

直投式与传统发酵泡菜工艺中病原菌的变化规律

熊涛, 关倩倩, 谢明勇

(南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047)

摘要:以植物乳杆菌 NCU116 作为直投式发酵剂, 研究自然发酵泡菜与直投式发酵剂发酵泡菜过程中大肠菌群、沙门氏菌与金黄色葡萄球菌的变化规律。结果表明: 直投式发酵剂发酵和自然发酵过程中, 3 种病原菌的数量变化趋势一致, 均是在发酵前期上升, 当达到最高值后下降, 最终在泡菜环境中消失。然而, 与自然发酵相比, 直投式发酵剂发酵可显著降低泡菜发酵过程中 3 种病原菌的数量($P < 0.05$), 且在发酵的第 2 天即消失。自然发酵环境中沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和大肠菌群分别在第 3、3.5、4.5 天消失。表明直投式发酵中植物乳杆菌 NCU116 对泡菜发酵过程中病原菌的生长具有显著的抑制作用。

关键词: 泡菜; 直投式发酵剂; 植物乳杆菌; 病原菌

Change of Pathogenic Bacteria in Pickle during Direct Vat Set and Traditional Fermentation

XIONG Tao, GUAN Qian-qian, XIE Ming-yong

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: In this study, the changes of *Coliforms*, *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* were compared in the pickle during natural and direct vat set fermentation. In the direct vat set fermentation, *Lactobacillus plantarum* NCU116 was used as the starter culture. The results showed that the counts of three pathogens during natural and direct vat set fermentation revealed an increase at the early stage, then a decline and disappearance finally. However, a significant decrease in the counts of the pathogens was observed in the direct vat set fermentation ($P < 0.05$) compared to the natural fermentation, and all three pathogens disappeared on the 2nd day in the direct vat set fermentation. On the other hand, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* and *Coliforms* disappeared on the 3rd, 3.5th and 4.5th day during the natural fermentation, respectively, suggesting that *Lactobacillus plantarum* NCU116 has significant inhibitory effect on food-borne pathogens during pickle fermentation process.

Key words: pickle; direct vat set starter; *Lactobacillus plantarum*; pathogenic bacteria

中图分类号: TS207.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)13-0140-04

泡菜是一种乳酸菌发酵蔬菜制品, 我国传统泡菜加工方式多采用自然发酵, 即利用蔬菜表面本身附着的微生物进行发酵。研究证明, 蔬菜表面天然附着的微生物除各种乳酸菌、酵母菌外, 还有沙门氏菌、志贺氏菌、大肠菌群等致病菌群^[1], 即使反复清洗也很难彻底清除。植物乳杆菌是泡菜发酵过程中产酸能力很强的菌株, 较其他乳酸菌更为耐酸, 在泡菜发酵中一般终止发酵过程。近年来, 随着国外浓缩型直投式发酵剂越来越多的应用于发酵酸奶、干酪、发酵香肠和酸泡菜等的工业化生产, 国内众多的研究者也相应

地开发出以植物乳杆菌为主的泡菜发酵专用菌粉, 并进行直投式发酵泡菜的研究^[2-4]。与自然发酵泡菜相比, 直投式发酵泡菜可显著缩短发酵周期, 提高泡菜中有机酸、氨基酸和各种有机醇的总量, 并大大降低亚硝酸盐含量^[2,5]。研究发现, 植物乳杆菌在泡菜发酵过程中除产生风味物质外, 还产生了有防腐能力的酸以及其他抑菌物质, 可以抑制一些病原菌的生长^[6]。本实验选用具有良好发酵性能的植物乳杆菌作为直投式发酵剂, 对比直投式发酵剂发酵泡菜和自然发酵泡菜过程中病原菌的变化, 以期为进一步控制泡菜产品的质量提供科学的理论依据。

收稿日期: 2011-06-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(31060224); 国家“863”计划项目(2011AA100904);

教育部留学回国人员创业基金项目(赣教财字[2009]135号)

作者简介: 熊涛(1970—), 男, 教授, 博士, 研究方向为益生菌及大宗果蔬高值化利用。E-mail: xiongtao0907@163.com

1 材料与amp;方法

1.1 材料

圆白菜、食盐、冰糖、生姜、干辣椒、花椒、大蒜等。

1.2 菌种与培养基

植物乳杆菌 NCU116 冻干菌粉, 由南昌大学食品科学与技术国家重点实验室保藏。

结晶紫中性红胆盐葡萄糖琼脂(VRBGA)、煌绿乳糖胆盐肉汤(BGLB)、亚硫酸铋(BS)琼脂、Baird-Parker 琼脂 北京索莱宝科技有限公司; 卵黄亚碲酸钾增菌剂 杭州微生物试剂有限公司; 三糖铁琼脂(TSI)、赖氨酸脱羧(LIA)培养基、尿素酶琼脂、蛋白胨水、吲哚、血琼脂平板、四硫磺酸钠煌绿增菌液、营养肉汤 北京路桥技术有限责任公司。

