

亮氨酸(Ile)为1.21%, 亮氨酸(Leu)和苯丙氨酸(Phe)为4.89%, 缬氨酸(Val)2.95%, 苏氨酸(Thr)为1.95%, 赖氨酸(Lys)为1.94%。这样的氨基酸组成与文献报道^[9]的猪皮胶原原料组成基本一致。

2.5 水解物的分子量分布

对于在不外加碱的pH值渐变条件下利用碱性和酸性蛋白酶双酶协同水解猪皮12h得到的水解物, 进行葡聚糖凝胶层析, 结果如图9所示。

经过分子量标准物标定, 在试管数小于25处的肽分子量在5000以上, 在试管数33处的肽分子量为4000左右, 在试管数54处的肽分子量为2000~3000, 在试管数61处出的肽分子量在1000以下。对图形进行积分计算, 用谱图中试管数为57之后的曲线的积分面积除以谱图曲线总的积分面积, 近似估算出分子量在1000以下的肽和氨基酸占全部水解产物的42.5%。

参考文献:

[1] 李中东. 浅谈猪皮的组成和利用[J]. 肉类研究, 1995, (2):

33-34.

[2] 李开雄等. 猪皮中胶原蛋白的提取及其应用[J]. 肉类研究, 1996, (4): 43-47.

[3] Hee-Guk Byun, Se-Kwon Kim. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Alaska Pollack (Theragra chalcogramma) skin[J]. Process Biochemistry, 2001, (36): 1155-1162.

[4] 邓勇等. 微生物蛋白酶对大豆分离蛋白水解作用的研究[J]. 食品科学, 1996, (6): 42-45.

[5] 北京师范大学生物系生物化学教研室. 基础生物化学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1982. 121-123.

[6] Alder-Nissen J. Enzyme Hydrolysis of Food Protein. Elsevier, London, 1986. 427.

[7] 商振华等. 高效液相色谱法(硝基氟苯柱前衍生化和紫外吸收)测定猪血蛋白氨基酸组成[J]. 色谱, 1993, 11(4): 236-238.

[8] 张龙翔等. 生化实验方法和技术(第二版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 1997. 116-123.

[9] 蒋挺大等. 胶原蛋白[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001. 34.

Lact.3和Lact.6两株选育菌种的 发酵性能研究

林亲录, 谭兴和, 何煜波, 秦 丹, 金阳海
(湖南农业大学食品科技学院, 长沙 410128)

摘 要 本文研究分析了我们课题组分离选育得到的Lact.3和Lact.6两株优良乳酸菌种的发酵产酸能力和对杂菌的抑制效果; 并以当地种植的芥菜为原料, 采用相同的生产工艺, 对比了自然接种和人工接种该两株优良菌株这两种接种方法对产品质量的影响。结果表明: Lact.3和Lact.6产酸速度快, 抑制杂菌能力强; 自然接种的芥菜发酵时间长, 产品中亚硝酸盐含量显著高于人工接种的芥菜发酵制品。

关键词: 芥菜; 发酵; 接种; 亚硝酸盐

Abstract: This article dealt with the capability of lactic acid fermentation and inhibition to corruptive microbes by Lact.3 and Lact.6, isolated in our lab. The effects of natural incubation and artificial incubation on native leaf mustard to produce fermented products by the same producing technique were compared. The results were that the Lact.3 and Lact.6 showed obvious lactic acid productivity and inhibition effect to corruptive microbes. Comparing the artificial incubation with the natural incubation of Lact.3 and Lact.6, in prolonged fermentation time, the results showed higher nitrite content by natural incubation in the final fermented leaf mustard products.

