

发酵蔬菜低温贮藏酵母菌动态变化研究

贺稚非, 李洪军, 任俊琦
(西南大学食品科学学院, 重庆 400715)

摘要:以发酵萝卜为研究对象, 系统测定酵母菌数量、种类的变化, 并进行鉴定, 同时, 研究发酵泡菜低温贮藏酵母菌的动态变化。结果表明: 酵母菌数量在4℃贮藏15d时下降明显, 由 4.67×10^2 CFU/g下降至13 CFU/g; 贮藏第1天分离得到酵母菌4株分别为近平滑假丝酵母(*Candida parapsilosis*)、异常汉逊酵母(*Hansenula anomala*)、瘦果红酵母(*Rhodotorula acheniorum*)和异酒香酵母(*Brettanomyces anomalus*), 贮藏30d只分离得一株瘦果红酵母; 发现糖添加量是影响低温贮藏泡菜风味的主要因素, 该研究对发酵蔬菜的质量控制具有指导作用。

关键词: 发酵蔬菜; 酵母菌; 鉴定; 低温; 贮藏

Dynamic Change of Yeast in Pickled Radish Stored at Low Temperature

HE Zhi-fei, LI Hong-jun, REN Jun-qi
(College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: Pickled radish was tested for dynamic changes in yeast count and species during storage at 4 °C. The results showed that after 15-day storage, yeast count in pickled radish exhibited an obvious reduction from 4.67×10^2 to 13 CFU/g. Four yeast strains were isolated from 1-day stored samples and identified as *Candida parapsilosis*, *Hansenula anomala*, *Rhodotorula acheniorum* and *Brettanomyces anomalus*. However, only *Rhodotorula acheniorum* was isolated and identified in 30-day stored samples. Moreover, the amount of sugar addition had a great impact on the flavor of pickled radish during 4 °C storage. These findings collectively provide a useful guidance for the quality control of pickled vegetables.

Key words: pickled vegetables; yeast; identification; low temperature; storage

中图分类号: TS255.54

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)13-0165-04

泡菜是我国的传统发酵蔬菜, 具有鲜酸美味、清爽可口、开胃促消化等诸多的优点, 深受我国人民的喜爱。泡菜主要由乳酸菌发酵而成^[1], 乳酸菌发酵产生大量的有机酸, 酵母菌发酵产生大量的醇类风味成分^[1-2], 泡菜发酵成熟后通常采取巴氏杀菌, 但经热杀菌的泡菜脆度降低、颜色变暗、风味损失。发酵蔬菜产业存在的共性问题是在货架期期间出现产气胀袋、变质, 通常是由于酵母菌导致的^[3]。随着我国经济的增长, 食品的冷链产业是国家“十二五”重点发展项目^[4], 发酵蔬菜进入冷链销售的时代已经到来。本实验对发酵蔬菜低温贮藏过程中酵母菌数量、微生物区系变化进行系统研究, 旨在为泡菜冷链产业的发展提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜白萝卜 市售; 小包装发酵泡菜: 以白萝卜为原料, 按配方发酵生产, 分装50g/袋贮藏于4℃冰箱备用。

葡萄糖、乳糖、麦芽糖、D-半乳糖、蔗糖、甘露糖、纤维二糖、D-甘露醇、L-阿拉伯糖、D-木糖、肌醇、淀粉、硫酸铵、硝酸钾; 以上试剂为化学纯或分析纯。

1.2 仪器与设备

BK-DM320 数码显微镜、奥特光学BK系列生物显微镜 重庆奥特光学仪器有限公司; 电热蒸馏水器 北京市光明医疗器械厂; JD200-3型电子天平 沈阳龙腾电子称量仪器有限公司; SWCJ-1F型超净工作台 江苏苏净安泰空气技术有限公司; Tomy autoclave SS-325快速高压灭菌锅 日本Tomy公司; 隔水式电热恒温培养箱、MJ-160型霉菌培养箱 上海跃进医疗器械厂。

收稿日期: 2010-10-08

基金项目: 重庆市科委攻关项目(CSTC, 2005AC1020)

作者简介: 贺稚非(1960—), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品微生物学与发酵食品。E-mail: zfh2003@yahoo.com.cn

