

自然发酵酸菜化学成分含量 和微生物数量的动态变化及其相关性分析

韩宏娇,丛敏,李欣蔚,孔繁华,李玮轩,梁肖娜,曹雪妍,岳喜庆*

(沈阳农业大学食品学院,辽宁沈阳 110161)

摘要:为探究东北地区自然发酵酸菜不同发酵时间的化学成分含量和微生物数量的动态变化及其相关性,本文以纯培养法追踪微生物数量变化,同时监测发酵体系中化学成分变化,并进行相关性分析。结果表明,随发酵时间的延长,pH和可溶性蛋白的含量下降,总酸含量上升,还原糖、亚硝酸盐和氨基酸态氮含量均先增加后减小。细菌菌落总数、大肠菌群数和乳酸菌数量先增加后减少,大肠菌群数最后为零。酵母菌数量先增加后降低,最后略上升。相关性分析表明,乳酸菌数与pH、大肠菌群数及可溶性蛋白含量极显著负相关($p < 0.01$),酵母菌数与亚硝酸盐、还原糖及氨基酸态氮含量极显著正相关($p < 0.01$)。大肠菌群数与pH、还原糖、可溶性蛋白及氨基酸态氮含量极显著正相关($p < 0.01$),细菌菌落总数与氨基酸态氮含量显著正相关($p < 0.05$)。本研究表明,酸菜发酵体系中多种化学成分与微生物数量相关性显著,为提高酸菜发酵环境中微生物与化学成分之间的协调性提供了理论基础。

关键词:酸菜,自然发酵,化学成分,微生物数量,相关性

Dynamic Changes and Correlation Analysis of Chemical Components Contents and Microbial Quantity in Naturally Fermented Sauerkraut

HAN Hong-jiao, CONG Min, LI Xin-wei, KONG Fan-hua, LI Wei-xuan,

LIANG Xiao-na, CAO Xue-yan, YUE Xi-qing*

(College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: In order to explore the dynamic changes and correlations between chemical components contents and microbial quantity at different fermentation time in traditional Chinese sauerkraut. Conventional culture assay was used to analyse microbial quantity, chemical indexes and correlation analysis of them during sauerkraut fermentation. The results showed that, with the prolongation of fermentation time, pH and soluble protein content decreased, total acid contents increased, the contents of reducing sugar, nitrite, and amino acid nitrogen all increased and then decreased during the fermentation process. The total number of bacteria, coliform bacteria and the lactic acid bacteria increased and then decreased. The number of coliform bacteria eventually became zero finally. The amount of yeast increased, decreased and then increased slightly. The correlation analysis showed that, the number of lactic acid bacteria was significantly negatively correlated with the pH, the number of coliform bacteria, and the soluble protein contents ($p < 0.01$). The number of yeasts was positively correlated with nitrite, reducing sugar and amino acid nitrogen contents ($p < 0.01$). The number of coliform bacteria was positively correlated with pH value, reducing sugar, soluble protein and amino acid nitrogen contents ($p < 0.01$). There was a positive correlation between total bacterial number and amino acid nitrogen contents ($p < 0.05$). The study indicated the significant correlations and complex relationships between chemical components content and microorganism quantity in traditional Chinese sauerkraut system, which provided theoretical basis for improving the coordination between microorganisms and chemical indexes in the fermentation environment.

Key words: sauerkraut; natural fermentation; chemical component; microorganism quantity; correlations

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2019)02-0148-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2019.02.026

引文格式: 韩宏娇,丛敏,李欣蔚,等.自然发酵酸菜化学成分含量和微生物数量的动态变化及其相关性分析[J].食品工业科技,2019,40(2):148-153.

酸菜是深受东北人民喜爱的一种传统的发酵制品。经过发酵后的蔬菜制品,不仅营养价值提升,而

收稿日期:2018-06-20

作者简介:韩宏娇(1994-),女,博士研究生,研究方向:动物性食品加工与利用,E-mail:13998311554@163.com。

*通讯作者:岳喜庆(1966-),男,博士,教授,研究方向:动物性食品加工与利用,yxqsyou@126.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31370502)。

且口味独特。其浓郁酸香的口感得益于发酵过程中微生物代谢的复杂变化。在整个发酵过程中,发酵液中各项化学指标以及微生物数量的变化对酸菜发酵品质、风味和贮藏特性等起着至关重要的作用^[1]。要实现酸菜由传统自然发酵转变为人工可调控发酵,必须准确掌握发酵过程中的微生物和化学成分的动态变化,这对于形成口感佳、风味好和质量高的产品尤为重要^[2-4]。

