

# 腌制叶用芥菜发酵菌应用与发酵工艺优化

胡丹丹<sup>1,2</sup>, 陈山乔<sup>2</sup>, 孙志栋<sup>1,2\*</sup>, 吴祖芳<sup>3</sup>

(1. 宁波铜钱桥食品菜业有限公司, 浙江余姚 315400) (2. 宁波市农业科学研究院, 浙江宁波 315800)  
(3. 宁波大学食品与药学学院, 浙江宁波 315800)

**摘要:** 为获得品质优良的发酵叶用芥菜, 通过层次分析法、多因素试验对叶用芥菜的腌制发酵工艺进行了优化和实证研究。结果表明, 发酵菌株 L8 (*Lactobacillus brevis*)、L9 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 以及 Y9 酿酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 复合发酵, 最佳配比为 1:1:1, 在新鲜芥菜堆黄优化基础上, 再通过菌接种量、堆黄时间、食盐添加量进行三因素三水平正交试验, 得到叶用芥菜腌渍最佳发酵工艺条件为: 菌接种量体积分数 5%、堆黄时间 2 d、食盐添加量质量分数 5%。该条件下, 总酸质量分数为 0.85 g/100 g、氨基酸态氮质量分数为 0.203 g/100 g, 亚硝酸盐半衰期为 4.23 d 以及感官评分为 86.50 分, 总体可接受性好。该研究为进一步提供优质发酵蔬菜生产奠定了技术基础。

**关键词:** 叶用芥菜; 发酵菌株; 发酵; 工艺优化

文章编号: 1673-9078(2024)03-131-141

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.3.0177

## Application of Fermentation Bacteria and Optimization of Fermentation Technology for Pickled Leaf Mustard

HU Dandan<sup>1,2</sup>, CHEN Shanqiao<sup>2</sup>, SUN Zhidong<sup>1,2\*</sup>, WU Zufang<sup>3</sup>

(1. Ningbo Tongqianqiao Food and Vegetable Industry Co. Ltd., Yuyao 315400, China)

(2. Ningbo Academy of Agricultural Sciences, Ningbo 315800, China)

(3. College of Food and Pharmaceutical Sciences, Ningbo University, Ningbo 315800, China)

**Abstract:** To obtain high-quality fermented leaf mustard, the process of pickling and fermentation of leaf mustard was optimized and empirically studied by means of analytic hierarchy process and multi-factor analysis. The results showed that when *Lactobacillus brevis* L8, *Lactobacillus plantarum* L9, and *Saccharomyces cerevisiae* Y9 are jointly applied in fermentation, the optimal ratio equals 1:1:1. After the yellowing processing of fresh leaf mustard was optimized, a three-factor and three-level orthogonal test was carried out by modifying the amount of bacterial inoculation, the duration of yellowing, and the amount of salt added. The optimal fermentation process conditions for leaf mustard are as follows: a volume fraction of bacterial inoculation of 5%, a yellowing duration of 2 d, and a salt addition amount of 5%. Under these conditions, the total acid content was 0.85 g/100 g, and the amino acid nitrogen content was 0.203 g/100 g. The half-life of nitrite was 4.23 days, and the sensory score was 86.50 points. Overall, the quality is reasonably acceptable. This research has laid a

引文格式:

胡丹丹, 陈山乔, 孙志栋, 等. 腌制叶用芥菜发酵菌应用与发酵工艺优化[J]. 现代食品科技, 2024, 40(3): 131-141.

HU Dandan, CHEN Shanqiao, SUN Zhidong, et al. Application of fermentation bacteria and optimization of fermentation technology for pickled leaf mustard [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(3): 131-141.

收稿日期: 2023-02-19

基金项目: 宁波市重大专项 (2022Z176); 宁波市公益性科技计划项目 (2022S140); 国家重点研发计划课题 (2016YFD0400405)

作者简介: 胡丹丹 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: 865130254@qq.com

通讯作者: 孙志栋 (1962-), 男, 硕士, 教授级高工, 研究方向: 食品与生物工程, E-mail: zdsun.cn@163.com

technical foundation for further developing high-quality fermented vegetables.

**Key words:** leaf mustard; fermentation strain; fermentation; process optimization

腌菜是我国广泛消费的传统发酵蔬菜食品,与四川泡菜、酸菜和其他发酵蔬菜相比,腌菜生产工艺简单,通常是挑选优质的新鲜蔬菜,去除水分,加盐在常温下放置 4~7 d 或长达数月<sup>[1]</sup>。自然发酵蔬菜的品质在一定程度上取决于蔬菜表面的微生物,而其受生产方法、季节和地理区域的影响<sup>[2,3]</sup>。在蔬菜发酵过程中,将从自然发酵的蔬菜中分离到的乳酸菌是优势菌,如短乳杆菌<sup>[4]</sup>、戊糖乳杆菌<sup>[5]</sup>、植物乳杆菌<sup>[6]</sup>等,已在泡菜的大规模生产中控制发酵过程并提高最终产品质量<sup>[7]</sup>。目前对发酵蔬菜中优势菌的筛选和应用主要集中在乳酸菌上,它在发酵过程中能够进行同型和异型乳酸发酵,代谢糖类产生有机酸,分解蛋白质为氨基酸,抑制有害微生物的生长。据报道,从发酵食品(如腌菜)中分离出的乳酸菌对健康有多种益处,包括预防便秘、结肠炎、肝损伤和糖尿病<sup>[8-11]</sup>。发酵蔬菜中酵母菌与乳酸菌的利用率相比较低,然而酵母菌对高糖、高渗透压等环境具有较强的适应性,是能够发酵糖类物质产醇的一类微生物,同时乙醇还可以与有机酸相结合产生酯类芳香物质<sup>[12,13]</sup>,可以提高发酵蔬菜的风味。此外,酵母菌在发酵过程中产生的游离氨基酸和短肽类物质以及维生素复合物提高了发酵蔬菜的口感和营养价值<sup>[14]</sup>。