1.3 仪器与设备

YXQ-LS-50S II / 75S II 立式压力蒸汽灭菌器 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; Airtech 生物安全柜 苏净集团安泰公司; DNP-9272 型生化培养箱 上海精宏实验设备有限公司; 雷磁 PHS-25 型 pH 计 上海精密科学仪器有限公司。

1.4 方法

1.4.1 泡菜的制作工艺

自然发酵: 圆白菜 → 清洗 → 沥干 → 切分 → 装坛 → 水封 → 发酵(20℃) → 成品

↑
4% 盐水(花椒等辅料)

直投式发酵剂发酵: 圆白菜 → 清洗 → 沥干 → 切分 → 装坛 → 水封 → 发酵(20℃) → 成品

↑
0.03% 菌粉 + 4% 盐水(花椒等辅料)

1.4.2 取样

取泡菜入坛开始计为 0h, 从 0h 开始, 每隔 12h 在无菌条件下取一次泡菜发酵液。

1.4.3 理化指标测定

pH 值测定: 采用 pH 计直接测定; 酸度测定: 用 0.1mol/L 氢氧化钠滴定, 以酚酞(1g 酚酞溶于 100mL 95% 乙醇)为滴定终点指示剂。

1.4.4 微生物指标的测定

1.4.4.1 大肠菌群数量的检测

无菌条件下, 取泡菜发酵液 25mL, 加于含 225mL 无菌生理盐水的三角瓶中, 充分摇匀, 制成 1:10 稀释液。然后依次进行 10 倍梯度稀释。选择 3 个适宜稀释度的稀释液(也可包括原液)各 0.1mL, 用紫红胆盐葡萄糖琼脂倾倒入双层平板, 37℃ 培养 18~24h, 选取典型菌落数在 15~150CFU/mL 之间的平板计数。从中挑取 10 个不同类型的典型和可疑菌落, 分别转接 BGLB 肉汤中 37℃

培养 24~48h, 观察产气情况。经 BGLB 肉汤管产气试验证实后, 计算样品中大肠菌群数量^[7]。

1.4.4.2 沙门氏菌数量的检测

无菌条件下, 取泡菜发酵液 25mL, 加于含 225mL 无菌生理盐水的三角瓶中, 充分摇匀, 制成 1:10 稀释液。然后依次进行 10 倍梯度稀释。在无菌条件下, 选取 3 个适宜稀释度的稀释液(也可包括原液)各 0.1mL, 涂布亚硫酸铋(BS)琼脂平板, 经 37℃ 培养 40~48h, 选取平板上菌落数在 20~200CFU/mL 之间的平板, 计数可疑菌落数。挑取 5 个可疑菌落, 经生化鉴定证实后, 计算样品中沙门氏菌数量^[8]。

1.4.4.3 金黄色葡萄球菌数量的检测

取泡菜发酵液 25mL, 加于含 225mL 无菌生理盐水的三角瓶中, 充分摇匀, 制成 1:10 稀释液。在无菌条件下, 选取 3 个适宜稀释度的稀释液(也可包括原液)各 0.1mL, 接至 Baird-Parker 琼脂平板, 35℃ 培养 24~48h, 选择菌落数在 20~200CFU/mL 之间的平板, 计数可疑菌落数。挑取 5 个可疑菌落, 革兰氏染色, 并进行血浆凝固酶实验。经血凝固酶实验证实后, 计算样品中金黄色葡萄球菌数量^[9]。

1.4.5 数据处理方法

采用统计分析软件 SPSS11.5, 进行 F 检验, 单项方差分析。

2 结果与分析

2.1 自然发酵与直投式发酵剂发酵泡菜过程中产酸的变化

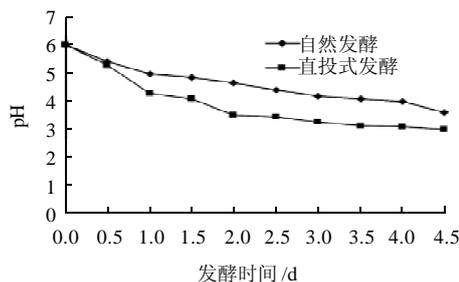


图 1 自然发酵和直投式发酵剂发酵过程中 pH 值的变化曲线
Fig.1 Change curves of pH in pickle during natural and direct vat set fermentation processes