Key words: leaf mustard fermentation incubation nitrite

中图分类号: Q93-3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2003)07-0079-04

收稿日期: 2003-01-03

作者简介: 林亲录(1966-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 农副产品保鲜与深加工及功能保健食品。

传统的泡菜起源于我国,先后传入日本、韩国、新加坡等国,这些国家对酸菜、泡菜的加工工艺研究起步较早,并实行了人工接种乳酸菌发酵蔬菜的工业化生产,制定了相应的产品质量标准,酸泡菜现已是世界性大众化蔬菜腌制品^[1~3]。我国目前上市销售的泡菜大都是传统方法生产的,传统方法多以自然接种生产泡菜,自然接种最大的隐患是易感染腐败菌等杂菌,亚硝酸盐等有害物质含量易超标^[4~7]。

大耳朵芥菜是湖南省华容县等地大面积推广的地方蔬菜品种,该品种有辛辣感而少有鲜食,一般经过乳酸菌发酵后做佐餐原料食用,当地农户每年3月份左右收获后,以水泥窖池或就地开窖盐腌自然乳酸菌发酵2个月左右而成。通过多年的反复试制,当地农户或生产大户积累了丰富的发酵生产经验,发酵生产的芥菜制品色泽金黄、风味极为鲜美,但是由于生产工艺比较粗放,生产的产品存在明显的食用安全性问题。为此,我们课题组通过对比自然接种和人工接种我们课题组选育得到的Lact.3和Lact.6两株优良菌株两种接种方法,以探索芥菜纯菌种接种工业化安全生产模式。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 芥菜原料

以湖南省华容县农户种植3月份左右收获的大耳朵芥菜为原料。

1.1.2 发酵用的乳酸菌种

自然接种的菌种来自芥菜等原料上面附着的自然菌株;人工接种的乳酸菌株是我们课题组从先年传统发酵芥菜制品中分离选育得来的Lact.3和Lact.6两株菌株(该二菌株的分离鉴定研究结果另文发表)。

1.1.3 用于检验Lact.3和Lact.6两菌株产酸和抑制杂菌能力用的培养基^[8]

检验产酸能力的培养基 蛋白胨10g;酵母提取物5g;牛肉膏10g;吐温80 1ml;K₂HPO₄ 2g;蔬菜汁200ml,蒸馏水800ml。

检验抑制杂菌能力的培养基(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80 1ml;K₂HPO₄ 2g;MgSO₄·7H₂O 0.58g;MnSO₄·4H₂O 0.25g;蒸馏水1000ml。

1.1.4 用于扩大培养的培养基

三角瓶菌种培养基 蛋白胨10g,酵母提取物5g,牛肉膏10g,吐温80 1ml,K₂HPO₄ 2g,蔬菜汁200ml,蒸馏水800ml,琼脂20g。

生产菌种培养基 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。

1.2 方法

1.2.1 产酸能力检验方法

取实验室保藏分离得到的Lact.3和Lact.6两株菌株,分别接种于检验产酸能力的培养基,35℃静置培养,定时取样,以酸度计测定发酵液的pH值,以721分光光度计在波长680nm下测发酵液的光密度(OD)值。

1.2.2 抑制杂菌能力检验方法

取MRS液体培养基,分别接种分离选育得到的Lact.3和Lact.6两株菌株以及实验室保存的其他相关菌株,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。

1.2.3 接种生产方法

1.2.3.1 自然接种生产方法

收购芥菜原料→去烂叶、黄叶、虫伤叶→清洗泥砂、摊晒脱除15%左右的水分→拌盐入池(一层芥菜一层盐,总盐用量5%左右)→盖上塑料膜密封→定期取样检测指标

1.2.3.2 人工接种生产方法

收购芥菜原料→去烂叶、黄叶、虫伤叶→清洗泥砂、摊晒脱除15%左右的水分→接种(将接种量为3%的菌种与脱水后的芥菜拌匀)→拌盐入池(一层芥菜一层盐,总盐用量5%左右)→盖上塑料膜密封→定期取样检测指标

1.2.4 发酵产品取样检测方法

感官评定 肉眼直接观测外观色泽。

酸度检测 同1.2.1。

亚硝酸盐检测 按国家标准检测(GB/T5009.33-1996)。

2 结果与分析

2.1 Lact.3和Lact.6两菌株的产酸能力

将Lact.3和Lact.6两菌株分别接种于检验产酸能力的培养基,35℃静置培养,定时取样检测酸度(pH值)和发酵液的光密度(OD)值,产酸速度和OD值增加较快(如图1所示),明显高于我院微生物实验室