目前,国内外对于自然发酵酸菜的研究主要是利用高新技术研究微生物区系的动态变化以及乳酸菌的分离和种类鉴定,人工接种发酵酸泡菜在发酵过程中的亚硝酸盐含量变化和风味成分分析。而对自然发酵酸菜尤其是东北酸白菜及其发酵液的化学成分和微生物数量随发酵时间的动态变化规律及相关性分析研究还鲜有报道。

本研究拟对东北地区自然发酵第0、3、6、9、12、15、18、21、24、27、30、35、40、50、60 d的酸菜及发酵液中的乳酸菌数、酵母菌数、大肠菌群数和细菌菌落总数、pH、总酸度、亚硝酸盐含量、可溶性蛋白含量、还原糖含量和氨基酸态氮含量进行了系统分析,并研究各项化学成分含量和微生物数量之间的相关性,以期对酸菜发酵工艺的优化及工业化生产提供理论依据和参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大白菜 沈阳农业大学农贸市场;乙酸锌、亚铁氰化钾、对氨基苯磺酸、盐酸萘乙二胺、亚硝酸钠、酒石酸钾钠、亚硫酸钠、3,5-二硝基苯磺酸、结晶酚、考马斯亮蓝 G-250 分析纯,鼎国生物技术有限公司。

ALC-210.2 型电子天平 北京赛多利斯仪器系统有限公司;AL204 分析天平 北京赛多利斯仪器系统有限公司;LDZX-50FBS 全自动高压蒸汽灭菌锅 上海申安医疗器械厂;ZHJH-C1214C 超净工作台 青岛海尔特种电器有限公司;ZHJH-C1213C 无菌操作台 青岛海尔特种电器有限公司;DNP 型电热恒温培养箱 上海精宏实验仪器设备有限公司;ND-2000 型紫外分光光度计 北京中西科技远大有限公司;DHG-9246A 型电热恒温鼓风干燥箱 上海精宏实验仪器设备有限公司;pHS-3C 型精密 pH 计 上海理达仪器;5804R 高速冷冻离心机 德国 Eppendorf 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 酸菜的腌制 采用中国东北地区酸菜腌制的传统方法。挑选结实饱满且成熟,无腐烂,无病虫害的大白菜,将其在通风且阳光充足的室外晾晒数日后(晒蔫、杀菌、去除一定的水分),去除黄叶、老帮并清洗干净,将整颗大白菜浸入沸水 3 min 左右后捞出,沥干水分,整齐摆入 5L 的发酵罐中装满压实并排出空气,用质量分数为 3.0% 淡盐水将发酵罐填满密封,不添加任何发酵剂和调味料。用塑料布将发酵罐口扎紧,将酸菜发酵罐放置在温度 20~25 °C,湿度 40~65% 且避光阴凉的环境中进行自然发酵,取 0、3、6、9、12、15、18、21、24、27、30、35、40、50、60 d 的

酸菜及发酵液进行如下指标的测定。

1.2.2 化学成分指标的测定 pH:取酸菜发酵罐中多个位置的发酵液进行混合,校准 pH 计后,将电极浸没在发酵液中直至数值稳定。连续测定三次取平均值作为最终结果;

总酸度^[5]:参考 GB/T 12456-2008《食品中总酸的测定》,取酸菜 10.00 g 研磨成匀浆,蒸馏水定容至 100 mL,过滤备用,采用酸碱滴定法对发酵悬浊液进行测定;

亚硝酸盐含量^[6]:取酸菜 500 g 研磨成浆,参照 GB 5009.33-2010《食品中亚硝酸盐和硝酸盐的测定》,制备酸菜样品的亚硝酸盐提取液,采用盐酸萘乙二胺法对发酵悬浊液进行测定,以亚硝酸钠含量为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程: $y = 0.0162x + 0.0053$, $R^2 = 0.9981$,呈线性关系;

可溶性蛋白含量^[7]:取酸菜 2.00 g 研磨成匀浆,与 5 mL 去离子水混合后在 4 °C,12000 r/min 的条件下离心 30 min,上清液即为酸菜可溶性蛋白提取液。参照 GB 5009.5-2010《食品中蛋白质的测定》,采用考马斯亮蓝染色法对酸菜样液进行测定,以蛋白质含量为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程: $y = 0.0057x + 0.0121$, $R^2 = 0.9983$,呈线性关系;

