

纯种发酵技术对发酵甘蓝中亚硝酸盐含量的影响

燕平梅^{1,2} 薛文通² 张惠²

(1. 太原师范学院, 山西 030001; 2. 中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要 以 *Lactobacillus pentosus* 和 *Leuconostoc mesenteroides* 为发酵剂分别发酵甘蓝, 自然发酵甘蓝作为对照, 测定甘蓝中亚硝酸盐含量的变化。结果表明: 纯种发酵甘蓝中亚硝酸盐含量比自然发酵低 2 倍多, 且未形成“亚硝峰”。纯种发酵甘蓝中导致亚硝酸盐形成的肠杆菌及乳酸菌之外的需氧嗜温菌数量显著低于自然发酵 ($P < 0.05$), 乳酸含量高于自然发酵, 且发酵第 2~5 天达到差异显著 ($P < 0.05$)。从纯种发酵甘蓝中分离 122 株菌株, 其中 6 种乳酸菌占分离菌株总数的 90.16%。这 6 种乳酸菌消耗亚硝酸盐的能力均比对照高 2 倍多, 消耗亚硝酸盐均超过 96%, 最高达到 99.623%, 远高于自然发酵 (31.580%)。纯种发酵方法能够抑制肠杆菌及乳酸菌之外的需氧嗜温菌生长, 抑制“亚硝峰”的形成。

关键词 自然发酵; 纯种发酵; 亚硝酸盐; 甘蓝

中图分类号 TS 201.5

文章编号 1007-4333(2007)03-0070-05

文献标识码 A

Effect of starter cultures on nitrite concentration of fermenting Chinese cabbage

Yan Pingmei^{1,2}, Xue Wentong², Zhang Hui²

(1. Department of Biology, Taiyuan Normal College, Taiyuan 030001, China; 2. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract The nitrite concentrations were measured, during the spontaneous fermentation and pure inoculation fermentation (with *Lactobacillus pentosus* and *Leuconostoc mesenteroides* as fermentation agent) of Chinese cabbage. It was found that the maximum nitrite concentration (nitrite peak) in the pure inoculation fermentation cabbage was two times lower than that in the spontaneous fermentation cabbage and the reason could be concluded from a series of experiments as follows: enumeration of lactic acid bacteria, mesophilic aerobic bacteria and enterobacteriaceae, changes of pH value and lactic acid concentration. Numbers of mesophilic aerobic bacteria (enterobacteria and lactic acid bacteria not included) that could produce the nitrite peak in the pure inoculation fermentation cabbage was less than these of in the spontaneous fermentation cabbage. And the numbers of lactic acid bacteria and concentrations of lactic acid in the former was more than these in the latter. The decrease velocity of pH value of the former was lower than the latter. Hence, nitrite concentration in the pure inoculation fermentation cabbage was lower than that in the spontaneous fermentation cabbage.

Key words spontaneous fermentation; pure inoculation fermentation; nitrite; Chinese cabbage

目前韩国泡菜 (kimchi)、德国泡菜 (sauerkraut) 和中国泡菜、酸菜均以自然发酵为主要加工方法^[1-3], 纯种发酵方法尚处于实验室和中试研究阶段^[4]。蔬菜自然发酵过程中不可避免地受到许多制约因素的影响, 如原料供应的限制、加工温度和容器的限制及操作卫生的限制等, 如有不慎, 均有导致

发酵异常和发酵失败的危险。自然发酵所需时间较长, 且发酵质量不稳定, 不利于工厂化、规模化及标准化生产。蔬菜自然发酵过程中产生 1 个或多个亚硝酸盐高峰 (亚硝峰), 其值可达新鲜菜的十几倍, 甚至几十倍^[5-7]。有文献报道, 纯种发酵能够降低发酵蔬菜中亚硝酸盐含量^[8-11], 但原因尚未见报道。

收稿日期: 2006-10-13

作者简介: 燕平梅, 讲师, 博士研究生, 主要从事食品生物技术研究, E-mail: yanpingmei @sohu.com; 薛文通, 教授, 博导, 通讯作者, 主要从事农产品加工贮藏与保鲜研究, E-mail: xwt315 @cau.edu.cn

