

湖南芥菜腌制发酵过程中的菌相变化规律

王一淇, 李宗军*

(湖南农业大学食品科学与技术学院, 湖南 长沙 410028)

摘 要: 从动态角度研究湖南芥菜发酵过程中6种菌相阶段性变化, 为其实现从自然发酵到人工发酵提供科学依据。结果表明: 芥菜发酵主要分为3个阶段。第1阶段发酵液pH>5.0, 细菌总数、肠道杆菌及酵母菌数量先下降后上升, 乳酸球菌为优势菌种, 数量达到 10^6 CFU/g; 第2阶段发酵液pH值降至5.0以下, 细菌总数、肠道杆菌及酵母菌数量在一个数量级内上下波动, 分别为 10^5 、 10^4 、 10^5 , 乳酸杆菌成为优势菌种, 数量级为 10^6 , 球菌为 10^5 ; 第3阶段发酵液pH<4.0, 细菌、酵母菌和乳酸菌的数量开始明显减少, 肠道杆菌生长基本受到抑制, 乳酸杆菌仍是优势菌种, 数量级在 10^4 。醋酸菌数量一直处于一个非常低的水平。为实现芥菜的自然发酵到人工发酵, 可以用乳酸球菌和乳酸杆菌组合当发酵剂, 并且适当降低发酵初始pH值。

关键词: 芥菜; 发酵; 菌相变化

Changing Patterns of Microflora during Natural Fermentation of Chinese Leaf Mustard (*Brassica juncea* coss)
Grown in Hunan Province, China

WANG Yi-qi, LI Zong-jun*

(College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410028, China)

Abstract: Dynamic changes in the numbers of six microbial populations at different stages of natural fermentation of Chinese leaf mustard (*Brassica juncea* coss) were investigated by microbial culture methods. The results showed that the fermentation process of Chinese leaf mustard included three stages: 1) the fermented juice was at a pH greater than 5.0, the numbers of total bacteria, *Enterobacteriaceae* and yeast were increased and subsequently decreased, and the dominant bacterium was *Lactobacillus*, reaching 10^6 CFU/g; 2) the pH of fermented juice was reduced to below 5.0, the numbers of total bacteria, *Enterobacteriaceae* and yeast were fluctuated within orders of magnitude of 10^5 , 10^4 and 10^5 , respectively, and *Lactococcus* became the dominant bacterium at an order of magnitude of 10^6 , compared to 10^5 for *Lactobacillus*; 3) the pH of fermented juice was further reduced to smaller than 4.0, the numbers of total bacteria and yeast began to significantly decline, the growth of *Enterobacteriaceae* was almost inhibited, and *Lactococcus* remained dominant at a level of 10^4 , whereas acetic acid bacteria were always at very low levels. Artificial fermentation with a composite starter culture consisting of *Lactobacillus* and *Lactococcus* at appropriately low levels of initial pH may be an alternative to natural fermentation.

Key words: Chinese leaf mustard; fermentation; microfloral change

中图分类号: R151.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2014) 11-0200-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201411040

大约3000年前, 我国就有了发酵蔬菜的制作工艺, 如四川泡菜、榨菜、扬州酱菜等。传统发酵蔬菜是我国蔬菜加工产品中产量最多的一种^[1]。传统的蔬菜腌制是利用高盐浓度的渗透作用及乳酸菌在蔬菜中的生长代谢, 利用乳酸发酵赋予腌菜特有风味。但目前, 一些地区蔬菜腌制产品工艺依然停留在自然发酵水平。其发酵周期长, 生产过程不易控制及易引起环境污染等一系列问题, 腌制过程中的杂菌尤其是硝酸盐还原菌, 能够产生