由图 1 可知, 直投式发酵剂发酵和自然发酵过程中 pH 值均呈下降趋势。但前者下降速度更快, 在最初 2d 内, 直投式发酵环境中 pH 值从 6.04 迅速下降到 3.49, 然后逐渐趋于平稳。而自然发酵环境中 pH 值下降速度缓慢, 到 4.5d 才达到 3.6 左右。

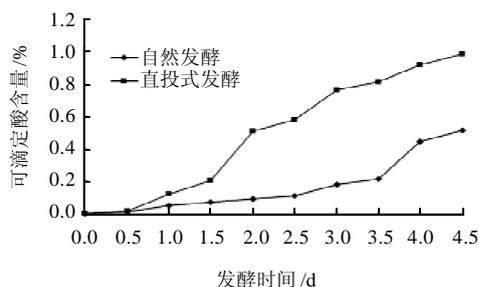


图2 自然发酵和直投式发酵剂发酵过程中酸度的变化曲线
Fig.2 Change curves of titrable acidity in pickle during natural and direct vat set fermentation processes

由图2可知,两种发酵环境中泡菜液的可滴定酸含量均不断增加。然而,与直投式发酵相比,自然发酵的酸度增加速度比较缓慢,且增长幅度较小,两者之间的差异显著($P = 0.026 < 0.05$)。自然发酵初期(0~3.5d)酸度增加缓慢,这是由于活跃于泡菜发酵初期的是一些产酸能力较弱的异型发酵乳酸菌,其发酵产物中乳酸含量较少。而直投式泡菜中一开始即占优势的植物乳杆菌是同型乳酸发酵菌,其产酸能力很强,所以直投式发酵中酸度增长迅速,且最终达到较高水平。

一般来说,泡菜液pH值达到3.5~3.8即可认为泡菜已发酵成熟,从图1、2直投式发酵剂发酵和自然发酵过程中pH值和酸度的变化曲线可以看出,采用直投式发酵剂植物乳杆菌NCU116可以使泡菜发酵周期明显缩短,大大提高泡菜发酵的效率。

2.2 自然发酵与直投式发酵剂发酵泡菜过程中3种病原菌的变化

2.2.1 大肠菌群的数量变化

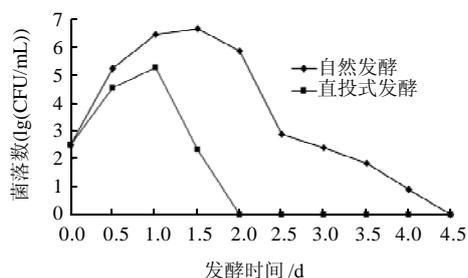


图3 自然发酵和直投式发酵剂发酵过程中大肠菌群变化曲线
Fig.3 Change curves of Coliforms in pickle during natural and direct vat set fermentation processes

直投式泡菜环境中大肠菌群数量在第1天达到最大值(5.27(lg(CFU/mL)))后,急剧下降,第2天在直投式发酵泡菜环境中已检测不到大肠菌群。而自然发酵泡菜环境中,大肠菌群数量在第1.5天达到最大值(6.66(lg(CFU/mL)))

后,开始缓慢下降,到第4.5天自然发酵泡菜环境中检测不到大肠菌群。在整个发酵过程中,两者的大肠菌群数量存在显著差异($P = 0.044 < 0.05$)。

2.2.2 沙门氏菌的数量变化

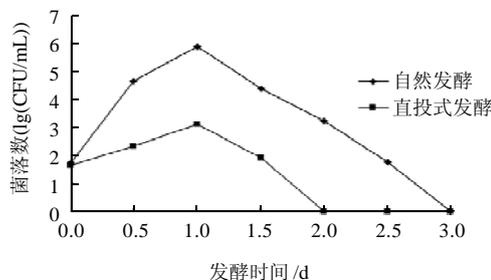


图4 自然发酵与直投式发酵剂发酵过程中沙门氏菌的变化曲线
Fig.4 Change curves of Salmonella in pickle during natural and direct vat set fermentation processes