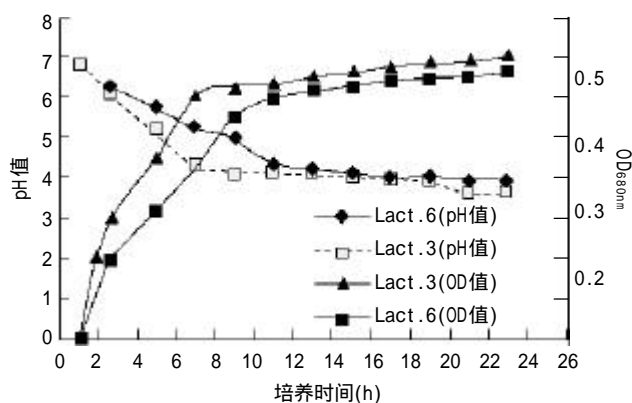


图1 培养时间与产酸量、OD 值的关系

保存的植物乳杆菌等其他菌株(其他菌株的发酵液 pH 值和 OD 值在图 1 中未做图显示出来), 其中 Lact. 3 菌株在接种后 8h 内 pH 值就降到 4.2, OD 值在不到一天时间内就增加到 0.5, 其产酸能力和繁殖速度极显著优于其它菌株。

2.2 Lact. 3 和 Lact. 6 两菌株抑制杂菌的能力

为验证我们课题组选育得到的两株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 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 1 所示。

表1 发酵液的抑菌作用

处理溶液(pH5)	指示菌		
	植物乳杆菌	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌
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)	-	-	-
Lac. 3 发酵液	+	+	-
Lac. 3 发酵液(胰酶处理)	-	-	-
Lac. 6 发酵液	+	+	-
Lac. 6 发酵液(胰酶处理)	-	-	-
乳酸	-	-	-

“-”: 没有抑制作用; “+”: 有抑制作用。

由表 1 可知, pH5 的 Lact. 3 和 Lact. 6 两菌株发酵液对 G⁺(革兰氏阳性)的植物乳杆菌和金黄色葡萄球

菌均表现为生长抑制作用。而对 G⁻(革兰氏阴性)的大肠杆菌无影响。而 pH5 的乳酸不能对 3 菌株起抑制作用, 排除了发酵液的抑制作用由酸引起的可能。胰蛋白酶作用后发酵液的抑菌作用丧失, 表明抑菌因子可能是蛋白质性质的。因而可以初步断定发酵液的抑菌成分可能是乳酸菌分泌的细菌素。已经证明乳酸菌细菌素是一种杀菌蛋白或多肽, 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, 由于食用后能很快被消化道中的蛋白酶降解, 因而安全性高。这不仅为食品加工和食品保藏提供了一个新方法, 而且验证了我们课题组选育得到的两株乳酸菌确有抑制杂菌的能力。

2.3 Lact. 3 和 Lact. 6 对发酵时间和产品质量的影响

取华容县新鲜芥菜, 洗净, 晾干脱除 15% 左右水分, 拌上 5% 左右的食盐后人工接种发酵液后(接种量 3% 左右)或不接种(靠残留在菜叶等处的天然乳酸菌发酵)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表 2。

表2 不同菌种对芥菜发酵制品发酵时间、亚硝酸盐含量和感官的影响

组别	1	2	3	4
菌种	Lact. 3	Lact. 6	混合菌种 (Lact. 3+ Lact. 6)	对照 (不接种)
亚硝酸盐含量 (mg/kg)	1.6	1.7	1.6	12
发酵时间(d)	12	10	10	55
感官鉴别结果	黄褐色、 有酱香	黄褐色、 有酱香	黄褐色、 酱香较浓	暗褐、酱 香浓郁

从表 2 中可看出, 将我们课题组选育得到的两株菌株(Lact. 3 和 Lact. 6), 单独或混合接种在芥菜上在发酵液 pH 值达到 4.0 后, 亚硝酸盐含量均小于 2mg/kg, 以 Lact. 3 菌株抑制亚硝酸盐效果最好, 而没有人工接种乳酸菌的对照组亚硝酸盐含量高达 12mg/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)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, 达到理想的感官指标后, 接种 Lact. 3 菌种(1 组)的需要 12d 左右时间, 接种 Lact. 6(2 组)与混合接种组(3 组)发酵时间在 10d 左右, 而对照组则在 55d 左右。