亚硝酸盐等对人体有害的物质, 导致腌菜企业难以实现标准化、规模化生产^[2]。同时由于消费者对食品安全和健康的追求, 迫切需要发酵蔬菜低盐、低亚硝酸盐含量的产品, 实现加工标准化、规模化。人工发酵蔬菜正好可以满足人们的这些要求。本实验针对湖南芥菜加工现状, 检测其发酵过程中的菌相变化, 为实现自然发酵到人工发酵提供科学依据^[3-4]。

收稿日期: 2013-09-21

作者简介: 王一淇 (1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。E-mail: wangyiqiice@163.com

*通信作者: 李宗军 (1968—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: hnlizongjun@163.com

1 材料与方法

1.1 材料与培养基

1.1.1 芥菜品种

芥菜来自湖南省长沙市黄兴镇。

1.1.2 培养基

PCA (plate count agar) 培养基 (培养细菌用): 胰蛋白胨5.0 g/L、酵母浸粉2.5 g/L、葡萄糖1.0 g/L、琼脂15 g/L, pH 7.0, 121 °C灭菌20 min。

MRS培养基 (g/L, 培养乳酸杆菌用): 蛋白胨10、牛肉膏10、酵母提取物5、 K_2HPO_4 2、柠檬酸二铵2、乙酸钠5、葡萄糖20、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.58、 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.25、琼脂15、吐温-80 1 mL/L, pH 6.2~6.4, 121 °C灭菌20 min。

M17培养基 (g/L, 培养乳酸球菌用): 大豆蛋白胨5.0、蛋白胨2.5、酪蛋白胨2.5、酵母浸粉2.5、牛肉浸粉5.0、乳糖5.0、抗坏血酸0.5、 β -甘油磷酸二钠19、琼脂15, pH 7.1, 121 °C灭菌20 min。

McConkey培养基 (g/L, 培养肠道杆菌用): 蛋白胨20、牛胆盐5、氯化钠5、乳糖10、结晶紫0.001、中性红0.025、琼脂15, pH 6.2~6.4, 121 °C灭菌20 min。

MEA (Malt Extract Agar) 培养基 (g/L, 培养酵母菌用): 麦芽膏粉130、氯霉素0.1、琼脂15, 121 °C灭菌20 min。

DMS (deoxycholate mannitol sorbitol) 培养基^[5-6] (g/L, 培养醋酸菌用): 蛋白胨10、酵母提取物3、乳酸钙15、葡萄糖1、山梨糖醇1、甘露糖1、磷酸钾1、脱氧胆酸钠0.1、硫酸镁0.02、溴甲酚0.03、放线菌酮0.1、琼脂18, pH 4.5, 121 °C灭菌20 min。

1.2 仪器与设备

超净工作台 安徽蚌埠市瑞风净化设备工程; 电热恒温培养箱 上海新苗医疗器械制造有限公司; 酸度计 中国杭州雷磁分析仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 发酵工艺流程

芥菜→切碎→撒盐 (质量分数10%的盐)→装袋→密封→保温发酵1 d→小袋分装→密封→恒温20 °C发酵

1.3.2 取样

在发酵第0、5、10、15、20、30、45、60、75、90天取样, 每次取1小袋 (约500 g) 样品进行检测。

1.3.3 微生物指标测定

采用稀释平板计数法: 无菌称取25 g样品于装有225 mL无菌生理盐水的三角瓶中, 制成 10^{-1} 稀释液后于试管内进行梯度稀释, 稀释至适宜度数进行以下各种微生物的分离培养与计数。

细菌总数的测定: 倾注PCA培养基, 37 °C培养48 h

计数, 由于乳酸菌在PCA生长微弱, 所以细菌总数不包括乳酸菌的数量。乳酸杆菌的测定: 倾注MRS培养基, 37 °C培养48 h计数。乳酸球菌的测定: 倾注M17培养基, 37 °C培养48 h计数。肠道杆菌属的测定: 倾注McConkey培养基, 37 °C培养48 h计数。酵母菌的测定: 倾注MEA培养基, 30 °C培养48 h计数。醋酸菌的测定: 倾注DMS培养基, 30 °C培养48 h计数。