不同的发酵工艺和环境条件对发酵蔬菜的香气、风味和质地等都有一定的影响<sup>[15]</sup>,而缩短发酵周期、控制发酵质量是规模化生产腌制菜的重要环节。据报道,接种发酵剂可以有效提高产品质量<sup>[16]</sup>。Chi 等<sup>[17]</sup>从 135 株乳酸菌中筛选低盐泡菜发酵剂并应用到泡菜中,表明发酵剂发酵能够加速风味形成并缩短泡菜的成熟期。Du 等<sup>[18]</sup>将干酪乳杆菌接种至酸菜中,与自然发酵的酸菜相比,更快的降低了 pH 值和亚硝酸盐含量,提高了 Vc 含量,更受消费者青睐。于洋等<sup>[19]</sup>将从锦州小菜中筛选的两株酵母菌和实验室保藏的乳酸菌混合发酵,所得产品色泽、口感、风味俱佳。陆步诗等<sup>[20]</sup>认为多菌种混合发酵可以结合单菌的优点,提高腌制菜的品质。

本研究主要将前期从自然发酵的叶用芥菜中筛选出的乳酸菌:L8 短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*)、L9 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 和 Y9 酿酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*)<sup>[21]</sup>作为混合发

酵剂应用于叶用芥菜腌制中,对其发酵条件进行优化。与自然发酵芥菜相比,混菌发酵缩短芥菜发酵周期,降低了 pH 值和亚硝酸盐含量,提高了总酸和氨基酸态氮含量,以期为优良发酵菌株的挖掘和混合蔬菜发酵剂的开发提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

新鲜的叶用芥菜,购于浙江省宁波市鄞州区新紫云堂公司;食盐,购于当地市场;短乳杆菌 L8 (*Lactobacillus brevis* L8)、植物乳杆菌 L9 (*Lactobacillus plantarum* L9)、酿酒酵母菌 Y9 (*Saccharomyces cerevisiae* Y9) 均为前期从自然发酵的叶用芥菜中筛选出的发酵性能优良的菌株,为宁波市农业科学研究院实验室优选菌种<sup>[21]</sup>,中国典型培养物保藏中心(武汉)专利保护菌株,保藏号分别为 M2022271、M2022270、M2022269;MRS (*Demanrogosasharpe*) 液体培养基、改良马丁培养基,杭州微生物试剂有限公司。

SW-CJ-2D 型双人单面净化工作台,苏州净化设备有限公司;PHS-3C 型 pH 计,上海圣科仪器设备有限公司;DuaLEx 便携式植物多酚-叶绿素仪,法国 Force-A 公司;CM-700d 手持式分光测色计,日本柯尼卡美能达(Konica Minolta)公司;Spectramax190 型全波长酶标仪,美国美谷分子仪器(Molecular Devices)有限公司;LD2F-50L- II 型立式高压蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂;5804R 型高速大容量冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司;LD2F-50L- II 型立式高压蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂;九阳多功能搅拌机,佛山市秋实电器有限公司;腌制桶,购于当地市场。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 发酵菌株的确定

参考许明军<sup>[22]</sup>等利用层次分析法(Analytic Hierarchy Process, AHP)对发酵菌株的使用进行确定,主要是利用层次分析权数法,根据客观现实的判断,对各个层次的重要性给予定量表示,确定各个指标之间的权重系数,减小了各实验因素之间的

相互影响对实验结果的影响,使得优化结果具有稳定性。在层次分析模型中,第一层为总评价指标,第二层为详细指标。在本试验中,总评价指标且分别对应的详细指标为滋味(鲜味、酸味、咸味、甜味、苦味以及辛辣味)、气味(芥菜味、果香味、奶油味、酒香味以及腐烂味)和外观(黄绿色、暗灰色以及形态),并根据各因素对产品的作用进行权重设置,滋味:气味为3:2,滋味:外观为2:1,气味:外观为2:1,同时设置自然发酵、L8、L9、Y9、L8-L9、L8-Y9、L9-Y9和L8-L9-Y9这8组试验通过层次分析方法确定发酵菌株。因新鲜的芥菜生长和采收时间有限,而整棵发酵芥菜腌制周期比较长,为加快发酵实验进程,前期发酵菌株的确定、发酵菌株最佳配比的确定以及接下来两个单因素试验(菌接种量和食盐添加量)均采用芥菜切成短段来加速发酵试验进程,即将堆黄的芥菜切成短段处理,通过确定发酵菌株,来进行后续的发酵菌株最佳配比、单因素和正交试验。

### 1.2.2 发酵菌株最佳配比的确定

参考王巧<sup>[23]</sup>方法以确定发酵菌株的最佳配比,将3株菌种L8 (*Lactobacillus brevis* L8)、植物乳杆菌L9 (*Lactobacillus plantarum* L9)、酿酒酵母菌Y9 (*Saccharomyces cerevisiae* Y9)比例分别设计为1:1:1、1:1:2、1:2:1、2:1:1进行发酵,对其最优配比进行确定,每隔1d取一次样测定pH值及总酸,通过确定最佳配比,来进行后续的单因素和正交试验。

### 1.2.3 发酵工艺优化

#### 1.2.3.1 发酵前堆黄时间和温度优化

将新鲜芥菜置于10、15、25℃温度条件下,湿度大约在30%~40%,进行避光堆黄6d,每隔1d测定堆黄叶绿素(Chlorophyll,简称Chl)、黄酮(Flavonoids,简称Flav)、花青素(Anthocyanin,简称Anth)和色差(明暗度简称L、红绿色简称a、黄蓝色简称b),得到最佳堆黄温度和时间。堆黄的目的是降解蛋白质增加氨基酸含量,提高腌菜的鲜味。

#### 1.2.3.2 接种量和食盐添加量优化

根据混合菌株配比结果,选择3株菌种L8、L9、Y9的添加比例为1:1:1,菌种活化浓度为 $10^7$ CFU/mL,分别称取100g芥菜于150mL锥形瓶中,在芥菜中添加复合发酵菌(L8:L9:Y9为1:1:1,下同)的接种量体积分数分别为1%、4%、7%、

10%,置于常温下发酵5d。每隔1d取一次样测定pH值及总酸,得到最优的接种量;在最优接种量的基础上,在芥菜中添加质量分数分别为2%、5%、8%、11%的食盐,置于常温下发酵5d,每隔1d取一次样测定pH值及总酸,得到最优的食盐添加量。

