

抗氧化活性乳酸菌的分离鉴定及其在泡菜发酵中的应用

梁小波, 王智能, 杨伟伟, 郑露华

(昆明理工大学食品安全研究院, 云南昆明 650500)

摘要: 本研究从农家自制泡椒中分离并鉴定出三株具有抗氧化活性的乳酸菌。并用这几株乳酸菌组合后发酵泡菜, 同时设立自然发酵组作对照, 分别测定了乳酸菌菌株和 1~5 d 发酵泡菜的抗氧化活性, 以揭示人工接种抗氧化活性乳酸菌在泡菜发酵中的作用。结果发现添加乳酸菌的泡菜发酵周期比自然发酵泡菜缩短 2 d。泡菜发酵实验表明添加乳酸菌发酵泡菜的抗氧化活性远大于自然发酵泡菜的抗氧化活性。到发酵后期, 三个发酵组中除 DPPH 自由基清除率无显著差异外($p < 0.05$), 自然发酵组的还原力、羟基自由基和 ABTs 自由基清除率显著低于人工接种组, 其中羟基自由基清除率的差异最为显著, 均大于自然组清除率 28.41% 的两倍以上。通过感官品尝实验对泡菜的风味进行初步评估, 表明添加乳酸菌发酵泡菜的风味较自然发酵更佳。进一步通过 GC-MS 对泡菜中的香气成分进行初步分析, 结果证明接种乳酸菌发酵泡菜的风味成分中烷烃和酯类比自然发酵泡菜中更为丰富, 二者的总比例在所测峰面积比例中均高出自然组 27%~30%。本研究为泡菜的健康发酵和泡菜风味的优化提供了理论依据。

关键词: 乳酸菌; 分离鉴定; 泡菜发酵; 抗氧化活性; 风味成分分析

文章编号: 1673-9078(2016)12-225-233

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.12.035

Isolation and Identification of Antioxidant Lactic Acid Bacteria and its Application in Pickle Fermentation

LIANG Xiao-bo, WANG Zhi-neng, YANG Wei-wei, ZHENG Lu-hua

(Yunnan Institute of Food Safety, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract: Three strains of lactic acid bacteria with antioxidant activity were isolated and identified from homemade chili pickle. These strains were used in pickle fermentation and compared with natural fermentation. The antioxidant activities of the bacterial strains and vegetables pickled for 1~5 d were determined in order to reveal the effect of vegetable pickling using artificial inoculation of lactic acid bacteria. Results showed that the optimum pickling period of vegetables with added lactic acid bacteria was two days shorter than that of naturally fermented vegetables. The antioxidant activity of vegetables pickled by the addition of lactic acid bacteria was far greater than that of vegetables pickled naturally. At late stages of fermentation, there was no significant difference in DPPH free radical scavenging between the three fermentation groups ($p < 0.05$). The reducing power, hydroxyl radical, and ABTs free radical scavenging rates of the naturally fermented group was significantly lower than that of the artificially inoculated group. Among these, the difference in the scavenging rate of hydroxyl free radicals was the most significant at 28.41%, a greater than twofold increase compared to the naturally fermented group. Preliminary sensory evaluation experiments of the taste of the pickled vegetables showed that those pickled with added lactic acid bacteria had a better taste and flavor compared to the naturally fermented pickled vegetables. Furthermore, preliminary GC-MS analysis of aromatic components of the pickled vegetables was conducted. Results confirmed that the alkane and ester flavor components of vegetables pickled with lactic acid bacteria were more abundant than those of naturally pickled vegetables. Comparing the total peak area ratio measured between the two components showed an increase of 27~30% over the naturally pickled group. This study provides a theoretical basis for the healthy pickling of foods and improvement of their flavor.

Key words: lactic acid bacteria; isolation and identification; pickling fermentation; antioxidant activity; flavor component analysis

收稿日期: 2015-12-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31360022); 昆明理工大学科学研究基金项目(14118648)

作者简介: 梁小波(1974-), 男, 博士, 副教授, 主要从事微生物遗传学与食品微生物学研究

泡菜在世界范围内尤其是亚洲人群的饮食中广受欢迎。与新鲜蔬菜相比,泡菜能刺激食欲、改善肠道菌群与通便等^[1]。当前常见泡菜主要为自然发酵泡菜,其发酵周期长、品质不稳定、受季节变化大、风味不佳及保质期短等缺点。随着食品工业的发展,使用纯种微生物接种发酵泡菜可以很好的克服这些缺陷,成为泡菜发展的趋势,乳酸菌就是最具潜力,最常见的用于发酵泡菜的益生菌。

乳酸菌发酵食品及其代谢产物的有益属性已成为当下全球研究的热点^[2]。在传统的发酵食品中,乳酸菌起着不可替代的作用,它能赋予发酵食品优良的风味及特殊性质。一些乳酸菌如乳酸杆菌属、乳酸乳球菌属和肠膜明串珠菌属都被广泛应用于发酵食品中,因为它们有着很多益生作用,如抗菌活性、免疫调节能力、抗肿瘤活性和调节肠道菌群平衡等,这些乳酸菌除了有着优良的益生菌属性外也有着较高安全性^[3]。

研究表明,乳酸菌发酵不仅提高蔬菜的营养状况,降低亚硝酸盐等有害物质,改善酸味和风味,同时由于抗菌物质的产生,延长了发酵制品的保存时间。普遍研究认为,一些乳酸菌的代谢产物能减少动物及人在摄食过程中活性氧成分的累积,因而有着抗氧化活性^[4],以植物乳杆菌 P-8 为例,首先该菌具有优异的耐受胃酸、肠液和胆盐能力,其在 pH 2.50 的人工胃液中消化 3 h 后继续在 pH 8.00 的人工肠液中消化 12 h,其存活率仍在 94.87%;动物实验还表明,高脂血症大鼠摄食植物乳杆菌 P-8(1×10^9 CFU/d)28 d 后低密度脂蛋白胆固醇、甘油三酯和总胆固醇的含量与之前相比显著降低($p < 0.01$);总抗氧化能力、超氧化物歧化酶和谷胱甘肽还原酶活力显著升高($p < 0.05$);大鼠粪便中乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)的含量和拟杆菌属(*Bacteroides*)等益生菌的数量显著增加,梭状菌属(*Clostridium*)的数量显著降低($p < 0.05$)。Maryam A.S. Abubakr 等^[5]应用分离自葡萄和香蕉等非乳制品的植物乳杆菌和肠膜明串珠菌混合发酵酸奶并发现其乳清中有很好的抗氧化活性。而对于发酵泡菜抗氧化活性的研究还鲜有报道,但是由于发酵食品中组分复杂,对其抗氧化活性及其活性的产生机制的评价需要进行系统研究分析。