1.4 数据处理

运用PASW Statistics Base 18分析, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果与分析

2.1 芥菜自然发酵过程中pH值的变化

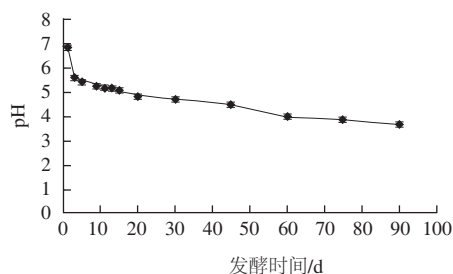


图1 芥菜发酵过程中pH值的变化

Fig.1 pH change during the fermentation process of Chinese leaf mustard

由图1可知, 芥菜在自然发酵过程中, 随着发酵时间的延长, 有机酸累积、pH值逐渐下降, 发酵前期 (0~15 d) pH值一直维持在5.0以上, 发酵中期 (15~60 d) pH降到了5.0以下; 发酵后期 (60~90 d), pH值降到了4.0以下, 并维持在一个较低值。

2.2 芥菜自然发酵过程中酵母菌及肠道杆菌总数的变化

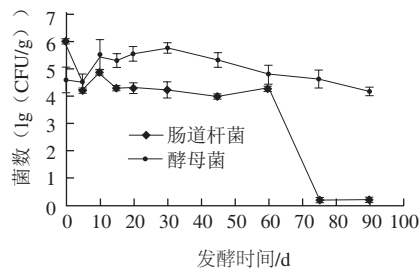


图2 芥菜发酵过程中肠道杆菌总数、酵母菌总数的变化

Fig.2 Change in the amounts of Enterobacteriaceae and yeast during the fermentation process of Chinese leaf mustard

由图2可知, 芥菜发酵过程中, 其自带的大量酵母菌, 在盐含量10%的环境中, 数量略有下降, 之后在发酵过程中酵母菌总数都保持在5 (lg (CFU/g)), 说明在芥菜自然发酵微生物区系中, 酵母菌对整个发酵过程起了重要作用。pH值在4.0以上的变化对酵母菌总数影响不大, 但pH值低于4.0时, 酵母菌生长受到抑制, 降到了

4 ($\lg$ (CFU/g))。芥菜自带大量肠杆菌。在高盐浓度环境下,其数量在第5天明显下降。由于自然发酵杂菌混多,导致产酸慢,到第60天的过程中,肠道杆菌数一直处于相对稳定的4 ($\lg$ (CFU/g)) 内。pH值降到4.0以下时,基本上抑制了其生长,在稀释10 倍的平皿上已经检测不到肠道杆菌的存在。

2.3 芥菜自然发酵过程中细菌总数的变化

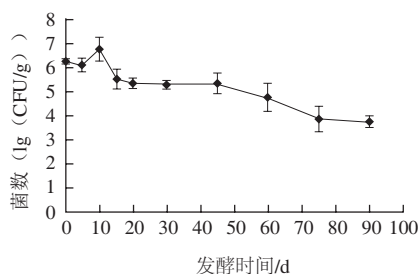


图3 芥菜发酵过程中细菌总数的变化

Fig.3 Change in the amount of total bacteria during the fermentation process of Chinese leaf mustard

由图3可知,芥菜自然发酵过程中,细菌总数基本处于一个下降的过程。第5天数量略为下降,第10天其数量达到峰值6.8 ($\lg$ (CFU/g)) ;在第15~60天,细菌总数保持在5 ($\lg$ (CFU/g)) ,这是由于在发酵的初期,环境中营养物质还比较丰富,酸度还不是很大,使得微生物类群大量生长;到了发酵中后期,厌氧或兼性厌氧的乳酸菌在各菌相中占据了优势, $\text{pH} < 4.0$ 时,细菌总数大部分被抑制住,总数明显下降,第90天降至3.75 ($\lg$ (CFU/g)) 。