#### 1.2.3.3 正交试验优化

根据发酵前芥菜堆黄温度试验结果,温度在一定范围内越高对发酵芥菜越有利,但从芥菜采收时间以及工业化生产角度考虑,我们将堆黄温度设置为25℃,再综合芥菜堆黄时间试验和芥菜切断发酵的试验结果,选择复合发酵菌接种量(简称菌接种量,下同)、堆黄时间以及食盐添加量为3个因素,选取完整的新鲜芥菜进行正交试验,每个因素设计3个水平,因素及水平见表1。

表1 正交试验因素与水平设计  
Table 1 Orthogonal test factors and level design

水平	因素		
	A(菌接种量)/%	B(堆黄时间)/d	C(食盐添加量)/%
1	3	0	5
2	4	2	6.5
3	5	4	8

### 1.3 理化指标测定

pH值:取发酵蔬菜的发酵液,采用PHS-3C型pH计直接测定<sup>[24]</sup>;

叶绿素、黄酮、花青素:取堆黄的蔬菜叶片,采用植物多酚-叶绿素仪直接无损测定;

色差分析:取发酵蔬菜的菜叶及根部,采用手持式分光测色计直接测定;

总酸:取发酵蔬菜的发酵液参考GB/T 12456-2021《食品中总酸的测定》,主要以乳酸进行计算;

氨基酸态氮:取发酵蔬菜的发酵液,参考GB/T 5009.235-2016《食品中氨基酸态氮的测定》;

亚硝酸盐含量及半衰期:取发酵蔬菜的发酵液,南京建成生物工程研究所亚硝酸盐测试盒测定。

### 1.4 感官评定

感官评定参考腌菜国标GB 2714-2015《酱腌菜》,发酵结束时,由8位经验丰富的感官评定员(4名男性,4名女性,22~33岁)对正交试验组发酵的叶用芥菜进行感官分析。气味、酸味占分各20分,滋味、外观占分分别为25分、35分,合计100分,具体评分标准见表2。

表 2 腌制叶用芥菜感官评定标准

Table 2 Sensory evaluation criterion of pickled leaf mustard

项目	标准	评分/分
气味	浓郁清香, 无异味	15~20
	香味小, 无异味	10~14
	有异味	0~9
酸味	酸度适中, 适口	15~20
	酸度一般, 较适口	10~14
	酸度大, 不适口	0~9
滋味	软硬适中, 口感好	20~25
	较软或较硬, 口感一般	10~29
	过软或过硬, 口感差	0~9
外观	黄绿色, 形态完整, 喜欢	25~35
	暗黄色, 形态基本完整, 一般	15~24
	暗灰色, 形态不完整不喜欢	0~14

## 1.5 数据处理

每组试验均进行 3 次生物学重复, 所有数据用 SPSS 26.0 软件进行差异显著性 ( $P < 0.05$ ) 分析, 采用 Origin Pro 9.0 作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵菌株的确定

将芥菜切成短段发酵 5 d 后, 依次进行感官评价, 并通过层次分析方法建立模型得到的结果如表 3 所示, 我们可知 L8-L9-Y9 菌种组合不仅在整体评分高于其他试验组, 且每个总评价指标滋味、气味以及外观三者评分均高于其他试验组。因此我们确定 L8-L9-Y9 为本试验的发酵菌株, 利用确定的发酵菌株进行后续发酵菌株比例的确定、单因素和正交试验。

表 3 层次分析法得到的权重系数结果 (%)

Table 3 Weight coefficient results obtained by analytic hierarchy process (%)

感官	权重	L8-L9-Y9	L8-L9	L9-Y9	L8-Y9	L8	L9	Y9	自然发酵
整体	100	17.7	16.0	14.1	13.3	11.4	11.3	9.5	6.6
滋味	45.5	8.1	7.6	6.4	5.9	5.3	5.0	3.8	3.3
鲜味	10.8	2.1	1.9	1.6	1.4	1.2	1.2	0.9	0.5
酸味	9.6	1.8	1.8	1.4	1.4	1.1	0.9	0.7	0.5
咸味	7.2	1.1	1.0	1.0	0.9	0.9	0.9	0.7	0.7
甜味	7.2	1.1	1.2	1.0	0.8	1.0	0.8	0.6	0.7
苦味	6.0	1.0	0.8	1.7	0.7	0.7	0.7	0.6	0.7
辛辣味	4.8	1.0	0.8	1.7	0.7	0.5	0.5	0.4	0.2
气味	34.7	6.4	5.4	5.1	4.8	3.7	4.0	3.6	1.6
芥菜味	9.2	2.0	1.3	1.5	1.5	0.8	0.8	1.0	0.3
果香味	8.2	1.4	1.2	1.2	1.0	1.0	1.0	0.9	0.5
奶油味	7.1	1.3	1.3	1.0	0.8	0.8	1.0	0.6	0.3
酒香味	5.1	0.9	0.8	0.7	0.8	0.6	0.6	0.6	0.3
腐烂味	5.1	0.9	0.9	0.7	0.7	0.6	0.7	0.6	0.1
外观	19.9	3.1	3.0	2.6	2.6	2.3	2.3	2.1	1.8
黄绿色	7.7	1.2	1.2	0.9	1.1	0.9	0.9	0.8	0.6
暗灰色	6.6	1.0	1.0	0.9	0.8	0.8	0.8	0.6	0.6
形态	5.5	0.8	0.7	0.7	0.7	0.6	0.6	0.6	0.5

### 2.2 发酵菌株最佳配比的确定

由图 1 可知, 将芥菜切成短段发酵 5 d, 添加 L8、L9、Y9 三株菌种。在整个发酵过程中, pH 值和总酸分别呈现下降和上升趋势, 但当 L8、L9、Y9 的添加比例为 1:1:1 时, pH 值最低, 为 3.17,

总酸质量分数最高, 为 1.07 g/100 g, 并且在发酵结束的时候, pH 值以及总酸含量均与其他三组有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。因此我们确定发酵菌株 L8、L9、Y9 的最佳配比为 1:1:1, 利用最佳配比结果进行后续单因素和正交试验。