笔者拟通过对纯种发酵甘蓝中微生物数量、乳酸相对含量和 pH 变化的研究,分析纯种发酵降低发酵蔬菜中亚硝酸盐的原因,为生产安全无毒的发酵蔬菜制品提供指导方法。

1 材料与方法

1.1 发酵甘蓝的制备

发酵容器为带有棉塞经湿热灭菌 20 min 的三角瓶(250 mL)。自然发酵:三角瓶冷却后加入用无菌水洗净的甘蓝和煮沸后冷却的盐水(含 5%(质量比)氯化钠),甘蓝质量浓度 1/2 g/mL。纯种发酵:设 2 个处理,开始步骤同自然发酵,然后分别接入乳酸菌发酵剂 *Lactobacillus pentosus* (*Lac.*) 和 *Leuconostoc mesenteroides* (*Leu.*) (接种量 2%(体积比)),放入厌氧发酵罐中,置于 30℃ 恒温箱中培养。

1.2 亚硝酸盐、可滴定酸和 pH 的测定方法

亚硝酸盐的测定分析按照《食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定方法》(GB/T 5009.33-1996)^[12];可滴定酸用 0.1 mol/L 氢氧化钠滴定,酚酞为滴定终点指示剂^[13],以乳酸质量分数计;泡菜卤 pH 测定使用数字 pH 计,用厂商提供的 pH 为 4.0 和 7.0 的标准缓冲溶液校准。

1.3 肠杆菌、乳酸菌和嗜温需氧菌的计数^[14]

1) 肠杆菌。培养基为结晶紫中性红胆盐琼脂(VRBG)附加 25 g NaCl,制成平板,接种后置于 30℃ 培养 24~36 h 计数。

2) 乳酸菌。培养基为 MRS 复合培养基附加 25 g NaCl 和 2 g 游霉素,接种后置于 30℃ 培养箱中培养 48 h^[14]。

3) 嗜温需氧菌。嗜温需氧菌用细菌计数琼脂(PCA)计数,样品平板培养在 37℃ 的培养箱中,培养 48 h 计数。

1.4 发酵甘蓝卤中乳酸菌的分离

乳酸菌从计数培养基中分离得到。计数后,从不同稀释度平板中随机挑取菌落转移到装有无菌 MRS 肉汤培养基的 10 mL 试管中,进行种属鉴定之前将分离的菌落在适宜的琼脂培养基上用连续划线方法纯化。

从纯种发酵甘蓝卤中获得菌株 122 株,对其进行革兰氏染色和过氧化氢酶反应测试,根据测试结果选取乳酸菌。122 株菌株中,8 株过氧化氢酶反应为阳性,4 株革兰氏反应呈阴性。对余下的 110 株乳酸菌菌株作进一步鉴定。

1.5 乳酸菌的鉴定

应用 API50CH 试剂条和 API50CHL 培养基按照厂商的指示说明对分离的 110 株菌株进行糖发酵反应,试验结果由 APILABPLUS (Version 3.3.3, Bio-Merieux, France) 程序和标准分类法描述。

1.6 乳酸菌降解亚硝酸盐试验

乳酸菌消耗的 NaNO_2 用 Dodds^[15] 方法测量。在试管中预先准备好的 9 mL MRS 肉汤中加入过滤杀菌的 NaNO_2 溶液,终质量浓度 100 $\mu\text{g/mL}$ 。取 1 mL 培养 18 h,细胞密度约 $10^6/\text{mL}$ 的菌接入此管,厌氧条件下 37℃ 恒温培养箱培养 3 d。用 538 nm 处最初和最终 NaNO_2 浓度差值计算其消耗值,以不接种的 MRS 肉汤为对照。

1.7 统计分析

试验结果为 3 次平行试验数据的平均值。用统计分析软件 SAS8.2 进行 Duncan 法单因素方差分析。

2 试验结果

2.1 纯种发酵和自然发酵甘蓝中亚硝酸盐含量的变化

自然发酵和纯种发酵甘蓝中亚硝酸盐含量变化见图 1。可以看出,纯种发酵甘蓝亚硝酸盐含量在发酵全程均低于自然发酵。自然发酵的第 2 天亚硝酸盐含量出现最高值(即“亚硝峰”),之后迅速下降,发酵 12 d 后变化缓慢。接种 *Leu.* 和 *Lac.* 的发酵甘蓝亚硝酸盐含量均在发酵第 1 天最高,以后平缓下降,无亚硝酸盐高峰出现。亚硝酸盐含量最高值方差分析结果表明,自然发酵甘蓝中亚硝酸盐含量显著高于 2 种纯种发酵 ($P < 0.05$),为其 3 倍多;纯种发酵甘蓝间无显著差异 ($P > 0.05$)。说明纯种发酵能够降低发酵甘蓝中亚硝酸盐含量。