3 讨论与结论

传统发酵制品是我国食品加工领域非常重要的组成部分, 湖南省华容县传统芥菜发酵制品不仅香气、色泽诱人, 而且风味鲜美。为了该传统产品的安全

化、规范化和工业化扩大生产,我们试图从该传统产品中分离选育优势且发酵性能优良的乳酸菌种,以应用于扩大生产,在另一论文中我们已对该选育得到的菌株进行了鉴定报道。从图1中可看出,该二菌株的产酸速度相当快,光密度(OD值)增加明显,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,有利于发酵产品的保存。国内外众多学者的研究表明,硝酸盐广泛存在于多种蔬菜中,硝酸盐本身对人体没有什么直接危害,但是在硝酸还原酶作用下生成亚硝酸盐(特别是亚硝酸盐)时,就有明显的致癌作用^[9~11]。张庆芳等学者的研究结果证明在蔬菜乳酸菌发酵制品中,乳酸的快速形成能显著抑制甚至降解亚硝酸盐^[12],因此,从产酸速度来看,本试验中选育得到的两株菌株是较理想的用于芥菜发酵的乳酸菌种。

在传统发酵制品的生产中,最大的安全隐患是腐败菌的生长,从本文的实验来看,选育得到的该二菌株的抑制杂菌能力是很强的(表1),实验中发现往发酵液中添加胰蛋白酶后,发酵液的抑菌作用丧失,表明抑菌因子可能是蛋白质性质的,这种抑菌因子是否为Nisin(抑菌肽)尚待进一步研究。

有学者从发酵温度和酸度变化等方面探讨了降低发酵制品中亚硝酸盐含量的方法^[13,14],本文以产品中亚硝酸盐含量为主要产品质量指标,对比了自然接种和人工接种两种接种方法对芥菜发酵制品质量的影响,从表2可看出,将我们课题组选育得到的两株菌株(Lact.3和Lact.6),单独或混合接种在芥菜上后,亚硝酸盐含量明显小于自然接种的(12mg/kg)。其原因可能主要是两个方面的:一是该二菌株接种后产酸速度快,产生的乳酸有降低亚硝酸盐的效果;另外就是有些腐败菌杂菌的硝酸还原酶的活性较强,能导致有害物质亚硝酸盐的增加,接种后Lact.3和Lact.6快速繁殖抑制了杂菌的生长,从而间接抑制了

亚硝酸盐的生成。同时,由于人工接种该二菌株后有助于亚硝酸盐的显著降低,可证明该二菌株硝酸还原酶的活性很低甚至根本不存在硝酸还原酶。至于是否还存在其他的降亚硝酸盐的机理尚待进一步探讨。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] H P Fleming et al. Use of Microbial culture, vegetable products[J]. Food Technology, 1981, 35: 84-88.
- [4] 秦太峰,张乃明.太原市蔬菜硝酸盐污染状况与防治对策[J].山西食品工业,2001,(2):42-44.
- [5] 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.
- [6] 周泽义.中国蔬菜硝酸盐与亚硝酸盐污染机制及控制对策[J].资源生态环境网络研究动态,1999,10(1):13-19.
- [7] 汤务霞.乳酸菌及其应用[J].四川食品与发酵,2001,37(4):33-37.
- [8] 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.
- [9] 李静娜,王红珠,梁高道.28种蔬菜中亚硝酸盐含量随贮藏时间的变化[J].中国公共卫生,2002,18(4):474.
- [10] 王万水,王丽萍,宠瑞发.腌菜中亚硝酸盐含量变化的研究[J].齐齐哈尔医学院学报,2002,23(5):561-562.
- [11] 黄绍宁,沈华山,吴华明等.几种叶菜类蔬菜的硝酸盐和亚硝酸盐含量初探[J].广东农业科学,2002,(2):21-22.
- [12] 张庆芳,迟乃玉,郑燕.乳酸菌降解亚硝酸盐机理的研究[J].食品与发酵工业,2002,28(8):27-31.
- [13] 纪叔娟,孟宪军.大白菜发酵过程中亚硝酸盐消长规律的研究[J].食品与发酵工业,2001,27(2):42-46.
- [14] 蒲朝文,夏传富,谢朝怀.酱菜腌制过程中亚硝酸盐含量动态变化及消除措施的研究[J].卫生研究,2001,30(6):352-354.

欢迎订阅

2003《食品科学》杂志