1.3 培养基

孟加拉虎红琼脂培养基成品用于酵母菌的计数、分离、纯化;培养基的制作均参照国家标准 GB/T 4789.15—2003《食品卫生微生物学检验霉菌和酵母计数》、GB/T 4789.2—2003《食品卫生微生物学检验菌落总数测定》、GB/T 4789.3—2003《食品卫生微生物学检验大肠菌群测定》。

1.4 方法

1.4.1 泡菜的发酵

以新鲜白萝卜为原料,清洗成型预腌,按配方接种量3%(短乳杆菌、肠膜明串珠菌、干酪乳杆菌质量比2:1:2)^[5]、食盐添加量3%、糖添加量4%、辣椒添加量为3%,于25℃发酵3d,分装小袋50g/袋,贮藏于4℃冰箱30d^[6-7],分别于0、5、10、15、20、25、30d取样测定酵母菌数量和分离鉴定酵母菌。

1.4.2 酵母菌数量的测定

于4℃冰箱中发酵的蔬菜于0、5、10、15、20、25、30d取样进行酵母菌计数,测定方法参照 GB/T 4789.15—2003 和 ISO 21527-1:2008《霉菌和酵母菌》。

1.4.3 分离纯化^[6]

划线分离:从计数平板表面挑选有代表性的菌落,孟加拉虎红培养基划线分离培养^[2],对纯化菌落进行形态特征和生理生化实验鉴定。

1.4.4 酵母菌鉴定

形态学观察:包括菌落形态、单细胞个体形态、假菌丝、掷孢子、子囊孢子等形态的观察,方法参照《微生物学实验手册》^[8]。

生理生化实验^[9-10]:酵母菌鉴定中主要涉及的生理生化实验包括糖类发酵实验、碳源同化实验、氮源同化实验、类淀粉化合物的生成、耐高渗透压生长和37℃条件下生长等。

2 结果与分析

2.1 泡菜中酵母菌数量变化趋势结果

图1显示,产品包装后酵母菌数量为 4.67×10^2 CFU/g,4℃保存至第15天下降至13CFU/g,之后酵母菌数量基本平衡稍有升高。

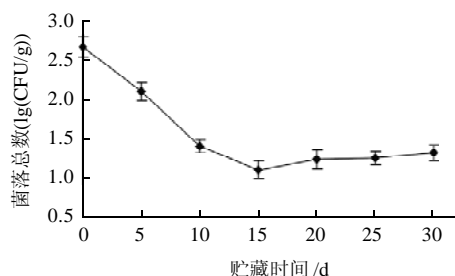
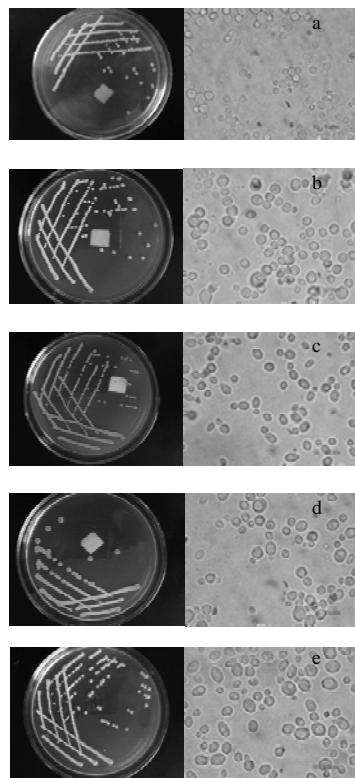


图1 酵母菌数量变化趋势

Fig.1 Change trend of total yeast count in pickled radish during storage at 4 °C

2.2 酵母菌的分离纯化结果

2.2.1 第1天泡菜样品中酵母菌的分离纯化结果



a.Y-1; b.Y-2; c.Y-3; d.Y-4; e.Y-5。

图2 酵母菌菌落形态和显微形态图(10×40)

Fig.2 Observations on the colonial morphology of yeast strains isolated from 1-day stored samples of pickled radish (10 × 40)

表1 第1天酵母菌分离纯化结果

Table 1 Colonial and cellular characteristics of yeast strains isolated from 1-day stored samples of pickled radish

