

研究报告

短乳杆菌与植物乳杆菌的发酵特性

田辉¹, 马卓¹, 陈嘉祎¹, 杨晖¹, 李云菲¹, 范文广^{*1}, 任海伟¹, 王永刚¹, 崔丽娟²

1 兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730030

2 兰州理工大学石油化工学院, 甘肃 兰州 730030

田辉, 马卓, 陈嘉祎, 杨晖, 李云菲, 范文广, 任海伟, 王永刚, 崔丽娟. 短乳杆菌与植物乳杆菌的发酵特性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(2): 802-814.

TIAN Hui, MA Zhuo, CHEN Jiayi, YANG Hui, LI Yunfei, FAN Wenguang, REN Haiwei, WANG Yonggang, CUI Lijuan. Fermentation characteristics of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus plantarum*[J]. Microbiology China, 2023, 50(2): 802-814.

摘要: 【背景】目前对于酸菜发酵的研究主要关注点是植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*), 有关短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)在酸菜方面的研究报道很少。【目的】为了挖掘短乳杆菌的发酵性能并开发酸菜发酵剂, 将 2 株短乳杆菌分别与 1 株植物乳杆菌进行组合并发酵酸菜, 分析短乳杆菌对酸菜发酵品质的影响。【方法】分别测定短乳杆菌与植物乳杆菌的单菌株生长产酸性能、耐酸性及亚硝酸盐降解力, 并将两菌种组合后发酵酸菜, 分析 1–7 d 内酸度、乳酸菌活菌数、亚硝酸盐含量及酸菜质构特性的变化趋势。【结果】相较于短乳杆菌 Lb-9-2, 短乳杆菌 Lb-5-3 的生长和产酸速率较慢、酸耐受力较弱, 但其亚硝酸盐降解力较强。两株短乳杆菌分别与植物乳杆菌 Lp-9-1 组合后产酸力显著增强, 并在 3 d 时达到最低 pH 值(约 3.10); 植物乳杆菌 Lp-9-1 的添加使酸菜中总体乳酸菌生长延迟, 在 5 d 时达到最高活菌数; 组合菌种的样品中亚硝酸盐含量在 1–7 d 内变化较为平缓, 前 5 天内两个组合之间差异不显著; 接种乳酸菌会降低酸菜硬度和弹性, 发酵 3 d 时 Lb-5-3/Lp-9-1 组合的硬度最大, 感官评价得分最高。【结论】短乳杆菌与植物乳杆菌组合后, 可在 3 d 内获得亚硝酸盐含量低且其他综合性能较好的酸菜, 但此时的短乳杆菌并未对组合菌的产酸力和亚硝酸盐降解力产生影响, 而对酸菜硬度和感官性能具有一定作用。

关键词: 酸菜; 发酵特性; 降解亚硝酸盐; 植物乳杆菌; 短乳杆菌

资助项目: 国家自然科学基金(31960491)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31960491).

*Corresponding author. E-mail: fanwenguang_88@163.com

Received: 2022-08-28; Accepted: 2022-10-28; Published online: 2022-11-07

Fermentation characteristics of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus plantarum*

TIAN Hui¹, MA Zhuo¹, CHEN Jiayi¹, YANG Hui¹, LI Yunfei¹, FAN Wenguang^{*1}, REN Haiwei¹, WANG Yonggang¹, CUI Lijuan²

¹ College of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730030, Gansu, China

² College of Petrochemical Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730030, Gansu, China

Abstract: [Background] The current studies about the fermentation of Chinese sauerkraut mainly focus on *Lactobacillus plantarum*, while there are few reports on *L. brevis* in Chinese sauerkraut. [Objective] To explore the fermentation performance of *L. brevis* and develop the starter of Chinese sauerkraut fermentation, we designed two strain combinations (two strains of *L. brevis* and one strain of *L. plantarum*) for fermentation to explore the effect of *L. brevis* on the quality of Chinese sauerkraut. [Methods] The growth, acid production capacity, acid resistance, and nitrite degradation capacity of single strains of *L. brevis* and *L. plantarum* were measured. During days 1–7 of the fermentation with the two strain combinations, the acidity, viable cell count, nitrite content, and texture changes of Chinese sauerkraut were measured. [Results] *L. brevis* Lb-5-3 had slower growth and acid production rate, weaker acid tolerance, and stronger nitrite degradation ability than *L. brevis* Lb-9-2. After the two strains were respectively combined with *L. plantarum* Lp-9-1, their acid production significantly increased and the pH value was the lowest (about 3.10) on day 3. The addition of Lp-9-1 delayed the growth of *Lactobacillus* in Chinese sauerkraut and the viable cell count peaked on day 5. The nitrite content of the samples inoculated with the combined strains varied gently from day 1 to day 7 and showed no significant difference between the two combinations in the first 5 days. The inoculation of *Lactobacillus* decreased the hardness and elasticity of Chinese sauerkraut, and the hardness was the highest on day 3 of fermentation with the combination of Lb-5-3/Lp-9-1. The sensory score of the Chinese sauerkraut fermented with Lb-5-3/Lp-9-1 was the highest on day 3 of fermentation. [Conclusion] Therefore, the combination of *L. brevis* and *L. plantarum* could produce Chinese sauerkraut with low nitrite content and good comprehensive properties within 3 days. *L. brevis* in the strain combination did not affect the acid production or nitrite degradation, while it affected the hardness and sensory properties of Chinese sauerkraut. This study is of great significance to the performance evaluation of new *Lactobacillus* strains and the development of starter for the production of Chinese sauerkraut.

Keywords: Chinese sauerkraut; fermentation characteristics; nitrite degradation; *Lactobacillus plantarum*; *Lactobacillus brevis*

食品发酵作为一种传统的食品加工和保存方法, 可有效增加食品安全性和营养价值、延长保质期及改善食品风味等^[1]。中国发酵蔬菜

可追溯至公元前 3 世纪^[1]。一般来说, 不同地区所采用的蔬菜品种和生产工艺各不相同^[1]。我国西南区域的四川酸菜和东北区域的东北酸

菜作为我国传统代表性发酵蔬菜制品,均为泡渍发酵蔬菜,因其清爽可口、酸鲜纯正而广受人们喜爱^[2]。韩国酸菜同样是具有悠久历史的发酵蔬菜,是在韩国及其他东亚国家被广泛消费的食品之一^[3]。其中酸菜是由附着于蔬菜叶子表面的乳酸菌经发酵产酸而成,这些乳酸菌主要包括乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)和片球菌属(*Pediococcus*)等,其原材料可为大白菜、卷心菜或芥菜,而不同的发酵工艺和条件(如盐浓度)则会影响酸菜中乳酸菌的种属组成^[1]。酸菜中除乳酸菌外,还有肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)、假单胞菌科(*Pseudomonadaceae*)和酵母菌(*yeasts*)^[4-5]。

