

混菌发酵对无盐酸菜品质特性的影响

Effect of mixed bacterial fermentation on the quality of salt-free sauerkraut

苏敬红 武 彬

SU Jing-hong WU Bin

(山东职业学院生物工程学院, 山东 济南 250104)

(Biological Engineering, Shandong Polytechnic, Jinan, Shandong 250104, China)

摘要:目的:利用乳酸菌发酵无盐酸菜。方法:通过考量菌株的发酵特性和抑菌能力,筛选具有高产酸能力和抑菌能力的乳酸菌制成混合发酵剂,并对其发酵工艺进行优化。结果:植物乳杆菌和嗜酸乳杆菌的生长活性、产酸能力及抑菌能力较强,选二者为发酵菌株;最佳发酵工艺条件为 $m_{\text{植物乳杆菌}} : m_{\text{嗜酸乳杆菌}}$ 为 2 : 1, 250 g 白菜中乳酸菌接种量为 450 μL , 玉米汁添加量为 7.5 g, 发酵温度 30 $^{\circ}\text{C}$, 此条件下制备的酸菜颜色和气味较好, 感官品质最佳。结论:在无盐条件下,接种乳酸菌发酵酸菜是控制发酵过程、优化产品质量的有效手段,可以确保发酵稳定进行并获得高品质酸菜。

关键词:植物乳杆菌;嗜酸乳杆菌;发酵;酸菜;品质特征

Abstract: Objective: To use lactic acid bacteria to ferment salt-free sauerkraut. **Methods:** By considering the fermentation characteristics and bacterial inhibition capacity of the strains, lactic acid bacteria with high acid production capacity and bacterial inhibition capacity were selected to make a mixed ferment. Then, the fermentation process was optimized using single-factor tests and response surface tests. **Results:** *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus* were selected as the fermenting strains with high growth activity, acid production capacity and bacterial inhibition capacity, and fermented at 30 $^{\circ}\text{C}$. The colour and odour of the sauerkraut prepared under this process condition was good and the organoleptic quality was optimal. **Conclusion:** Fermentation of sauerkraut with lactic acid bacteria under salt-free conditions is the most effective means of controlling the fermentation process and optimizing product quality, ensuring stable fermentation and high quality sauerkraut.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*; *Lactobacillus acidophilus*; fermentation; sauerkraut; quality characteristics

发酵食品一直是人类饮食的重要组成部分,发酵工艺对食物成分的结构产生了重要影响^[1]。发酵产品种类的多样性反映了在驱动发酵过程中微生物的多样性^[2]。酸菜因富含维生素、有机酸和氨基酸等营养成分而深受大众喜爱,发酵酸菜成分的动态变化高度依赖于发酵过程中的微生物菌群^[3]。乳酸菌能够代谢蔬菜的化学成分,这些微生物产生的代谢产物的组合形成了最终产品的独特风味^[4]。

植物乳杆菌是发酵益生菌菌属中最常见的一种,在乳杆菌属中因其高度灵活的基因组而具有非常好的生态位适应能力^[5-7],对发酵产品的风味和质地有显著影响。Miriam 等^[8]利用植物乳杆菌降解橄榄苦苷,消除了其所造成的特征苦味,改善了食用橄榄的风味。在植物乳杆菌 NCU116 发酵苦瓜汁过程中,减少了果汁中的醛类和酮类,增加了醇类和酸类,改善了果汁的香气,赋予了更理想的风味^[9]。除了改善风味外,Beatriz 等^[10]通过研究发现橙汁牛奶饮料经短乳杆菌 POM 与植物乳杆菌 TR-71、TR-14 的辅助发酵后,与未发酵组相比,具有更高的抗氧化性能。

嗜酸乳杆菌是用于发酵食品的具有高经济价值的益生菌菌株,属于同型发酵乳酸菌。Kwaw 等^[11]发现接种植物乳杆菌、副干酪乳杆菌和嗜酸乳杆菌发酵桑葚汁后颜色更加鲜艳。嗜酸乳杆菌 CH-2 可以产生具有强抗氧化活性的代谢物,利用其发酵显著改善了梨汁的褐变程度^[12]。接种嗜酸乳杆菌和发酵乳杆菌发酵桃汁后显著增加了其超氧阴离子自由基清除活性和铁还原能力等,提高了果汁的生物活性潜力和营养价值^[13]。

由于乳酸菌对人体健康的积极影响,近年来被广泛用作食品工业中的食品发酵剂。植物乳杆菌和嗜酸乳杆菌被定义为食品工业中最广泛使用的益生菌。添加盐分可以抑制发酵制品中有害菌的生长、改善色泽质地、降低水分活度和保证风味,但高盐不仅会引发某些疾病,还会抑制乳酸菌的生长,延长发酵周期。

基金项目:山东省高校科研计划项目(编号:J18KB080)

作者简介:苏敬红(1978—),女,山东职业学院讲师,硕士。

E-mail:sujinghong1978@163.com

收稿日期:2022-09-30 改回日期:2023-02-09

研究拟利用从东北酸菜中筛选出的优良植物乳杆菌,同发酵性能优良的嗜酸乳杆菌复配发酵,寻找一种在无盐环境下也能保证产品质量的最优发酵条件,避免高盐对乳酸菌生长的抑制,降低高盐对健康的风险,以期为开发无盐酸菜提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

白菜(*Brassica pekinensis Rupr*):市售;

硫酸镁、柠檬酸氢二钾:分析纯,天津市东丽区天大化学试剂厂;

牛肉膏:北京奥博星生物技术有限责任公司;

吐温-80:天津市致远化学试剂有限公司;

氢氧化钠:分析纯,天津市天力化学试剂有限公司;

植物乳杆菌(suan1、suan3、suan5、suan9、suan12、suan14、suan15、suan16、suan17)、大肠杆菌 ATCC25922、嗜酸乳杆菌(KLDS1.0901、KLDS1.0902):哈尔滨维科生物技术有限公司。

1.2 试验设备

紫外可见分光光度计:UV-5100 型,上海元析仪器有限公司;

恒温加热磁力搅拌器:85-2 型,杭州仪表电机有限公司;

电热恒温培养箱:DHP9160 型,上海佳胜实验设备有限公司;

生化培养箱:SPX-150B 型,上海佳胜实验设备有限公司;

立式压力高压灭菌锅:HVE-50 型,上海申安医疗器械厂;

数显搅拌水浴锅:HH-420-034 型,常州赛普实验仪器厂;

电热恒温鼓风干燥箱:HPG-9245 型,北京东联哈尔仪器制造有限公司;

电子天平:PL2002 型,梅特勒—托利多仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 乳酸菌的筛选

(1) 不同温度下植物乳杆菌和嗜酸乳杆菌生长性能的测定:将植物乳杆菌(suan1、suan3、suan5、suan9、suan12、suan14、suan15、suan16、suan17)、嗜酸乳杆菌(KLDS1.0901、KLDS1.0902)菌株于 MRS 培养基中活化两代,使菌体浓度达到 6×10^9 CFU/mL,以 2% 的接种量接至 MRS 液体培养基中,分别在 22、26、30、34、38 °C 培养 24 h,分别于 0、4、8、12、16、20、24 h 测其 $OD_{600\text{ nm}}$ 及培养液 pH 值,重复 3 次取平均值,并绘制菌株生长曲线。

(2) 不同温度下植物乳杆菌和嗜酸乳杆菌产酸量的测定:取发酵液 1 mL 置于 150 mL 锥形瓶中,以 50 mL 蒸馏水稀释,以酚酞为指示剂,用 0.1 mol/L NaOH 标准