编号	培养基	菌落形态特征	细胞形态特征(10×40)
Y-1	虎红琼脂	圆形, 边缘整齐, 直径约2.5mm, 乳白色, 光滑湿润, 低凸起, 有光泽, 易挑取	卵圆形, 菌体较小, 一端芽殖, 无假菌丝
Y-2	虎红琼脂	圆形, 边缘整齐, 直径2~3mm, 乳白色, 凸起, 表面光滑, 有光泽, 易挑取	近球形, 芽殖, 无假菌丝
Y-3	虎红琼脂	圆形, 边缘整齐, 直径3mm左右, 淡红色, 湿润光滑, 凸起, 有光泽	球形, 无假菌丝, 出芽生殖
Y-4	虎红琼脂	圆形, 边缘较整齐, 直径3mm左右, 白色, 高凸起, 无光泽, 易挑取	椭圆形或长圆形, 菌体较大, 一端芽殖, 无假菌丝
Y-5	虎红琼脂	圆形, 边缘整齐, 直径2~3mm, 乳白色, 凸起, 表面光滑, 有光泽, 易挑取	卵圆形, 菌体较大, 一端芽殖

从表1和图2可看出,发酵蔬菜产品包装后酵母菌种类有5种,细胞为圆形或卵圆形,菌落为乳白色,圆形,有一株菌落为红色。

2.2.2 第30天泡菜样品中酵母菌的分离纯化结果

通过平板划线法,分离纯化获得了酵母菌的单菌落,再进行鉴定^[7],结果见图3。

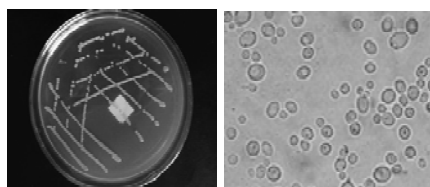


图3 酵母菌Y-6菌落形态和显微形态图(10×40)

Fig.3 Observations on the colonial morphology of a yeast strain isolated from 30-day stored samples of pickled radish (10×40)

如图3所示,第30天从虎红琼脂培养基中分离出的酵母菌(Y-6)菌落形态为圆形,边缘整齐,直径3mm左右,淡红色,湿润光滑,凸起,有光泽;细胞形态为卵圆形,无假菌丝,一端芽殖。

2.3 酵母菌的鉴定结果

表2 糖发酵实验结果

Table 2 Results of carbohydrate fermentation tests of yeast strains

发酵糖类	菌株编号					
	Y-1	Y-2	Y-3	Y-4	Y-5	Y-6
葡萄糖	+	+	—	+	+	—
乳糖	—	—	—	+	—	—
麦芽糖	—	V	—	V	—	—
D-半乳糖	—	V	—	V	—	—
蔗糖	—	+	—	+	V	—
甘露糖	—	V	—	—	—	—

注: +. ≥90% 为阳性菌株; —. ≥90% 为阴性菌株; V. 可变反应。下同。

表3 碳源同化实验结果

Table 3 Results of carbon source assimilation tests of yeast strains

同化碳源	菌株编号					
	Y-1	Y-2	Y-3	Y-4	Y-5	Y-6
葡萄糖	+	+	+	+	+	+
乳糖	—	—	+	+	—	+
麦芽糖	+	+	+	V	+	+
D-半乳糖	+	V	+	+	+	+
蔗糖	+	+	+	V	+	+
甘露糖	+	+	+	V	+	+
纤维二糖	—	V	V	+	—	V
D-甘露醇	+	+	+	—	+	+
L-阿拉伯糖	+	—	+	—	+	+
D-木糖	+	V	+	—	+	+
肌醇	—	—	—	—	—	—
淀粉	—	+	—	—	—	—

表4 氮源同化实验结果

Table 4 Results of nitrogen source assimilation tests of yeast strains

同化氮源	菌株编号					
	Y-1	Y-2	Y-3	Y-4	Y-5	Y-6
硫酸铵	+	+w	+	+	+	+
硝酸钾	—	+	—	—	—	—

注: +w. 阳性到弱反应。

表5 其他生化实验结果

Table 5 Identification of other biochemical and physiological properties of yeast strains

项目	菌株编号					
	Y-1	Y-2	Y-3	Y-4	Y-5	Y-6
产类淀粉化合物	—	—	—	—	—	—
耐高渗透压 50% 葡萄糖	+	V	—	—	+	—
60% 葡萄糖	—	V	—	—	—	—
37℃ 生长	+	V	—	V	+	—
掷孢子	—	—	—	—	—	—
假菌丝	—	—	—	—	—	—
子囊孢子	—	—	—	—	—	—