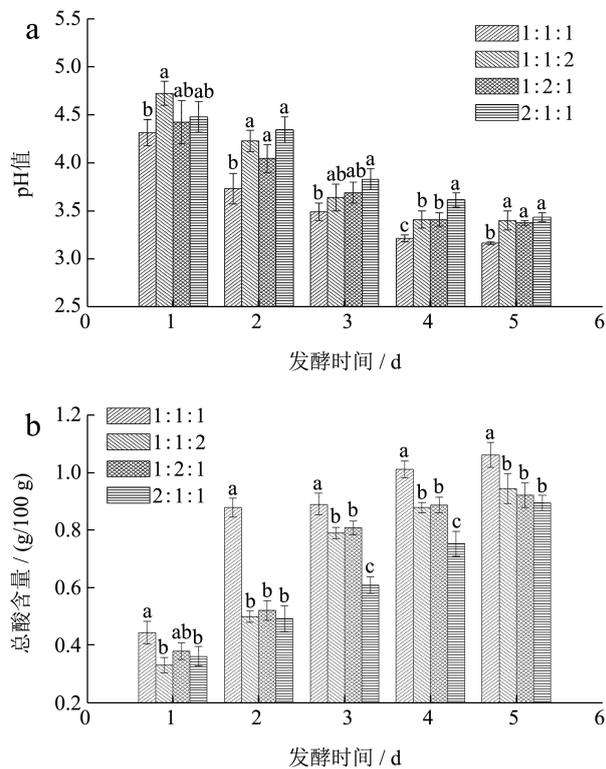


图 1 不同发酵菌株对比对芥菜未发酵过程中 pH 和总酸的影响

Fig.1 The effect of different fermentation strains on pH and total acid during the fermentation of mustard

注: 不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

### 2.3 发酵工艺优化

#### 2.3.1 发酵前堆黄时间和温度

从图 2 可知, 25 °C 条件下新鲜芥菜堆黄速度最快, 其次是 15 °C, 10 °C 条件下堆黄效果最差。这从图 3 可以看出, 在三个不同温度下, 叶绿素均处于下降状态且趋势相近, 从第 3 天开始 25 °C 的叶绿素降低速度显著高其他两者 (见图 3a), 三者 在 黄 酮 含 量 的 差 异 不 显 著 ( $P < 0.05$ ) (见图 3b), 而 25 °C 下花青素的积累显著高于 10 °C (见图 3c)。

从  $L$  指标上看, 芥菜在堆黄过程中明度升高, 即越来越“白”, 其中 25 °C 的更加明显 (见图 3d)。色度指标  $a$  表示红绿, + 表示偏红, - 表示偏绿, 25 °C 比 15 °C 在第 2~5 天绿色的褪去速度更快 (见图 3e);  $b$  表示黄蓝, + 表示偏黄, - 表示偏蓝, 25 °C 变黄的速度比 15 °C 的更快 (见图 3f)。

色素水平的变化和叶片颜色的变化反映了植物的生理状况。在新鲜芥菜堆黄过程中, 光线不足导致叶片不能进行正常的光合作用, 如果光照不足, 会导致植物细胞不能顺利分化, 且处于长期缺水

状态, 从而引起植株生长不良, 导致叶片黄化<sup>[25]</sup>, 也有研究表明叶绿素生物合成的正调控和叶绿素分解的负调控, 延迟了叶黄素的降解并加速了叶绿素的分解, 促进了叶片黄色的形成<sup>[26]</sup>, 同时叶绿素含量的下降受到花青素含量增加的影响<sup>[27]</sup>, 这与本试验结果相一致。从图 2 可以看出温度在一定范围内越高新鲜芥菜黄化越快, 但从芥菜收获时间以及工业标准化生产角度, 综合考虑选择在 25 °C 将芥菜进行堆黄, 又因 25 °C 条件下堆黄的芥菜从 4 d 以后腐烂的较多, 考虑到发酵前芥菜的利用率, 最终正交试验选取 0、2 及 4 d 三水平的堆黄时间进一步优化。



图 2 不同温度芥菜堆黄照片

Fig.2 Photographs of leaf mustard pile yellow at different temperatures

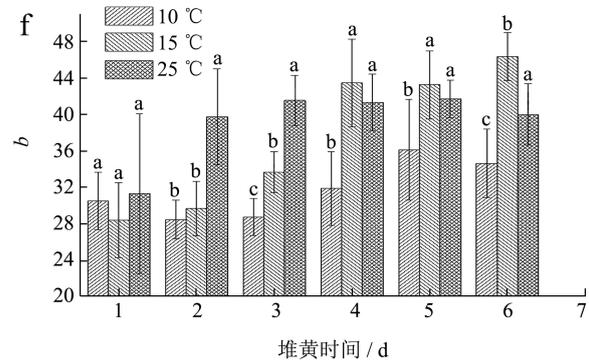
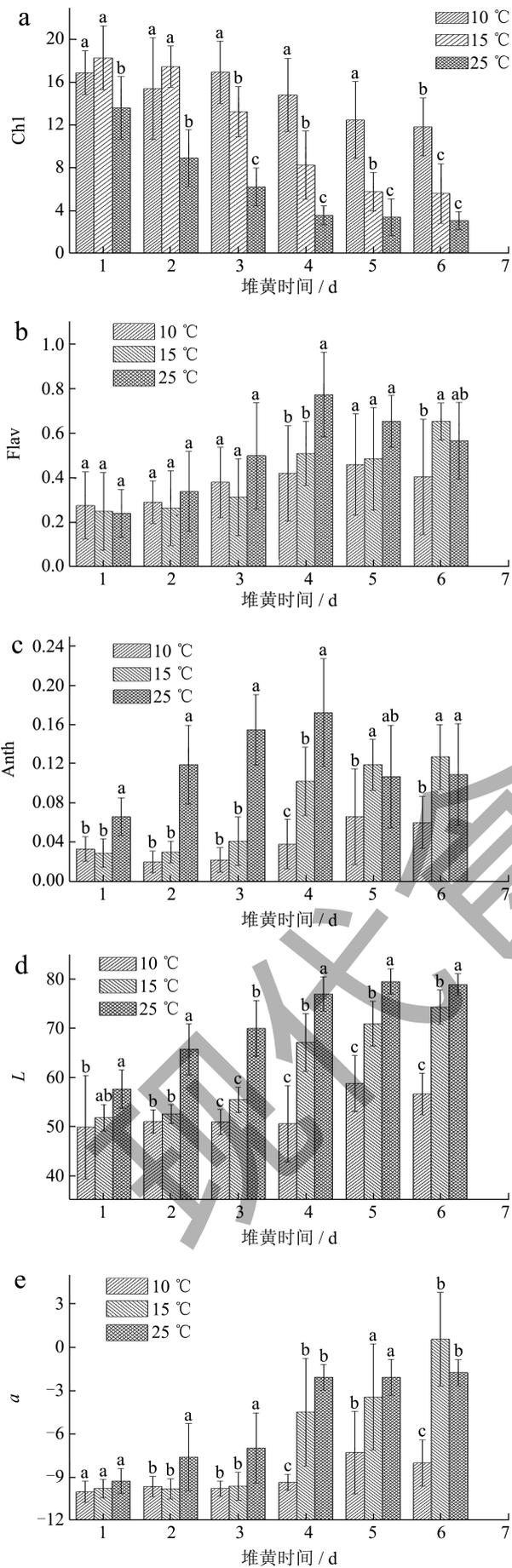