溶液滴定至溶液呈微红色,重复 3 次取平均值,并按式(1)计算产酸率。

$$R_1 = \frac{c \times (V_1 - V_0) \times 0.09}{V_2} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

R_1 ——植物乳杆菌和嗜酸乳杆菌产酸率,%;

C ——NaOH 标准溶液浓度, mol/L;

V_0 ——空白组消耗 NaOH 标准溶液体积, mL;

V_1 ——消耗 NaOH 标准溶液体积, mL;

V_2 ——样品溶液体积, mL。

(3) 不同植物乳杆菌抑菌性能的测定:采用牛津杯定量扩散法。先将含 1% 水的琼脂倒入平板中,冷却后将牛津杯均匀插入。将含 1% 琼脂的 LB 培养基趁热迅速倒入,且不超过牛津杯顶部,4 °C 冷却 1.5 h,取出牛津杯,在孔洞处加发酵上清液 150 μ L,并用蒸馏水做空白对照。处理后的平板于 4 °C 冷却 2 h,再于 37 °C 放置 24 h,用游标卡尺测量读数。

1.3.2 无盐酸菜发酵工艺 将市售白菜去根和老叶、清洗、沸水热烫 3~5 s 后沥干切丝,每次称取 250 g 白菜丝装入聚乙烯薄膜袋中,将筛选得到的植物乳杆菌与嗜酸乳杆菌按一定比例接入到白菜丝上,并与一定量玉米汁培养基充分混合,用真空保鲜机密封,选择合适的温度进行发酵。

1.3.3 单因素试验

(1) 乳酸菌复配比例优化:将活菌数为 6×10^9 CFU/mL 的植物乳杆菌 suan-15 和嗜酸乳杆菌 KLDS1.0901 在 MRS 液体培养基中活化两代,用生理盐水将菌液稀释 10 倍,将 450 μ L 植物乳杆菌 suan-15 和嗜酸乳杆菌 KLDS1.0901 分别按 $m_{\text{植物乳杆菌}} : m_{\text{嗜酸乳杆菌}}$ 为 3 : 1, 2 : 1, 1 : 1, 1 : 2, 1 : 3 置于 EP 管中,8 000 r/min 离心 3 min,除去上清液,用生理盐水洗涤菌泥两次,加入由 7.5 g 玉米汁和相同质量蒸馏水组成的 15.0 g 无菌发酵培养液中,一起接种至白菜丝中,混合发酵,以感官评分为指标确定最佳复配比例。

(2) 菌种接种量优化:将活菌数为 6×10^9 CFU/mL 的植物乳杆菌 suan-15 和嗜酸乳杆菌 KLDS1.0901 在 MRS 液体培养基中活化两代,用生理盐水将菌液稀释 10 倍,分别取 150、300、450、600、750 μ L 的植物乳杆菌 suan-15 和嗜酸乳杆菌 KLDS1.0901 按 $m_{\text{植物乳杆菌}} : m_{\text{嗜酸乳杆菌}}$ 为 1 : 1 置于 EP 管中,8 000 r/min 离心 3 min,除去上清液,用生理盐水洗涤菌泥两次,加入由 7.5 g 玉米汁和相同质量蒸馏水组成的 15.0 g 无菌发酵培养液中,一起接种至白菜丝中,混合发酵,以感官评分为指标确定最佳复配比例。

(3) 玉米汁添加量优化:将活菌数为 6×10^9 CFU/mL 的植物乳杆菌 suan-15 和嗜酸乳杆菌 KLDS1.0901 在

MRS 液体培养基中活化两代,用生理盐水将菌液稀释 10 倍,取 450 μL 植物乳杆菌 suan-15 和嗜酸乳杆菌 KLDS1.0901 按 $m_{\text{植物乳杆菌}}:m_{\text{嗜酸乳杆菌}}$ 为 1:1 置于 EP 管中,8 000 r/min 离心 3 min,除去上清液,用生理盐水洗涤菌泥两次,加入由 2.5,5.0,7.5,10.0,12.5 g 玉米汁和蒸馏水配置的 15.0 g 无菌发酵培养液中,一起接种至白菜丝中,混合发酵,以感官评分为指标确定最佳复配比例。

(4) 发酵工艺参数优化:根据单因素试验的结果,通过 Design-Expert 13.0 软件采用 Box-Benhknen 进行试验

设计,选取感官评分为响应值,以乳酸菌复配比例($m_{\text{植物乳杆菌}}:m_{\text{嗜酸乳杆菌}}$)、菌种接种量和玉米汁添加量 3 个因素为自变量对发酵工艺条件进行优化。

1.3.4 pH 值测定 采用 pH 计测定。

1.3.5 总酸含量测定 按 GB 12456—2021 执行。

1.3.6 亚硝酸盐含量测定 按 GB 5009.33—2016 执行。

1.3.7 感官评价 选取 10 名人员,以蔬菜颜色、渍液颜色、软硬度、包装和气味为评价项目,按表 1 对酸菜成品进行感官评价。

表 1 无盐酸菜成品感官评价标准

Table 1 Sensory evaluation criteria of sauerkraut without salt

分值	蔬菜颜色	包装	气味	渍液颜色	组织形态
8~10 分	颜色自然,叶呈淡黄色,帮呈半透明白色	无胀袋、漏液现象	具有酸菜特有的酸香味,无异味	汤汁较为清澈,无气泡附着	质地脆嫩,无发黏,腐烂现象
5~8 分	色泽略暗	袋内有少量气体空间出现	过酸或酸气较弱,香气不正	汤汁略有浑浊,呈浅乳白色	结构略软绵
5 分以下	色泽不新鲜,呈灰黄色	袋内气体留存空间较大,轻微胀袋	香气很弱,稍有腐臭味	汤汁浑浊	结构软绵、无韧性

1.3.8 数据分析 所有试验平行 3 次,结果以平均值士标准差表示。采用 Origin Pro 8.5 软件作图,使用 Statistix 8.1 软件进行显著性分析($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 发酵菌株的筛选

2.1.1 不同温度下植物乳杆菌的生长活性 由图 1、图 2 可知,9 株植物乳杆菌在 0~4 h 处于生长迟缓期,为了适应新的接种环境,该阶段菌株生长缓慢^[14], $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 值缓慢

增加,发酵液 pH 值缓慢下降。随着菌株生长进入对数期,菌株生长旺盛, $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 值快速增加,pH 值下降速率最快,持续时间为 4~20 h。之后,菌株生长进入稳定阶段,菌株增殖速度减慢, $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 值保持相对稳定,发酵液的 pH 值稳定在 3.65~4.10。综合来看,9 株植物乳杆菌在 22~38 $^{\circ}\text{C}$ 范围内均可以良好生长。其中,30 $^{\circ}\text{C}$ 时,植物乳杆菌 suan-15 表现出较好的生长活性,且高于其他培养温度,发酵液 pH 值下降最快,其值从 5.83 ± 0.02 下降至 3.70 ± 0.01 ,反映了该菌株良好的生长特性和产酸能力。