从表2~5可以看出,对照《酵母菌的特征与鉴定手册》初步鉴定出:Y-1、Y-5为近平滑假丝酵母(*Candida parapsilosis*),Y-2为异常汉逊酵母(*Hansenula anomala*),Y-3为瘦果红酵母(*Rhodotorula acheniorum*),Y-4为异酒香酵母(*Brettanomyces anomalus*);Y-6为瘦果红酵母。蔬菜发酵的优势微生物是乳酸菌,发酵产生大量有机酸,接种发酵泡菜中有机酸主要有乳酸、乙酸、酒石酸、苹果酸、柠檬酸和琥珀酸,其中乳酸和乙酸的含量最高^[11-12]。有机酸形成酸性环境,有利于发酵蔬菜的贮藏,有报道指出^[7,13]有机酸对酵母菌的抑菌作用,当有机酸含量达到0.5%时对红酵母的抑菌率达94.6%,绝大部分微生物处于低温时,新陈代谢减弱到极低的程度,呈休眠状态,甚至死亡^[14];低温、高酸再加上食盐的作用是导致酵母菌数量和种类减少的主要因素。

3 结 论

3.1 发酵蔬菜4℃贮藏15d后酵母菌数量由 4.67×10^2 CFU/g下降至13CFU/g;之后酵母菌数量变化不大,维持在较低的水平。菜贮藏初期酵母菌种类有4种,分别为近平滑假丝酵母、异常汉逊酵母、瘦果红酵母和异酒香酵母。

3.2 泡菜4℃贮藏30d酵母菌种类减少了3种,第30天时只分离得到了一株瘦果红酵母。

3.3 糖含量是影响低温贮藏泡菜风味变化的因素,建议发酵蔬菜糖添加量低于5%。酵母菌发酵糖可产生醇

类等风味物质,低温贮藏条件下泡菜中酵母菌的数量和种类都有所减少,但是酵母菌的发酵仍然存在,实验中观察到当泡菜中的糖达5%时,泡菜低温贮藏20d左右,风味就会发生变化,主要风味物质变为醇类,特殊香气消失,因此,控制发酵蔬菜糖的添加量,有利于产品的质量控制。

参考文献:

- [1] KIM M, CHUN J. Bacterial community structure in kimchi, a Korean fermented vegetable food, as revealed by 16S rRNA gene analysis[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 103(1): 91-96.
- [2] GARDNER N J, SAVARD T, OBERMEIER P, et al. Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage, beet and onion vegetable mixtures[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 64(3): 261-275.
- [3] 贺稚非, 李洪军. 发酵酸菜变质原因的微生物学探讨[J]. *食品工业*, 1994(1): 7-8.
- [4] 黄业传, 曾凡坤. 自然发酵与人工发酵泡菜的品质对比[J]. *食品工业*, 2005(3): 41-43.
- [5] 周彬, 孟宪军, 张忠泽. 白菜乳酸菌混菌发酵的研究[J]. *微生物学杂志*, 2002, 22(2): 12-14.
- [6] 马长伟, 曾名勇. 食品工艺学导论[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002.
- [7] SONG H P, KIM D H, YOOK H S, et al. Application of gamma irradiation for aging control and improvement of shelf-life of kimchi, korean salted and fermented vegetables[J]. *Radiation Physics and Chemistry*, 2004, 71(1/2): 57-60.
- [8] 巴尼特 J A. 酵母菌的特征与鉴定手册[M]. 胡瑞卿, 译. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1992.
- [9] 周德庆. 微生物学教程[M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 2002.
- [10] 赵丽珺, 齐凤兰, 陈有容. 泡菜研究与展望[J]. *食品研究与开发*, 2004, 25(3): 21-23.
- [11] 杨瑞鹏, 赵学慧. 酸泡菜发酵过程中乳酸菌区系的研究[J]. *中国调味品*, 1991(1): 8-10.
- [12] 李春, 张毅, 李明璠, 等. 人工接菌黄瓜发酵过程中的品质变化[J]. *中国酿造*, 2006(7): 59-61.
- [13] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [14] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986.