本实验从口味优良的普洱农家自制泡椒里分离出具有抗氧化活性的两株植物乳杆菌和一株肠膜明串珠菌,通过人工接种的方法发酵泡菜,对乳酸菌与发酵泡菜的抗氧化活性进行了系统分析,同时评价了发酵泡菜中的风味并对其香气成分进行了分析^[6]。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株

实验室自行分离得到的植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* subsp ZN002、*Lactobacillus plantarum* subsp ZN007 和肠膜明串珠菌 *Leucinostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* ZN011; 罗伊氏乳杆菌 *Lactobacillus reuteri* 购自 ATCC。

1.1.2 原料及辅料

原料: 结球甘蓝(*Brassica oleracea L. var. capitata L.*), 取洁白、无霉变、无虫害且无污染的脆嫩的卷心菜为原料。洗净后切成长短、粗细一致的小段, 大小约 $5 \times 5 \text{ cm}^2$ 。

辅料: 食盐、白酒、花椒、生姜、尖辣椒、柿椒和白砂糖。

1.1.3 培养基及试剂

MRS 培养基用于乳酸菌的分离; PCA 培养基用于菌落总数的分析。

pUCm-T 载体(上海生工), 多功能 DNA 胶回收试剂盒(BioTeKe)。其他化学试剂均为分析纯。

1.1.4 主要仪器设备

BX53F 型生物显微镜(日本 OLMPUS 公司); universal HoodXR⁺型凝胶成像系统(美国 BIO RAD 公司); VEGA 3 SBH 型扫描电镜(上海泰思肯贸易有限公司); Tp Gradient 型 PCR 仪(德国 Biometra 公司); FE20 型 pH 计(上海美谱达仪器有限公司); XR1 型高速冷冻离心机(上海赛默飞世尔公司); 3111 型 CO₂ 恒温培养箱(上海赛默飞世尔公司); GCMS-QP2010 型气质联用仪(日本 SHIMADZU 公司); SW-CJ-2F 型超净工作台(上海博讯实业有限公司); BXM-30R 型立式高压灭菌锅(上海博讯实业有限公司); DYY-6C 型电泳仪(北京六一公司)等。

1.2 实验方法

1.2.1 乳酸菌的分离与鉴定

1.2.1.1 乳酸菌的分离纯化

取云南普洱口味优良的农家自制泡椒汁液 30 mL, 均分三份用无菌生理盐水十倍梯度稀释, 取 100 μL 各梯度培养液涂布于 MRS 平板上, 5%的 CO₂、37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 48 h。参考 Mansour S 等^[7]的方法进行微生物的分离与纯化。所得单一菌株的过夜菌悬液中加入 7%的二甲基亚砷于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.1.2 菌体与菌落形态观察

参考了 Soo-Hwan K 等^[8]的研究, 简化了其乳酸菌扫描电镜制样方法及观察条件, 取 500 μL 过夜培养

的乳酸菌, 4 ℃下 5000 r/min 离心 5 min, 加入 2.5% 戊二醛 500 μL 于 4 ℃下固定 4 h 或过夜, PBS 漂洗三次, 乙醇梯度脱水 30%、50%、70%、80%、90% 和 100%。将脱水后的菌体滴加于盖玻片上置于干燥皿中自然干燥, 扫描放大倍数 10000 倍。

1.2.1.3 植物乳酸菌 16S rDNA PCR 扩增和测序

改进国立东等^[9]16S rDNA 序列测定分析的方法对微生物进行鉴定与分析。溶菌酶法提取乳酸菌总 DNA 用于 16S rDNA 的 PCR 扩增反应, 通过软件 Vector NTI 10 设计 PCR 引物: 16S-f: 5'-AGAGTTTG ATCCTGGC-TCAG-3'; 16S-r: 5'-AAGGAGGTGAT CCAGCCGCAGGT-3'。

扩增条件: 95 ℃变性 30 s, 55 ℃复性 30 s, 72 ℃延伸 1.5 min, 共 30 个循环, 将 PCR 扩增产物用 DNA 凝胶回收试剂盒纯化。纯化后产物与 pUCm-T 载体连接, 转入大肠杆菌中, 提取质粒进行测序, 引物合成与 DNA 序列测定均由上海生工生物公司进行。将测序结果通过 NCBI BLAST 进行相似性检索, 选择同源性较高的菌株序列, 并进行同源性分析使用 MEGA5.1 构建系统发育树。

1.2.2 乳酸菌生长曲线的测定

取冻存的乳酸菌菌种, Z 字划线于 MRS 平板上, 于 5% 的 CO₂ 下 37 ℃恒温培养 48 h。挑取单菌落于 5 mL MRS 液体培养基中于相同条件下静置培养过夜。过夜培养液按 1:100 稀释进 200 mL 新鲜 MRS 液体培养基中 5% 的 CO₂ 下 37 ℃恒温培养。每两小时取样于 490 nm 测吸光值, MRS 液体培养基为空白对照。实验设三个重复, 重复三次, 用 Excel 计算平均值和标准偏差绘制生长曲线。