还原糖含量^[8]:取酸菜 1.00 g 研磨成匀浆,定容至 25 mL,80 °C 水浴 30 min 使还原糖充分溶出,过滤后定容至 100 mL 即为酸菜还原糖提取液。参照 GB/T 5009.7-2008《食品中还原糖的测定》,采用 3,5-二硝基水杨酸比色法对酸菜样液进行测定,以葡萄糖含量为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程: $y = 0.3074x - 0.0012$, $R^2 = 0.9992$,呈线性关系;

氨基酸态氮含量^[9]:甲醛滴定法,取酸菜样品 10 g,研磨成匀浆状,去离子水定容至 100 mL,摇匀后过滤,取滤液 20 mL 与 60 mL 蒸馏水混合。用 0.05 mol/L 的标准碱液调节溶液 pH 至 8.2(V_1)。再加入 10 mL 甲醛溶液,再调节 pH 至 9.2(V_2)。用去离子水(V_0)作为空白对照,计算如下:

$$\text{氨基酸态氮含量}(\%) = \frac{(V_2 - V_0) \times c \times 0.014}{5 \times \frac{V_1}{100}} \times 100$$

1.2.3 微生物指标的测定 采用纯培养法,将发酵第 0、3、6、9、12、15、18、21、24、27、30、35、40、50、60 d 的发酵液用 25 mL 离心管收集,经过四层无菌纱布过滤后,取滤液作为研究对象进行微生物指标的测定。细菌菌落总数^[10]:参照 GB 4789.2-2010,采用平板计数法测定细菌菌落总数;乳酸菌总数^[11]:参照 GB 4789.35-2010,采用平板计数法测定乳酸菌数量;酵母菌数量^[12]:参照 GB 4789.15-2010,采用平板计数法测定酵母菌数量;大肠菌群数^[13]:参照 GB 4789.3-2010,采用平板计数法测定大肠菌群数量。

1.3 数据处理

用 Excel 和 SPSS 17.0 对试验数据进行绘图和统计分析。

2 结果与分析

2.1 酸菜自然发酵过程中 pH 的动态变化

pH 是酸菜发酵过程中的重要指标。pH 不仅会影响发酵环境中微生物的种类、数量和生长状况,还会影响微生物的代谢途径及其代谢产物的变化,进而影响发酵风味的形成^[3]。

自然发酵酸菜 pH 随发酵时间的动态变化如图 1 所示。在发酵时间为 0~35 d 时,pH 逐渐下降,从初始的 6.42 下降为 3.64。在发酵时间为 40~60 d 时,pH 在 3.70 左右保持平稳。Xiong 等^[14]认为,发酵初期乳酸菌的生长处于劣势,发酵环境中产酸较少。随着发酵时间的延长,乳酸菌在厌氧环境中利用大白菜中的还原糖发酵,产生大量的乳酸等酸性物质,使 pH 不断下降^[15]。在酸菜发酵 40~60 d,pH 变化较小。杜书^[16]和马欢欢等^[17]研究表明,pH 随发酵时间的延长而下降,最终稳定在 pH3 左右,与本文结果类似。

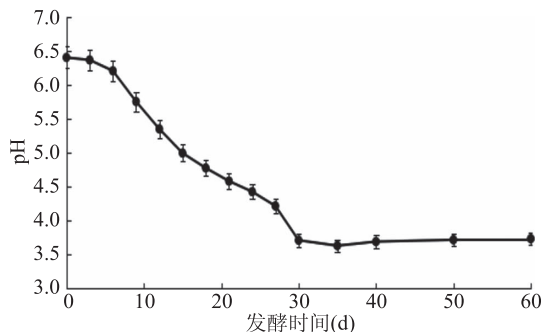


图 1 酸菜自然发酵过程中 pH 的动态变化

Fig.1 Dynamic changes of pH

during natural fermentation of sauerkraut

2.2 酸菜自然发酵过程中总酸含量的动态变化

如图 2 所示,酸菜发酵环境中的总酸含量呈持续上升趋势,在发酵时间为 50 d 时达到最大值 6.68 g/kg,在发酵时间为 50~60 d 时基本保持稳定。Liu 等^[18]发现,乳酸菌在发酵蔬菜中的作用主要是形成酸性环境和抑制不耐酸有害菌的生长。且乳酸菌是发酵体系中的主体微生物^[19]。因此,在酸菜腌制初期,发酵环境中以肠膜明串珠菌的异型发酵为主,产生的 CO_2 、 CH_3COOH 和 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 导致发酵液的总酸含量升高^[20]。由此创造的酸性环境促进部分抗酸乳酸菌的繁殖,产生大量乳酸,总酸含量持续增加。而在发酵时间为 50 d 之后,发酵环境中的碳源和氮源因被大量消耗而不足,乳酸菌数量趋于稳定,其产酸作用减弱并逐渐停止,发酵环境中总酸含量趋于稳定。乳酸菌发酵食品的酸味及风味受其总酸度的影响较大^[21]。自然发酵酸菜中的适量酸有助于掩盖白菜味,同时赋予制品独特的风味。