直投式泡菜环境中沙门氏菌数量在第1天达到最大值(3.13(lg(CFU/mL)))后,急剧下降,第2天在直投式泡菜环境中已检测不到沙门氏菌。而自然发酵泡菜环境中,沙门氏菌数量在第1天达到最大值(5.91(lg(CFU/mL)))后开始下降,到第3天自然发酵泡菜环境中检测不到沙门氏菌。在整个发酵过程中,两者的沙门氏菌数量存在显著差异($P = 0.034 < 0.05$)。

2.2.3 金黄色葡萄球菌的数量变化

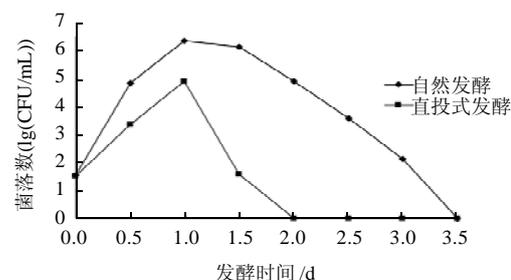


图5 自然发酵与直投式发酵剂发酵过程中金黄色葡萄球菌的变化曲线
Fig.5 Change curves of Staphylococcus aureus in pickle during natural and direct vat set fermentation processes

直投式泡菜环境中金黄色葡萄球菌数量在第1天达到最大值(4.92(lg(CFU/mL)))后急剧下降,第2天在直投式泡菜环境中已检测不到金黄色葡萄球菌。而自然发酵泡菜环境中,金黄色葡萄球菌数量在第1天达到最大值(6.38(lg(CFU/mL)))后缓慢下降,到第3.5天自然发酵泡菜环境中检测不到金黄色葡萄球菌。在整个发酵过程中,两者的金黄色葡萄球菌数量存在显著差异($P = 0.047 < 0.05$)。

由图3~5可知,直投式发酵剂发酵泡菜和自然发酵泡菜过程中,3种病原菌的数量变化趋势一致。均是在发酵前期上升,当达到最高值后下降,最终在泡菜环境中消失。

直投式发酵剂发酵泡菜和自然发酵泡菜初期,大肠菌群、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌均呈快速上升趋势,这主要是由于泡菜坛中含有部分空气,发酵液中较好的营养条件和适宜的pH值环境,使得本身附着在蔬菜表面的一些好气性微生物迅速繁殖,成为泡菜发酵早期的优势菌群。自然发酵泡菜中,以肠膜明串珠菌为主的异型乳酸发酵菌活跃在泡菜发酵初期,其产酸能力较弱,对杂菌及病原菌的抑制能力很弱。而直投式环境中植物乳杆菌一开始就是优势菌株,可以抑制杂菌及病原菌的生长。所以0~1d,尽管直投式发酵和自然发酵环境中病原菌数量均呈上升趋势,但直投式泡菜环境中3种病原菌数量明显少于自然发酵泡菜。直投式泡菜环境中,从1~2d,由于pH值从4.26骤然下降到3.49,3种病原菌的数量也迅速下降并于第2天同时消失。说明pH值的迅速下降是病原菌数量减少最后消失的主要原因,这一结论与以往报道一致^[10]。自然泡菜环境中,随着泡菜发酵时间的延长,泡菜坛中氧气被消耗完,杂菌及病原菌的生长逐渐受到抑制。随后产酸能力较强的同型乳酸发酵菌逐渐成为优势菌群,杂菌及病原菌的生长被进一步抑制,最终从自然发酵泡菜环境中消失。研究表明,泡菜液中病原菌被抑制得益于乳酸菌进行乳酸发酵的代谢产物,对大肠菌群、沙门氏菌等致病菌具有抑制作用的乳酸菌代谢产物有过氧化氢^[11]、乳酸、丙酸、乙酸等有机酸^[12-13]、乳酸菌素^[14]等。从自然发酵泡菜环境中病原菌消失时间来看,相比沙门氏菌和金黄色葡萄球菌,大肠菌群对乳酸菌产生的抑菌物质的耐受性更强。这一结果也同于以往的报道^[15-16]。

2.3 泡菜加工工艺改进措施

按照酱腌菜卫生标准要求,该产品检测限定指标为:大肠菌群远小于90MPN/100g,沙门氏菌、志贺氏菌、金黄色葡萄球菌为不得检出。值得注意的是,本实验中,直投式发酵剂发酵和自然发酵初期,泡菜液中3种病原菌数量都大大超过了食品安全卫生的要求,这可能是由于蔬菜在加工前未进行彻底清洗,且泡菜坛在使用前未进行消毒处理。鉴于发酵初期病原菌数量如此之高,使得泡菜产品存在很大的风险。在今后实验室自制泡菜的发酵工艺中,蔬菜在彻底清洗后最好采用消毒液处理,以尽可能减少蔬菜表面附着的病原微生物。此外,用于发酵泡菜的泡菜坛在使用前需用开水冲洗,还可用白酒擦拭泡菜坛以进一步消毒杀菌。