1.2.3 泡菜的发酵

泡菜的制作参照标准 ZB X 10042-86, 按配比混合灌装至 1 L 玻璃泡菜坛中, 室温水封发酵。

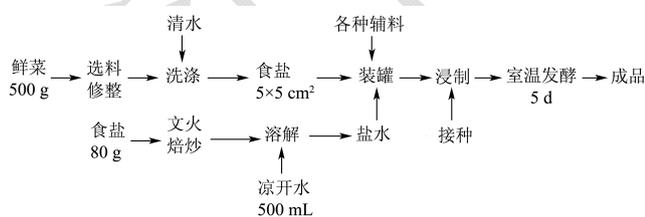


图 1 泡菜发酵的工艺流程

Fig.1 Process of pickle fermentation

注: 配比为鲜菜 500 g, 食盐 80 g, 白酒 30 mL, 花椒 1 g, 尖辣椒 1 g, 柿椒 10 g, 生姜 30 g, 白砂糖 5 g, 凉开水 500 mL。

接种, 植物乳杆菌:肠膜明串菌株:发酵罐体积 =1:1:1000, 初始菌体浓度约为 10³~10⁴ CFU/mL^[10]。

(注: 自然组为自然发酵; 组一为人工接种菌 ZN002 和 ZN011

组合发酵; 组二人工接种菌 ZN007 和 ZN011 组合发酵, 泡菜工艺流程如图 1。)

1.2.4 品尝实验

共计 15 人对三个组发酵的泡菜色泽形态、香气、质地和滋味四个指标进行感官品评。

1.2.5 菌落总数测定

取发酵 5 d 后的三组泡菜溶液 25 mL 按标准 GB 4789.2-2010 进行菌落总数测定活菌数, 然后从一定稀释倍数的 PCA 平板中随机挑取 8 个菌落共 24 株进行 16S rDNA 序列分析。

1.2.6 抗氧化活性测定

选取还原力、羟基自由基清除率、DPPH 自由基清除率和 ABTs 自由基清除率作为指标评估菌体及发酵泡菜的抗氧化活性。抗氧化活性分别与不同浓度的 Vc 作对照。

对于泡菜抗氧化活性的检测, 以未发酵的料液为阴性对照, 取 50 mL 发酵液混匀后, 4 ℃下 5000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 根据莫开菊等^[11]的方法测定泡菜发酵液的还原力以及羟基自由基清除能力; 根据 Thaipong K 等^[12]的研究方法测定泡菜发酵液的 ABTs 和 DPPH 自由基清除能力。

对于微生物的抗氧化活性, 挑取 ZN002、ZN007 和 ZN011 三个菌株单菌落于 MRS 液体培养基中, 取培养达到稳定期的菌液 5 mL, 用无菌 MRS 培养基稀释至 OD₄₉₀ 值相同, 4 ℃下 5000 r/min 离心 5 min, 取上清液用培养基稀释适当倍数, MRS 培养基为空白对照, 测定四个抗氧化指标, 方法与泡菜发酵液抗氧化活性测定方法一致。

1.2.7 风味成分分析

取 100 mL 发酵液混匀后按 Kulkarni R S 等^[13]的研究方法用二氯甲烷萃取溶液中风味成分, 将萃取两次的滤液加入分液漏斗中与适量的蒸馏水混合, 静置分层后收集下层有机溶液以除去萃取液中水溶性杂质, 再加入过量的无水硫酸钠, 静置 1 h, 去除水分, 过滤后收集溶液, 低温旋蒸浓缩。色谱条件和质谱条件参考章献^[14]等人的研究方法, 并根据现有条件和预实验进行修改, 实验条件如下:

色谱条件: 色谱柱 SH-Rxi-5Sil MS 毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm); 载气: 氦气; 柱流量: 1 mL/min; 不分流进样; 升温程序: 柱初温 35 ℃, 保持 5 min, 以 10 ℃/min 升至 150 ℃, 保持 20 min; 再以 5 ℃/min 升至 250 ℃; 保持 30 min; 进样口温度 250 ℃。

质谱条件: 离子源 EI; 电子能量 70 eV; 接口温度 280 ℃; 离子源温度 200 ℃; 四极杆温度 150 ℃; 质量扫描范围 35~500 u。

由 GC-MS 测定得到的谱图, 经计算机在 NIST14.lib 标准谱库的检索, 确定可萃取风味成分。

1.2.8 数据处理

发酵实验重复三次, 所有实验数据以平均值±标准差(Means±SD)表示, 采用 SPSS 软件进行显著性分析($p<0.05$), 抗氧化活性的相关性分析采用 OriginPro 8.5 制图。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌的分离与鉴定

2.1.1 菌种的分离

从不同稀释倍数 MRS 筛选平板上随机挑取 96 个单菌落, 于 5 mL MRS 液体培养, 分别记为 ZN001~ZN096, 过夜培养液于平板划线并挑取单菌落进行纯化。通过初步菌落与菌体形态观察和 16S rDNA 鉴定分析表明这 96 个菌株主要为三种形态的乳酸菌, 占总菌株数量的 81.25%, 本文选取其中具有代表性的 ZN002、ZN007 和 ZN011 进行研究。

2.1.2 形态观察

2.1.2.1 菌落形态

将乳酸菌涂布于 MRS 固体培养基上, 于 5%的 CO_2 下 37 °C 恒温培养 48 h, 观察平板上的菌落形态。三个菌株在 MRS 固体培养基表面生长良好, 菌落呈白色不透明状, 表面光滑, 边缘规则, 有清淡的发酵酸味, 初步判断为乳酸菌。ZN011 菌落同其他两株菌落唯一不同的是菌落偏小。