复杂的微生物组成使得不当加工易导致酸菜质量不稳定^[4]。由于传统自然发酵酸菜的周期长、过程复杂,在日本和韩国逐渐被人工接种乳酸菌所取代^[6]。

接种乳酸菌可缩短酸菜发酵周期、改善营养品质并提高产品的感官特性^[4]。Yang 等^[4]将分离自辽宁酸菜的本土单一菌株分别接种到酸菜中,包括植物乳杆菌、副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*)、肠膜明串珠菌及食蜜魏斯氏菌(*Weissella cibaria*)等,结果显示,接种乳酸菌酸菜的 pH 值下降迅速,有益菌数量更多,风味成分显著提高。另有研究表明,将干酪乳杆菌 11MZ-5-1 接种至中国传统酸菜后,发现酸菜中细菌种类多样性下降,但乳酸杆菌取代乳球菌成为优势菌群,而且假单胞菌和肠杆菌水平降低,因此,接种干酪乳杆菌 11MZ-5-1 有益于酸菜的良性发酵^[7]。Lee 等^[8]使用肠膜明串珠菌和清酒乳杆菌为复合发酵剂,接种并制作韩国酸菜,发现复合菌种可在一定程度上弥补单菌株发酵性能的弱点。研究表明,酸菜发酵前期由异型乳酸发酵的菌种进行启动,包括肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)和短乳杆菌

(*Lactobacillus brevis*),而后期则由同型乳酸发酵的植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)来完成^[4]。

短乳杆菌和植物乳杆菌是酸菜发酵过程中的常见菌种。其中,短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)是一种异型乳酸发酵菌^[9],是酸菜发酵中酸化和过酸化阶段的优势菌种^[10]。研究报道指出,短乳杆菌部分菌株具有降低酸菜中亚硝酸盐的能力。张庆芳等^[11]发现短乳杆菌相较于其他菌株,具有更强的降解亚硝酸盐的能力;夏永军等^[12]从四川酸菜中分离得到的短乳杆菌 AR123,发现其降解亚硝酸盐效果显著。

植物乳杆菌产酸力强、应用广泛,已经成为研究热点之一^[13]。该菌种可以缩短发酵周期^[14],减少有害微生物的数量^[15],增加酸菜风味物质^[16]。此外,植物乳杆菌还能降低酸菜中亚硝酸盐含量^[17]。王英等^[18]从酸豆角中分离得到植物乳杆菌 SD-7,其降解亚硝酸盐能力较强。

本研究使用前期分离到的 2 株短乳杆菌和 1 株植物乳杆菌组合后用于酸菜发酵,其中 2 株短乳杆菌具有不同的降解亚硝酸盐能力。通过研究短乳杆菌与植物乳杆菌组合后的发酵性能,尤其是对酸菜发酵过程中亚硝酸盐的含量变化进行研究,以期对菌种资源挖掘及自主优良发酵剂的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

短乳杆菌 Lb-5-3、短乳杆菌 Lb-9-2 和植物乳杆菌 Lp-9-1 均分离自甘肃传统酸菜,其 16S rRNA 基因的 GenBank 序列号分别为 OP579169、OP579168 及 OP575926。

大白菜,兰州市七里河区水磨沟蔬菜批发市场;无碘食盐,中盐黑龙江盐业集团有限公司;MRS 培养基(培养或分离菌种),上海博微生物科技有限公司。

立式高压蒸汽灭菌锅, 上海申安医疗器械厂; 紫外可见分光光度计, 尤尼科(上海)仪器有限公司; 离心机, 上海安亭科学仪器厂; 电子天平, 上海台衡电子衡器有限公司; 超净台, 苏州安泰空气技术有限公司; 质构仪, 兰州陇嘉化工科技公司。

1.2 方法

1.2.1 菌种活化

菌种使用前需进行活化, 即将菌种接种于 MRS 液体培养基中, 37 °C 恒温静置培养 24 h, 以 2% (体积分数) 比例接种传代, 连续活化 2 代。

1.2.2 菌种组合

实验分为单菌发酵和双菌混合发酵两种模式: 双菌混合发酵设立 2 个组, 与单菌发酵组成 5 个组, 第 1 组样品接种了短乳杆菌 Lb-5-3, 第 2 组样品接种了短乳杆菌 Lb-9-2, 第 3 组样品接种了短乳杆菌 Lb-5-3/植物乳杆菌 Lp-9-1, 第 4 组样品接种了短乳杆菌 Lb-9-2/植物乳杆菌 Lp-9-1, 第 5 组样品未接种菌株; 单菌发酵设立 3 个组, 第 1 组样品接种短乳杆菌 Lb-5-3, 第 2 组样品接种短乳杆菌 Lb-9-2, 第 3 组样品接种植物乳杆菌 Lp-9-1。

1.2.3 酸菜制作方法

如图 1A 所示, 将大白菜的菜帮和菜叶分别切成小块, 并将这些实验材料置于一次性饭盒中, 每盒放置菜帮约 65 g, 菜叶约 30 g, 加

入 500 mL 蒸馏水, 加入浓度为 4% 的食盐水(无碘), 分别将每个菌种培养液以 1% (体积分数) 比例接种于白菜中, 并使用无菌木筷搅拌均匀, 置于室温发酵(图 1B), 每组 3 个重复。经过一定时间完成酸菜发酵(图 1C)。

1.2.4 耐酸性测定

酸菜在密闭饭盒中发酵, 随着发酵时间的延长, 酸菜汁中 pH 值不断下降, 分别在 pH 值约为 3.0、4.0、5.0 和 6.0 时取样测定酸菜汁中 OD_{600} 值, 通过比较短乳杆菌 Lb-5-3、Lb-9-1 及植物乳杆菌 Lp-9-1 的 OD_{600} 值, 以此判断各菌株的耐酸性能。

1.2.5 亚硝酸盐含量测定

亚硝酸盐含量参考文献[19]的方法测定, 以亚硝酸盐标准液浓度(x)为自变量, 以 538 nm 处吸光度值(y)为因变量绘制亚硝酸盐溶液标准曲线, 结果见图 2, 得到线性回归方程为 $y=0.6171x-0.0019$, 相关性系数 $R^2=0.9948$ 。

样品测定: 准确吸取 2 mL 上清液, 置于 50 mL 容量瓶中, 加水 35 mL 混匀, 滴加无水对氨基苯磺酸溶液 2 mL, 摇匀, 避光静置处理 3 min, 再加入盐酸萘乙二胺溶液 1 mL, 定容至 50 mL, 混匀, 避光静置处理 15 min, 用玻璃比色皿测定在波长 538 nm 处的吸光值。以等量的蒸馏水代替样品作为空白对照。根据图 2 所得标准曲线方程计算亚硝酸盐的含量。