3 结 论

直投式发酵泡菜和自然发酵泡菜过程中,3种病原菌的数量变化趋势均是在发酵前期上升,当达到最高值后下降,最终在泡菜环境中消失。由于大肠菌群、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌都是会产生毒素的致病菌,尽管自然发酵泡菜中病原菌最终也一样消失,但发酵前期病原菌数量一直处于较高的水平,这样就很难保证自然发酵泡菜产品中不含致病菌毒素,从而使泡菜品质存在潜在威胁。而直投式泡菜发酵可显著降低发酵过程中3种病原菌的数量,使其一直处于较低水平,且在发酵的第2天即消失。结果表明,直投式泡菜发酵不仅可以缩短发酵周期、降低亚硝酸盐含量^[5],还可以显著降低泡菜发酵过程中病原菌数量,从而显著减少致病菌毒素在泡菜产品中的残留量,大大提高泡菜产品的安全健康性。

本研究所用菌种为实验室筛选保藏的植物乳杆菌NCU116,该菌株具有优良的发酵性能^[17],且对人工胃肠液和胆盐具有较好的耐受性^[18],从本实验结果来看,该菌株对大肠菌群、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌还具有显著的抑制作用。因此该菌株不仅可以作为直投式泡菜发酵专用菌,还可考虑用作益生菌素生产菌株。

参 考 文 献:

- [1] 陈世化,夏延斌,聂乾忠.发酵蔬菜中乳酸菌抑菌性的研究[J].食品工程,2007(2):6-9.
- [2] 于娟娟,王顺喜,马微.直投式发酵剂生产酸菜及其风味物质的研究[J].食品科学,2008,29(4):82-86.
- [3] 贺雅非,向瑞宝,李洪军,等.泡菜活性直投式乳酸菌发酵剂的研究[J].食品科学,2006,27(8):191-197.
- [4] 蔡永峰,熊涛,岳国海,等.直投式生物法快速生产泡菜工艺条件的研究[J].食品与发酵工业,2006,32(6):73-76.
- [5] 陆利霞,王晓飞,熊晓辉,等.乳酸菌发酵剂制备白萝卜泡菜的研究[J].中国调味品,2007(3):30-33.
- [6] FLEMING H P. Fermented foods[M]//ROSE A H. Economic microbiology: chapter 7. New York: Academic Press, 1982.
- [7] GB/T 4789.3—2010 食品卫生微生物学检验大肠菌群测定[S].
- [8] GB/T 4789.4—2010 食品卫生微生物学检验沙门氏菌测定[S].
- [9] GB/T 4789.10—2010 食品卫生微生物学检验金黄色葡萄球菌测定[S].
- [10] SVANBERG U, SJOGREN E, KORRL W, et al. Inhibited growth of common enteropathogenic bacteria in lactic-fermented cereal gruels[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1992, 8(6): 601-606.
- [11] JWVEN B J, WEISSLOWIOZ H, HEREL S. Detection of hydrogen peroxide produce by meat lactic starter culture[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1988, 65: 357-360.
- [12] SORRELS K M, SPECK M L. Inhibition of *Salmonella gallinarum* by culture filtrates of *Leuconostoc citrovorum*[J]. Journal of Dairy Science, 1970, 53: 237-243.
- [13] FULLER R. Probiotics in man and animal[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1989, 6: 365-378.
- [14] JUVEN B J, MEINERSMAN R J, STERN N T. Antagonistic effect of lactobacilli and pediococci to control intestinal colonization by human enteropathogens in live poultry[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1991, 70: 95-103.
- [15] SIRAGUSA G R, DICKSON J S. Inhibition of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Escherichia coli* O157:H7 on beef muscle tissue by lactic acid and acetic acid contained in calcium alginate gels[J]. Food Safety, 1993, 13: 147-158.
- [16] CONNER D E, KOTROLA J S. Growth and survival *Escherichia coli* O157:H7 under acidic conditions[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61: 382-385.
- [17] 王韵. 蔬菜发酵专用乳酸菌选育及其菌剂制备核心技术研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2010.
- [18] 熊涛, 宋苏华, 黄锦卿, 等. 植物乳杆菌 NCU116 在模拟人体消化环境中的耐受力[J]. 食品科学, 2011, 32(11): 114-117.