2.3 酸菜自然发酵过程中亚硝酸盐含量的动态变化

在腌制初期,发酵体系内酸度较低,蔬菜本身及发酵器具上携带的肠杆菌和黄杆菌属等革兰氏阴性菌会分泌硝酸还原酶,蔬菜中的大量硝酸盐还原为亚硝酸盐^[22]。由图 3 所示,酸菜的亚硝酸盐含量在发酵时间为 0~9 d 时急剧增加,并在 9 d 时达到最大值 69.76 mg/kg。何淑玲等^[23]发现,硝酸还原酶产生

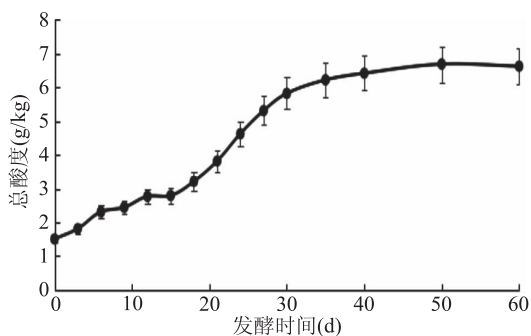


图 2 酸菜自然发酵过程中总酸含量的动态变化

Fig.2 Dynamic changes of total acid content during natural fermentation of sauerkraut

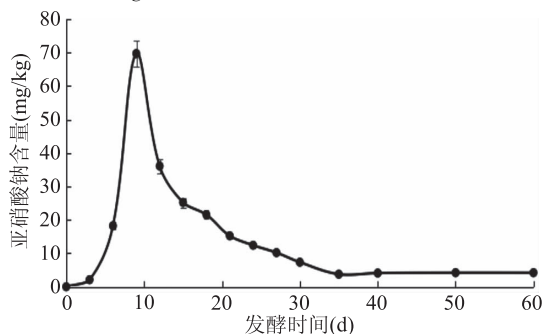


图 3 酸菜自然发酵过程中亚硝酸盐含量的动态变化

Fig.3 Dynamic change of nitrite content

during natural fermentation of sauerkraut

作用的临界点为 pH5.0,且硝酸还原酶活性对亚硝酸盐含量变化规律起主要作用。由图 3 变化趋势结合 2.1 pH 变化规律,亚硝酸盐含量在发酵第 15 d (pH4.99)后逐渐减小并趋于稳定,15 d 之后降低到国家标准以下的水平,小于 20 mg/kg。

2.4 酸菜自然发酵过程中可溶性蛋白含量的动态变化

Do 等^[24]研究表明,*Lactobacillus delbrueckii* UFB H2b20 有编码合成蛋白质水解酶和氨基肽酶的基因,从而提高蛋白质的降解速率和消耗速率。由图 4 可知,在酸菜的天然发酵过程中,可溶性蛋白被分解为氨基酸和小肽等物质被微生物生长发育所利用,整体呈现下降趋势,从发酵时间为 0 d 时的 49.85 mg/100 g 下降到 60 d 的 1.34 mg/100 g,下降了约 37 倍。在 40~60 d 时,可溶性蛋白含量趋于稳定,蛋白质代谢产物也为酸菜特殊风味和口感的形成提供了保证。

2.5 酸菜自然发酵过程中还原糖含量的动态变化

由图 5 所示,发酵时间为 0~9 d 时,酸菜发酵体系中还原糖含量逐渐增大并达到最大值,分析原因可能是,随着发酵时间的不断延长和盐水的渗透压作用,导致大白菜本身的还原糖等营养物质不断溶出,此时微生物对还原糖的分解速率小于还原糖的生成速率。Dodds 等^[25]对 TS4 乳酸杆菌的研究表明还原糖和 NADH 是发酵环境中酶的主要电子供体。同时,还原糖在发酵后期作为微生物生长繁殖的主要碳源被消耗,其含量逐渐减少并趋于稳定,因此在发酵时间为 9~60 d 时整体呈现下降趋势。