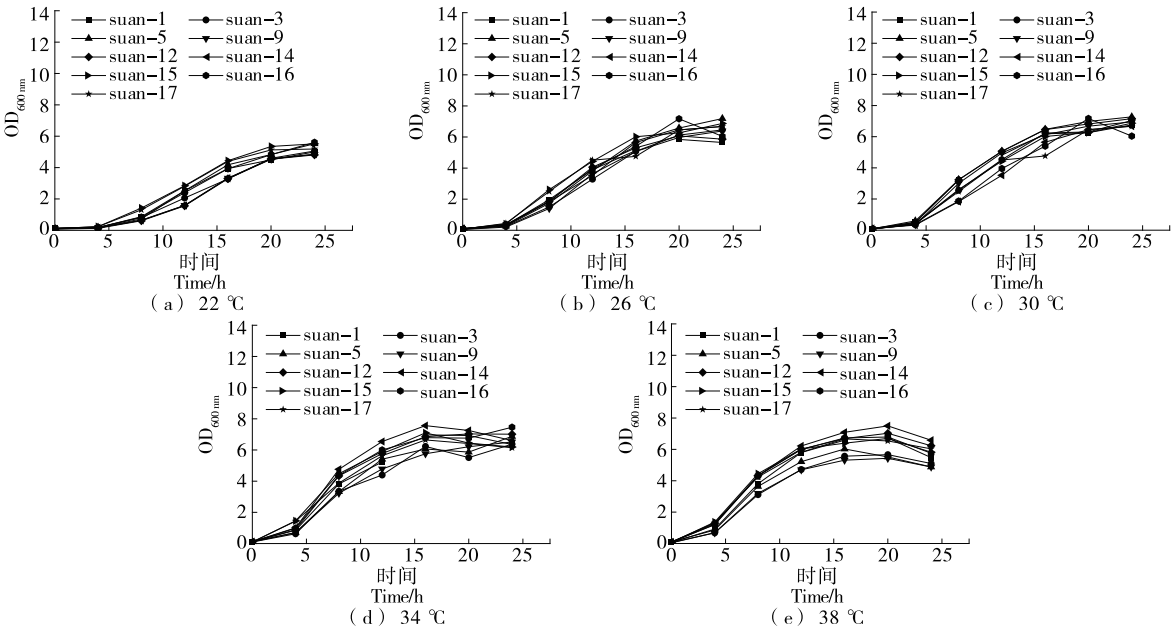


图 1 不同温度下 9 株植物乳杆菌的生长曲线

Figure 1 Growth curves of 9 *Lactobacillus plantarum* strains at different temperatures

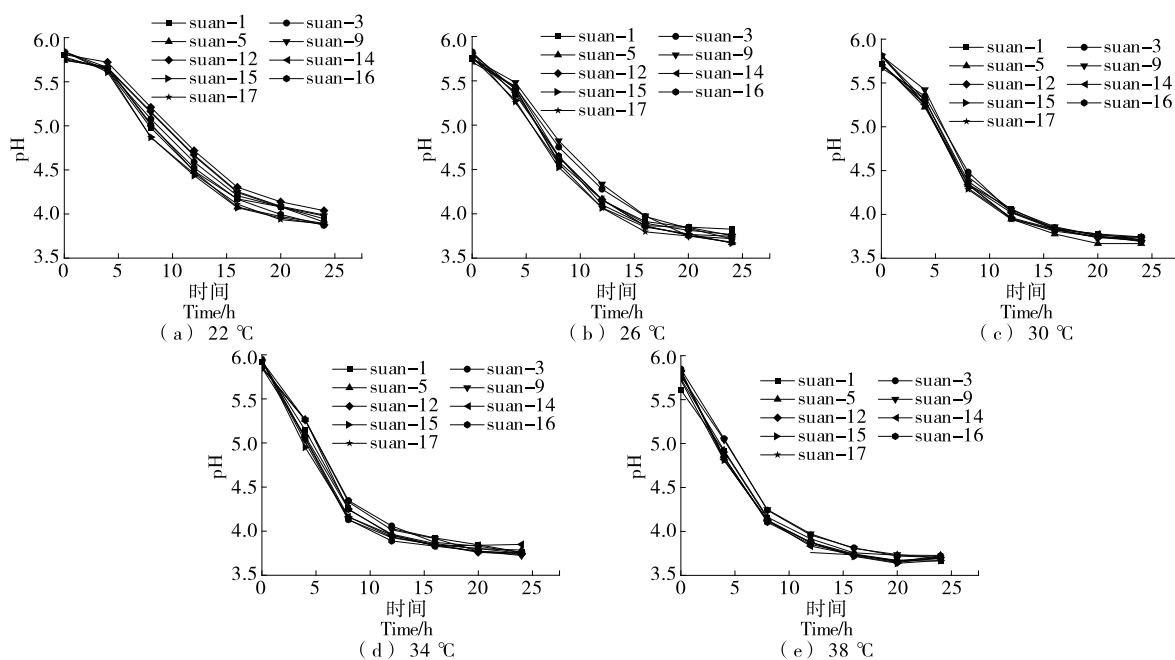


图2 不同温度下9株植物乳杆菌发酵液pH值

Figure 2 pH of fermentation broth of 9 *Lactobacillus plantarum* strains at different temperatures

2.1.2 不同温度下植物乳杆菌的产酸能力 由图3可知,发酵液pH值和菌体产酸量呈负相关,9株植物乳杆菌在0~4 h内产酸量均缓慢增加,在菌体对数生长阶段快速增加,随后(20~24 h)趋势平缓。26 °C下,不同植物乳杆菌产酸量差异较大,但产酸量均低于较高温度。30 °C时,植物乳杆菌 suan-15 的产酸量在24 h内增加最多,最终产酸量可达 $(1.821 \pm 0.02)\%$,与菌株生长活性的

研究结果相一致。因此,选取发酵性能最好的植物乳杆菌 suan-15 为后续发酵菌种,选取其最适培养温度30 °C为发酵温度。

2.1.3 不同植物乳杆菌对大肠杆菌的抑制能力 致病性大肠杆菌是常见的食源性病原体,传统的发酵酸菜很容易受到致病菌和腐败菌特别是大肠杆菌的污染,从而影响产品质量,危害人体健康。由图4可知,抑菌能力较强

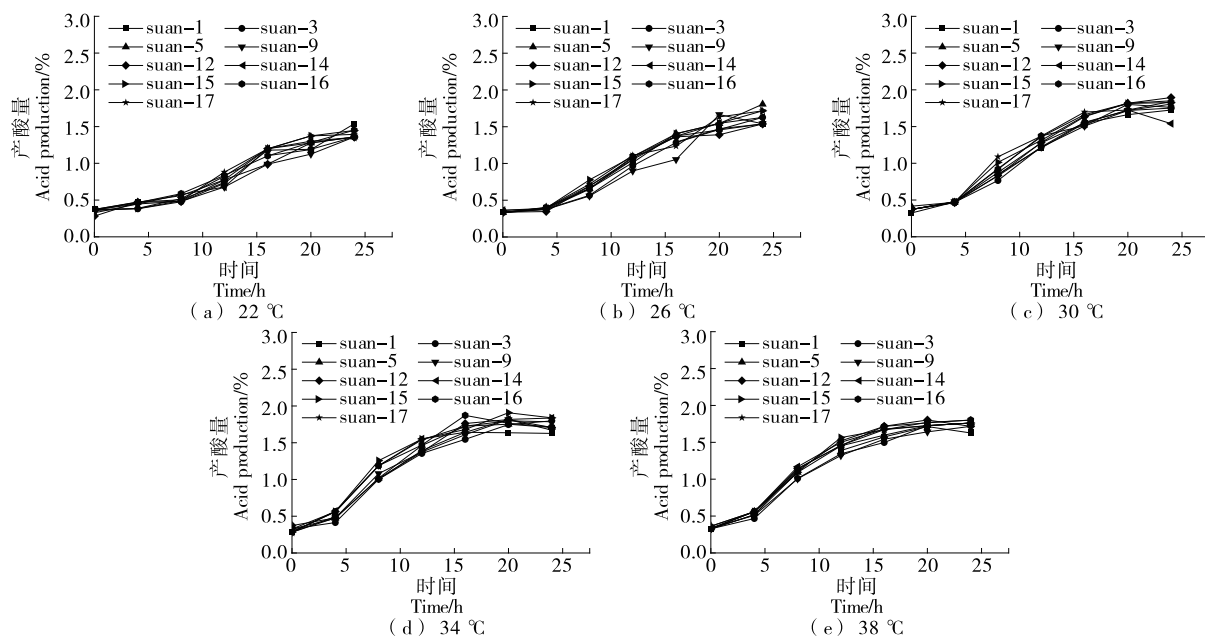


图3 不同温度下9株植物乳杆菌的产酸量

Figure 3 Acid production of 9 *Lactobacillus plantarum* strains at different temperatures