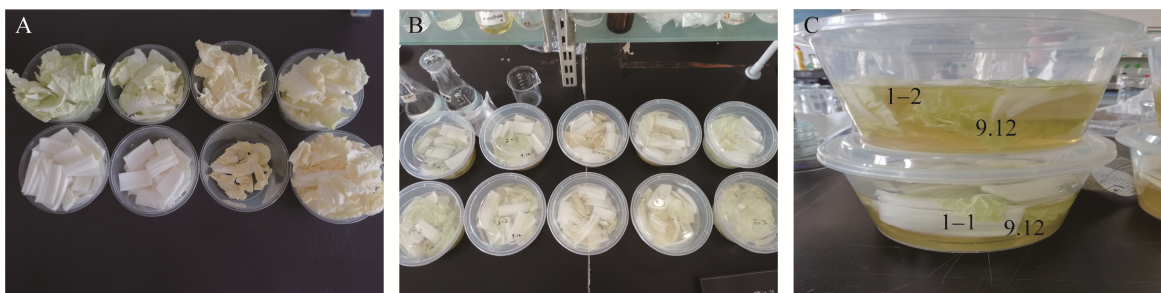


图 1 酸菜的腌制过程 A: 切分. B: 开始腌制. C: 腌制完成的酸菜

Figure 1 The pickling process of sauerkrauts. A: Sauerkrauts being cut. B: Sauerkrauts being pickled. C: Sauerkrauts being fermented completely.

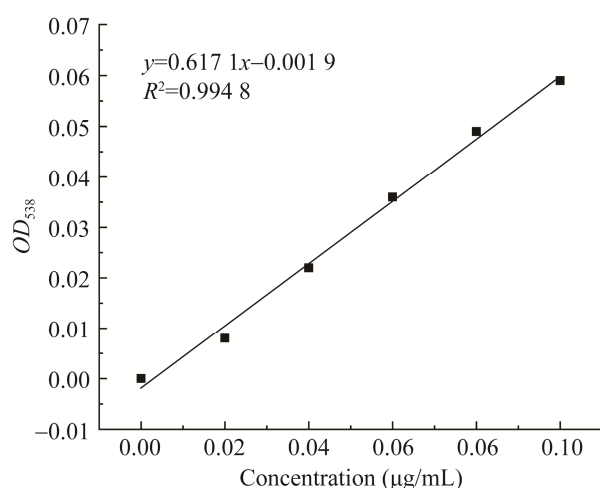


图2 亚硝酸盐溶液的标准曲线

Figure 2 Standard curve of nitrite solution.

1.2.6 质构特性测定

用质构仪测定酸菜, 采用直径为 5 mm 的圆柱形探头进行分析实验。测试参数为: 测前速度 60 mm/min, 测试速度 60 mm/min, 测后速度 60 mm/min, 压缩程度 40%, 2 次压缩间隔时间为 5 s, 触发点负载 0.15 N, 数据采集速率 100 Hz, 每个样品重复 3 次^[20]。

1.2.7 感官评价

由经过培训的食品相关专业人员组成评价小组, 至酸菜 pH 值为 3.8 时, 从酸菜的色、香、味、质地方面对 4 组接菌样品及未接种的酸菜为对照进行打分, 满分 100 分。每个样本进行 3 次重复评价。具体酸菜感官评价标准参照表 1^[21]。

表1 酸菜感官评价标准

Table 1 Sensory evaluation criteria of sauerkrauts

项目	特征	得分
Item	Characteristics	Score
色泽	色泽发黑, 无光泽, 有霉花浮膜, 汤汁不清亮	0-8
	色泽偏暗沉, 无异物, 汤汁不清亮	9-16
	色泽新鲜, 汤汁清亮	17-25
	Fresh colour, clear liquid	
香气	无酸菜应有香气, 有酸败、腐烂味, 或其他刺鼻难闻气味	0-8
	无酸菜应有香气, 无不良异味	9-16
	无不良异味	17-25
	With sauerkraut aroma originated from lactic acid fermentation, without objectionable odor	
滋味	过酸或过咸味, 有其他不良味道, 如馊味、霉味等	0-8
	酸咸度较适中, 无不良味道	9-16
	滋味鲜美, 酸度适宜	17-25
	Delicious taste, moderate acidity	
质地	菜质脆嫩度差, 咀嚼有渣	0-8
	菜质脆嫩度较差	9-16
	质地脆嫩	17-25
	With a crisp texture	

2 结果与讨论

2.1 生长和产酸性能

如图 3 所示, 根据发酵时间的变化, 3 种菌株的生长曲线有明显差异, 菌株 Lp-9-1 在第 3 小时进入指数生长期, 菌株 Lb-9-2 在第 9 小时进入指数生长期, 而菌株 Lb-5-3 生长最为缓慢, 在第 21 小时进入指数生长期。

单菌株的产酸性能曲线如图 4 所示, 与生长曲线对照来看, 菌株 Lp-9-1 在第 3 小时开始 pH 值不断下降, 与生长曲线的趋势基本一致; 而菌株 Lb-9-2 的 pH 值快速下降是在 12 h 开始, 这与生长曲线相比稍显滞后; 菌株 Lb-5-3 的 pH 值在前 18 小时下降速率平缓, 18 h 之后, 下降速率快速增加, 与生长曲线相比趋势走向基本一致。

短乳杆菌具有高产酸能力, 其利用酸菜发酵液中的可溶性养分进行乳酸发酵, 产生乳酸和 CO_2 , 一方面使环境 pH 值降低; 另一方面提

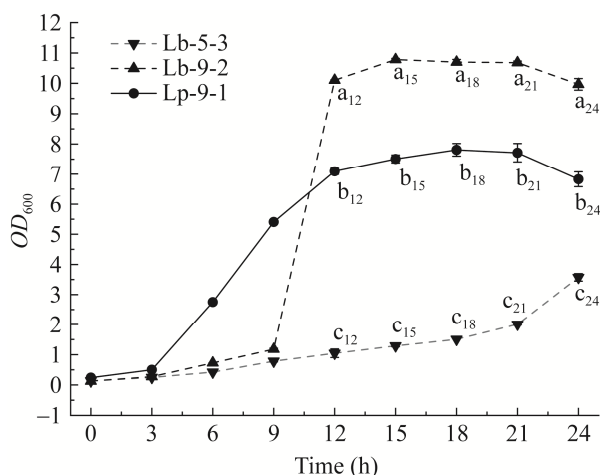


图 3 单菌株生长曲线图 不同小写字母代表组别差异显著($P<0.05$)

Figure 3 Growth curves of different strains. Different lowercase letters represent significant differences between groups at $P<0.05$ level.