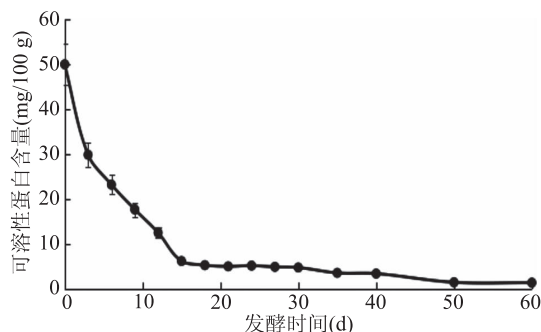


图4 酸菜自然发酵过程中可溶性蛋白含量的动态变化

Fig.4 Dynamic change of soluble protein during natural fermentation of sauerkraut

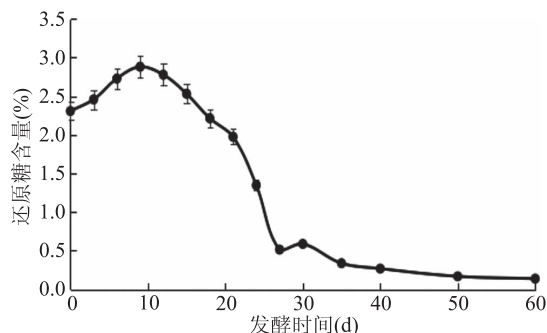


图5 酸菜自然发酵过程中还原糖含量的动态变化

Fig.5 Dynamic change of reducing sugar during natural fermentation of sauerkraut

2.6 酸菜自然发酵过程中氨基酸态氮含量的动态变化

微生物通过代谢活动产生蛋白酶, Lee 等^[26]研究发现, 泡菜中的 *Lb.sakei* 能够分解蛋白质产生大量的必需氨基酸和肽类物质。如图 6 所示, 酸菜发酵环境中氨基酸态氮含量在 0~9 d 逐渐增加, 并在发酵时间为 10 d 时, 达到最大值 11.3 mg/100 g, 这是由于初期微生物数量较少, 且代谢活动较弱, 因此酶解蛋白质作用较弱。在发酵时间为 10~60 d 时, 整体呈现下降趋势, 可能是由于高酸性的发酵环境抑制中性和碱性蛋白酶的活性, 同时微生物代谢活动趋于平稳, 氨基酸态氮含量趋于稳定。

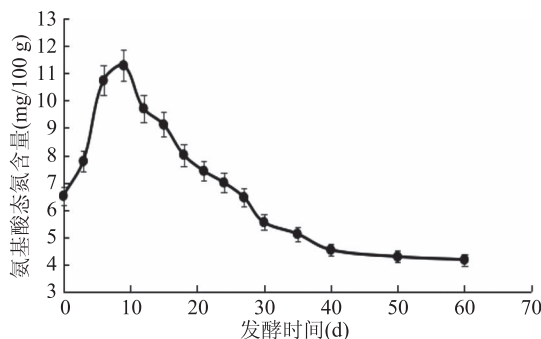


图6 酸菜自然发酵过程中氨基酸态氮含量的动态变化

Fig.6 Change of amino acid nitrogen during natural fermentation of sauerkraut

2.7 酸菜自然发酵过程中微生物数量的动态变化

如图 7 所示, 自然发酵酸菜中乳酸菌数量、酵

母菌数量、大肠杆菌数量和细菌菌落总数的变化趋势基本一致, 细菌菌落总数、乳酸菌数量、酵母菌数量和大肠菌群数量均在发酵前期逐渐增加到峰值, 出现峰值的时间分别为 15、18、9、6 d, 在发酵后期数量逐渐减少并趋于平稳的趋势, 其中酵母菌数量在发酵 40~60 d 时略有上升, 而大肠菌群数量在发酵 20 d 后变为零。Xiong 等^[19]对发酵圆白菜的研究表明, 发酵过程中的主体微生物为乳酸菌。如图 7 所示在发酵第 18 d 时, 乳酸菌数量到达峰值成为优势菌群。随后其数量开始减少, 这是由于乳酸富集到 1.1%~1.3% 的浓度时, 反而抑制了部分不耐酸乳酸菌的生长^[16,27]。Mundt 等^[21]发现, 甘蓝发酵初期乳酸菌和细菌总数急剧上升, 同时伴随一定数量的霉菌和酵母菌, 在发酵后期乳酸菌和细菌逐渐抑制其他杂菌, 与本研究结果相符。分析原因认为, 一方面随着发酵时间的延长, 乳酸菌生长并大量产酸, 酸性和低氧的发酵环境抑制了酵母菌和大肠菌群的生长^[28]。另一方面, 发酵环境中微生物生长所需要的营养物质如碳源和氮源不足, 使得发酵液中乳酸菌的数量逐渐减少。发酵环境中微生物的交替生长为酸菜产生独特风味和提高贮藏品质提供了保证。

