

乳酸菌影响腌制芥菜亚硝酸盐含量的途径分析

李共国¹, 孙志栋^{2*}

(1. 浙江万里学院, 宁波 315100; 2. 宁波市农业科学研究院, 宁波 315040)

摘要: **目的** 对乳酸菌影响腌制芥菜亚硝酸盐含量进行途径分析。**方法** 采用3因素3水平的正交试验方法, 研究接种短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)、植物乳杆菌(*L. plantarum*)和干酪乳杆菌(*L. casei*)对腌制芥菜品质和亚硝酸盐含量的影响。**结果** 影响腌制芥菜亚硝酸盐和感官指标的主要因素均为短乳杆菌, 影响腌制芥菜总酸、氨基态氮含量的主要因素分别为植物乳杆菌和干酪乳杆菌。本试验的最佳工艺组合为, 鲜芥菜接种15 mL/kg 短乳杆菌+20 mL/kg 干酪乳杆菌, 腌制芥菜的氨基态氮含量为12.7 mg/kg, 比对照高10.4%, 亚硝酸盐含量为0.46 mg/kg, 比对照降低60.3%。**结论** 短乳杆菌是影响腌制芥菜亚硝酸盐含量的决策因子; 干酪乳杆菌构成了影响腌制芥菜亚硝酸盐含量波动的限制因子, 主要通过氨基态氮对亚硝酸盐含量产生较大的间接正向作用。

关键词: 乳酸菌; 芥菜; 正交试验; 亚硝酸盐

Path analysis of lactic acid bacteria affecting nitrite content in pickled mustard

LI Gong-Guo¹, SUN Zhi-Dong^{2*}

(1. Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China;
2. Ningbo Academy of Agricultural Sciences, Ningbo 315040, China)

ABSTRACT: Objective To analyze the path of lactic acid bacteria affecting nitrite content in pickled mustard. **Methods** The effects of inoculating *Lactobacillus brevis*, *L. plantarum* and *L. casei* on the quality and nitrite content of pickled mustard were studied by orthogonal test with 3 factors and 3 levels. **Results** *L. brevis* was the main factor affecting nitrite and sensory index of pickled mustard. *L. plantarum* and *L. casei* were the main factors affecting total acid and amino nitrogen content of pickled mustard, respectively. The optimum technological combination of this experiment was as follows: When inoculated with 15 mL/kg *L. brevis* and 20 mL/kg *L. casei*, the amino nitrogen content (12.7 mg/kg) of pickled mustard was 10.4% higher than that of the control, and the nitrite content (0.46 mg/kg) was 60.3% lower than that of the control. **Conclusion** *L. brevis* is the decision factor affecting nitrite content of pickled mustard. *L. casei* is the limiting factor affecting nitrite content fluctuation of pickled mustard, and it has a greater indirect positive effect on nitrite content through amino nitrogen.

KEY WORDS: lactic acid bacteria; pickled mustard; orthogonal test; nitrite

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFD0400405)、宁波市公益类项目(202002N3084)、余姚市科技计划项目(20191YYS030027)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Plan of China (2016YFD0400405), Ningbo Public Welfare Projects (202002N3084), Yuyao Science and Technology Plan (20191YYS030027)

*通信作者: 孙志栋, 教授级高级工程师, 主要研究方向为果蔬保鲜与加工技术。E-mail: zdsun.cn@163.com

*Corresponding author: SUN Zhi-Dong, Professor, Ningbo Academy of Agricultural Sciences, No.19. Ningbo Dehou Street, Ningbo 315040, China. E-mail: zdsun.cn@163.com