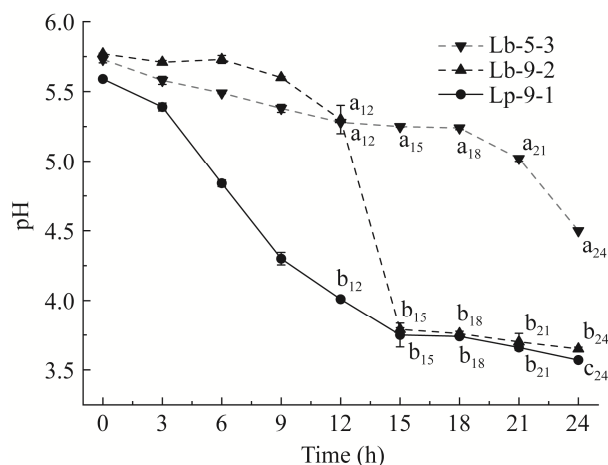


图 4 单菌株产酸曲线图 不同小写字母代表组别差异显著($P<0.05$)

Figure 4 Acid-production curve of strains. Different lowercase letters represent significant differences between groups at $P<0.05$ level.

供厌氧环境条件, 从而更有利于乳酸发酵的继续进行和乳酸细菌在酸菜酸化成熟阶段的大量繁殖, 以及抑制腐败微生物的繁殖^[10]。

2.2 菌株耐酸性

菌株耐酸性如图 5 所示, 对于菌株 Lb-9-2、Lp-9-1 和 Lb-5-3, 其中, 菌株 Lb-9-2 的耐酸性最强, 菌株 Lb-5-3 的耐酸性最弱, 随着 pH 值的降低, 反应体系酸度增加, 抑制菌株的生长, 导致该现象的原因可能是: H^+ 的积累抑制了菌株的生长, 这与闫征等^[22]研究结果基本一致, H^+ 对乳酸菌产酸的抑制作用主要是通过抑制乳酸脱氢酶的活性从而抑制糖代谢, 影响菌体能量的获得, 进而抑制了菌体的生长。

2.3 菌株降解亚硝酸盐性能

菌株降解亚硝酸盐性能如图 6 所示, 菌株 Lp-9-1 降解亚硝酸盐性能最好, 降解率约达到 50%; 菌株 Lb-5-3 降解亚硝酸盐性能稍次于 Lp-9-1, 降解率约达到 45%; 菌株 Lb-9-2 降解亚硝酸盐性能最弱, 降解率约为 30%。

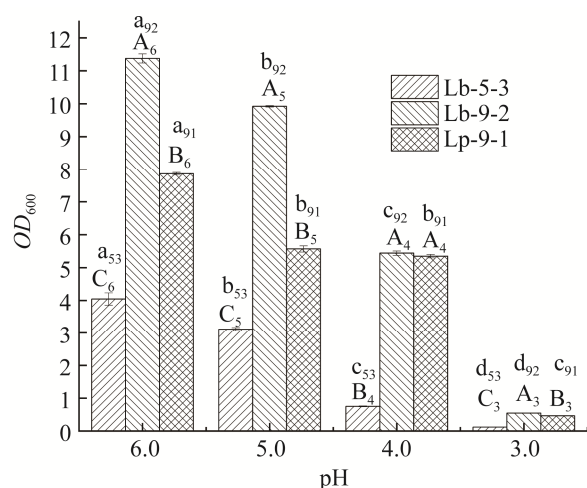


图 5 菌株酸耐受力 不同小写字母代表同菌株不同 pH 处理之间的差异显著性($P < 0.05$). 不同大写字母代表相同 pH 不同菌株处理之间的差异显著性($P < 0.05$)

Figure 5 Acid tolerance of three strains. Different lowercase letters represent the significant differences between groups of the same strain but different pH at $P < 0.05$ level. Different capital letters represent the significant differences between groups with different strains at the same pH at $P < 0.05$ level.

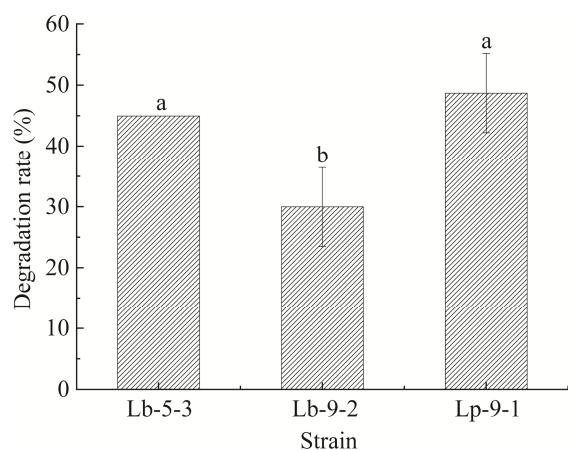


图 6 菌株亚硝酸盐降解性能 不同小写字母代表组别差异显著($P < 0.05$)

Figure 6 Nitrite degradation abilities of three strains. Different lowercase letters represent significant differences between groups at $P < 0.05$ level.

在发酵过程中,蔬菜中的硝酸盐被硝酸盐还原菌(如肠杆菌)还原为亚硝酸盐^[23],发酵蔬菜中亚硝酸盐的形成与微生物和蔬菜体内硝酸盐还原酶有关^[24],亚硝酸盐是一种潜在的致癌物质,对人体有强的毒害作用,过量摄入易诱发癌症^[25],而乳酸菌是降解亚硝酸盐中最理想的菌株^[26],乳酸菌降解亚硝酸盐主要是通过产生亚硝酸盐还原酶将亚硝酸盐还原为无毒物质,每种细菌只含有一种亚硝酸盐还原途径,而且不同菌株亚硝酸盐还原酶的性质也各不相同^[24]。王兰等^[27]从发酵辣椒中得到强降解亚硝酸盐的短乳杆菌 L5;凌洁玉等^[28]对于植物乳杆菌的降亚硝酸盐机理及亚硝酸盐还原酶进行深入研究,均证实其降解亚硝酸盐的作用特性。

2.4 双菌发酵酸菜

2.4.1 酸度

酸菜发酵过程中 pH 曲线如图 7 所示,对于双菌组合发酵,在第 3 天时, pH 值降到最低,

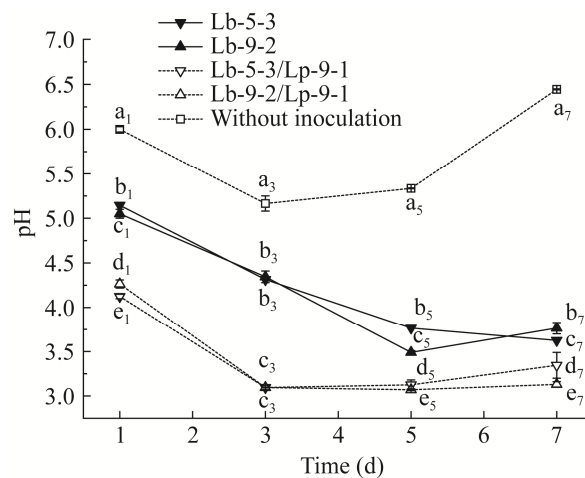


图 7 酸菜发酵过程中的 pH 曲线 不同小写字母代表组别差异显著($P < 0.05$)

Figure 7 The pH curves of sauerkraut samples during fermentation. Different lowercase letters represent significant differences between groups at $P < 0.05$ level.