2.4 芥菜自然发酵过程中乳酸球菌与乳酸杆菌总数的变化

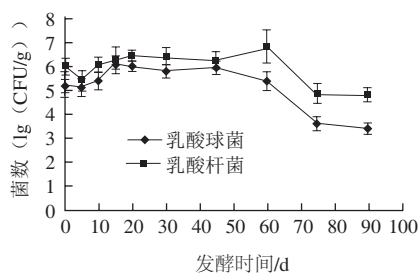


图4 芥菜过程中乳酸球菌总数、乳酸杆菌总数的变化

Fig.4 Change in the amounts of *Lactobacillus* and *Lactococcus* during the fermentation process of Chinese leaf mustard

由图4可知,在芥菜自然发酵过程中,乳酸菌生长可分成3 个阶段。发酵前期(0~15 d),主要是乳酸球菌处于优势地位, pH 值维持在5.0以上,乳酸球菌具有繁殖快、耐酸性差的特点;发酵中期(15~60 d), pH 值下降到5.0以下,这时乳酸球菌的活动受到抑制,杆菌数量始终高于球菌,球菌的数量在5 ($\lg$ (CFU/g)) 开始有下降趋势;发酵到第60天, pH 值降至4.0,乳酸杆菌数量达到峰值6.86 ($\lg$ (CFU/g)) ,乳酸球菌的数量因杆菌

的生长和 pH 值的变化受到抑制,数量开始显著下降;发酵后期(60~90 d), $\text{pH} < 4.0$,乳酸球菌的数量大量减少,杆菌的生长在后期因营养物质减少,代谢物质的增加,数量也开始明显减少,但仍大量存在。

2.5 芥菜自然发酵过程中醋酸菌总数的变化

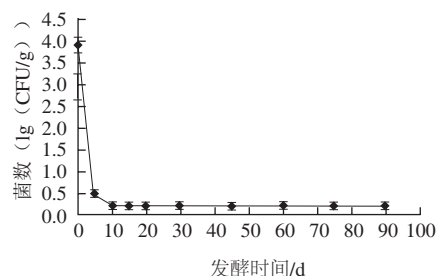


图5 芥菜发酵过程中醋酸菌的总数变化

Fig.5 Change in the amount of acetic acid bacteria during the fermentation process of Chinese leaf mustard

由图5可知,芥菜在未发酵前自带一定量的醋酸菌,但在高盐厌氧环境中,醋酸菌数量迅速下降,在稀释10 倍的样品中已经检测不到醋酸菌的存在。说明在芥菜的发酵过程中,醋酸菌的作用甚微。

3 讨论

蔬菜发酵是中国保藏食品传统方法之一,因其具有独特的风味所以流行至今。慢慢人们发现发酵蔬菜的未来市场广阔^[7],但其发酵周期长,难以实现工业化生产;同时人们也开始意识到自然发酵蔬菜处理不当^[8],存在许多健康隐患,如亚硝酸盐含量高等。于是大量的研究开始针对各种发酵蔬菜其微生物组成,大多研究^[9-10]是对已经腌制好的成品进行分析,并从中分离优势菌种来作为后期研究,这些样品具有较高酸度,所以分离出的优势菌种大多为乳酸杆菌。

本实验是利用微生物培养的方法,从一个动态的角度,完整的观察了蔬菜发酵不同阶段的菌相变化。这样不仅是为了分离出优良的发酵剂菌种,还为了了解芥菜发酵过程中优势菌种的变化以及其对不同发酵阶段的意义,为选择发酵菌种提供依据。本实验针对发酵蔬菜中普遍存在的几大菌群进行了动态数量分析。