0 引言

芥菜具有独特的风味,集鲜、香、嫩的特点,深受人们的喜爱。芥菜独特的酸味和咸鲜味,常用于佐餐、做汤、炒菜中,能给食物增添特有的风味。但传统芥菜腌制工艺通常有营养流失、亚硝酸盐超标等问题,高浓度的亚硝酸盐会引起中毒甚至有致癌风险。乳酸菌(lactic acid bacteria)在食品加工工业中有增添食品风味、生物保鲜的作用。在蔬菜腌制发酵过程中,有许多微生物的参加,乳酸菌是优势菌,乳杆菌(*Lactobacillus*)和明串珠菌(*Leuconostoc*)能通过抑制肠杆菌等硝酸盐还原菌而降低亚硝酸盐含量^[1]。乳酸菌在食品加工工业中有增添食品风味、生物保鲜的作用^[2],乳酸菌拥有独特的酶系,在代谢过程中产生亚硝酸还原酶将亚硝酸盐还原成硝酸盐,降低芥菜中亚硝酸盐的含量,以及利用各类营养成分产生风味物质、抑菌性物质等保证腌菜的品质^[3]。张锐^[4]研究发现,芥菜在低盐腌制初期,主要的优势菌群有肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*),随着腌制环境 pH 值下降,优势菌群转为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)和短乳杆菌(*L. brevis*);在腌制保存后期起主导作用的微生物为植物乳杆菌和费斯莫尔德乳杆菌(*Lactobacillus versmoldensis*)。接种植物乳杆菌可明显缩短(萝卜)泡菜^[5]、传统酸菜^[6]的发酵时间,泡菜的色、香、味明显较好,并且显著降低其亚硝酸盐的含量。短乳杆菌有较强的去除亚硝酸盐能力^[7]。BEÁTA 等^[8]研究认为,干酪乳杆菌(*L. casei*)能降低牛奶样品中的硝酸盐和亚硝酸盐含量。接种混合乳酸菌比自然发酵氨基酸更丰富^[9]。本研究在芥菜腌制过程中接种短乳杆菌、植物乳杆菌和干酪乳杆菌 3 种乳酸菌,进行 3 因素 3 水平的正交试验,考察接种乳酸菌对腌制芥菜品质的影响,探究乳酸菌影响腌制芥菜亚硝酸盐含量的路径,以期获得优质、安全的腌制芥菜提供思路。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜芥菜由宁波铜钱桥食品菜业有限公司提供;植物乳杆菌、短乳杆菌、干酪乳杆菌由浙江大学何国庆教授实验室提供,宁波市农业科学研究院实验室制备;MRS 培养基(国药集团上海有限公司);食盐市售。

H1850R 离心机(湘仪离心机仪器有限公司);ST-756P 紫外分光光度计(上海光谱仪器有限公司);S23-2 磁力搅拌器(上海司乐仪器有限公司);DDSJ-308A 型电导率仪(上海仪电科学仪器股份有限公司)。

1.2 试验流程

接种乳酸菌

↓

鲜芥菜清洗→沥干→称重→加 8%食盐分层腌制→压实→2 d 后翻池→分装腌菜坛→定期检测指标

1.3 发酵剂制备

乳酸菌 MRS 固体培养基活化→扩大培养(在 MRS 液体培养基中于 37 °C 保温箱中培养 24 h)→制备成 10⁵ CFU/mL 乳酸菌发酵液。

1.4 正交试验设计

参考高世阳等^[10]乳酸菌接种方法应用于芥菜腌制发酵加工,结合前期单因素试验,设计如表 1 所示的乳酸菌接种浓度梯度。

表 1 正交试验因素和水平
Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	A 短乳杆菌 (/mL/kg 鲜菜)	B 植物乳杆菌 (/mL/kg 鲜菜)	C 干酪乳杆菌 (/mL/kg 鲜菜)
1	0	0	0
2	15	20	20
3	30	40	40

注:乳酸菌数量为 10⁷ CFU/mL。

1.5 测定方法

样品处理方法:在腌菜坛中取大小合适的芥菜 1 份,用食物匀浆机将其打碎,备用。总酸含量采用酸碱滴定法测定。氨基态氮含量采用甲醛法^[11]测定。亚硝酸盐含量采用盐酸奈乙二胺法^[12]测定。

盐度采用电导率法测定:称取 5 g 芥菜匀浆置于 100 mL 容量瓶中,加水至刻度,摇匀,静置 30 min。用蒸馏水校零后直接用电导率仪进行测定。感官指标的评定方法:从芥菜的色泽及形状、香味、质地及口感 3 方面进行综合评定,评分标准为 0~10 分。参考标准:外观有芥菜独特的颜色和光泽,形状饱满,能够引起食欲(满分 3 分);具有芥菜风味,无不良气味(满分 3 分);质地脆嫩、爽口,有咸鲜味(满分 4 分)。