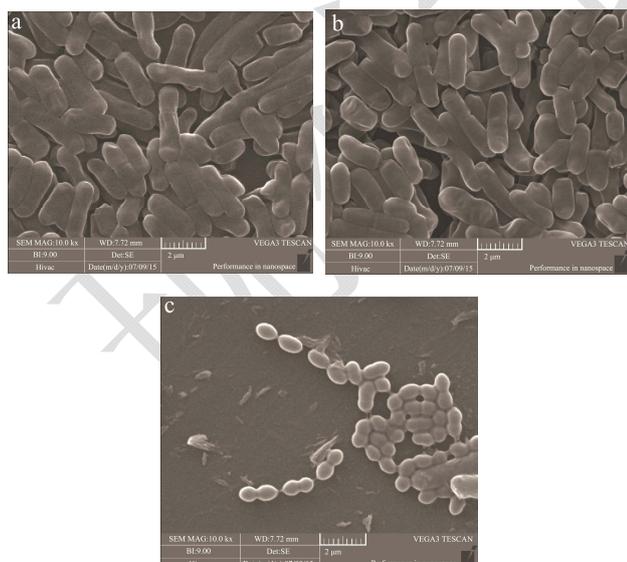


图 2 乳酸菌的形态结构

Fig.2 Morphological structure of lactic acid bacteria strains

注: a, ZN002; b, ZN007; c, ZN011

2.1.2.2 菌体形态

革兰氏染色显示 ZN002 与 ZN007 为革兰氏阳性(G+), 短杆状; ZN011 为革兰氏阳性(G+), 对生微球状(图 2)。

扫描电镜观察(图 2)显示 ZN002 和 ZN007 形态较为一致, 生长密集, 杆状(1.70~2.60)×(0.80~1.20) μm^2 , 表面光滑, 两端略粗, 中间略窄, 同时可以看到正在分裂的两个细胞中间有分裂节, 刚分裂不久的细胞较短; ZN011 为对生微球状(1.50~1.80)×(0.70~0.90) $\mu m^2/2$ 个, 菌体生长稀疏, 两个细胞之间有连接杆, 表面光滑。

2.1.3 乳酸菌 16S rDNA 鉴定

以三种乳酸菌总 DNA 为模板。使用乳酸菌通用 16S rDNA 引物扩增均得到 1500 bp 大小的 DNA 片段, 与乳酸菌 16S rDNA 片段大小相符。将所得的 PCR 产物经纯化后与 pUCm-T 载体连接后, 各挑取三个菌落进行 16S rDNA 测序。

所得 16S rDNA 序列应用 NCBI Blast 进行同源检索及三个菌株系统发育树的构建(系统发育树结果未展示), 发现 ZN002 与 *Lb. Plantarum Strain subsp ZS2058* 最为接近, 相似度 99%; ZN007 与 *Lb. Plantarum subsp P-8* 最为接近, 相似度 99%; ZN011 与 *L. mesenteroides subsp. dextranicum DSM 20484* 最为接近, 相似度 100%。因而将这三株均分别命名为 *Lb. Plantarum subsp ZN002*, *Lb. Plantarum subsp ZN007* 和 *L. mesenteroides subsp. dextranicum ZN011*。

2.2 乳酸菌的生长曲线

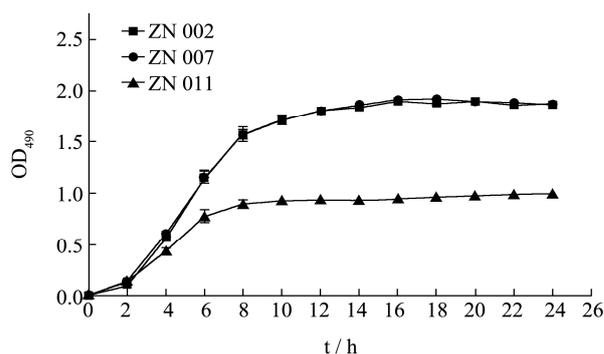


图 3 三株乳酸菌的生长曲线

Fig.3 Growth curve of lactic acid bacteria

将经过活化的 *Lb.plantarum subsp ZN002*、*Lb. plantarum subsp ZN007* 和 *L. mesenteroides subsp. dextranicum ZN011* 单菌落接种于 MRS 培养基中, 5% CO_2 下 37 °C 恒温培养 24 h, 间隔 2 h, 取出于 490 nm 处测定吸光值, 以培养时间为横坐标, 吸光值为纵坐标得乳酸菌生长曲线。

从图 3 中可以看出 0~2 h 均为三株乳酸菌生长的

初始期,其中 ZN002 和 ZN007 两株菌的生长趋势基本保持一致,它们的最终 OD_{490} 值 1.84 ± 0.02 均高于 ZN011 的 OD_{490} 值 0.99。除此之外植物乳杆菌对数期为 2~14 h,其中 2~8 h 增长迅速,8~14 h 增长缓慢;肠膜明串珠菌对数期为 2~8 h,其中 2~6 h 增长迅速,6~8 h 增长缓慢,8 h 以后基本进入稳定期。菌株的生长曲线为进一步应用其进行发酵提供了依据。

2.3 泡菜发酵 pH 变化

按泡菜发酵配料比进行泡菜发酵,开始发酵后每 24 h 取 50 mL 发酵液测定 pH 值,以发酵天数为横坐标, pH 值为纵坐标得泡菜发酵过程中 pH 变化曲线。