图3 不同温度堆黄芥菜堆黄叶绿素 (Chl)、黄酮 (Flav)、花青素 (Anth)、色差 (*L*, *a*, *b*) 指标变化  
Fig.3 Changes of yellow chlorophyll (Chl), flavonoids (Flav), anthocyanins (Anth), and Chromatic aberration (*L*, *a*, *b*) indexes of yellow mustard piles at different temperatures

注: 不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。图 4、5 同。

### 2.3.2 菌接种量

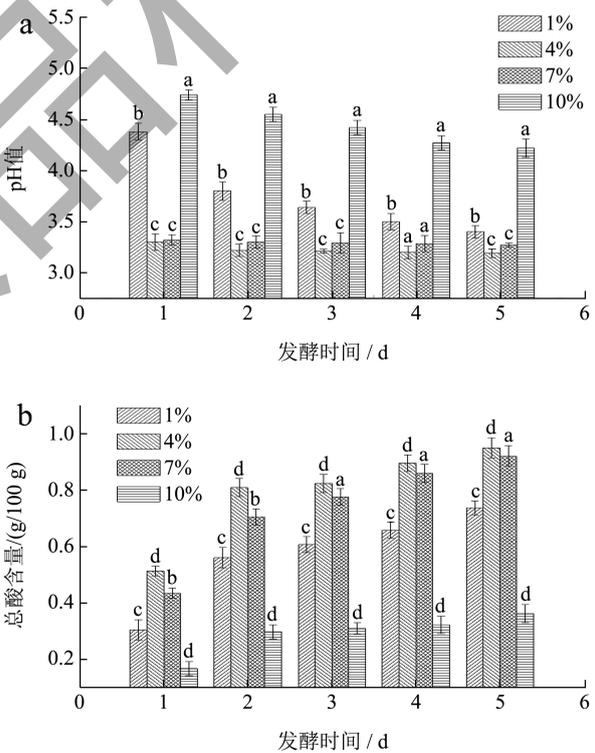


图4 发酵菌的接种量对芥菜未发酵过程中 pH 和总酸的影响  
Fig.4 The influence of the inoculum of fermenting bacteria on the pH and total acid during the fermentation of mustard

蔬菜发酵过程中, 发酵条件的控制直接影响发酵成品的口感、品质与风味。由图 4 可知, 随着时间的延长, 各组的 pH 不断降低, 最终达到稳定, 各组的产酸量不断增加, 综合两图可知, 接种量过高或过低均不利于产酸。复合发酵菌 (L8:L9:Y9 为

1:1:1) 的接种量质量分数为 4%、7% 时均有利于产酸, 但 4% 接种量与 7% 接种量在总酸含量上差异达到显著水平 ( $P < 0.05$ ), 所以菌的接种量质量分数 4% 为最佳单因素条件。因此在后续正交试验时, 选取质量分数 3%、4% 以及 5% 三水平的 (复合发酵) 菌接种量进一步优化。

### 2.3.3 食盐添加量

由图 5 可知, 随着发酵时间的增加, 各组的 pH 不断降低, 产酸量不断增加, 总体趋势大致相同。发酵菌只有在正常的渗透压条件下, 才能很好的生长, 食盐浓度过高或过低均不利于菌株的生长, 食盐添加量质量分数为 5% 和 8% 时, 芥菜末的 pH 分别为 3.17 和 3.19, 总酸质量浓度分别为 1.04 g/100 g、1.002 g/100 g。因此在后续正交试验时, 选取质量分数 5%、6.5% 以及 8% 三水平的食盐添加量进一步优化。

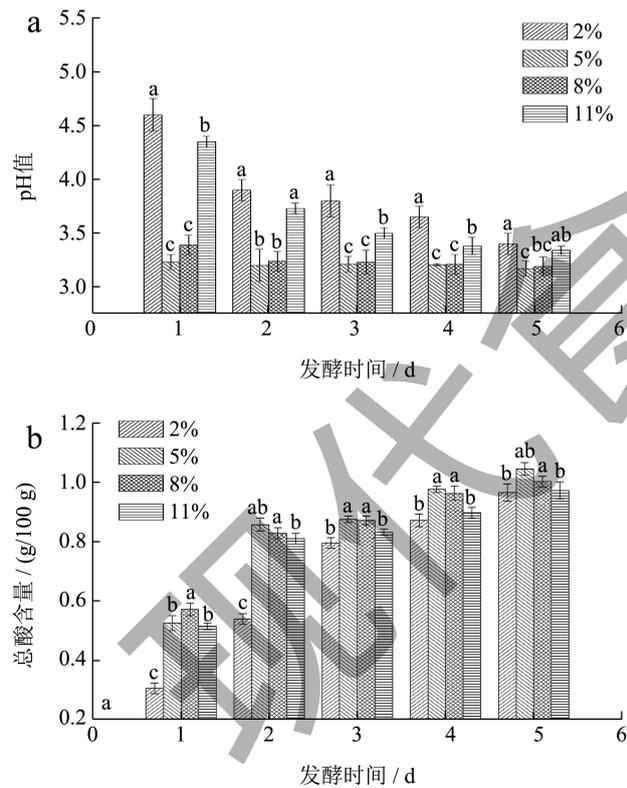


图 5 盐浓度对芥菜末发酵过程中 pH 和总酸的影响

Fig.5 The effect of salt concentration on pH and total acid during the fermentation of mustard