此时的酸度达到最大值, 未接种的发酵组 pH 值在第 3 天时也降到最低, 而单菌发酵的 pH 值在第 5 天时降到最低, 说明双菌组合发酵可以提高酸度, 缩短发酵时间, 也可有效避免杂菌的污染; 对于两组组合发酵的实验组, 在产酸方面的变化趋势大体一致, 无明显差异。短乳杆菌与植物乳杆菌组合后发酵环境的酸度明显降低, 这与李共国等^[29]所得植物乳杆菌是影响酸菜酸度的主要因素这一结果基本一致。

2.4.2 活菌数

酸菜发酵过程中的产酸菌活菌数变化如图 8 所示, 相较于未接种的酸菜, 随着发酵时间的增加, 仅有菌株 Lb-9-2 在第 3 天时达到活菌最大数, 可能的原因是短乳杆菌 Lb-9-2 耐酸性强且产酸力强, 酸度增加, 对短乳杆菌 Lb-9-2 的抑制作用不明显; 从第 3 天之后, 随着发酵时间的增加, 酸度超过 Lb-9-2 的耐酸性临界值, 抑制菌株生长, 所以菌株 Lb-9-2 的活菌数开始呈现下降趋势。对于未接种的自然发酵组, 酵

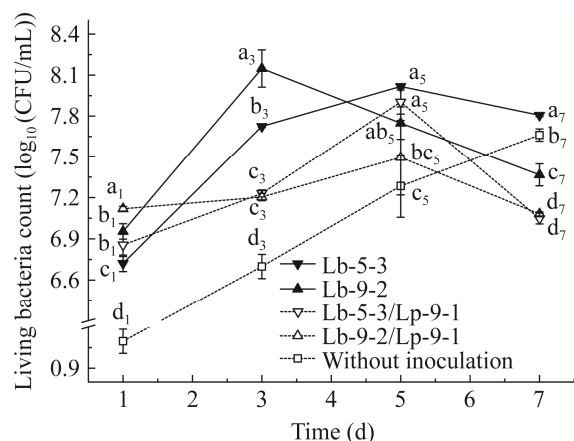


图 8 酸菜发酵过程中的活菌数曲线 不同小写字母代表组别差异显著($P<0.05$)

Figure 8 Viable counts curves of inoculated strains in sauerkraut during fermentation. Different lowercase letters represent significant differences between groups at $P<0.05$ level.

母菌大量繁殖且耐酸性强, 因此, 随着发酵时间的增加, 活菌数不断上升。双菌组合发酵时, 在第 5 天活菌数最多, 发酵时间继续延长, 活菌数呈下降趋势。导致此现象的原因可能是: 双菌组合发酵可以提高耐酸性且增加酸菜中的酸度, 但是 pH 值超过临界值, 产酸菌活性被抑制, 菌株大量衰亡。与前期报道一致, 酸菜发酵初期的优势菌群为肠膜明串珠菌, 随着 pH 值下降, 优势菌群转为植物乳杆菌和短乳杆菌^[30]。

2.4.3 亚硝酸盐含量变化

酸菜发酵过程中酸菜汁中的亚硝酸盐含量变化如图 9 所示, 对于未接种的自然发酵组, 在第 3 天亚硝酸盐含量达到峰值。导致此现象的原因是: 出现亚硝酸盐峰值是由于酸菜发酵初期氧气含量较多, 发酵体系中乳酸菌尚未占据优势地位, 产酸少, 未形成酸性环境, 而好氧的真菌和肠杆菌科细菌等有害微生物迅速增长, 产生硝酸还原酶, 将硝酸盐转化为亚硝

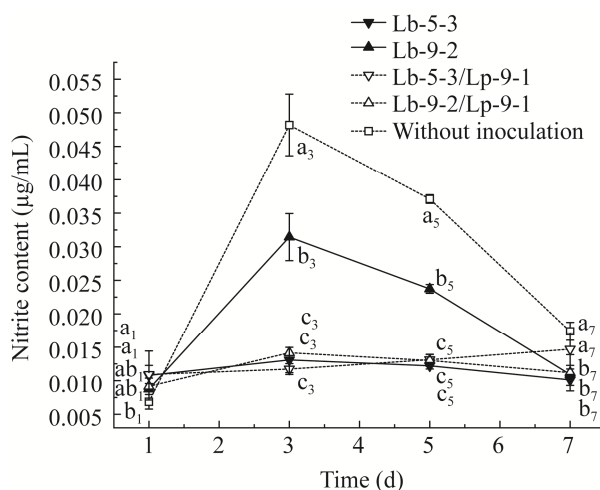


图 9 酸菜发酵过程中的亚硝酸盐含量曲线 不同小写字母代表组别差异显著($P<0.05$)

Figure 9 Curves of sodium nitrite content in sauerkraut juice during fermentation. Different lowercase letters represent significant differences between groups at $P<0.05$ level.

酸盐^[31]。相较于未接种组,对于菌株 Lb-5-3 和双菌混合发酵的酸菜,随着发酵时间的增加,酸菜中亚硝酸盐含量在极小的范围内变化,发酵的整个过程中亚硝酸盐含量变化曲线整体上升趋势趋于平稳,未出现大幅度的波动。可能的原因是:在发酵开始时接种短乳杆菌和植物乳杆菌,乳酸菌占主导地位,大量繁殖,产生酸性环境,硝酸盐还原酶活性降低,亚硝酸盐含量下降^[32];在发酵至 pH 值低于 5 时,亚硝酸盐以酸降解为主,乳酸菌代谢产生大量酸,抑制了杂菌的生长繁殖和硝酸还原酶的活力, H^+ 与亚硝酸盐发生非酶歧化反应等都促使了亚硝酸盐含量的降低^[33]。

亚硝酸盐是一种对人体具有强致癌性的化学物质^[34],硝酸盐是产生亚硝酸盐的前体物质,亚硝酸盐存在于大多数蔬菜中,目前降解亚硝酸盐的方法主要是生物、化学、物理降解^[35],其中生物降解主要是通过发酵剂降解亚硝酸盐^[36]。关于短乳杆菌作为发酵剂降解亚硝酸盐的研究很少,国家强制性标准中规定,蔬菜中亚硝酸盐含量不得高于 20 mg/kg。肉制品生产中,单独使用亚硝酸钠最高限量为 0.15 g/kg;成品残留量不得超过 30 mg/kg,因此,控制亚硝酸盐含量水平与提高发酵产品特别是发酵蔬菜的安全性有关^[37]。对酸菜汁中亚硝酸盐含量变化分析可以看出,短乳杆菌与植物乳杆菌均有极强的亚硝酸盐降解能力,因此,在发酵蔬菜中应用乳酸菌可以降低酸菜对人体的致癌作用,从而开发出健康、营养的酸菜。