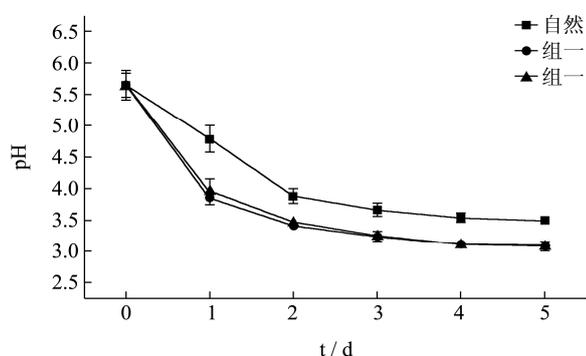


图4 泡菜发酵过程中发酵液的 pH 变化曲线

Fig.4 pH curve of broth during the fermentation process

从发酵过程的 pH 值变化可以看出,初始发酵时的 pH 基本一致为 5.64 ± 0.02 ; 0~3 d 下降最为明显,3 d 以后下降缓慢,趋于平衡。组一和组二的发酵 pH 下降趋势基本相近且均低于自然组的 pH 下降趋势。以标准泡菜 pH 而言,人工接种发酵泡菜在发酵 2 d 后即达到相应 pH 值,比自然发酵泡菜缩短了 2 d,且人工接种乳酸菌发酵泡菜 pH 值更低。在泡菜发酵、酱油酿造、风味发酵乳制备以及生物堆肥等发酵过程中,乳酸菌均是发酵体系 pH 值降低的重要贡献者。Yan B 等人^[4]将植物乳杆菌 P-8 用以直投式发酵豆乳,结果显示:至发酵终点 pH 4.5 时,发酵豆乳中维生素 B1 和 B2 的含量较原豆乳显著上升($p < 0.05$), γ -氨基丁酸由发酵初始的 $72.25 \mu\text{M}$ 增加至发酵结束时的 $110.67 \mu\text{M}$; 乳酸含量由初始的 0.97 g/L 增加至 5.36 g/L ,而乙酸含量由初始的 1.04 g/L 增加至 2.09 g/L ; 豆乳发酵过程中,该菌可以促使无生物活性的异黄酮转化为具有生物活性的异黄酮;而植物乳杆菌 P-8 用以直投式发酵牛乳,发酵乳具有良好的口感和风味,且后酸化程度低,同时可以有效抑制霉菌和酵母菌对发酵乳的后期污染,延长酸奶货架期,而这些有益的因素也可能也是本研究中的乳酸菌能够赋予泡菜且令品尝者喜欢的原因。因而人工接种纯种乳酸菌能够使乳酸菌

的初始菌量加大并在整个体系中处于优势菌,本实验中酸度增加很可能是人工接种的植物乳杆菌和肠膜明串珠菌共同发酵的结果。

2.4 发酵泡菜中微生物菌群评价

发酵 5 d 后,三个组的泡菜的酸度均已达到稳定。通过稀释涂平板菌落计数测得自然组、组一和组二中活菌数分别为 $1.01 \times 10^7 \text{ CFU/mL}$ 、 $2.67 \times 10^7 \text{ CFU/mL}$ 和 $2.25 \times 10^7 \text{ CFU/mL}$ 。可见自然发酵与人工接种泡菜发酵最终的微生物量接近。经 16S rDNA 鉴定自然发酵组中的优势菌全部为植物乳杆菌的不同株系;组一中所鉴定菌株 50% 为 ZN002, 37.50% 为 ZN011, 12.50% 与植物乳杆菌 KS6I1 同源性最高;组二中所鉴定菌株 50% 为 ZN007, 37.50% 为 ZN011, 12.50% 与植物乳杆菌 gp23 同源性最高。同时,植物乳杆菌 KS6I1 和植物乳杆菌 gp23 也在自然组中检出。这表明组一和组二中泡菜的发酵中所添加的乳酸菌发挥主要作用,而自然组中有多株不同植物乳杆菌发酵。由于原材料的灭菌会造成营养物质的流失与口感的改变,本实验中没有对发酵的原材料卷心菜进行灭菌处理,并且在发酵过程中进行了严格操作避免了杂菌的污染,说明自然发酵中的乳酸菌来自于卷心菜本身,这些乳酸菌在人工添加乳酸菌发酵中为弱势菌,对发酵过程的贡献较小。

2.5 乳酸菌与发酵泡菜的抗氧化活性

通过对还原力,羟基自由基的清除率,ABTs 自由基清除率和 DPPH 自由基清除率的测定对于三株乳酸菌抗氧化活性评价(图 5),发现三株乳酸菌均具有一定的抗氧化活性。进一步评价这三株乳酸菌抗氧化活性在泡菜发酵中的体现(图 6)。通过相同方法对发酵泡菜的四种抗氧化指标进行评价,结果发现随着发酵时间的延长,发酵泡菜抗氧化性的各项指标均呈现增加趋势,羟基自由基清除率,ABTs 自由基清除率和 DPPH 自由基清除率均在 3~4 d 达到稳定。与自然发酵对照组相比较,人工接种泡菜组一与组二均表现出较强的抗氧化活性。自然发酵组除 DPPH 自由基清除率在发酵末期达到与人工接种组相同水平外,研究者 Osuntoki A^[2]在相关研究中采用从尼日利亚发酵食品中分离的几种乳酸菌单一菌株直投式发酵酸奶,并测定酸奶发酵 24 h 乳清中的还原力。其中 *L.plantarum* (from kunnu)的 DPPH 自由基清除率为 23.90%,与本文中自然发酵组同等发酵时间的 DPPH 自由基清除率 20.75% 较为接近; *L.brevis*(from wara)的 DPPH 自由基清除率在其研究的 8 株乳酸菌内最高为 33.60%,而本

实验中人工接种组一和组二发酵 24 h 的 DPPH 自由基清除率分别为 34.01% 和 35.50%，且在发酵 48 h 后急剧升高，发酵 72 h 后达到最大 99% 以上并趋于稳定。在还原力，羟基自由基的清除率和 ABTs 自由基清除率中均显著低于两组人工接种泡菜；在羟基自由基清除率中最为显著，组一的羟基自由基清除能力 58.91% 略大于组二的 57.89%，二者均超过自然组 28.41% 的两倍。这表明，人工接种的乳酸菌使发酵泡菜的抗氧化性得到了提高。人工接种发酵的两组抗氧化活性虽然在个别指标中有所不同，但总体在抗氧化活性中无显著差异，这表明在泡菜抗氧化活性中 *L. mesenteroides subsp. dextranicum* ZN011 发挥了主要作用，这一结果与肠膜明串珠菌具有增强机体抗氧化活性的报道相一致^[5]。