3.1 乳酸球菌与乳酸杆菌

由本实验结果可知,前期以乳酸球菌为主要优势菌和后期主要以乳酸杆菌来完成发酵,结合乳酸球菌不耐酸和杆菌耐酸能力强等特点,以及参考相关文献,此结果与前人所研究的结果是一致的。关倩倩^[11]对泡菜自然发酵过程中的菌系结构进行了研究,得出在此过程中,乳酸菌总数在起始发酵阶段相对较少,为2.19 ($\lg$ (CFU/mL)) ,在发酵中期才成为优势菌。值得提出的是,包括上述这份

报道在内的国内关于我国传统泡菜乳酸菌的研究中,乳酸菌在初期并不是优势菌种。而本研究中,蔬菜本身自带大量的乳酸菌,而且在发酵前中阶段,乳酸菌就一直属于优势菌种。除此之外,在本实验中,乳酸球菌与杆菌的数量虽始终有个数量级的落差,但是整体上是同升同降,并不存在杆菌的大量繁殖而抑制球菌的数量的现象^[4]。出现这些不同结果的原因可能有两种:1)样品表面附着的菌系结构会因蔬菜种类,地区,气候等因素的不同而产生差异;2)发酵蔬菜在腌制过程中,会因为操作、盐度、温度的不同也会导致微生物群的差异。

3.2 酵母菌

酵母菌作为发酵过程中不能忽视的一大类菌。酵母菌可以从蔬菜的本身带来,也可以从腌制工具和空气中来^[3]。它参与发酵,给予发酵蔬菜特殊的风味。但是大量的繁殖也会带给腌制品不愉快的酸臭味,导致腌制品变质。有研究^[12]表明,在运用变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)分析发酵蔬菜中的菌相变化中,发酵性酵母可在整个主发酵及二次发酵阶段生长,酵母的数量变化主要由发酵pH值阶段变化来决定,这与本实验的结果相一致。在本实验中,在主要的发酵阶段酵母的数量仅次于乳酸菌。这一结果表明,在湖南芥菜腌制过程中,酵母菌这一菌群也起着非常重要的作用。

3.3 肠道杆菌

肠道杆菌对于整个发酵属于有害菌。根据施安辉等^[3]的研究,蔬菜腌制中有害微生物的生长繁殖在pH 4.5以下时是受到抑制的。其中大肠杆菌所能忍受的最低pH值为5.0~5.5。结合本实验结果,在人工发酵芥菜中,在初始发酵时添加适当的酸来降低pH值,可以大量抑制发酵液中的有害菌,同时还能为乳酸菌提供更适的生长环境。

3.4 醋酸菌

在蔬菜发酵中普遍存在一些醋酸菌,其在好氧的条件下,把酒精转化为醋酸^[3]。适量的醋酸菌及其活动是对泡菜有利的^[9]。对于醋酸菌的相关研究中^[13],常规筛选培养基具有黏度小、倾倒平板时用于产酸指示剂作用的碳酸钙很容易在平皿底沉淀的特点,这样导致上层碳酸钙含量低,不利于好氧菌醋酸菌的观察。针对醋酸菌的分离培养,本实验使用的是DMS培养基,不同于常规醋酸菌筛选培养基,其黏度适中,使用溴甲酚紫作为指示剂,其产生的变色反应能很好的观察醋酸菌的生长。

3.5 细菌

传统蔬菜腌制,利用的就是蔬菜自带的细菌进行发酵,除了以上几大菌群之外,发酵液中还存在大量的其他细菌。这一部分微生物组成相对复杂,但是其生长状况对最后蔬菜品质存在重要意义。董玲^[14]对四川传统腌制的冬菜进行了细菌多样性研究,发现其细菌主要由变

形杆菌门、厚壁菌门和放线菌门组成,而其中芽孢杆菌对冬菜腌制成熟起重要作用。本实验对于细菌总数的研究,意在观察其与发酵阶段以及其他几大菌群的消长规律,结果表明:高盐的环境能抑制一部分细菌的生长,但就整个发酵阶段来看,其主要受发酵酸度变化的影响,与其他菌群消长关系不大。