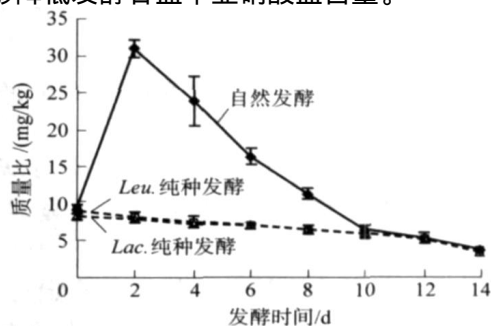


图 1 不同发酵方式甘蓝卤中亚硝酸盐质量比的变化
Fig. 1 Concentration changes of nitrite in cabbage brine with different fermentation methods

2.2 纯种发酵和自然发酵甘蓝中微生物数量的变化

2.2.1 肠杆菌数的变化 发酵甘蓝卤中肠杆菌数统计结果(图2)表明,自然发酵甘蓝卤中肠杆菌数高于2种纯种发酵。发酵1d后,自然发酵甘蓝卤中肠杆菌数为560 cfu/mL,分别为接种 *Lac.* 和 *Leu.* 乳酸菌菜卤的6.5和7.0倍;发酵2d后肠杆菌数下降迅速,到第5天其数量为30 cfu/mL。纯种发酵的肠杆菌数远远低于自然发酵,发酵3d后其为个位数,发酵5d内未测到肠杆菌。显著性分析结果表明,发酵5d内自然发酵甘蓝卤中肠杆菌数显著高于纯种发酵 ($P < 0.05$),说明纯种发酵方法能够抑制肠杆菌的生长。

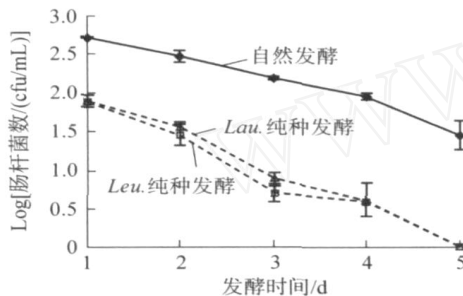


图2 不同发酵方式甘蓝卤中肠杆菌数

Fig. 2 Enumeration of enterobacteria in cabbage brine with different fermentation methods

2.2.2 乳酸菌和需氧嗜温菌数的变化 发酵过程中纯种(*Lac.* 和 *Leu.*)发酵和自然发酵甘蓝卤中乳酸菌数均呈上升趋势,相同发酵时间纯种发酵甘蓝

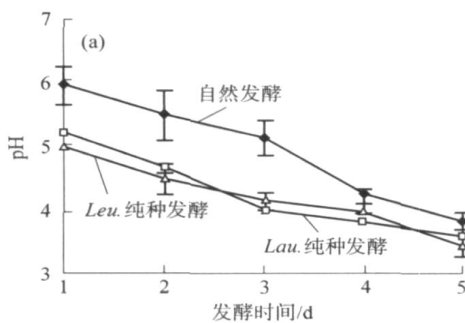


图4 不同发酵方式甘蓝卤中 pH和可滴定酸质量分数(以乳酸质量分数计)的变化

Fig. 4 Changes of pH and titratable acidity in cabbage brine with different fermentation methods

蓝中可滴定酸含量高于自然发酵。发酵第1天纯种发酵和自然发酵甘蓝中乳酸含量差异不显著 ($P > 0.05$),第2~5天差异显著 ($P < 0.05$) (图4(b))。

2.4 纯种发酵甘蓝中乳酸菌的描述和鉴定

从纯种发酵甘蓝卤中分离的122株微生物有110株为乳酸菌,占所分离菌的90.16%,其鉴定结

卤中乳酸菌数高于自然发酵(图3),且发酵初期和发酵后期差异显著 ($P < 0.05$),发酵中期差异不显著 ($P > 0.05$)。也就是说,发酵初期和后期纯种发酵甘蓝中乳酸菌数大大高于相应期间自然发酵甘蓝。