1.6 数据处理

为分析乳酸菌对腌制芥菜亚硝酸盐含量的影响,以腌制芥菜亚硝酸盐含量为因变量(Y),以短乳杆菌(X_1)、植物乳杆菌(X_2)、干酪乳杆菌(X_3)添加浓度,以及腌制芥菜的氨基态氮(X_4)、总酸(X_5)和食盐(X_6)含量为自变量,进行逐步回归分析^[13]。对进入回归方程的因子,作进一步的通径分析,将自变量与因变量之间的相关系数分解为直接通径系数和间接通径系数,相关系数在数值上等于直接通径系

数与间接通径系数之和。通过比较通径系数绝对值的大小, 确定对因变量有显著影响的自变量的主次顺序^[14]。并通过计算决策系数(2×相关系数×直接作用系数-直接作用系数²), 把各自变量对应变量综合作用的决策系数进行排序, 以确定主要决策变量(决策系数为最大正值)和限制变量(决策系数为最小负值)^[15], 以上计算分析与方差分析均应用 DPS 数据处理系统完成。

2 结果与分析

2.1 正交试验结果与极差分析

为使更多的检测数据信息应用于正交试验结果分析, 正交试验结果中各指标均为试验期测定的平均值, 见表 2。经方差分析, 不同乳酸菌接种处理条件下各试验号芥菜坯的品质

指标之间均无显著差异。由极差值大小可知, 影响腌制芥菜氨基态氮含量的主要因素为干酪乳杆菌(C), 影响腌制芥菜酸度的主要因素为植物乳杆菌(B), 而影响腌制芥菜亚硝酸盐、食盐含量和感官评分的主要因素均为短乳杆菌(A)。

本试验中亚硝酸盐含量最低(0.46 mg/kg)的为试验 4 号, 同时, 氨基态氮含量与试验 6 号同为最高, 酸度最低, 感官评分仅次于试验 8 号; 试验 8 号的感官评分虽最高(8.7 分), 但与试验 4 号相比氨基态氮含量较低, 且亚硝酸盐含量也较高。因此, 本试验的最佳工艺组合为试验 4 号(A₂B₁C₂), 即接种短乳杆菌 15 mL/kg 鲜菜、干酪乳杆菌 20 mL/kg 鲜菜, 其氨基态氮含量(12.7 mg/kg)比对照(11.5 mg/kg)高 10.4%, 感官评分(8.5 分)比对照(7.0 分)高 21.4%, 亚硝酸盐含量(0.46 mg/kg)比对照(1.16 mg/kg)降低 60.3%。

表 2 正交试验结果与极差分析
Table 2 Orthogonal test results and range analysis

试验号	A	B	C	氨基态氮/(g/100 g)	总酸/(g/kg)	食盐/%	亚硝酸盐/(mg/kg)	感官评分
1	0	0	0	0.115	22.48	7.7	1.16	7.0
2	0	20	20	0.116	26.59	7.8	1.05	7.1
3	0	40	40	0.110	27.44	7.2	0.84	7.6
4	15	0	20	0.127	20.14	7.4	0.46	8.5
5	15	20	40	0.100	29.36	7.4	0.71	7.9
6	15	40	0	0.127	24.48	7.8	0.66	8.0
7	30	0	40	0.099	27.79	7.5	0.59	7.4
8	30	20	0	0.122	27.62	7.4	0.63	8.7
9	30	40	20	0.102	31.39	7.0	0.95	7.3
k ₁	0.114	0.114	0.121					
k ₂	0.118	0.113	0.115					
k ₃	0.108	0.113	0.103					
极差	0.010	0.001	0.018					
k ₁	25.50	23.47	24.86					
k ₂	24.66	27.86	26.04					
k ₃	28.93	27.77	28.19					
极差	4.27	4.39	3.33					
k ₁	1.02	0.70	0.78					
k ₂	0.61	0.84	0.86					
k ₃	0.72	0.71	0.71					
极差	0.41	0.14	0.14					
k ₁	7.57	7.53	7.63					
k ₂	7.53	7.53	7.40					
k ₃	7.30	7.33	7.37					
极差	0.27	0.20	0.26					
k ₁	7.23	7.55	7.65					
k ₂	8.13	7.52	7.37					
k ₃	7.80	7.30	7.35					
极差	0.90	0.25	0.30					