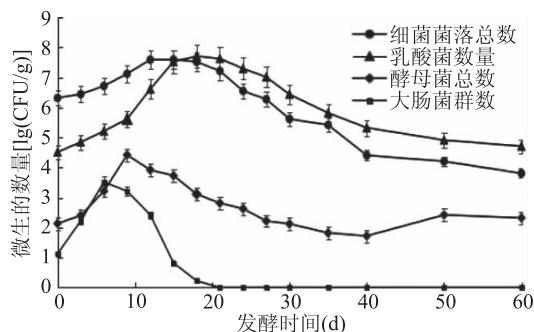


图7 酸菜自然发酵过程中微生物数量的动态变化

Fig.7 Dynamic changes of microbial quantity during natural fermentation of sauerkraut

2.8 酸菜自然发酵过程中微生物数量变化与化学成分含量变化的相关性分析

将酸菜自然发酵过程中化学成分含量与各类微生物数量进行相关性分析, 结果如表 1 所示。乳酸菌数与 pH、大肠菌群数及可溶性蛋白含量呈极显著负相关 ($p < 0.01$), 相关系数分别为 -0.801、-0.697 和 -0.811。酵母菌数与亚硝酸盐含量、还原糖含量及氨基酸态氮含量呈极显著正相关 ($p < 0.01$), 相关系数分别为 0.934、0.811 和 0.874。大肠菌群数与 pH、还原糖含量、可溶性蛋白含量及氨基酸态氮含量呈极显著正相关 ($p < 0.01$), 与总酸含量呈极显著负相关 ($p < 0.01$), 相关系数分别为 0.869、0.830、0.665、0.813 和 -0.765。而细菌菌落总数与氨基酸态氮含量呈显著正相关 ($p < 0.05$)。pH 与还原糖含量、可溶性蛋白含量和氨基酸态氮含量呈极显著正相关 ($p < 0.01$), 与总酸含量呈极显著负相关 ($p < 0.01$), 相关系数分别为 0.858、0.851、0.773 和 -0.962。总酸含量与还原糖含量、可溶性蛋白含量和氨基酸态氮含量

表1 酸菜自然发酵过程中微生物数量变化与化学成分变化的相关性分析

Table 1 Correlation Analysis of the changes of chemical composition and microbial quantity in the process of sauerkraut fermentation

指标	乳酸菌数	酵母菌数	大肠菌群数	细菌菌落总数	pH	总酸	亚硝酸盐	还原糖	可溶性蛋白	氨基酸态氮
乳酸菌数	1									
酵母菌数	-0.166	1								
大肠菌群数	-0.697**	0.622*	1							
细菌菌落总数	0.417	0.401	0.088	1						
pH	-0.801**	0.498*	0.869**	0.233	1					
总酸	0.562*	-0.607*	-0.765**	0.455	-0.962**	1				
亚硝酸盐	-0.067	0.934**	0.528*	0.312	0.365	-0.427	1			
还原糖	-0.499	0.811**	0.830**	0.465	0.858**	-0.948**	0.611*	1		
可溶性蛋白	-0.811**	0.111	0.665**	0.019	0.851**	-0.742**	0.019	0.558*	1	
氨基酸态氮	0.321	0.874**	0.813**	0.544*	0.773**	-0.818**	0.755*	0.917*	0.366	1

注: * 代表相关性显著($p < 0.05$), ** 代表相关性极显著($p < 0.01$)。

呈极显著负相关($p < 0.01$), 相关系数分别为-0.948、-0.742 和-0.818。

3 讨论

3.1 酸菜自然发酵过程中微生物数量与化学成分的动态变化

酸菜中乳酸发酵是主要的发酵类型, 同时也有少量的乙醇发酵过程和微量的醋酸发酵过程^[28]。此外, 自然发酵酸菜的总酸含量随发酵时间的延长呈现上升趋势, pH 随发酵时间的延长呈现下降趋势, 因此, 酸菜会呈现独特的酸味。在发酵过程中, 发酵液中乳酸菌数量呈现先增加后逐渐减小并保持稳定的趋势, 细菌菌落总数和大肠菌群数在发酵前期略有增加, 之后逐渐减少, 其中大肠菌群数在发酵 20 d 后数量变为零。酵母菌数量呈现先增加后降低在略上升的趋势。这些微生物数量的变化显著影响着发酵液中营养物质还原糖、可溶性蛋白和氨基酸态氮含量的变化, 可溶性蛋白含量随着发酵时间的延长呈现不断下降的趋势, 而还原糖和氨基酸态氮含量随着发酵时间的延长则略有上升后下降。在发酵过程中, 亚硝酸盐含量的变化趋势为先增加后下降, 最终在一定范围内波动并保持稳定, 且发酵 21 d 后的酸菜产品已经符合国家标准。