2.4.4 酸菜质构特性

酸菜发酵过程中的菜帮硬度变化如图 10 所示,随着发酵时间的增加,除双菌混合发酵 Lb-5-3/Lp-9-1 在第 3 天时菜帮硬度变化幅度不大外,其余组包括未接种的酸菜在发酵过程

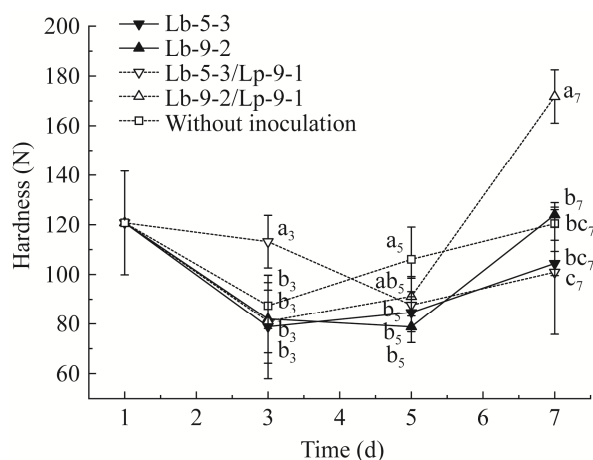


图 10 酸菜发酵过程中菜帮硬度的变化 不同小写字母代表组别差异显著($P < 0.05$)

Figure 10 Changes in hardness of sauerkrauts during fermentation. Different lowercase letters represent significant differences between groups at $P < 0.05$ level.

中菜帮硬度均发生明显下降。导致此结果可能的原因是:(1) 酸菜菜帮的果胶在酸性环境中被分解,导致硬度下降^[20]; (2) 腌制过程中一些有害微生物生长繁殖,分泌果胶酶水解果胶物质,导致酸菜菜帮变软^[38]。

酸菜发酵过程中菜帮弹性的变化如图 11 所示,0-3 d 内,随着发酵时间的增加,通过比较对照组与实验组可以明显看出,单菌发酵与双菌混合发酵相较于未接种的酸菜组,菜帮的弹性下降速率明显高于未接种;超过 3 d 之后,发酵时间继续延长,菜帮的弹性变化趋于稳定,在极小的范围内进行变化。出现此结果可能的原因是:发酵过程中,产酸菌的大量繁殖使溶液中 pH 值快速下降,导致酸菜内部质构发生改变,质构测定时,酸菜弹性因内部质构的变化从而出现明显的下降。

2.5 感官评价结果

酸菜感官评价结果如表 2 所示,综合香气、质地、滋味、色泽 4 个方面进行评价,其中

表 2 酸菜感官评价结果

Table 2 Results of sensory evaluation of sauerkraut

样品 Sample	香气 Aroma	质地 Texture	滋味 Taste	色泽 Colour	总分 Total score
Lb-5-3	17	19	20	21	77
Lb-9-2	18	22	21	22	83
Lb-5-3/Lp-9-1	19	21	23	22	85
Lb-9-2/Lp-9-1	12	14	16	15	57
未接种 Without inoculation	14	17	18	16	65

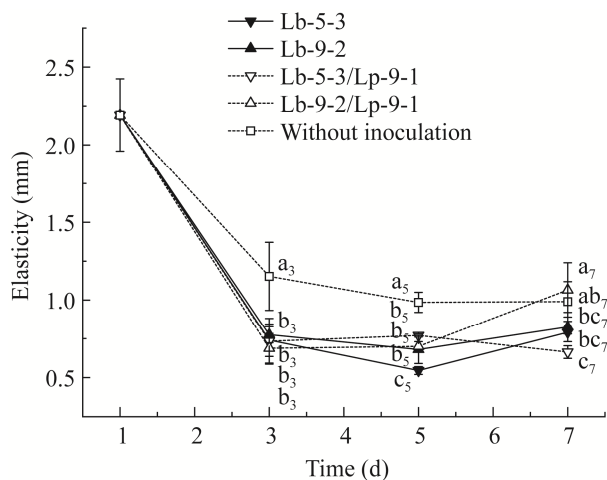


图 11 酸菜发酵过程中菜帮弹性的变化 不同小写字母代表组别差异显著($P<0.05$)

Figure 11 Changes in the elasticity of sauerkrauts during fermentation. Different lowercase letters represent significant differences between groups at $P<0.05$ level.

Lb-5-3/Lp-9-1 在 5 组结果中评价总分最高, Lb-5-3/Lp-9-1 组合发酵之后, 酸菜香气更加浓郁, 滋味更加酸爽, 说明 Lb-5-3/Lp-9-1 组合作为新型发酵剂可以提高酸菜的风味。

3 结论

以 2 株短乳杆菌和 1 株植物乳杆菌为实验菌株分别进行单菌发酵和双菌组合发酵, 由于 2 株短乳杆菌降解酸菜中亚硝酸盐能力差异明显, 因此与该株植物乳杆菌进行组合发酵, 通过测定酸菜发酵过程中的 pH、亚硝酸盐含量、

质构的动态变化, 以及通过物理感官评价, 分析乳酸杆菌对酸菜品质的影响, 从而筛选出高降解亚硝酸盐的最佳菌株和最优组合。

(1) 通过对 3 个单菌株、2 个组合菌种、1 个自然发酵酸菜的特性进行对比, 结果表明: Lb-5-3/Lp-9-1 组合发酵 3 d 时的硬度最大, 发酵 3 d 时 Lb-5-3/Lp-9-1 组合感官评价得分最高。

(2) 单菌株降解亚硝酸盐不同的短乳杆菌与植物乳杆菌组合后, 亚硝酸盐降解力差异不显著。

(3) 短乳杆菌与植物乳杆菌组合, 可在 3 d 内完成酸菜发酵且酸菜品质优良, 其中 Lb-5-3/Lp-9-1 组合是筛选所得到的最优组合。

REFERENCES

[1] LIU SN, HAN Y, ZHOU ZJ. Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods[J]. Food Research International, 2011, 44(3): 643-651.

[2] 朱翔, 汪冬冬, 明建英, 陈功, 唐垚, 李恒, 张伟, 张其圣. 四川泡菜和东北酸菜在发酵过程中的物质成分变化[J]. 中国调味品, 2021, 46(4): 78-81.

ZHU X, WANG DD, MING JY, CHEN G, TANG Y, LI H, ZHANG W, ZHANG QS. Changes of substance composition of Sichuan pickle and northeast pickled cabbage during fermentation[J]. China Condiment, 2021, 46(4): 78-81 (in Chinese).