影响氨基态氮含量的主要因素为 C

影响酸度的主要因素为 B

影响亚硝酸盐含量的主要因素为 A

影响盐度的主要因素为 A

影响感官指标的主要因素为 A

2.2 乳酸菌影响腌制芥菜亚硝酸盐含量的通径分析

腌制芥菜亚硝酸盐含量与添加乳酸菌浓度以及菜坯品质指标之间的逐步多元回归方程通过了显著性检验(表3)。根据重要因子决策系数,影响腌制芥菜亚硝酸盐含量的决策因子是短乳杆菌,决策系数为0.192,而干酪乳杆菌是影响菜坯亚硝酸盐含量波动的限制因子,决策系数为-0.546。

为探究短乳杆菌和干酪乳杆菌对腌制芥菜亚硝酸盐含量的作用机制,作通径分析见表4。影响亚硝酸盐含量的最大直接作用因子为干酪乳杆菌,作用系数达-0.957,但其通过氨基态氮对亚硝酸盐含量产生较大的间接正向作用(作用系数0.654),致使干酪乳杆菌与亚硝酸盐含量之间的相关系数并非最大;而短乳杆菌对亚硝酸盐的直接作用系数虽较小(-0.874),但其通过氨基态氮对亚硝酸盐含量产生的间接正向作用最小(0.214)。因此,短乳杆菌与亚硝酸盐含量之间有最大的相关系数(绝对值)(-0.547),其综合作用(降亚硝酸盐)效果最大。由于短乳杆菌对亚硝酸盐含量的决策系数为最大正值(0.192),且与亚硝酸盐含量之间的偏相关系数 $[r(Y, X_{\text{短乳杆菌}}) = -0.927, P=0.008]$ 达到极显著水平。可见,短乳杆菌是影响亚硝酸盐含量的决策因子;而干酪乳杆菌对亚硝酸盐含量的决策系数为最大负值(-0.546),且与亚硝酸盐含量之间的偏相关系数 $[r(Y, X_{\text{氨基态氮}}) = -0.899, P=0.015]$ 也达到显著水平,构成了影响亚硝酸盐含量波动的限制因子。

2.3 氨基态氮和总酸含量的动态变化

氨基态氮和总酸含量是决定芥菜香、鲜风味的重要指标。试验1号没有接种乳酸菌,可视为本试验的对照组。由正交试验结果分析得出的2个较好的试验号(试验4号和6号)与对照(试验1号)作指标动态变化图,见图1。从腌制第12 d起接种组氨基态氮含量明显高于对照组。总酸含量的变化:腌制初期,接种组(特别是试验6号)的总酸含量上升速度比对照快。可见,接种乳酸菌可加速乳酸菌成为腌制系统中的优势菌,缩短发酵的成熟时间,能缩短发酵周期,但到腌制后期接种组总酸含量又有回落,特别是试验4号总酸含量比对照还低。张庆芳等^[7]认为短乳杆菌对亚硝酸盐的作用期,主要处于亚硝酸还原酶还原亚硝酸盐阶段,原因是短乳杆菌产酸能力相对较弱,加之酶还原亚硝酸盐产生氨的中和作用,使发酵液的酸度一直处于较低水平,这可能是试验4号总酸和亚硝酸盐含量均为最低的原因(表2)。用干酪乳杆菌和亚硝酸盐添加剂虽可用来降低牛奶中的可滴定酸含量^[7],但在本试验中干酪乳杆菌对降低腌制芥菜亚硝酸盐含量的效果并不明显,主要原因是干酪乳杆菌通过(降解)氨基态氮对亚硝酸盐含量产生了较大的间接正向作用(表4)。周光燕等^[4]接种5株乳酸菌菌株对萝卜泡菜进行发酵试验,也以接种干酪乳杆菌试验组的亚硝酸盐含量最高,这与本试验的结果一致。