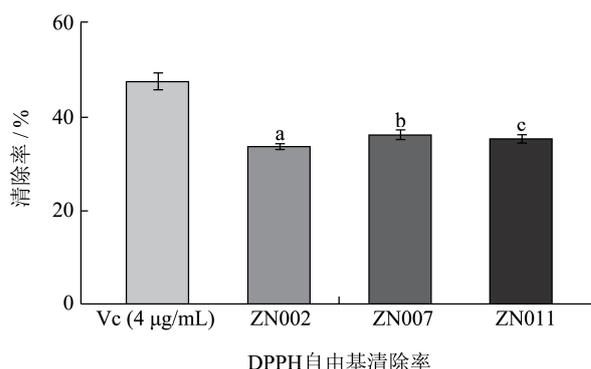
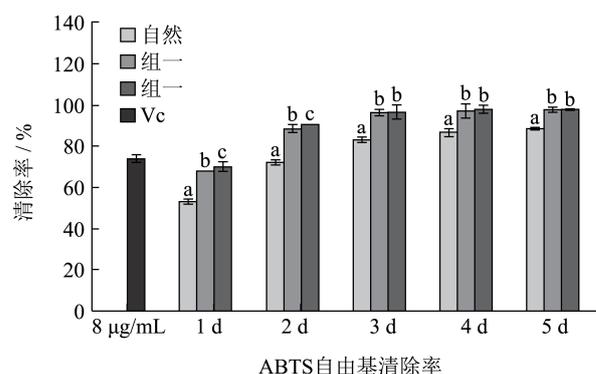
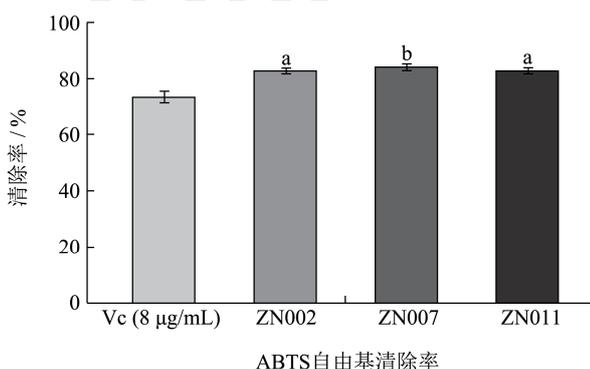
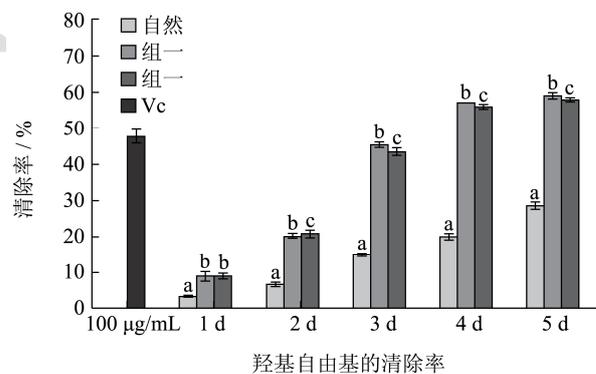
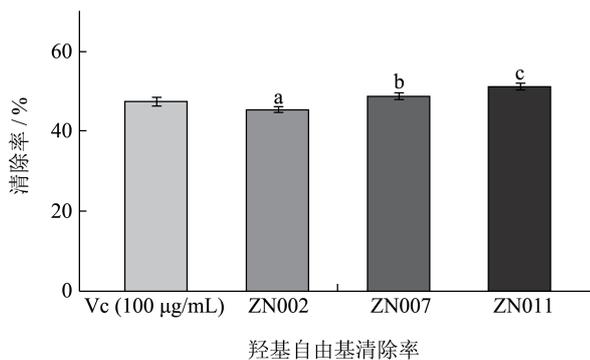
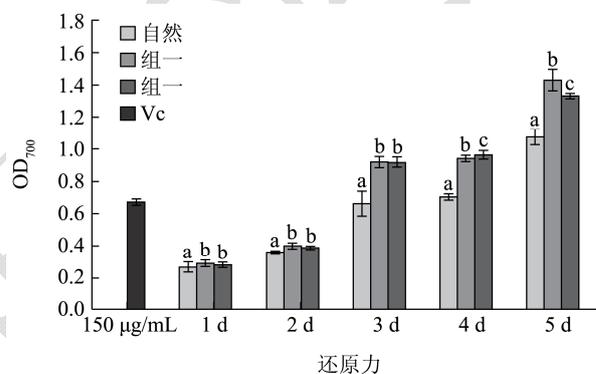
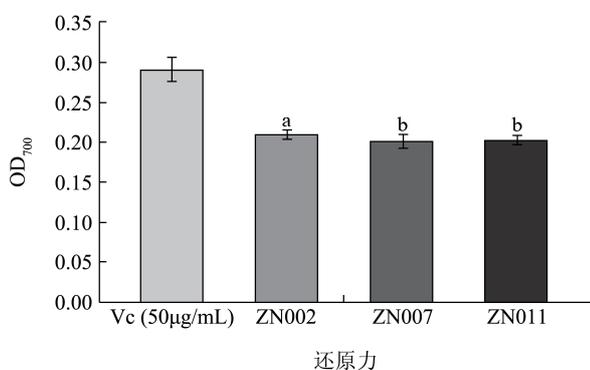


图5 乳酸菌的抗氧化活性

Fig.5 Antioxidant activity of three lactic acid bacteria strains

注：a, b和c不同字母表示菌株间存在显著性差异($p < 0.05$)，相同字母表示无显著差异。



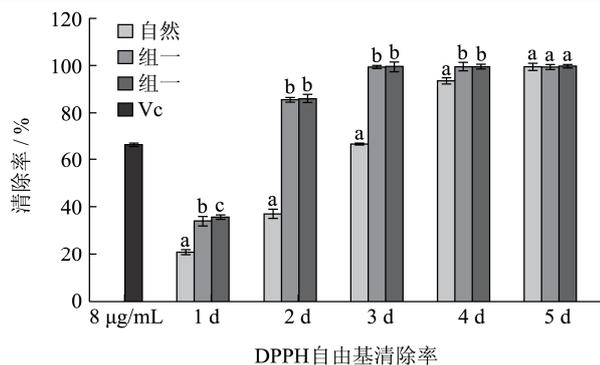


图6 泡菜发酵液的抗氧化活性

Fig.6 Antioxidant activity of broth during the fermentation process

注: a, b和c不同字母表示组间在同一发酵时间存在显著性差异($p < 0.05$), 相同字母表示无显著差异。

2.6 感官品尝

15 位品尝者对三组发酵泡菜进行整体评价与打分(结果未展示)。其中 12 人认为实验组一发酵的泡菜为最优, 其风味较之其余两组更佳, 食用酸度更容易接受, 口感好脆性适中。其余 3 位品尝者认为实验组二发酵的泡菜最优。所有品尝者均认为自然发酵组的泡菜为最差。