### 2.4 正交试验优化结果分析

通过正交试验优化, 得到了不同条件下腌制芥菜成品的总酸、氨基酸态氮以及亚硝酸盐含量, 并进行极差分析。通过比较可以确定 3 个因素的影响

顺序及最佳组合, 正交优化试验结果及极差分析见表 4。同时对 9 组正交试验组合整个发酵过程中的总酸、氨基酸态氮以及亚硝酸盐进行测定, 观察发酵过程中的动态变化, 结果见图 6。

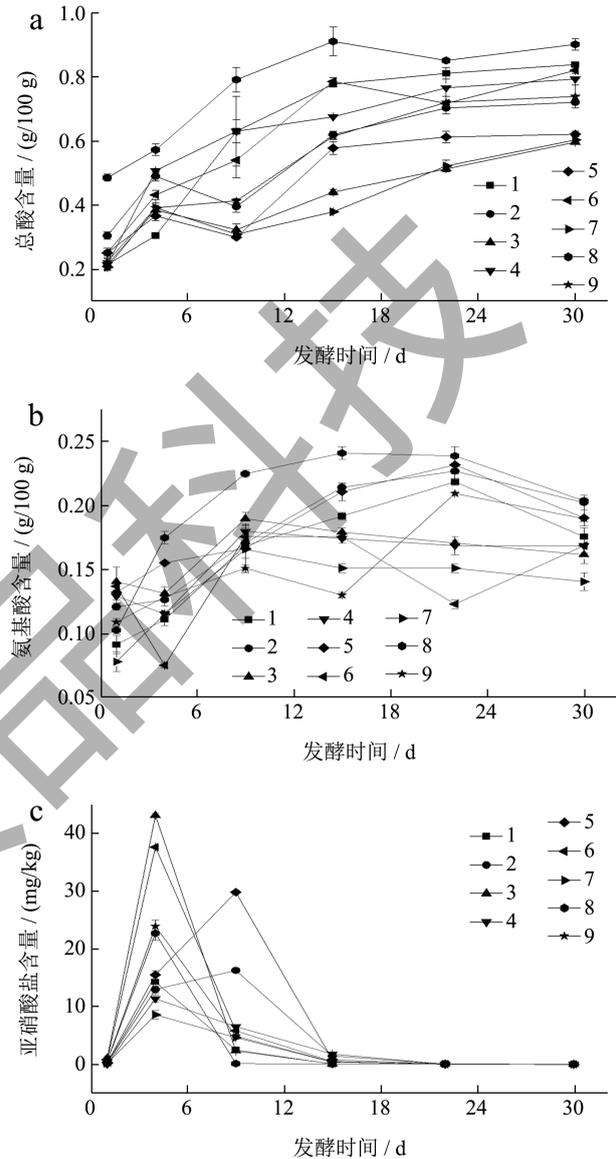


图 6 芥菜发酵过程中总酸 (a)、氨基酸态氮 (b)、亚硝酸盐 (c) 的变化

Fig.6 Changes of total acid (a), amino nitrogen (b) and nitrite (c) during the fermentation of mustard

由表 4 可以看出, 各因子水平间的极差值可以得出影响总酸含量三个因素顺序为 C>B>A, 即影响总酸含量的最大因素为食盐添加量, 其次是堆黄时间, 最后是菌接种量。结合方差分析表 5, 得出三者对总酸含量的影响并不显著 ( $P > 0.05$ )。影响氨基酸态氮含量三个因素重要性为 B>C>A, 即影响氨基酸态氮含量的最大因素是堆黄时

间, 再是食盐添加量和菌接种量, 结合方差分析表 5, 得出三者对氨基酸态氮含量的影响并不显著 ( $P>0.05$ )。而亚硝酸盐半衰期和感官指标的极差大小顺序一致, 说明影响两者的因子重要性均为  $B>A>C$ , 即影响亚硝酸盐半衰期和感官评分的最大因素均是堆黄时间, 其次是菌接种量, 最后是食盐添加量。结合方差分析表 6, 菌接种量以及食盐添加量两者相对亚硝酸盐半衰期和感官评分的影响都不具有显著性差异 ( $P>0.05$ ), 而堆黄时间与亚硝酸盐半衰期达到差异显著性水平 ( $P<0.05$ ), 由此可以得出堆黄时间是影响亚硝酸盐半衰期最

主要的因素。

综合表 4~6, (复合发酵) 菌接种量根据感官评分选择 A3, 堆黄时间根据亚硝酸盐半衰期和感官评分选择 B2, 影响总酸含量最主要的因素是食盐添加量, 根据总酸含量选择 C1, 所以得到的产品最佳配方是 A3B2C1, 而正交试验中总酸和氨基酸态氮含量最高的也是 A3B2C1, 且亚硝酸半衰期和感官评分也具有很大的优势。因此, 该配方为发酵叶用芥菜的最佳工艺, 即以发酵蔬菜质量为基准, (复合发酵) 菌接种量体积分数为 5%, 堆黄时间为 2 d, 食盐添加量质量分数为 5%。