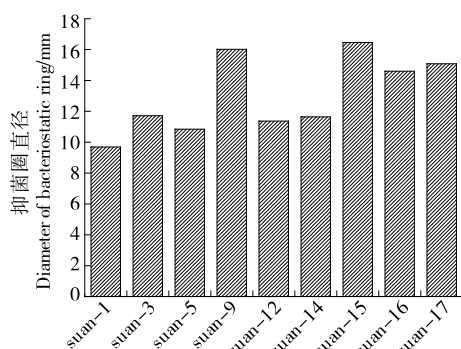
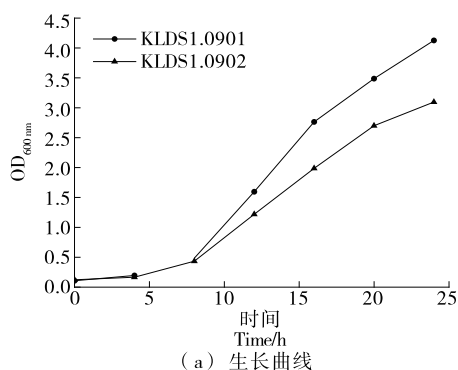
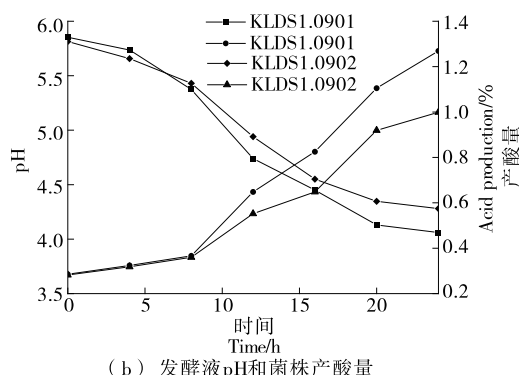


图 4 不同植物乳杆菌对大肠杆菌 ATCC25922 的抑菌效果

Figure 4 Bacteriostatic effect of different *Lactobacillus plantarum* on *Escherichia coli* ATCC25922



(a) 生长曲线



(b) 发酵液 pH 和菌株产酸量

图 5 30 °C 下嗜酸乳杆菌 KLDS1.0901 和嗜酸乳杆菌 KLDS1.0902 的发酵特性

Figure 5 Fermentation characteristics of *Lactobacillus acidophilus* KLDS1.0901 and *Lactobacillus acidophilus* KLDS1.0902 at 30 °C

2.2 发酵工艺参数优化

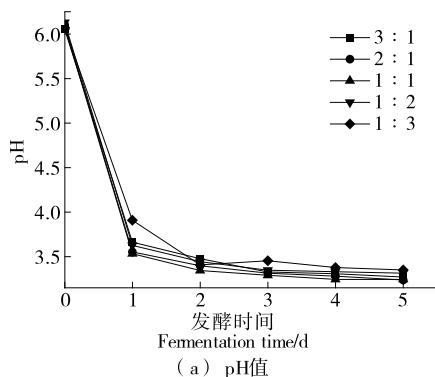
2.2.1 乳酸菌复配比例

(1) pH 值和总酸含量:由图 6 可知,乳酸菌复配比例对无盐酸菜发酵过程中的 pH 值和总酸含量有显著影响。样品的初始 pH 值为 6.0~6.2,在发酵过程中,所有样品组的 pH 值在第 1 天急剧下降,然后逐渐下降,最后趋于稳

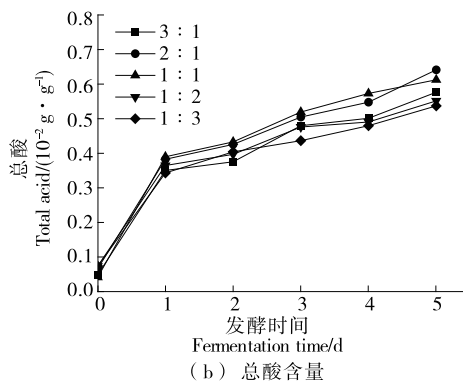
定,总酸含量从快速增加到缓慢增加直至发酵成熟。接种的乳酸菌更好地适应了厌氧环境,可有效利用能源物质代谢产酸,大量增殖。所有样品组的 pH 值和总酸含量在发酵 5 d 后趋于稳定,菌群代谢造成的酸性环境对乳酸菌的生长产生了一定的抑制作用^[15]。此时,样品组 pH 值均低于 3.4,总酸含量为 0.53~0.65 g/100 g,可认为发酵成熟^[16]。

的是植物乳杆菌 suan-15 和植物乳杆菌 suan-9,2 株植物乳杆菌的抑菌活性无显著性差异。抑菌圈直径范围为 10~17 mm,特别是植物乳杆菌 suan-15 表现出最强的抗菌活性,抑菌圈直径达 (16.40 ± 0.30) mm。利用该菌株较强的抑菌特性可以确保发酵酸菜的安全性。

2.1.4 嗜酸乳杆菌在 30 °C 下的发酵性能 由图 5 可知,2 株嗜酸乳杆菌在 0~4 h 时生长迟缓,OD_{600 nm} 和菌株产酸量缓慢增加,发酵液 pH 值缓慢下降,且无明显差异。在菌株生长的对数期阶段,与嗜酸乳杆菌 KLDS1.0902 相比,嗜酸乳杆菌 KLDS1.0901 生长更旺盛,增殖更快,产酸量更大。其 24 h 后产酸量可达 1.27%。30 °C 下,嗜酸乳杆菌 KLDS1.0901 具有更优良的发酵特性。因此,选取嗜酸乳杆菌 KLDS1.0901 作为后续复配发酵剂的发酵菌株。



(a) pH 值



(b) 总酸含量

图 6 不同比例乳酸菌发酵无盐酸菜中 pH 值和总酸含量变化

Figure 6 Changes of pH value and total acid content in sauerkraut fermented by different proportions of lactic acid bacteria without salt

发酵成熟时, $m_{\text{植物乳杆菌}} : m_{\text{嗜酸乳杆菌}}$ 为 2 : 1, 1 : 1 的混合发酵组 pH 值显著低于其他组; 相应的总酸积累最多, 达 0.61~0.64 g/100 g, 且两组间无显著差异 ($P > 0.05$)。 $m_{\text{植物乳杆菌}} : m_{\text{嗜酸乳杆菌}}$ 为 1 : 3 的混合发酵组 pH 值最高, 为 3.35 ± 0.01 ; 总酸含量显著低于其他组 ($P < 0.05$), 为 (0.54 ± 0.03) g/100 g。