2.7 风味成分分析

表1 泡菜发酵液的香气成分

Table 1 Flavor components of fermented pickle broth

序号	保留时间/min	化合物名称	峰面积/%		
			自然	自然	自然
1	4.05	异戊醇; 3-甲基-1-丁醇	1.58	-	-
2	5.89	(2R,3R)-2,3-丁二醇	1.12	-	-
3	6.43	L-乳酸乙酯; 2-羧基丙酸乙酯	4.91	1.34	1.90
4	8.24	异硫氰酸烯丙酯	2.81	1.01	1.61
5	10.84	2,2-二甲基癸烷	2.43	0.61	1.08
6	11.10	异硫氰酸环丙酯	-	0.49	-
7	11.73	己基癸醇; 2-己基-1-癸醇	2.43	-	-
8	11.74	桉叶油醇	-	0.76	-
9	11.74	5-丁基壬烷	-	-	-
10	12.12	3-甲基壬烷	1.26	-	-
11	12.33	3,6-二甲基十一烷	1.07	-	-
12	13.01	芳樟醇; 沉香醇; 3,7-二甲基-1,6-辛二烯-3-醇	2.15	1.10	-
13	13.25	苯乙醇	0.71	-	-
14	13.35	磷酸三乙酯; 三乙基磷酸酯	0.67	-	-
15	14.24	9-甲基十七烷	0.82	-	-
16	14.73	十二烷	3.81	1.48	1.66
17	15.82	壬酸	0.73	-	-
18	16.47	3-甲磺酰基丙基异硫代氰酸酯	9.75	3.41	3.17
19	17.41	3-甲基; 氰基-丙硫醛	1.41	0.98	1.16
20	17.95	十四烷	1.45	0.74	1.16
21	20.25	十六烷	-	1.73	4.67
22	22.51	2,6,0,14-四甲基十六烷	-	-	1.06
23	25.91	2,6,10-三甲基十五烷	-	-	1.09
24	26.44	二十三烷醇	-	-	1.98
25	29.03	十七烷	-	2.39	3.82
26	37.50	十八烷	-	4.07	5.26
27	42.89	双杂氧螺葵二酮	1.06	0.54	-
28	43.37	二十烷	-	9.89	15.26

转下页

接上页

29	43.40	二十一烷	-	3.75	-
30	45.02	邻苯二甲酸二丁酯	2.32	1.52	1.62
31	45.74	正三十五烷醇	-	-	-
32	45.76	棕榈酸抗坏血酸酯	-	2.54	-
33	48.18	氯代十八烷	-	-	1.12
34	48.81	环己基十九烷	-	0.69	-
35	49.19	苦香皮属二烯	1.10	-	-
36	49.73	二氯十六烷	0.72	-	-
37	52.12	二十四烷	-	4.05	-
38	52.85	乙二醇棕榈酸酯	-	0.51	-
39	53.25	二十八烷	-	-	1.17
40	53.77	姜烯酚	0.81	-	-
41	53.90	十八碳四烯酸甲酯	3.09	-	-
42	54.17	四甲基庚烯	2.86	-	-
43	54.22	三十烷	-	9.47	2.38
44	54.55	2-亚甲基; 3-乙烯基-环戊基甲酸	16.96	10.15	6.57
45	55.77	5-羟基-1-(4-羟基-3-甲氧基酚基)癸酮	0.73	0.79	-
46	55.96	己二酸二辛酯	2.90	1.23	1.34
47	56.32	2,2-亚甲基双-(4-甲基-6-叔丁基酚)	2.64	-	-
48	58.46	油醇	10.52	4.52	5.26
49	59.07	2-十六酰基甘油	-	1.35	1.70
50	60.19	天然辣椒碱	5.54	2.63	3.59
51	60.90	二氢辣椒素	1.19	-	1.14
52	61.91	三十四烷	1.74	18.51	16.91
53	63.76	三十五烷	-	-	1.40
54	67.63	对苯二甲酸二辛酯	5.02	1.63	2.06
55	71.61	三十六烷	1.00	4.31	2.44
56	71.90	反式角鲨烯	-	1.78	2.01

注:“-”表示未检出。

为揭示三组泡菜风味差异的内在原因,对三个实验组泡菜发酵液中的风味成分进行了分析(表1)。由谱库 NIST14.lib 图谱解析可得出川氏自然发酵泡菜组中各类物质占被测总峰面积分别为 11 种烷烃占 14.30%, 7 种酯类占 31.48%, 5 种醇类占 7.90%, 2 种烯烃占 3.96%, 2 种有机酸类占 17.69%, 1 种醛类占 1.42%, 含有 1 种少量酮占 0.73%, 1 种酚类占 3.45%, 其他物质如油醇、天然辣椒碱、二氢辣椒素与双杂氧螺葵二酮共计占被测总峰面积的 18.32%。

与自然发酵组对比,人工接种组一中烷烃类峰面积百分比有所提高但总面积下降,酯类种类增加且峰面积比例下降但总面积上升,并含有其它如乙二醇棕榈酸酯、2,6-棕榈酸抗坏血酸酯、桉叶油醇、芳樟醇、十六酰基甘油与反式角鲨烯特征性成分,这很有可能是品尝者更喜欢组一发酵的泡菜的主要原因。实验组

二与自然组相比也是烷烃种类和比例有所提高,但总面积下降,酯类所占比例与实验组一相近但种类较少,总面积也次之,这可能是其风味次于实验组一的原因。

自然发酵组中含人工接种组中未检测到的 4-甲基-6-叔丁基苯酚、四甲基庚烯、壬酸、苯乙醇、己基癸醇和二氯十六烷等风味物质,这可能是导致该组泡菜风味较差的主要原因。而人工接种泡菜组一和组二中,酸、醛、酮及酚类物质所占比例均下降,且与自然组相比,除各组分峰面积比例不同外,反式角鲨烯、十六酰基甘油、十六烷、十七烷、十八烷和二十烷这些物质也是组一和组二中共同检出且与自然组不同的典型代表物。