表 4 正交试验结果与极差分析  
Table 4 Orthogonal test results and range analysis

试验号	A(菌接种量)/%	B(堆黄时间)/d	C(食盐添加量)/%	总酸/(g/100 g)	氨基酸态氮/(g/100 g)	亚硝酸盐半衰期/d	感官评分/分
1	1(3)	1(0)	1(5)	0.81	0.18	5.62	64.94
2	1	2(2)	2(6.5)	0.702	0.202	7.14	71.21
3	1	3(4)	3(8)	0.51	0.16	3.45	78.88
4	2(4)	1	2	0.77	0.17	9.09	70.69
5	2	2	3	0.62	0.19	6.25	71.63
6	2	3	1	0.72	0.19	4.82	79.56
7	3(5)	1	3	0.52	0.14	5.90	75.19
8	3	2	1	0.85	0.203	4.23	86.50
9	3	3	2	0.72	0.19	4.18	85.44
<hr/>							
$K_1$	0.674	0.70	0.79				
$K_2$	0.70	0.72	0.73				
$K_3$	0.70	0.65	0.55				
$R$	0.03	0.07	0.24				
<hr/>							
$K_1$	0.18	0.16	0.17				
$K_2$	0.18	0.2	0.19				
$K_3$	0.18	0.16	0.16				
$R'$	0	0.04	0.03				
<hr/>							
$K_1$	5.40	6.87	4.89				
$K_2$	6.72	5.87	6.80				
$K_3$	4.77	4.15	5.20				
$R''$	1.95	2.72	1.91				
<hr/>							
$K_1$	71.68	70.27	75.00				
$K_2$	73.96	76.45	77.00				
$K_3$	82.38	81.27	75.23				
$R'''$	10.70	11.00	2.00				

影响总酸质量分数因子重要性为  $C>B>A$

影响氨基酸态氮质量分数的因子重要性为  $B>C>A$

影响亚硝酸盐半衰期的因子重要性为  $B>A>C$

影响感官指标因子重要性为  $B>A>C$

注:  $K_1\sim K_3$  分别为各因子 1~3 水平所对应指标平均值,  $R$  为最大值与最小值之差。

表 5 腌制加工因子影响芥菜总酸和氨基酸态氮的方差分析

Table 5 Variance analysis of influence of saline processing factors on the mustard total acid and amino nitrogen concentrations

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A(菌接种量)	0.001 (0.000 024)	2(2)	0.001 (0.000 012)	0.131(0.074)	0.884(0.93)
B(堆黄时间)	0.009(0.002)	2(2)	0.004(0.001)	0.968(6.78)	0.508(0.13)
C(食盐添加量)	0.093(0.001)	2(2)	0.046(0)	10.400(2.69)	0.088(0.27)
误差	0.009(0)	2(9)	0.004(0)		
总变异	4.409(0.29)				

表 6 腌制加工因子影响芥菜亚硝酸盐半衰期和感官评分的方差分析

Table 6 Variance analysis of influence of saline processing factors on the mustard nitrite half-life and sensory score concentrations

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A(菌接种量)	5.94(190.54)	2(2)	3.0(95.27)	10.72(11.27)	0.085(0.16)
B(堆黄时间)	11.36(183.04)	2(2)	5.68(91.52)	20.52(17.15)	0.046*(0.16)
C(食盐添加量)	6.33(4.91)	2(2)	3.16(2.45)	11.43(0.089)	0.08(0.88)
误差	0.55(35.055)	9(9)	0.28(17.53)		
总变异	309.57(52 403.63)				

注: \* 为  $P < 0.05$  时差异显著。

## 2.5 不同正交组合发酵中总酸、氨基酸态氮、亚硝酸盐含量的动态变化

产酸能力的强与弱是评判菌种发酵活力的重要指标,也是影响腌制菜品质的一个重要因素。一般认为,当发酵蔬菜的总酸质量分数上升至 0.3% 以上,生蔬菜的味道将消失,腌制的产品也已经可以食用<sup>[28]</sup>,且 GB/T 19858-2005《涪陵榨菜》规定发酵蔬菜总酸质量分数 $\leq 1.5$  g/100 g。所以在符合国家标准条件下,总酸质量分数越高,腌制菜的品质越好。从图 6a 可知,所有试验组随着发酵的进行,总酸质量分数总体均呈上升状态,这与 Xiong<sup>[6]</sup>、Yan 等<sup>[29]</sup>研究结果相似。但当食盐质量分数最低为 5% 时,总酸质量分数上升的最快且最高,如处理 8 号达到 0.85 g/100 g,这可能是食盐添加量影响乳酸菌的产酸能力,盐浓度过高抑制乳酸菌生长,盐浓度过低抑制不了有害微生物生长,从而使得乳酸菌的产酸能力受到影响。

氨基酸是发酵蔬菜重要的营养成分,氨基酸含量的高低代表着发酵蔬菜营养成分多少,且多种氨基酸会给发酵。从图 6b 可知,在发酵过程中,我们可以看出九组不同处理的氨基酸态氮的变化上升及下降的趋势有一定的差异,如处理 8 氨基酸态氮含量上升的最快且含量最高,质量分数达到 0.203 g/100 g。

亚硝酸盐含量是评价发酵蔬菜和腌制蔬菜安全性的重要指标,国家及地方标准均对食品中亚硝酸盐含量有着严格的要求。从图 6c 可知,所有试验处理组在发酵过程中,均会出现亚硝峰,但随着有机酸的不断积累,亚硝峰也逐渐消失,并且在 9 d 或之后亚硝酸盐含量迅速降低并基本保持稳定,但堆黄两天亚硝峰出现的较迟,如正交试验处理 2 号、5 号两组亚硝峰在第 9 天出现,其他组均在第 4 天出现亚硝峰;堆黄 4 d,亚硝峰出现早且含量高,但是降解率也较高,其中处理 3 号在第 4~9 天时,降解率达到了 94.3%,可知堆黄时间与亚硝酸盐以及亚硝峰的出现有着一定的联系。

## 3 结论

本研究通过层次分析法确定发酵菌株 L8 短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*)、L9 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 以及 Y9 酿酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 为复合发酵,且在 L8、L9、Y9 复合发酵、发酵菌株最佳配比为 1:1:1。短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*) 在新鲜芥菜堆黄温度为 25 °C 条件下,通过菌接种量、堆黄时间、食盐添加量进行三因素三水平正交试验,并对不同正交组合整个发酵过程中的总酸、氨基酸态氮含量以及亚硝酸盐含量进行了动态研究,得到影响腌制芥菜