[3] PATRA JK, das G, PARAMITHIOTIS S, SHIN HS. Kimchi and other widely consumed traditional fermented foods of Korea: a review[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1493.

[4] YANG XZ, HU WZ, XIU ZL, JIANG AL, YANG XY,

- SARENGAOWA, JI YR, GUAN YG, FENG K. Comparison of northeast sauerkraut fermentation between single lactic acid bacteria strains and traditional fermentation[J]. Food Research International, 2020, 137: 109553.
- [5] LIU ZG, LI JY, ZHOU XW, WEI BL, XIE SH, DU TH, ZHAO XT, JIANG L, XIONG T. The lactic acid bacteria and yeast community of home-made sauerkraut from three provinces in southwest China[J]. Archives of Microbiology, 2021, 203(6): 3171-3182.
- [6] 邢宇, 张迪, 李新莉. 应用 DGGE 和 Real-time PCR 分析酸菜发酵液中乳酸菌的动态变化[J]. 中国微生物生态学杂志, 2017, 29(4): 395-398, 412.
- XING Y, ZHANG D, LI XL. Dynamic changes of lactic acid bacteria in fermentation of Chinese sauerkraut by PCR-DGGE and real-time PCR[J]. Chinese Journal of Microecology, 2017, 29(4): 395-398, 412 (in Chinese).
- [7] DU R, GE J, ZHAO D, SUN J, PING W, SONG G. Bacterial diversity and community structure during fermentation of Chinese sauerkraut with *Lactobacillus casei* 11MZ-5-1 by Illumina Miseq sequencing[J]. Letters in Applied Microbiology, 2018, 66(1): 55-62.
- [8] LEE JJ, CHOI YJ, LEE M J, PARK S J, OH SJ, YUN YR, MIN SG, SEO HY, PARK SH, LEE MA. Effects of combining two lactic acid bacteria as a starter culture on model kimchi fermentation[J]. Food Research International, 2020, 136: 109591.
- [9] TEIXEIRA P. *Lactobacillus brevis*[A]//Carl A. Batt, Mary Lou Tortorello. Encyclopedia of Food Microbiology[M]. 2nd ed. AV AMSTERDAM: Elsevier Ltd, 2014: 418-424.
- [10] 李文斌, 唐中伟, 宋敏丽. 短乳杆菌的研究和应用进展[J]. 中国食品添加剂, 2007(6): 110-112.
- LI WB, TANG ZW, SONG ML. Research and application process of *Lactobacillus brevis*[J]. China Food Additives, 2007(6): 110-112 (in Chinese).
- [11] 张庆芳, 迟乃玉, 郑学仿, 袁玉莲, 孟宪军. 短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)去除亚硝酸盐的研究[J]. 微生物学通报, 2004, 31(2): 55-60.
- ZHANG QF, CHI NY, ZHENG XF, YUAN YL, MENG XJ. Study on removal of nitrite by *Lactobacillus brevis*[J]. Microbiology, 2004, 31(2): 55-60 (in Chinese).
- [12] 夏永军, 杨映津, 马佳莹, 王光强, 熊志强, 张汇, 艾连中[A]//短乳杆菌 AR123 在泡菜短时发酵中降解亚硝酸盐的研究. 乳酸菌健康及产业化: 第十一届乳酸菌与健康国际研讨会[C]. 中国河北石家庄, 2016: 90.
- XIA YJ, YANG DJ, MA JY, WANG GQ, XIONG ZQ, ZHANG H, AI LZ. Characterization of *Lactobacillus brevis* starter for nitrite degradation in pickle short-time fermentation[A]//Lactic acid bacteria health and industrialization: the 11th international symposium on lactic acid bacteria and health[C]. Shijiazhuang, Hebei, China, 2016: 90 (in Chinese).
- [13] LEE H, YOON H, JI Y, KIM H, PARK H, LEE J, SHIN H, HOLZAPFEL W. Functional properties of *Lactobacillus* strains isolated from kimchi[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 145(1): 155-161.
- [14] 陆利霞, 王晓飞, 熊晓辉, 熊强. 植物乳杆菌 B₂ 纯种发酵萝卜泡菜的研究[J]. 食品工业科技, 2005, 26(7): 59-60, 63.
- LU LX, WANG XF, XIONG XH, XIONG Q. Study on pickling radish by *Lactobacillus plantarum* B₂[J]. Science and Technology of Food Industry, 2005, 26(7): 59-60, 63 (in Chinese).
- [15] 杜晓华, 刘书亮, 蒲彪, 张艾青, 陈立. 植物乳杆菌纯种半固态发酵泡菜工艺条件的研究[J]. 中国酿造, 2011, 30(1): 63-66.
- DU XH, LIU SL, PU B, ZHANG AQ, CHEN L. Production technology of pickle by semi-solid fermentation of *Lactobacillus plantarum*[J]. China Brewing, 2011, 30(1): 63-66 (in Chinese).
- [16] 邓风, 张一涵, 罗芳会, 赵慧君, 郭壮, 张振东. 咸丰鲜广椒中乳酸菌的分离与鉴定及其泡菜发酵特性评价[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(16): 172-177.
- DENG F, ZHANG YH, LUO FH, ZHAO HJ, GUO Z, ZHANG ZD. Isolation and identification of lactic acid bacteria from Xianfeng Zha-chili and evaluation of their fermenting property[J]. Food Research and Development, 2019, 40(16): 172-177 (in Chinese).
- [17] 杨晶, 黄玉军, 姚瑶, 周帆. 植物乳杆菌 5-7-3 发酵产生的有机酸对亚硝酸盐的降解作用研究[J]. 中国调味品, 2019, 44(3): 22-25.
- YANG J, HUANG YJ, YAO Y, ZHOU F. Degradation of nitrite by organic acids produced by *Lactobacillus plantarum* 5-7-3 fermentation[J]. China Condiment, 2019, 44(3): 22-25 (in Chinese).
- [18] 王英, 周剑忠, 李清, 梁红云, 刘小莉, 黄自苏. 植物乳杆菌 SD-7 的分离鉴定及其亚硝酸盐降解特性[J]. 中国食品学报, 2016, 16(7): 97-104.
- WANG Y, ZHOU JZ, LI Q, LIANG HY, LIU XL, HUANG ZS. Isolation and identification of