3.2 酸菜自然发酵过程中微生物数量与化学成分含量之间的关系

酸菜发酵环境中的乳酸菌数与 pH 及可溶性蛋白含量极显著负相关($p < 0.01$)。Liu 等^[29]研究表明 *Lb. Plantarum* 能够合成蛋白水解酶基因的前体物质, 可水解发酵体系中的蛋白质产生氨基酸。因此可溶性蛋白为乳酸菌的生长提供氮源。乳酸菌是发酵过程的优势微生物和产酸的主要微生物^[19], 且发酵体系中的酸度直接影响 pH 的变化。同时还发现, 乳酸菌对大肠杆菌数量的消长规律有极显著影响且呈反向相关关系, 这与杨丽等^[30]的研究结果一致。

酵母菌数量与氨基酸态氮含量的相互关系与 Beltran 等^[31]和 Vilanova 等^[32]的研究结果相似, 可同化氮是酵母菌生长的必需营养物质, 其含量变化的

消长规律与酵母菌数量保持同步。酵母菌数量与酸菜发酵体系中的还原糖具有极显著的正相关关系, 可能是由于发酵环境中的其他营养物质限制了酵母菌对还原糖的消耗速率, 也可能是酵母菌发酵需要一定浓度的还原糖存在。国内外均有研究表明, 发酵蔬菜中亚硝酸盐的产生是由于肠杆菌和黄杆菌分泌的硝酸还原酶作用^[22-33]。但亚硝酸盐含量与酵母菌数量呈极显著正相关的作用机理尚无定论, 有待在后续研究中开展。

相关性分析发现大肠菌群的生长受到发酵体系中多种因素的影响, pH、还原糖含量、可溶性蛋白含量、氨基酸态氮含量及总酸含量对大肠菌群数的影响极显著。其中可溶性蛋白和氨基酸态氮作为发酵体系中的主要氮源促进大肠杆菌的生长发育。程立坤等^[34]证明了葡萄糖浓度对大肠杆菌 TRJTH0709 的菌体生物量、菌体比生长速率等具有显著影响, 与本文结果一致。但是 pH 及总酸含量与大肠菌群的关系与杨丽等^[30]的研究存在一定的差异, 这可能与发酵过程中是否添加调味料以及发酵液的盐浓度有关。

比较细菌菌落总数与其他指标的变化发现, 细菌菌落数量仅与氨基酸态氮含量有显著的正向相关关系。因此, 除乳酸菌外, 氨基酸态氮含量是发酵酸菜中其他微生物生长的关键因子。

4 结论

东北酸菜自然发酵过程中的氨基酸态氮含量是影响发酵体系内微生物生长的主要营养物质。随发酵时间的延长, pH 和可溶性蛋白的含量下降, 总酸含量上升, 还原糖、亚硝酸盐和氨基酸态氮含量均先增加后减小。细菌菌落总数、大肠菌群数和乳酸菌数量先增加后减少, 大肠菌群数最后为零。酵母菌数量先增加后降低, 最后略有上升。发酵体系中化学成分含量和微生物数量相关性显著($p < 0.05$)。乳酸菌则受到大肠杆菌和可溶性蛋白含的极显著影响($p < 0.01$)。而大肠菌群数则受诸多化学成分含量的影响, 在发酵 20 d 后数量变为零。酵母菌数量极显著地影响还原糖、氨基酸态氮和亚硝酸的含量($p <$