泡菜风味成分的差异与发酵过程密切相关。自然发酵组里初始微生物少而杂,在发酵过程中会由不同微生物代谢产生多种不同的风味物质,包括异硫氰酸

烯丙酯, 3-甲磺酰基丙基异硫代氰酸酯, 苦香皮属二烯, 2,2-亚甲基双-(4-甲基-6-叔丁基酚)等具有不良气味的成分。而在人工接种组发酵中乳酸菌自始至终为优势菌, 乳酸菌为公认的益生菌, 在其发酵过程中产生大量乳酸, 乙酸等有机酸及以及芳香气味的次级代谢产物。同时乳酸菌会抑制来自蔬菜或环境中的杂菌, 从而抑制了不良气味的产生。另外乳酸菌的抗氧化活性抑制了发酵体系中因氧化作用而产生的不良气味成分, 从而使还原性质的成分产生于增加, 这些物质赋予了两个乳酸菌接种发酵组泡菜更好的风味。

3 结论

3.1 本文从口味优秀的普洱农家自制泡椒中分离并鉴定得到具有一定抗氧化活性的植物乳杆菌 *Lb. plantarum subsp* ZN002、*Lb. plantarum subsp* ZN007 和 *L. mesenteroides subsp. dextranicum* ZN011。使用这三株乳酸菌进行泡菜的发酵, 结果表明, 人工接种乳酸菌发酵泡菜不仅使发酵周期缩短 2 d 左右, 而且使制备的泡菜获得更优的风味与更高的抗氧化活性。

3.2 本文在不对原料卷心菜进行杀菌处理的条件下, 进行乳酸菌纯种接种发酵制备泡菜, 既提高了生产效率, 又保持并提高了产品的口感, 风味与品质, 为传统泡菜的标准化工业生产提供了理论基础。

参考文献

- [1] 周相玲, 胡安胜, 王彬, 等. 人工接种泡菜与自然发酵泡菜风味物质的对比分析[J]. 中国酿造, 2011, 49(1): 159-160
ZHOU Xiang-ling, HU An-sheng, WANG Bin, et al. Comparison analysis of flavor compounds in pickles produced by inoculated fermentation and natural fermentation [J]. China Brewing, 2011, 49(1): 159-160
- [2] Osuntoki A, Korie I, Pandey A, et al. Antioxidant activity of whey from milk fermented with *Lactobacillus* species isolated from nigerian fermented foods [J]. Food Technology and Biotechnology, 2010, 48(4): 505-511
- [3] Ali, Asmahan Azhari. Isolation and identification of lactic acid bacteria isolated from traditional drinking yoghurt in Khartoum State, Sudan [J]. Current Research in Bacteriology, 2011, 4(1): 16-22
- [4] Yan B, Yong Z, Li H, et al. *In vitro* screen of *Lactobacillus plantarum* as probiotic bacteria and their fermented characteristics in soymilk [J]. Annals of Microbiology, 2011, 62(3): 1311-1320
- [5] Maryam A S, Abubakr, Zaiton Hassan, et al. Antioxidant activity of milk fermented with *Lactobacillus plantarum* 1 and *Leuconostoc mesenteroides* isolated from non-dairy sources [J]. Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development 2013, 1 (2): 71-83
- [6] 徐丹萍, 蒲彪, 陈安均, 等. 传统四川泡菜中挥发性成分分析 [J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(11): 227-232
XU Dan-ping, PU Biao, CHEN An-jun, et al. Analysis of volatile components in traditional Sichuan Paocai [J]. Food and Fermentation Industries, 2014, 40(11): 227-232
- [7] Saeedi, Mansour, et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria in W inter salad (local pickle) during fermentation using 16 S rRNA gene sequence analysis [J]. Journal of Food Safety, 2015, 35(3): 287-294
- [8] K Soo Hwan, H S Lee, D S Ryu, et al. Antibacterial activity of silver-nanoparticles against staphylococcus aureus and escherichia coli [J]. Korean Journal of Microbiology & Biotechnology, 2011, 39(1): 77-85
- [9] 国立东, 刘倩, 江柳青, 等. 开菲尔粒中一株乳酸乳球菌的分离及性能研究 [J]. 现代食品科技, 2014, 30(9): 121-125
GUO Li-dong, LIU Qian, JIANG Liu-qing, et al. Isolation and properties of *Lactococcus lactis* strain from kefir grains [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(9): 121-125
- [10] T Xiong, F Peng, Y Liu Xiong, et al. Fermentation of Chinese sauerkraut in pure culture and binary co-culture with *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum* [J]. Food Science and Technology, 2014, 59(2): 713-717
- [11] 莫开菊, 柳圣, 程超. 生姜黄酮的抗氧化活性研究 [J]. 食品科学, 2006, 27(9): 110-115
MO Kai-ju, LIU Sheng, CHENG Chao. Study on antioxidant activity of the ginger flavonoid [J]. Food Science, 2006, 27(9): 110-115
- [12] Thaipong, Kriengsak, et al. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts [J]. Journal of Food Composition & Analysis, 2006, 19(s 6-7): 669-675
- [13] R S Kulkarni, H G Chidley, K H Pujari, et al. Geographic variation in the flavour volatiles of Alphonso Mango [J]. Food Chemistry, 2012, 130(1): 58-66
- [14] 章献, 赵勇, 刘源, 等. 2 种韩国泡菜挥发性风味物质分析研究 [J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(1): 150-156
ZHANG Xian, ZHAO Yong, LIU Yuan, et al. Analysis of the volatiles in two kinds of Korea Kimchi by gas chromatograph-mass spectrometry with solid phase microextraction [J]. Food & Fermentation Industries, 2009, 35(1): 150-156

现代食品科技