(2) 亚硝酸盐含量: 由图 7 可知, 所有样品组中亚硝酸盐含量在发酵过程中整体呈持续降低趋势, 未出现亚硝酸盐峰, 且始终低于最高限值 20 mg/kg, 在发酵 5 d 后降低至最低水平。发酵初期 (0~1 d), $m_{\text{植物乳杆菌}} : m_{\text{嗜酸乳杆菌}}$ 为 1 : 2 样品组和 $m_{\text{植物乳杆菌}} : m_{\text{嗜酸乳杆菌}}$ 为 1 : 3 样品组的亚硝酸盐含量下降趋势相接近, $m_{\text{植物乳杆菌}} : m_{\text{嗜酸乳杆菌}}$ 为 3 : 1, 2 : 1, 1 : 1 样品组的下降趋势接近。

当 $m_{\text{植物乳杆菌}} : m_{\text{嗜酸乳杆菌}}$ 为 2 : 1 时, 亚硝酸盐含量在发酵成熟时达同组最低水平 (0.23 ± 0.10) mg/kg。 $m_{\text{植物乳杆菌}} : m_{\text{嗜酸乳杆菌}}$ 为 1 : 3 时, 亚硝酸盐含量达同组最高水平 (1.31 ± 0.10) mg/kg, 说明接种这两株乳酸菌混合发酵能够有效控制发酵酸菜的亚硝酸盐浓度。

(3) 感官评价: 由图 8 可知, $m_{\text{植物乳杆菌}} : m_{\text{嗜酸乳杆菌}}$ 为 2 : 1 样品组, 除组织形态外, 各方面感官指标均优于其他

组, 综合评分为 42.36 ± 0.10 。整体来看, 所有样品组均未出现胀袋现象, 综合评分情况为 $m_{\text{植物乳杆菌}} : m_{\text{嗜酸乳杆菌}}$ 为 2 : 1 > $m_{\text{植物乳杆菌}} : m_{\text{嗜酸乳杆菌}}$ 为 1 : 1 > $m_{\text{植物乳杆菌}} : m_{\text{嗜酸乳杆菌}}$ 为 3 : 1 > $m_{\text{植物乳杆菌}} : m_{\text{嗜酸乳杆菌}}$ 为 1 : 2 > $m_{\text{植物乳杆菌}} : m_{\text{嗜酸乳杆菌}}$ 为 1 : 3。其中, $m_{\text{植物乳杆菌}} : m_{\text{嗜酸乳杆菌}}$ 为 3 : 1, 1 : 3, 1 : 2 样品组的评分无显著差异 ($P > 0.05$)。有关组织形态, 当 $m_{\text{植物乳杆菌}} : m_{\text{嗜酸乳杆菌}}$ 为 2 : 1 时, 感官评分最低, 可能与其较低的 pH 值有重要关系。综合各项指标, $m_{\text{植物乳杆菌}} : m_{\text{嗜酸乳杆菌}}$ 为 2 : 1 时酸菜产品的感官评分最高, 视为最适合发酵的复配比例。

2.2.2 乳酸菌接种量优化

(1) pH 值和总酸含量: 由图 9 可知, 发酵第 1 天, 所有酸菜样品的 pH 值从初始值 6.0 迅速下降, 然后缓慢下降至 3.2~3.3; 总酸含量变化与 pH 值呈负相关, 在所有样品中均随发酵时间的延长而增加, 并于发酵第 5 天稳定在 0.54~0.62 g/100 g, 此时已达到 DBS 22/025—2014《地方标准酸菜》中酸菜成熟的标准。发酵前期 (0~3 d), pH 值随乳酸菌接种量增加而降低, 总酸含量随乳酸菌接种量增加而增加; 随后, 乳酸菌接种量为 450 μL 样品组与 600, 750 μL 样品组的指标变化无显著差异。

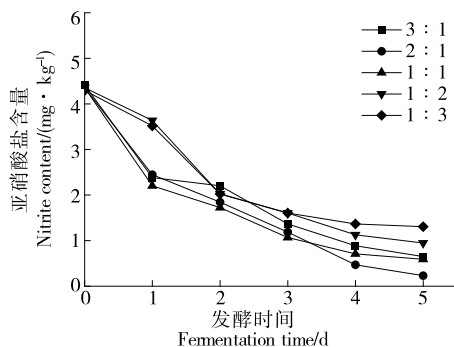


图 7 不同比例乳酸菌发酵无盐酸菜中亚硝酸盐含量变化
Figure 7 Changes of nitrite content in sauerkraut fermented by different proportions of lactic acid bacteria without salt

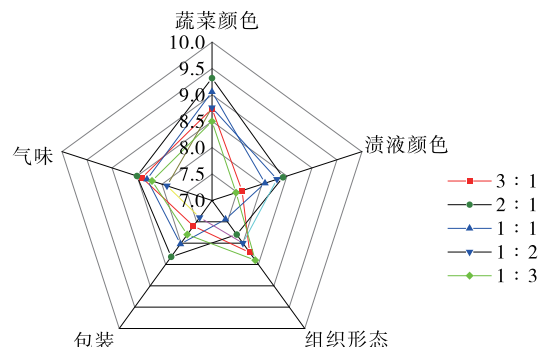


图 8 不同比例乳酸菌发酵无盐酸菜的感官评分
Figure 8 Sensory score of sauerkraut fermented by different proportions of lactic acid bacteria without salt

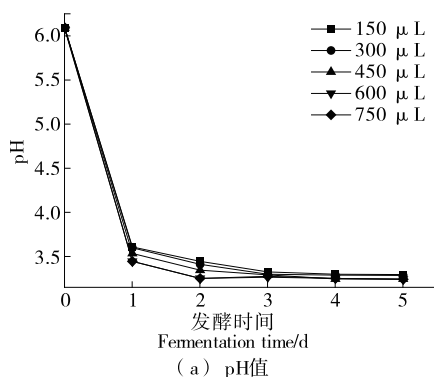


图 9 不同乳酸菌接种量下发酵无盐酸菜的 pH 值和总酸含量变化

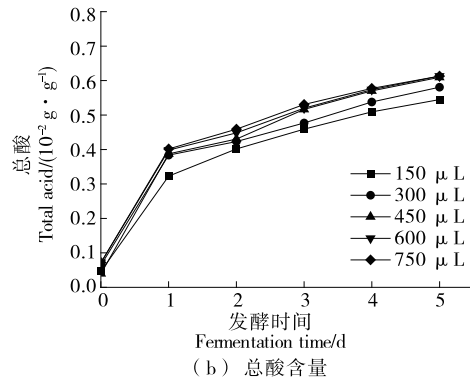


Figure 9 Changes of pH value and total acid content in sauerkraut fermented by different doses of lactic acid bacteria inoculation without salt

当乳酸菌接种量为 450 μL 时,发酵成熟时的 pH 值最低为 3.24 ± 0.01 ,发酵 5 d 后积累的总酸含量最高达 $(0.61 \pm 0.01) \text{ g}/100 \text{ g}$ 。与 pH 值相对应,混菌接种量在 750 μL 时表现出更显著的酸化速度。发酵早期 pH 值迅速下降至 4.0 以下,同时伴随着总酸含量的快速增加,表明添加的混菌数量能够保证其迅速成为优势菌,显著加速发酵进程,加快酸菜的生产。