0.01), 其与亚硝酸盐的关系可以进一步研究, 为解决发酵蔬菜中亚硝酸盐的积累问题提供理论依据。

参考文献

- [1] 宋春璐, 胡文忠, 陈晨, 等. 酸菜发酵工艺与贮藏特性的研究进展[J]. 食品工业科技, 2016, 37(9): 376-379.
- [2] 岳喜庆, 杜书, 武俊瑞, 等. 酸菜自然发酵过程质地变化的分析[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(4): 68-71.
- [3] 武俊瑞, 张苗, 蔡森, 等. 自然发酵酸菜发酵液中化学成分测定[J]. 食品科学, 2012, 33(16): 117-119.
- [4] Xinwei Li, Xiqing Yue. Analysis of the microbiota in naturally fermented cabbage of northeastern part of china by high-throughout sequencing of the V3-V4 regions of the 16S rRNA gene[J]. International Journal of Agriculture and Biology, 2016, 6(18): 1153-1158.
- [5] 质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 12456-2008 食品中总酸的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [6] 聂焱, 郭双霜, 陈安均. 泡菜中亚硝酸盐消长规律及调控技术研究进展[J]. 食品工业科技, 2015, 4(4): 382-386.
- [7] 周颖, 樊荣. 人参中可溶性蛋白质含量测定[J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 16(8): 94-95.
- [8] 卫生部. GB/T 5009.7-2008 食品中还原糖的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [9] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 5009.235-2016 食品中氨基酸态氮的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [10] 卫生部. GB 4789.2-2010 食品微生物学检验 菌落总数测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [11] 卫生部. GB 4789.35-2010 食品微生物学检验 乳酸菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [12] 卫生部. GB 4789.15-2010 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [13] 卫生部. GB 4789.3-2010 食品微生物学检验 大肠菌群计数[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [14] Xiong T, Li J, Liang F, et al. Effects of salt concentration on Chinese sauerkraut fermentation[J]. LWT - Food Science And Technology, 2016, 69(3): 169-174.
- [15] Wu R N, Wu Z X, Zhao C Y, et al. Identification of lactic acid bacteria in suancai, a traditional northeastern Chinese fermented food, and salt response of *Lactobacillus paracasei*, LN-1[J]. Annals of Microbiology, 2013, 64(3): 1325-1332.
- [16] 杜书. 酸菜自然发酵过程中风味及质地变化规律研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2013.
- [17] 马欢欢, 李欣然, 林洋, 等. 传统东北酸菜自然发酵过程中乳酸菌与营养物质同步分析[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(2): 81-82.
- [18] Liu S, Han Y, Zhou Z. Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods[J]. Food Research International, 2011, 44(3): 643-651.
- [19] Xiong T, Peng F, Xiao L I, et al. Changes and metabolic characteristics of main microorganisms during Chinese sauerkraut fermentation[J]. Food Science, 2015, 36(3): 158-161.
- [20] 丛敏, 李欣蔚, 岳喜庆, 等. PCR-DGGE 分析东北传统发酵酸菜中乳酸菌多样性[J]. 食品科学, 2016, 37(7): 78-82.
- [21] Mundt J O, Graham W E, Mc Cartye. Spherical lactic acid-producing bacteria of southerngrown raw and processed vegetables[J]. Applied Microbiology, 1967, 15: 1303-1308.
- [22] Wolf G, Hammes W P. Effect of hematin on the activities of nitritereductase and catalase in *Lactobacilli* [J]. Archive Microbiology, 1988, 149: 220-224.
- [23] 何淑玲. 泡菜发酵过程中亚硝酸盐生成和降解机理的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2006.
- [24] Do C A, Da S D, De O M, et al. Genes involved in protein metabolism of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 [J]. Beneficial Microbes, 2011, 2(3): 209-220.
- [25] Dodds K L, Collins-thompson D L. Characteristics of nitrite reductase activity in *Lactobacillus lactis* TS4 [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1985, 31(6): 558-562.
- [26] Lee J H, Bae J W, Chun J. Draft genome sequence of *Weissella koreensis* KCTC 3621T [J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(20): 5711-5712.
- [27] 李欣, 武俊瑞, 岳喜庆, 等. 大庆自然发酵酸菜中乳酸菌的分离鉴定及耐酸菌株初步筛选[J]. 食品科学, 2014, 35(1): 150-154.
- [28] Jiang Xue, Sun Qingsheng, Wu Tong, et al. Effect of mixed fermentation of lactic acid bacteria on the quality of pickled cabbage[J]. Food and Ferment Industry, 2016, 42(5): 126-131.
- [29] Liu M, Bayjanov J R, Renckens B, et al. The proteolyticsystem of lactic acid bacteria revisited: A genomic comparison[J]. BMC Genomics, 2010, 11(5): 1248-1251.
- [30] 杨丽, 吴正云, 曾文雯, 等. 四川泡菜发酵过程中大肠杆菌消长规律的定量系统评价[J]. 食品安全质量检测学报. 2017(12): 4529-4533.
- [31] Beltran G, Novo M, Rozes N, et al. Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation[J]. FEMS Yeast Research, 2004, 4(6): 625-632.
- [32] Vilanova M, Ugliano M, Varela C, et al. Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 77(1): 145-157.
- [33] 张庆芳, 迟乃玉, 郑燕, 等. 乳酸菌降解亚硝酸盐机理的研究[J]. 食品与发酵工业, 2002(8): 27-31.
- [34] 程立坤, 赵春光, 黄静, 等. 葡萄糖浓度对大肠杆菌发酵 L-色氨酸的影响[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(3): 5-9.