠膜状明串珠菌	
+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	3.70	0.79	发酵乳杆菌	
+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	3.90	0.92	植物乳杆菌	
+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	3.75	0.72	短乳杆菌	

注: “+”表示阳性反应; “-”表示阴性反应; “±”表示可变性质。

表2 半干腌制芥菜不同发酵阶段微生物菌群变化

菌名	发酵前期 (装坛发酵 7d)	发酵中期 (装坛发酵 14d)	发酵后期 (装坛发酵 21d)	成熟期 (装坛发酵 31d)
酵母菌	+	—	—	—
肠膜状明串珠菌	+	—	—	—
乳酸片球菌	+	+	—	—
发酵乳杆菌	+	+	+	+
植物乳杆菌	—	+	+	—
短乳杆菌	—	+	+	+

“+”表示分离到;“—”表示未分离到。

将疑似乳酸菌菌落进行革兰氏染色观察菌体形态和染色特征,并接种MRS液体培养基观察生长情况,同时进行过氧化氢酶试验和耐热试验,凡为厌氧或兼性厌氧的G⁺无芽孢菌,过氧化氢酶阴性,45℃不生长,可为初步认定疑似乳酸菌。

1.2.5 其它生物学特性研究

将初步疑似乳酸菌的菌株接种MRS液体培养基经37℃培养24h后,按3000r/min离心15min,取菌体用生理盐水洗2次后,再用适量生理盐水稀释,进行以下生化实验:糖发酵试验、吲哚硝酸盐还原、明胶液化、耐盐性试验、耐酸性试验、pH值测定和乳酸度测定。

2 结果与分析

2.1 首先我们请海宁沛国食品公司将二次腌制后毛熟菜装入小坛,压紧密封,送往实验室,共四小坛,每坛约5kg。分别于装坛发酵后7、14、21、31d时各开一坛,进行乳酸菌分离培养及各项生理生化及生长特性观察,并根据《乳酸菌-生物学基础及应用》^[1]、《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》^[2]、《伯杰细菌鉴定手册》^[3]、《应用微生物学实验法》^[4]、《盐渍蔬菜生产实用技术》^[5]等文献进行综合判定,从而分析发酵不同时期微生物菌群变化。结果见表1、2。

由表1可见,半干腌制芥菜中微生物种类较丰富,共有6种发酵微生物参与。

从表2可见,就参与发酵的微生物种类来看:发酵前期和中期共有四种微生物参与,发酵后期为三种,到了成熟期仅为二种,呈逐渐减少趋势。

就参与发酵的主导菌相来看:发酵前期以肠膜状明串珠菌和乳酸片球菌占优势,为主导菌相,这两种菌均为繁殖快而不耐酸的产气球菌类;发酵中期,酵母菌和肠膜状明串珠菌消失,除乳酸片球菌外,产酸乳杆菌开始活跃种类由一种增加到三种;到发酵后期,球菌也随之消失,全部由产酸乳杆菌取代为主导菌相;进入成熟期,植物乳杆菌也消失,发酵乳杆菌与短乳杆菌成为主导菌相。而发酵乳杆菌自始至终参与整个芥菜腌制发酵过程。

3 结 论

3.1 从海宁半干腌制芥菜中共分离到参与发酵的菌种有6种,分别为:酵母菌、乳酸片球菌、肠膜状明串珠菌、发酵乳杆菌、植物乳杆菌和短乳杆菌。

3.2 在整个芥菜腌制发酵过程,酵母菌出现在发酵前期,肠膜状明串珠菌和乳酸片球菌出现在发酵前期和中期,植物乳杆菌出现在发酵中期和后期,短乳杆菌出现在发酵中期至成熟期,而发酵乳杆菌出现在发酵各个时期。

3.3 腌制芥菜进入成熟期,参与发酵的微生物仅有发酵乳杆菌和短乳杆菌二种。其中发酵乳杆菌赋予腌制芥菜特有的乳酸发酵风味和香味,而短乳杆菌既能产酸又能产出风味物质,这也是海宁半干腌制芥菜咸中带酸,并有特殊芳香味的原由。

3.4 参与发酵所有菌种均能在25、37℃两个温度生长,而大多数不能在45℃生长。因此,在腌制装坛后,应放置阴凉处,避免阳光直射,温度控制在室温以下,以保证腌制芥菜达到成熟并保证其品质良好。

3.5 参与发酵的乳酸菌中,出现在发酵前期和中后期的乳酸片球菌和植物乳杆菌为正型乳酸发酵,而出现在成熟期的发酵乳杆菌、短乳杆菌为异型乳酸发酵,其产生的酸度均在pH3.75左右。据有关资料介绍,在低于pH3.6时,乳酸菌生长会逐渐停止甚至死亡。可见,海宁半干腌制芥菜的制作工艺是合理的。

参 考 文 献:

- [1] 杨洁彬,等.乳酸菌-生物学基础及应用[M].中国轻工业出版社,1996.
- [2] 凌代文,等.乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M].中国轻工业出版社,1999.
- [3] R.E 布坎南,等.伯杰细菌鉴定手册(第八版)[M].科学出版社.
- [4] 方心芳.应用微生物学实验法[M].中国轻工业出版社,1993.
- [5] 陈功.盐渍蔬菜生产使用技术[M].中国轻工业出版社,2001.