(2) 亚硝酸盐含量:由图 10 可知,所有酸菜样品的亚硝酸盐含量在发酵过程中持续降低,并在发酵第 5 天降低至最低水平。发酵前期(0~3 d),亚硝酸盐含量随乳酸菌接种量的增加而降低,乳酸菌接种量为 450 μL 样品组与 600,750 μL 样品组无显著差异。当乳酸菌接种量为 450~750 μL 时,亚硝酸盐含量始终低于其他组,发酵第 5 天最低亚硝酸盐含量为 $(0.65 \pm 0.21) \text{ mg}/\text{kg}$ 。当乳酸菌接种量为 150 μL 时,表现出最高的亚硝酸盐含量为 $(1.31 \pm 0.10) \text{ mg}/\text{kg}$ 。此外,所有发酵成熟的样品中亚硝酸盐含量均低于初始含量,说明无盐酸菜中的亚硝酸盐含量得到了有效控制。

(3) 感官评价:由图 11 可知,乳酸菌接种量为 450 μL

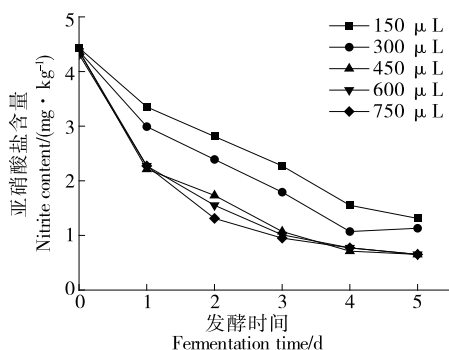


图 10 不同乳酸菌接种量下发酵无盐酸菜中亚硝酸盐含量变化

Figure 10 Changes of nitrite content in sauerkraut fermented by different doses of lactic acid bacteria inoculation without salt

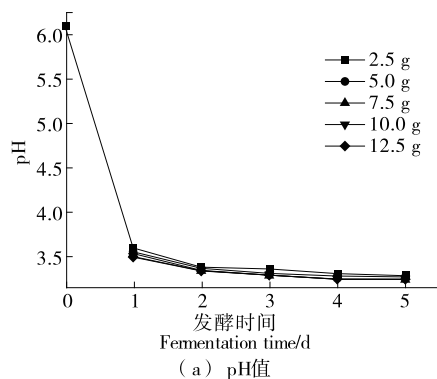


图 12 不同玉米汁添加量下发酵无盐酸菜 pH 值和总酸含量变化

Figure 12 Changes of pH value and total acid content in sauerkraut fermented under different amount of corn juice without salt

的样品组,在渍液颜色、组织形态和气味方面的感官指标均优于其他组,综合评分为 42.2 ± 0.12 。整体来看,所有样品组均未出现胀袋现象,综合评分情况为乳酸菌接种量为 450 μL 样品组 > 600 μL 样品组 > 300 μL 样品组 > 150 μL 样品组 > 750 μL 样品组。综合各项指标,乳酸菌接种量为 450 μL 的酸菜产品感官评分最高,视为最适合发酵的乳酸菌接种量。

2.2.3 玉米汁添加量优化

(1) pH 值和总酸含量:由图 12 可知,发酵 1 d 后,乳酸菌在发酵体系中迅速增殖,代谢积累的酸使 pH 值迅速降低至 3.5 左右,随后,过低的酸性环境抑制了乳酸菌的生长^[17],导致样品组 pH 值降低减缓,总酸含量缓慢增加直至稳定。发酵前期(0~2 d),pH 值随玉米汁添加量的增加而下降,总酸含量随玉米汁添加量的增加而增加;当玉米汁添加量为 2.5~7.5 g 时,随着添加量的增加,pH 值越低,总酸含量越高;当添加量为 7.5~12.5 g 时,随添加量的增加,pH 值和总酸含量差异不显著。因此,添加量为 7.5~12.5 g 的样品组酸水平最为显著,成熟样品最

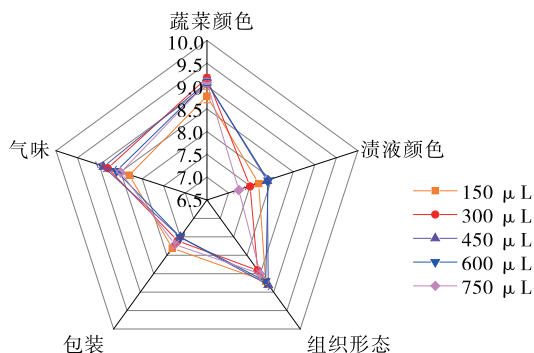
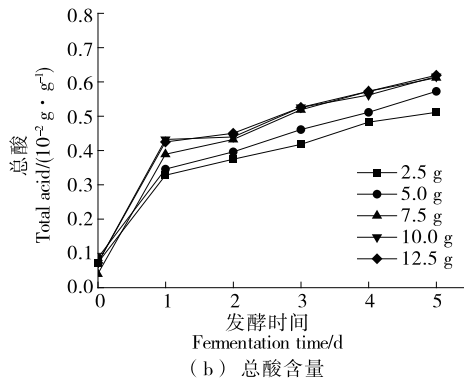


图 11 不同乳酸菌接种量下发酵无盐酸菜的感官评分情况

Figure 11 Sensory score of sauerkraut fermented by different doses of lactic acid bacteria inoculation without salt



低 pH 值为 3.24 ± 0.01 , 相应的总酸含量最高达 (0.62 ± 0.01) g/100 g。

(2) 亚硝酸盐含量: 由图 13 可知, 所有样品组亚硝酸盐含量均表现出持续降低的趋势, 且始终低于初始含量。发酵过程中, 当玉米汁添加量为 7.5~12.5 g 时, 样品组的亚硝酸盐含量始终低于其他组, 发酵第 5 天, 表现出最低的亚硝酸盐含量为 (0.65 ± 0.21) mg/kg, 此时, 玉米汁添加量为 7.5~12.5 g 样品组的亚硝酸盐含量差异不显著。当玉米汁添加量为 2.5 g 时, 表现出最高的亚硝酸盐含量为 (1.55 ± 0.10) mg/kg, 且亚硝酸盐含量下降速率显著低于 7.5~12.5 g 样品组 ($P < 0.05$)。

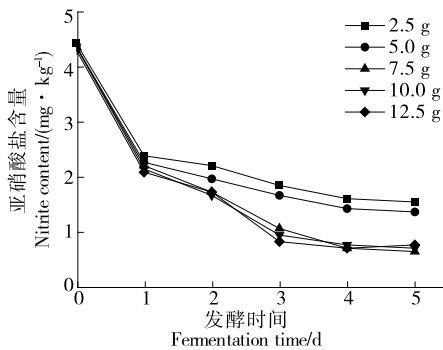


图 13 不同玉米汁添加量下发酵无盐酸菜中亚硝酸盐含量变化

Figure 13 Changes of nitrite content in sauerkraut fermented under different amount of corn juice without salt

(3) 感官评价: 由图 14 可知, 综合蔬菜颜色、渍液颜色、组织形态、包装和气味 5 项指标, 样品组之间存在显著差异 ($P < 0.05$)。当玉米汁添加量为 7.5 g 时, 表现出最好的蔬菜颜色和气味, 与样品组具有最高的总酸含量相对应, 可能是由于高酸度对酸菜品质有改善作用^[18]。综合各方面感官评分, 当玉米汁添加量为 7.5 g 时发酵的无盐酸菜总评分高于其他组, 故将其视为发酵的最适玉米汁添加量。