表3 腌制芥菜亚硝酸盐含量与乳酸菌浓度及氨基态氮含量之间的多元逐步回归方程

Table 3 Multiple stepwise regression equation between nitrite content and lactic acid bacteria and quality indexes of pickled mustard

项目	样本数量	多元回归方程	重要因子及决策系数		R	P
			决策因子 (决策系数)	限制因子 (限制系数)		
亚硝酸盐	9	$Y=2.97-0.02X_1-0.01X_3-19.11X_4+0.02X_5$	短乳杆菌 (0.192)	干酪乳杆菌 (-0.546)	0.950	0.026

表4 乳酸菌影响腌制芥菜亚硝酸盐含量的通径分析结果

Table 4 Path analysis on the effect of lactic acid bacteria on nitrite content in pickled mustard

因子	相关系数	直接作用系数	间接作用系数之和	间接作用系数			
				→短乳杆菌	→干酪乳杆菌	→氨基态氮	→总酸
短乳杆菌	-0.547	-0.874	0.327		0.000	0.214	0.112
干酪乳杆菌	-0.193	-0.957	0.764	0.000		0.654	0.109
氨基态氮	-0.216	-0.913	0.697	0.205	0.686		-0.194
总酸	0.164	0.263	-0.099	-0.374	-0.398	0.673	

注: *决策系数: 短乳杆菌(0.192)>总酸(0.017)>氨基态氮(-0.439) > 干酪乳杆菌(-0.546)。

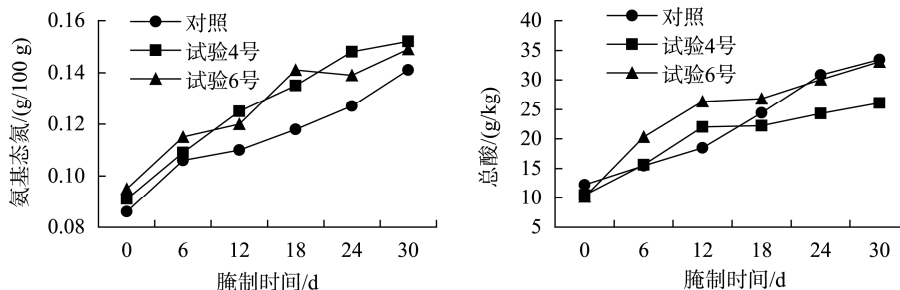


图1 芥菜腌制过程中氨基态氮和总酸含量的变化

Fig.1 Changes of amino nitrogen and total acid content in pickled mustard

3 结论

影响腌制芥菜亚硝酸盐含量和感官评分的主要因素均为短乳杆菌,植物乳杆菌是影响腌制芥菜酸度的主要因素,干酪乳杆菌是影响腌制芥菜氨基态氮含量的主要因素。通径分析结果表明,短乳杆菌是影响菜坯亚硝酸盐含量的决策因子,表现为直接以亚硝酸盐还原酶还原亚硝酸盐;干酪乳杆菌构成影响菜坯亚硝酸盐含量波动的限制因子,主要通过氨基态氮对亚硝酸盐含量产生较大的间接正向作用。本试验的最佳工艺组合为:鲜芥菜接种 15 mL/kg 短乳杆菌+20 mL/kg 干酪乳杆菌,腌制芥菜的氨基态氮含量(12.7 mg/kg)比对照高 10.4%,感官评分比对照高 21.4%,亚硝酸盐含量(0.46 mg/kg)比对照降低 60.3%。