需氧嗜温菌的变化曲线与乳酸菌相似(图3)。纯种发酵和自然发酵初期(1~3d),需氧嗜温菌数高于乳酸菌,发酵后期(4~5d)与乳酸菌数相近;而自然发酵初期(1~2d)需氧嗜温菌与乳酸菌数的差值大于纯种发酵,说明其杂菌高于纯种发酵。

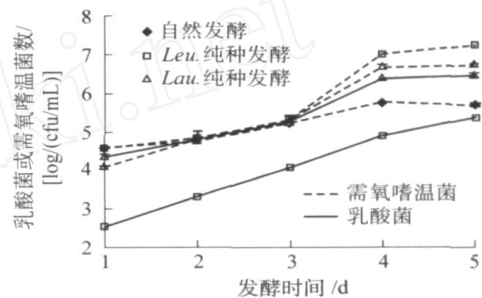
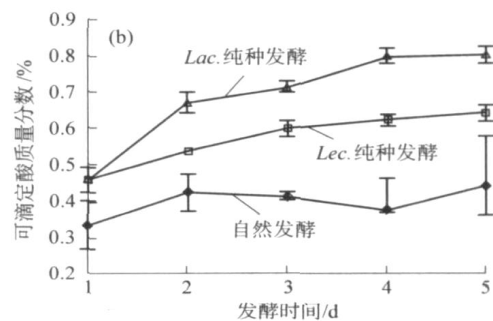


图3 不同发酵方式甘蓝卤中乳酸菌数和需氧嗜温菌数

Fig. 3 Enumeration of mesophilic aerobic bacteria and lactic acid bacteria

2.3 纯种发酵和自然发酵甘蓝中 pH和可滴定酸的变化

发酵过程纯种发酵和自然发酵甘蓝中pH的变化趋势均呈下降走向,且纯种发酵低于自然发酵,尤其发酵初期(1~3d)显著低于自然发酵 ($P < 0.05$) (图4(a))。可滴定酸含量呈上升趋势,纯种发酵甘



果见表1。乳酸菌为 *Lactobacillus* 和 *Leuconostoc* 2个属,其中分离到的 *Lactobacillus plantarum* 最多, *Lactobacillus pentosus* 次之。 *Leuconostoc mesenteroides*、*Lactobacillus lactis*、*Lactobacillus fermentum* 和 *Lactobacillus brevis* 数量很少,占所分离乳酸菌的百分率很低。

表 1 纯种发酵甘蓝卤中乳酸菌数

Table 1 Tentative identification of lactic acid bacteria isolated from fermentation cabbage brine according to phenotypic characterisation

乳酸菌(代号)	分离菌数	占分离总菌数比率/ %
<i>Lactobacillus plantarum</i> (Lac. 1)	48	43.636
<i>Lactobacillus pentosus</i> (Lac. 2)	21	19.091
<i>Lactobacillus brevis</i> (Lac. 3)	8	7.273
<i>Lactobacillus lactics</i> (Lac. 4)	12	10.909
<i>Lactobacillus fermentum</i> (Lac. 5)	10	9.091
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (Leu. 1)	11	10.000

注:分离总菌数 110 株。

2.5 乳酸菌消耗亚硝酸盐的能力

将鉴定出的 6 种乳酸菌接入含 100 mg/L 亚硝酸盐的 MRS 培养液中,3 d 后培养液中所含亚硝酸盐质量浓度见表 2。这 6 种乳酸菌消耗亚硝酸盐的能力均比对照高 2 倍多,每种乳酸菌消耗亚硝酸盐的百分率均超过 96%,最高达到 99.623%,说明乳酸菌能够消耗大量亚硝酸盐。

表 2 6 种乳酸菌利用亚硝酸盐能力比较

Table 2 Comparison of nitrite using ability of six types of lactic acid bacteria

乳酸菌代号	亚硝酸盐质量浓度/(mg/L)	消耗亚硝酸盐百分率/ %
自然发酵	68.421 ± 0.603	31.579
Lac. 1	0.377 ± 0.112	99.623
Lac. 2	0.704 ± 0.171	99.296
Lac. 3	3.021 ± 0.667	96.979
Lac. 4	1.534 ± 0.172	98.466
Lac. 5	1.185 ± 0.012	98.815
Leu. 1	0.776 ± 0.244	99.224