- Lactobacillus plantarum* strain SD-7 and its nitrite degradation characteristics[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016, 16(7): 97-104 (in Chinese).
- [19] GB 5009.33—2016, 食品安全国家标准-食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定[S]. 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会; 国家食品药品监督管理总局. GB 5009.33—2016, National Food Safety Standards of China-determination of nitrite and nitrate in food[S]. National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China; China Food and Drug Administration (in Chinese).
- [20] 岳喜庆, 杜书, 武俊瑞, 辛广. 酸菜自然发酵过程中的质地变化[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(4): 68-71. YUE XQ, DU S, WU JR, XIN G. Analysis of changes of texture propertise of Chinese sauerkraut during natural fermentation[J]. Food and Fermentation Industries, 2013, 39(4): 68-71 (in Chinese).
- [21] 寿禹亮, 刘丽波, 李艾黎, 刘光宇. 直投式发酵剂生产四川泡菜的研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(8): 236-238. SHOU YL, LIU LB, LI AL, LIU GY. Study on Sichuan pickle fermented by DVS starter[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(8): 236-238 (in Chinese).
- [22] 闫征, 王昌禄, 顾晓波. pH 值对乳酸菌生长和乳酸产量的影响[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(6): 35-38. YAN Z, WANG CL, GU XB. Influence of pH on the growth of *Lactobacillus casei* G-7 and lactic acid production[J]. Food and Fermentation Industries, 2003, 29(6): 35-38 (in Chinese).
- [23] ZHOU Q, ZANG SZ, ZHAO ZN, LI XL. Dynamic changes of bacterial communities and nitrite character during northeastern Chinese sauerkraut fermentation[J]. Food Science and Biotechnology, 2018, 27(1): 79-85.
- [24] 卿煜维. 发酵辣椒中降亚硝酸盐乳酸菌筛选及其降亚硝酸盐机理研究[D]. 长沙: 湖南农业大学硕士学位论文, 2020. QING YW. Screening of nitrite-lowering lactic acid bacteria in fermented *Capsicum* and study on its nitrite-lowering mechanism[D]. Changsha: Master's Thesis of Hunan Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [25] 赵慧娟, 许梓文. 乳酸菌降解亚硝酸盐条件的优化[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(17): 176-178. ZHAO HJ, XU ZW. Optimization of the degradation conditions of nitrite by *Lactobacillus*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2018, 46(17): 176-178 (in Chinese).
- [26] 李凤姿. 接种乳酸杆菌及盐对东北酸菜发酵效果的影响研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学硕士学位论文, 2019. LI FZ. Effects of inoculation of *Lactobacillus* and salt on sauerkraut fermentation in northeast China[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Forestry University, 2019 (in Chinese).
- [27] 王兰, 赵玲艳, 陈思思, 王雪艳, 游静, 邓放明. 发酵辣椒中产亚硝酸盐还原酶短乳杆菌 L5 的选育及特性研究[J]. 中国酿造, 2014, 33(11): 25-29. WANG L, ZHAO LY, CHEN SS, WANG XY, YOU J, DENG FM. Screening of nitrite reductase producing *Lactobacillus brevis* L5 from fermented chili and its characteristic study[J]. China Brewing, 2014, 33(11): 25-29 (in Chinese).
- [28] 凌洁玉, 陈旭, 陈思羽, 金翩翩. 植物乳杆菌降解亚硝酸盐及其亚硝酸盐还原酶的研究[J]. 中国调味品, 2017, 42(7): 72-75, 89. LING JY, CHEN X, CHEN SY, JIN PP. Study on nitrite degradation and nitrite reductase of *L. plantarum*[J]. China Condiment, 2017, 42(7): 72-75, 89 (in Chinese).
- [29] 李共国, 孙志栋. 乳酸菌影响腌制芥菜亚硝酸盐含量的通径分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(6): 2351-2356. LI GG, SUN ZD. Path analysis of lactic acid bacteria affecting nitrite content in pickled mustard[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(6): 2351-2356 (in Chinese).
- [30] 张锐. 低盐榨菜自然发酵微生物群落动态的变化与功能分析[D]. 宁波: 宁波大学硕士学位论文, 2011. ZHANG R. Dynamic and functional analysis of microbial community structure during the processing of low-salinity pickled mustard tuber[D]. Ningbo: Master's Thesis of Ningbo University, 2011 (in Chinese).
- [31] 贾亚莉, 贡建民, 艾对元, 张素玮, 赵风琴, 赵小瑞, 李宏珍. 甘肃浆水传统发酵过程中亚硝酸盐含量动态变化分析[J]. 生物技术进展, 2016, 6(1): 59-66. JIA YL, YUN JM, AI DY, ZHANG WW, ZHAO FQ, ZHAO XR, LI HZ. Nitrite dynamics analysis during Gansu traditional Jiangshui fermentation processing[J]. Current Biotechnology, 2016, 6(1): 59-66 (in Chinese).
- [32] LU Z, BREIDT F, PLENGVIDHYA V, FLEMING HP. Bacteriophage ecology in commercial sauerkraut fermentations[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(6): 3192-3202.

- [33] YANG HY, ZOU HF, QU C, ZHANG LQ, LIU T, WU H, LI YH. Dominant microorganisms during the spontaneous fermentation of Suan Cai, a Chinese fermented vegetable[J]. Food Science and Technology Research, 2014, 20(5): 915-926.
- [34] HUANG YY, LIANG MH, ZHAO S, CHEN SM, LIU JS, LIU DM, LU YZ. Isolation, expression, and biochemical characterization: nitrite reductase from *Bacillus cereus* LJ01[J]. RSC Advances, 2020, 10(62): 37871-37882.
- [35] 柳念, 陈佩, 高冰, 汪超, 徐宁, 胡勇, 史文博, 李冬生, 周梦舟. 乳酸菌降解亚硝酸盐的研究进展[J]. 食品科学, 2017, 38(7): 290-295.
- LIU N, CHEN P, GAO B, WANG C, XU N, HU Y, SHI WB, LI DS, ZHOU MZ. Progress in understanding degradation of nitrite by lactic acid bacteria[J]. Food Science, 2017, 38(7): 290-295 (in Chinese).
- [36] 潘冬梅, 吴怡瑾, 王玉露, 李海燕, 梅林. 茶多酚辅助植物乳杆菌 FQR 降解亚硝酸盐效应的研究[J]. 中国酿造, 2020, 39(5): 131-134.
- PAN DM, WU YJ, WANG YL, LI HY, MEI L. Effect of tea polyphenols-assisted *Lactobacillus plantarum* FQR on nitrite degradation[J]. China Brewing, 2020, 39(5): 131-134 (in Chinese).
- [37] HUANG YY, JIA XZ, YU JJ, CHEN YH, LIU DM, LIANG MH. Effect of different lactic acid bacteria on nitrite degradation, volatile profiles, and sensory quality in Chinese traditional Paocai[J]. LWT, 2021, 147: 111597.
- [38] 周涛. 蔬菜腌制制品的种类及腌制原理和保藏措施[J]. 中国调味品, 2000, 25(5): 6-12.
- ZHOU T. The kinds of salted vegetable and processing principle and storing measures[J]. Chinese Condiment, 2000, 25(5): 6-12 (in Chinese).