根据以上研究分析,如果要想实现湖南芥菜的工业化生产,在选择发酵剂菌种时应选择组合菌种发酵效果会比较好,可以用乳酸球菌和乳酸杆菌进行组合。因为这样更接近它自然发酵的状态,并且乳酸菌在发酵过程中产生大量有机酸,其既能抑制其他有害微生物的生长,还能提高产品的营养价值^[15-16]。除此之外,可以在发酵初期添加适当的酸,降低其初始pH值到5.0左右,这样可以有效抑制有害菌群的生长,同时也为乳酸菌提供更合适的生长环境,相信在一定程度上也可以缩短发酵周期以及降低亚硝酸盐含量^[17-18]。湖南芥菜是湖南本地人经常用来作为腌制酸菜吃的,基本融入了每家每户的生活,通过发展发酵剂,期望能在保留原有风味的同时,让人们吃得更方便和健康。

参考文献:

- [1] 杨荣玲,肖更生,吴晓玉,等.我国蔬菜发酵加工研究进展[J].保鲜与加工,2006(2):15-18.
- [2] 刘璞,翁佩芳,吴祖芳,等.新型发酵蔬菜制品乳酸菌发酵剂的筛选研究[J].宁波大学学报,2006,19(3):316-320.
- [3] 施安辉,周波.蔬菜传统腌制发酵工艺过程中微生物生态学的意义[J].中国调味品,2002(5):32-35.
- [4] 董硕,孟宪军,张庆芳.乳酸菌发酵蔬菜菌体生长规律的研究[J].中国调味品,2010(11):60-62.
- [5] WOUTERS D, BERNART N, CONJAERTS W, et al. Species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of spontaneous leek fermentations[J]. Food Microbiology, 2013, 33(2): 185-196.
- [6] CLEENWERCK L, GONZALEZ A, CAMU N, et al. *Acetobacter fabarum* sp. nov., an acetic acid bacterium from a Ghanaian cocoa bean heap fermentation[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58: 2180-2185.
- [7] 赵丽娟,齐凤兰,陈有容.泡菜研究现状及展望[J].食品研究与开发,2004,25(3):21-23.
- [8] 魏元,李景茹.泡菜研制过程中亚硝酸盐含量变化研究[J].农产品加工:学刊,2011(2):106-108.
- [9] 罗松明,刘书亮,杜晓华,等.四川泡菜微生态分布及其与盐度、酸度的关系[J].食品与发酵工业,2013,39(2):29-34.
- [10] 顾金华.泡菜微生态研究及优良接种剂的研制[D].南京:南京农业大学,2009.
- [11] 关倩倩.我国传统发酵泡菜菌系结构及其消长规律研究[D].江西:南昌大学,2012.
- [12] CHANG H W, KIM K H, NAM Y D, et al. Analysis of yeast and archaeal population dynamics in kimchi using denaturing gradient gel electrophoresis[J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 126(1/2): 159-166.
- [13] 周帼萍,汪芳安,高冰.醋酸菌筛选培养基的优化和优良醋酸菌分离的研究[J].研究报告,2004(6):18-19.
- [14] 董玲.四川传统腌制冬菜中细菌多样性研究[D].雅安:四川农业大学,2012.
- [15] 王卫东,陈安徽,杨望根,等.人工发酵蔬菜的研究进展[J].食品科学,2010,31(21):413-416.
- [16] AMMOR M S, MAYO B. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: an update[J]. Meat Science, 2007, 76: 138-146.
- [17] 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,2005,26(3):41-43.
- [18] YAN Pingmei, XUE Wentong, TAN Szesze, et al. Effect of inoculating lactic acid bacteria starter cultures on the nitrite concentration of fermenting Chinese paocai[J]. Food Control, 2008, 19(1): 50-55.