注:见表 1。

3 讨论

本试验甘蓝自然发酵过程中产生亚硝酸盐,并形成亚硝酸盐高峰,与文献[5-7]报道一致。“亚硝峰”的形成是由于发酵初期大量革兰氏阴性菌,如肠杆菌、假单孢菌等硝酸还原反应阳性菌,把蔬菜中部分硝酸盐还原为亚硝酸盐而导致的^[7,16]。蔬菜收获后表面所含微生物种类较多且数量较大,如甘蓝外叶含微生物约 13×10^8 个/g,而革兰氏阳性的乳

酸菌一般数量较少,因此发酵初期乳酸菌活动微弱,形成的抑制杂菌的物质^[17]含量很低,大量能将硝酸盐还原的细菌快速繁殖;再者泡菜制作过程中所加盐量较低,不能对肠杆菌、假单孢菌等硝酸盐还原阳性菌造成威胁。所以发酵初期亚硝酸盐含量迅速增高。

本研究结果表明,甘蓝纯种发酵过程未出现“亚硝峰”,而自然发酵甘蓝中亚硝酸盐含量显著高于纯种发酵($P < 0.05$),为纯种发酵甘蓝的 3 倍多。导致亚硝酸盐形成的肠杆菌及乳酸菌之外的需氧嗜温菌数显著低于自然发酵($P < 0.05$)是纯种发酵甘蓝中亚硝酸盐含量低于自然发酵的重要原因。

本试验中纯种发酵初期 pH 显著低于自然发酵,乳酸菌高于自然发酵,可滴定酸含量显著高于自然发酵。pH 的降低和乳酸菌的增加能够抑制发酵体系中其他微生物的生长,如除乳酸菌外的需氧嗜温菌和肠杆菌的减少,同样结果也见于其他发酵产品^[18-19],有资料报道 pH 3.5 ~ 4.0 能够抑制肠道菌和革兰氏阴性菌^[20]。除乳酸菌外乳酸也能抑制肠道菌。文献[21]报道,乳酸发酵能够抑制如 *Escherichia coli*、*Campylobacter jejuni*、*Shigella flexneri* 和 *Salmonella typhimurium* 等革兰氏阴性致病菌及其毒素的形成。自然发酵初期需氧嗜温菌数量高于纯种发酵,而乳酸菌数量较纯种发酵低,这些乳酸菌之外的需氧嗜温菌也可能引起蔬菜中硝酸盐还原为亚硝酸盐。

本研究中从纯种发酵甘蓝中分离得到的 110 株乳酸菌均能不同程度降解亚硝酸盐,降解率达 96% 以上,最高达到 99.6%。有研究表明,从香肠中分离出降解量很高的乳酸菌,而此乳酸菌发酵的 pH 是很高的,这说明香肠发酵体系中不仅是由于 pH 的降低引起亚硝酸盐含量降低,其中的乳酸菌也能够降解亚硝酸^[15]。其他相关报道还有,Kimchi 发酵过程中乳酸菌降解了大量亚硝酸盐^[22];从 Kimchi 中分离出的 *L. plantarum*, *Lactobacillus sake* 和 *L. mesenteroides* 能达到很高的亚硝酸盐降解率^[1];从商业肉样中分离出的乳酸菌在 30 的厌氧环境 24 h 后将 ATP 液体培养基中含 200 mg/L 的亚硝酸盐降解了 61.4% ~ 92.7%;分离出的能降解亚硝酸盐的 17 种菌中 15 种菌确定为同型发酵菌^[15]。这些结果暗示乳酸产品和 pH 降低可能是亚硝酸盐降低的部分原因。Collins-Thompson^[23]也证实,在肉汤培养中某些乳酸菌降低了亚硝酸盐的浓度,并指出