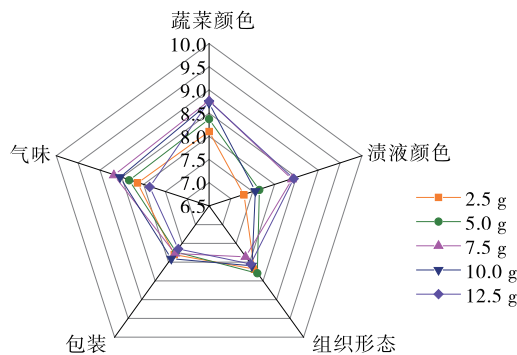


图 14 不同玉米汁添加量下发酵无盐酸菜的感官得分

Figure 14 Sensory score of sauerkraut fermented under different amount of corn juice without salt

2.2.4 最佳发酵参数优化 以感官评分为响应值, 根据 Box-Benhnken 试验设计进行响应面优化, 试验因素与水平见表 2, 试验设计及结果见表 3。

表 2 Box-Benhnken 中心试验因素水平编码

Table 2 Level coding of Box-Benhnken center test factors

水平	A 乳酸菌复配比例 (<i>m</i> 植物乳杆菌 : <i>m</i> 嗜酸乳杆菌)	B 菌种接种 量/ μ L	C 玉米汁添 加量/g
-1	1 : 1	300	5.0
0	2 : 1	450	7.5
1	3 : 1	600	10.0

表 3 响应面试验设计及结果

Table 3 Response surface test design and results

试验号	A	B	C	Y 感官评分
1	0	0	0	46.30
2	1	0	-1	37.60
3	0	0	0	44.12
4	0	0	0	45.80
5	1	-1	0	40.32
6	-1	0	-1	39.87
7	-1	-1	0	33.81
8	-1	1	0	42.49
9	0	0	0	45.62
10	1	1	0	40.32
11	0	1	1	41.59
12	0	-1	1	36.89
13	1	0	1	43.06
14	0	1	-1	35.79
15	0	0	0	46.30
16	0	-1	-1	33.80
17	-1	0	1	39.41

表 4 回归模型方差分析[†]

Table 4 Variance analysis of regression model

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	273.38	9	30.38	31.79	<0.000 1	* *
A	4.09	1	4.09	4.28	0.077 3	
B	29.53	1	29.53	30.90	0.000 9	* *
C	24.12	1	24.12	25.24	0.001 5	* *
AB	18.84	1	18.84	19.71	0.003 0	* *
AC	8.76	1	8.76	9.17	0.019 2	*
BC	1.84	1	1.84	1.92	0.208 2	
A ²	12.35	1	12.35	12.93	0.008 8	* *
B ²	92.23	1	92.23	96.52	<0.000 1	* *
C ²	65.04	1	65.04	68.07	<0.000 1	* *
残差	6.69	7	0.96			
失拟项	3.48	3	1.16	1.45	0.354 3	
纯误差	3.21	4	0.80			
总和	280.07	16				

[†] * 表示显著 ($P < 0.05$); * * 表示极显著 ($P < 0.01$)。

根据回归模型方差分析,得到感官评分对自变量乳酸菌复配比例、菌种接种量和玉米汁添加量的二次多项回归方程为:

$$Y = 45.63 + 0.72A + 1.92B + 1.74C - 2.17AB + 1.48AC + 0.68BC - 1.71A^2 - 4.68B^2 - 3.93C^2. \quad (2)$$

由表 4 可知,试验建立的响应面模型极显著 ($P < 0.01$),失拟项的 F 值为 1.45, P 值为 0.354 3,不显著,说明此回归方程对试验拟合性较好。该模型的决定系数 $R^2 = 0.976 1$,校正决定系数 $R^2_{adj} = 0.945 4$,说明该模型可以解释 94.54% 响应值的变化。模拟方程中二次项 AC 、 BC 、 A^2 、 B^2 和 C^2 均对结果存在显著影响,说明乳酸菌复配比例、菌种接种量和玉米汁添加量对发酵无盐酸菜的感官品质有重要影响。

由图 15 可知,发酵无盐酸菜感官评分受菌种添加量影响较大,相关响应曲面较弯曲;乳酸菌接种量和乳酸菌复配比例两者间交互作用更显著,等高线呈椭圆形,图形颜色变化更快。当乳酸菌接种量一定时,乳酸菌复配比例和玉米汁添加量的交互作用对感官评分影响较小,响应曲面较为平缓,图形颜色变化较为缓慢,与方差分析结果一致。

根据模拟方程得到感官评分的最大预测值为 46.11,此时乳酸菌接种量为 476.13 μL , $m_{\text{植物乳杆菌}} : m_{\text{嗜酸乳杆菌}}$ 为 2.22 : 1,玉米汁添加量为 8.19 g。结合实际情况,将发酵无盐酸菜的最好条件调整为乳酸菌接种量 450 μL , $m_{\text{植物乳杆菌}} : m_{\text{嗜酸乳杆菌}}$ 为 2 : 1,玉米汁添加量为 7.5 g,此条件下无盐酸菜感官评分为 46.81,无胀袋现象,颜色自然,口感脆嫩,无异味。

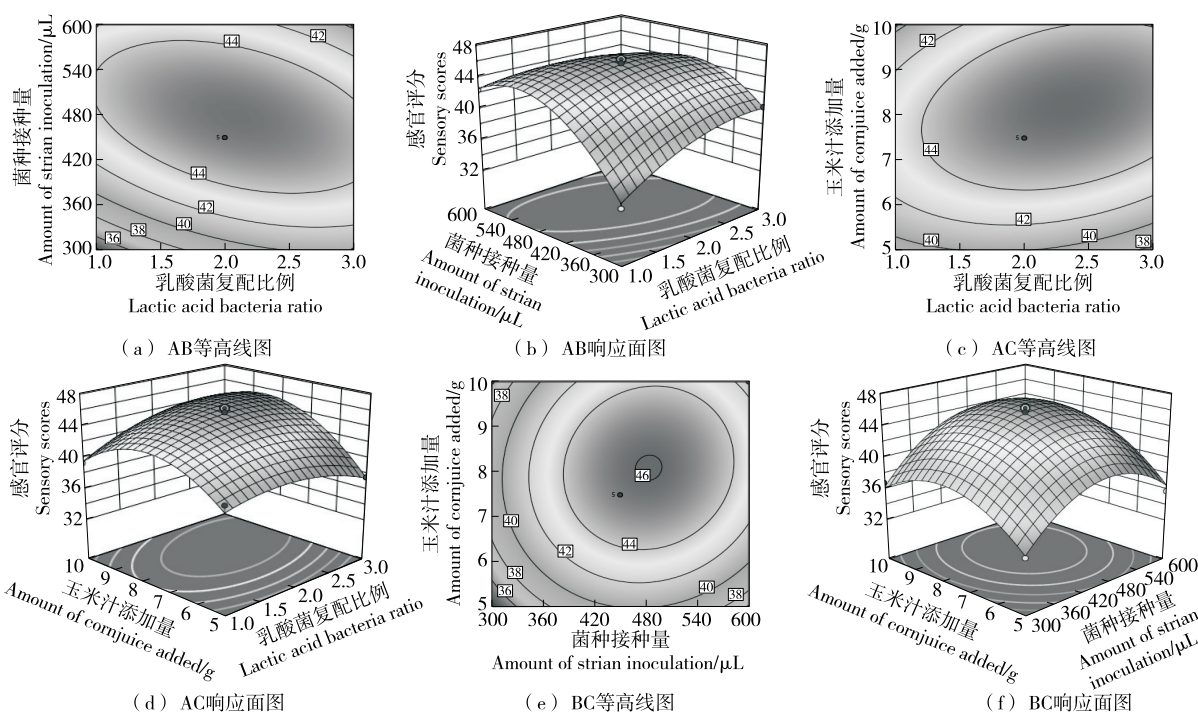


图 15 响应面交互作用

Figure 15 Interaction results of surface response

3 结论

以 2 株嗜酸乳杆菌和从传统东北酸菜中分离出的 9 株植物乳杆菌为研究对象,筛选出了发酵性能优良的植物乳杆菌和嗜酸乳杆菌作为复配乳酸菌。结果表明:针对不同温度下 9 株植物乳杆菌的发酵特性,综合考量其对大肠杆菌的抑制能力,其中,植物乳杆菌 suan-15 抑菌能力最强,在最适生长温度 30 $^{\circ}\text{C}$ 时产酸性能最好,筛选出该菌株为发酵菌株,30 $^{\circ}\text{C}$ 为发酵温度;嗜酸乳杆菌 KLDS1.0901 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下生长活性最好、产酸能力最佳,作为混合发酵的乳酸菌。以蔬菜颜色、渍液颜色、包装、气味和组织状态为感官评价指标进行综合评分,确定出发酵