参考文献

- ZHOU Q, ZANG S, ZHAO Z, *et al.* Dynamic changes of bacterial communities and nitrite character during northeastern Chinese sauerkraut fermentation [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2018, 27: 79–85.
- 饶瑜, 王猛, 蒋云璐, 等. 筛选用于四川泡菜生物保鲜的产细菌素乳酸菌(英文)[J]. *食品科学*, 2015, 36(3): 171–177.
RAO Y, WANG M, JIANG YL, *et al.* Isolation of bacteriocinogenic lactic acid bacteria for biopreservation of Chinese traditional sichuan pickle [J]. *Food Sci*, 2015, 36(3): 171–177.
- WU C, ZHENG J, HUANG J, *et al.* Reduced nitrite and biogenic amine concentrations and improved flavor components of Chinese sauerkraut via co-culture of *Lactobacillus plantarum* and *Zygosaccharomyces rouxii* [J]. *Ann Microbiol*, 2014, 64, 847–857.
- 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, 2011.
ZHANG R. Dynamic changes and functional analysis of microbial community in natural fermentation of low salt mustard [D]. Ningbo: Ningbo University, 2011.
- 周光燕, 张小平, 钟凯, 等. 乳酸菌对泡菜发酵过程中亚硝酸盐含量变化及泡菜品质的影响研究[J]. *西南农业学报*, 2006, 19(2): 290–293.
ZHOU GY, ZHANG XP, ZHONG K, *et al.* Effect of different lactic acid bacteria inoculation on the nitrite concentration and the quality of pickle [J]. *Southwest China J Agric Sci*, 2006, 19(2): 290–293.
- REN DY, CHEN P, LI WT, *et al.* Screening, mutagenesis of nitrite-degrading lactobacilli in Chinese traditional fermented sauerkraut and its application in the production of sauerkraut [J]. *J Food Saf*, 2016, 36(4): 474–481.
- 张庆芳, 迟乃玉, 郑学仿, 等. 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, *et al.* Study on removal of nitrite by *Lactobacillus brevis* [J]. *Microbiol China*, 2004, 31(2): 55–60.
- BEÁTA K, JANA K, MARIÁN K. Effects of nitrates and nitrites on *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus casei* dairy cultures [J]. *Eur Food Res Echnol*, 2000, 211: 136–140.
- 宋文华, 何佳, 袁江月, 等. 不同乳杆菌强化发酵红薯叶及其酸菜品质的研究[J]. *食品与机械*, 2020, 36(2): 193–198, 236.
SONG WH, HE J, YUAN JY, *et al.* Effects of different *Lactobacillus* on reinforce-fermented sweet potato leaves on the quality of its pickles [J]. *Food Mach*, 2020, 36(2): 193–198, 236.
- 高世阳, 孙志栋, 杜新勇, 等. 乳酸菌对低盐腌制榨菜理化性质及风味成分的影响[J]. *现代食品科技*, 2013, 29(11): 2663–2668.
GAO SY, SUN ZD, DU XY, *et al.* Physicochemical properties and flavor components of low-salt pickle inoculated with lactic acid bacteria [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2013, 29(11): 2663–2668.
- GB/T 5009. 39—2003 酱油卫生标准的分析方法[S].
GB/T 5009. 39—2003 Method for analysis of hygienic standard of soybean sauce [S].
- GB 5009. 33—2016 食品中亚硝酸盐和硝酸盐的测定[S].
GB 5009. 33—2016 Determination of nitrite and nitrate in foods [S].
- 唐启义, 冯明光. DPS 数据处理系统—实验设计、统计分析及数据挖掘 [M]. 北京: 科学出版社, 2002.
TANG QY, FENG MG. DPS data processing system—experimental design, statistical analysis and data mining [M]. Beijing: Science Press, 2002.
- 陈鹏, 叶辉, 刘建宏. 云南瑞丽桔小实蝇成虫种群数量变动及其影响

因子分析[J]. 生态学报, 2006, 26(9): 2801–2809.

CHEN P, YE H, LIU JH. Population dynamics of *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) along with analysis on the factors influencing the population in Ruili, Yunnan province [J]. Acta Ecol Sin, 2006, 26(9): 2801–2809.

- [15] 袁志发, 周静芋, 郭满才, 等. 决策系数—通径分析中的决策指标[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2001, 29(5): 131–133.

YUAN ZF, ZHOU JY, GUO MC, *et al.* Decision coefficient the decision index of path analysis [J]. J Northwest A F Univ (Nat Sci Ed), 2001, 29(5): 131–133.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



李共国, 硕士, 教授, 主要研究方向为农产品加工与贮藏。

E-mail: ligongguo@zwu.edu.cn



孙志栋, 教授级高级工程师, 主要研究方向为果蔬保鲜与加工技术。

E-mail: zdsun.cn@163.com