乳酸菌与一种大腊肠(bologna)中30%亚硝酸盐的损失有关。

本研究结果表明,纯种发酵甘蓝中亚硝酸盐含量显著低于自然发酵($P > 0.05$),且未形成亚硝酸盐高峰。

参 考 文 献

- [1] Oh Chang-kyung, Oh Myung-chul, Kim Soo-hyun, et al. The depletion of sodium nitrite by lactic acid bacteria isolated from kimchi [J]. Journal of Medicinal Food, 2004, 7(1): 38-44
- [2] Britta Viander, Maarit Mäki, Airi palva, et al. Impact of low salt concentration, salt quality on natural large-scale sauerkraut fermentation [J]. Food Microbiology, 2003, 20: 391-395
- [3] 陈仲翔,董英. 泡菜工业化生产的研究进展[J]. 食品科技, 2004, 4: 33-36
- [4] 泡菜和酸菜工业化生产技术[J]. 农机化研究, 2002, 1: 116-119
- [5] Toshirou hashimoto. The cause on the abnormal accumulation of nitrite in pickles of chinese cabbage (*Brassica pekinensis* Rupr.) [J]. Nippon shokuhin kagaku Kogaku kaishi, 2001, 48(6): 409-415
- [6] 纪淑娟,孟宪军. 大白菜发酵过程中亚硝酸盐消长规律的研究[J]. 食品与发酵工业, 2002, 27(2): 42-46
- [7] 张庆芳,迟乃玉,魏毓棠. 大白菜腌渍发酵亚硝酸盐含量的研究[J]. 食品工业, 2001(1): 38-39
- [8] 孟良玉,兰桃芳,何余堂. 酸菜中亚硝酸盐含量变化规律及降低措施的研究[J]. 中国酿造, 2005, 11: 9-10
- [9] 杨性民,刘青梅,奚李峰,等. 腌渍雪里蕻亚硝酸盐含量控制研究[J]. 中国食品学报, 2004, 4(1): 48-52
- [10] 刘青梅,杨性民. 腌渍蔬菜亚硝酸盐含量及降低措施研究[J]. 食品科学, 2001, 22(1): 44-46
- [11] 杨性民,刘青梅,徐喜圆,等. 人工接种对泡菜品质及亚硝酸盐含量的影响[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2003, 29(3): 291-294
- [12] 黄伟坤. 食品检验与分析[M]. 北京:轻工业出版社, 1989: 19-21
- [13] AOAC. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists[S]. 15th ed. Virginia(US): Association of Official Analytical Chemists, 1990: 780-842
- [14] Han B Z, Cao C F, Rombouts F M, et al. Microbial changes during the production of Sufu—a Chinese fermented soybean food [J]. Food Control, 2004, 15: 265-270
- [15] Dodds K L, Collins-Thompson D L. Incidence of nitrite-depleting lactic acid bacteria in cured meats and in meat starter cultures [J]. Journal of Food protection, 1984, 47: 7-10
- [16] Shigeo miyao. Microbiological controlling of fermented vegetables[J]. Nippon shokuhinkagaku Kogaku kaishi, 1997, 44(1): 1-9
- [17] Cheigh H S, Park K Y. Biochemical microbiological and nutritional aspects of kimchi (Korean fermented vegetable products) [J]. Critical Reviews in food Science and Nutrition, 1994, 175: 42-44
- [18] Muyanja C M B K, Narvhus J A, Treimo J, et al. Isolation, characterization and identification of lactic acid bacteria from *bushera*: a Ugandan traditional fermented beverage [J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 80: 201-210
- [19] Ruiz-barba J L, Cathcart D P, Warner P J, et al. Use of *Lactobacillus plantarum* LPCO 10, a bacteriocin producer, as a starter culture in Spanish-style green olive fermentations [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60: 2059-2064
- [20] Nout M J R. Ecology of accelerated natural lactic fermentation of sorghum-based infant formulas [J]. International Journal of Food Microbiology, 1991, 12: 217-224
- [21] Svanberg U, Sjogren E, Lorri W, et al. Inhibited growth of common enteropathogenic bacteria in lactic fermented cereal gruels [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1992, 8: 601-606
- [22] Park K Y, Cheigh H S. Kimchi and nitrosamines [J]. Korean Journal of Food Science and Nutrition, 1992, 21: 109-116
- [23] Collins-Thompson D L, Lopez G R. Depletion of sodium nitrite by lactic acid bacteria isolated from vacuum packed bologna [J]. Food Protection, 1981, 44: 593-595