无盐酸菜的最好工艺条件。最适发酵条件为 $m_{\text{植物乳杆菌}} : m_{\text{嗜酸乳杆菌}}$ 为 2 : 1,250 g 白菜添加乳酸菌 450 μL ,添加玉米汁 7.5 g,此时酸菜感官评分为 46.81。后续将进一步研究发酵机理对无盐酸菜风味的影响。

参考文献

- [1] CAI W C, TANG F X, ZHAO X X, et al. Different lactic acid bacteria strains affecting the flavor profile of fermented jujube juice [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2019, 43 (9): 14095.
- [2] TAMANG J P, KOICHI W, HOLZAPFEL W H. Review: Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages [J].

- Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 377.
- [3] LI Q, KANG J, MA Z, et al. Microbial succession and metabolite changes during traditional serofluid dish fermentation[J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 84: 771-779.
- [4] BELL V, FERRAO J, FERNANDES T. Nutritional guidelines and fermented food frameworks[J]. Foods, 2017, 6(8): 65.
- [5] SABO S S S, VITOLO M, JMD G, et al. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria[J]. Food Research International, 2014, 64: 527-536.
- [6] VRIE S, VAUGHAN E E, KLEEREBEZEM M, et al. *Lactobacillus plantarum*-survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract[J]. International Dairy Journal, 2006, 16(9): 1 018-1 028.
- [7] SIEZEN R J, Vlieg J. Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer[J]. Microbial Cell Factories, 2011, 10(S1): S3.
- [8] ZAGO M, LANZA B, ROSSETTI L, et al. Selection of *Lactobacillus plantarum* strains to use as starters in fermented table olives: Oleuropeinase activity and phage sensitivity [J]. Food Microbiology, 2013, 34(1): 81-87.
- [9] GAO H, WEN J J, HU J L, et al. Momordica charantia juice with *Lactobacillus plantarum* fermentation: Chemical composition, antioxidant properties and aroma profile[J]. Food Bioscience, 2019, 29: 62-72.
- [10] FUENTE B, LUZ C, PUCHOL C, et al. Evaluation of fermentation assisted by *Lactobacillus brevis* POM, and *Lactobacillus plantarum* (TR-7, TR-71, TR-14) on antioxidant compounds and organic acids of an orange juice-milk based beverage[J]. Food Chemistry, 2021, 343: 128414.
- [11] KWAW E, MA Y, TCHABO W, et al. Effect of lactobacillus strains on phenolic profile, color attributes and antioxidant activities of lactic-acid-fermented mulberry juice[J]. Food Chem, 2018, 250: 148-154.
- [12] LI X, GAO J, SIMAL-GANDARA J, et al. Effect of fermentation by *Lactobacillus acidophilus* CH-2 on the enzymatic browning of pear juice [J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 147(2): 111489.
- [13] HASHEMI S M B, JAFARPOUR D, JOUKI M. Improving bioactive properties of peach juice using *Lactobacillus* strains fermentation: Antagonistic and anti-adhesion effects, anti-inflammatory and antioxidant properties, and Maillard reaction inhibition[J]. Food Chem, 2021, 365: 130501.
- [14] YANG J, LU J, ZHU Q Z, et al. Isolation and characterization of a novel *Lactobacillus plantarum* MMB-07 from traditional Suanyu for *Acanthogobius hasta* fermentation[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2021, 132(2): 161-166.
- [15] 经联源, 李婷, 曾凡坤, 等. 发酵剂对泡萝卜品质的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(22): 171-177.
- JING T Y, LI T, ZENG F K, et al. Effect of fermenters on the quality of pickled radish[J]. Food Science, 2021, 42(22): 171-177.
- [16] 付雪. 酸菜生物发酵剂研究[D]. 大连: 大连工业大学, 2018: 45-49.
- FU X. Research on biological fermenters for sauerkraut[D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2018: 45-49.
- [17] LI X, XU W, YANG J, et al. Effect of different levels of corn steep liquor addition on fermentation characteristics and aerobic stability of fresh rice straw silage[J]. Anim Nutr, 2016, 2(4): 345-350.
- [18] CHEN A J, LUO W, PENG Y T, et al. Quality and microbial flora changes of radish paocai during multiple fermentation rounds[J]. Food Control, 2019, 106: 106733.
- (上接第 119 页)
- [27] 马恒珍, 南庆贤, 戴瑞彤. 冷却猪肉中腐败菌的分离、初步鉴定与初始菌相分析[J]. 天津农学院学报, 2005, 12(3): 39-43.
- MA L Z, MAN Q X, DAI R T. Isolation and identification of spoilage bacteria of chilled meat and analysis on composition of initial micro-organism[J]. Journal of Tianjin Agricultural College, 2005, 12(3): 39-43.
- [28] BLAIOTTA G, PENNACCHIA C, VILLANI F, et al. Diversity and dynamics of communities of coagulase-negative staphylococci in traditional fermented sausages[J]. Journal of Applied Microbiology, 2004, 97(2): 271-284.
- [29] OWUSU-KWARTENG J, TANO-DEBRAH K, AKABANDA F, et al. Technological properties and probiotic potential of *Lactobacillus fermentum* strains isolated from West African fermented millet dough[J]. BMC Microbiology, 2015, 15(1): 261.
- [30] SHAH N, PATERL A, AMBALAM P, et al. Determination of an antimicrobial activity of *Weissella confusa*, *Lactobacillus fermentum*, and *Lactobacillus plantarum* against clinical pathogenic strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in co-culture[J]. Annals of Microbiology, 2016, 66(3): 1 137-1 143.
- [31] 李天宇. 不同杀菌工艺和包装技术对酱牛肉贮藏品质的影响试验研究[D]. 长春: 吉林大学, 2020: 18.
- LI D Y. Experimental study on the effects of different sterilization processes and packaging techniques on the storage quality of spiced beef[D]. Changchun: Jilin University, 2020: 18.
- [32] 史文艳, 孙震. ϵ -聚赖氨酸盐酸盐与 Nisin 对蜡状芽孢杆菌的协同作用及机理[J]. 食品与机械, 2019, 35(3): 15-19, 103.
- SHI W Y, SUN Z. Synergistic effect and mechanism of ϵ -polylysine hydrochloride and Nisin on *Bacillus cereus*[J]. Food & Machinery, 2019, 35(3): 15-19, 103.
- [33] 程琴, 黄庶识, 陈丽梅. 芽孢杆菌孢子萌发机理的研究进展[J]. 生命科学, 2010, 22(9): 878-885.
- CHENG Q, HUANG S S, CHEN L M. Research advances on the germination mechanism of *Bacillus* spores[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2010, 22(9): 878-885.