的总酸含量的主要因素是食盐添加量,影响氨基酸态氮含量、亚硝酸盐半衰期以及感官评分的主要因素均是堆黄时间,得到叶用芥菜最佳发酵工艺条件为:复合发酵菌(L8:L9:Y9比例1:1:1)接种量体积分数5%、堆黄时间2d、食盐添加量质量分数5%,该条件下,总酸质量分数为0.85 g/100 g、氨基酸态氮质量分数为0.203 g/100 g、亚硝酸盐半衰期为4.23 d以及感官评分为86.50分,总体可接受性好,易受消费者青睐。本研究结果解决了因自然发酵导致发酵周期长、质量不一致和口味单一等问题,pH值、总酸表明其产酸能力强,氨基酸态氮含量增加丰富了食用营养与滋味含量,亚硝峰降低提高了食用安全性,为发酵蔬菜菌种的选择以及工艺提供了一定的基础。

### 参考文献

- [1] LIU Z G, LI J Y, HUANG T, et al. Comparison of the bacterial communities in home-made Nanfeng yancai with and without salt [J]. Food Research International, 2019, 125(11): 1-12.
- [2] LIU Z G, ZHEN P, HUANG T, et al. Comparison of bacterial diversity in traditionally homemade paocai and Chinese spicy cabbage [J]. Food Microbiology, 2019, 83(10): 141-149.
- [3] LIANG H P, CHEN H Y, JI C F, et al. Dynamic and functional characteristics of predominant species in industrial paocai as revealed by combined DGGE and metagenomic sequencing [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9(5): 1-10.
- [4] XIA Y J, LIU X F, WANG G Q, et al. Characterization and selection of *Lactobacillus brevis* starter for nitrite degradation of Chinese pickle [J]. Food Control, 2017, 78(8): 126-131.
- [5] LIU Y, XIE X X, IBRAHIM S A, et al. Characterization of *Lactobacillus pentosus* as a starter culture for the fermentation of edible oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.) [J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 68(5): 21-26.
- [6] XIONG T, GUAN Q Q, SONG S H, et al. Dynamic changes of lactic acid bacteria flora during Chinese sauerkraut fermentation [J]. Food Control, 2012, 26(1): 178-181.
- [7] XIANG W L, ZHANG N D, LU Y, et al. Effect of *Weissella cibaria* co-inoculation on the quality of Sichuan pickle fermented by *Lactobacillus plantarum* [J]. LWT, 2020, 121(3): 1-13.
- [8] YU Q, SONG J L, YI R K, et al. Preventive effects of *Lactobacillus plantarum* YS4 on constipation induced by activated carbon in mice [J]. Applied Sciences, 2018, 8(3): 1-17.
- [9] CHEN X, ZHAO X, WANG H, et al. Prevent effects of *Lactobacillus fermentum* HY01 on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice [J]. Nutrients, 2017, 9(6): 1-12.
- [10] CHEN X Y, TAN F, YI R K, et al. Effects of *Lactobacillus* on mice with diabetes induced by high-fat diet with streptozotocin [J]. Applied Sciences, 2018, 8(8): 1-14.
- [11] CHEN X Y, ZHANG J, YI R K, et al. Hepatoprotective effects of *Lactobacillus* on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(8): 1-12.
- [12] GARDNE N J, SAVARD T, OBERMEIER P, et al. Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage, beet and onion vegetable mixtures [J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 64(3): 261-275.
- [13] 夏姣.四川泡菜发酵过程中乳酸菌的动态变化及其对泡菜风味的影响[D].雅安:四川农业大学,2014.
- [14] 李默,曹凯欣,任广钰,等.自然发酵锦州小菜中优良酵母菌的筛选及鉴定[J].中国食品学报:2021,21(4):277-285.
- [15] XIAO M Y, XIONG T, ZHENG P, et al. Correlation between microbiota and flavours in fermentation of Chinese Sichuan Paocai [J]. Food Research International (Ottawa, Ont.), 2018, 114(12): 123-132.
- [16] WOUTERS D, GROSU-TUDOR S, ZAMFIR M, et al. Applicability of *Lactobacillus plantarum* IMDO 788 as a starter culture to control vegetable fermentations [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2013, 93(13): 3352-3361.
- [17] CHI Y L, ZHANG Q S, CHEN G, et al. Survival of *Escherichia coli* O157:H7, nitrite content and sensory acceptance of low-salt Chinese paocai fermented by screened lactic acid bacteria [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2016, 51(10): 2178-2184.
- [18] DU R P, SONG G, ZHAO D, et al. *Lactobacillus casei* starter culture improves vitamin content, increases acidity and decreases nitrite concentration during sauerkraut fermentation [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2018, 53(8): 1-8.
- [19] 于洋.锦州小菜中优良酵母菌的筛选及应用[D].沈阳:沈阳农业大学,2018.
- [20] 陆步诗,李新社,李健.多菌种混合发酵生产百合泡菜工艺初探[J].邵阳学院学报(自然科学版),2005,2(2):111-113.
- [21] 胡丹丹,吴祖芳,孙志栋,等.腌制叶用芥菜发酵菌分离鉴定及应用研究[J].核农学报,2022,36(6):1174-1182
- [22] 许明君,邓辰辰,曹苗苗,等.基于层次分析法的多指标综合评价优选复方中药保健食品提取方法[J].食品与发酵科技,2019,55(5): 55-59.

- [23] 王巧.复合菌预处理秸秆产沼气试验研究[D].西安:西安工程大学,2013.
- [24] 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
- [25] 李淑阁.植物叶片变黄的原因及对策[J].中国园艺文摘, 2009,25(1):92.
- [26] WU S J, GUO Y S, ADIL M F, et al. Comparative proteomic analysis by iTRAQ reveals that plastid pigment metabolism contributes to leaf color changes in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during curing [J].International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(7): 1-20.
- [27] VERENA J L, INGO E. Relationship between leaf optical properties, chlorophyll fluorescence and pigment changes in senescing acer saccharum leaves [J].Tree Physiology, 2016, 36(6): 694-711.
- [28] ZHANG Q S, CHEN G, SHEN W X, et al. Microbial safety and sensory quality of instant low-salt Chinese paocai [J]. Food Control, 2016, 59(1): 575-580.
- [29] YAN P M, XUE W T, TAN S S, et al. Effect of inoculating lactic acid bacteria starter cultures on the nitrite concentration of fermenting Chinese paocai [J]. Food Control, 2008, 19(1): 50-55.

现代食品科技