

人工接种发酵甘蓝工艺条件的优化

燕平梅, 赵文婧, 宋敏丽, 吴丽花, 陈燕飞, 张 腾

(太原师范学院生物系, 山西 太原 030031)

摘 要: 为了探究甘蓝人工接种发酵适宜的发酵剂及发酵条件, 采用从四川泡菜老汤中分离的植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、戊糖乳杆菌(*Lactobacillus pentosus*)、肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)3种菌以单一和不同配比混合组合成16组组合发酵剂中选出发酵甘蓝时亚硝酸盐含量低、发酵速度快、风味好的发酵剂。结果表明: 肠膜明串珠菌、戊糖乳杆菌, 其质量比为1:2(nPb:SPc组合), 肠膜明串珠菌、戊糖乳杆菌、植物乳杆菌, 其质量比为1:1:1(nPb:bC1:SPc组合), 此两种组合为较优化发酵剂。应用响应面分析法优化此两种组合发酵剂接种发酵甘蓝的工艺条件。人工接种发酵甘蓝的条件为食盐质量浓度4g/100mL、接种量0.2%、发酵温度25℃。通过主效应分析说明食盐质量浓度对总酸度影响最大, 发酵温度次之, 接种量对其影响较小。

关键词: 人工接种发酵; 蔬菜; 乳酸菌; 响应面分析法

Optimization of Cabbage Fermentation Using Starter Culture

YAN Ping-mei, ZHAO Wen-jing, SONG Min-li, WU Li-hua, CHEN Yan-fei, ZHANG Teng

(Department of Biology, Taiyuan Normal University, Taiyuan 030031, China)

Abstract: The purpose of this study was to develop a fermentation strater culture and to optimize the fermentation conditions for fermented cabbage production. In this study, 16 strains including single strains of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Leuconostoc mesenteroides* isolated from Sichuan pickles and their combinations were first tested. Two different strain combinations were then selected out of them based on fermentation speed, nitrite content and fermented cabbage flavor for the optimization of fermentation by response surface methodology. The results showed that the optimal condition for cabbage fermentation by a mixture of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus pentosus* (1:2) or *Leuconostoc mesenteroides* *Lactobacillus pentosus*, and *Lactobacillus plantarum*(1:1:1) were 4 g/100 mL salt, 0.2% of inoculum size and 25 °C of fermentation temperature. Main effect analysis showed that salt concentration had the greatest effect on total acidity of fermented cabbage, followed by fermentation temperature and then inoculums size.

Key words: inoculated fermentation; vegetables; lactic acid bacteria; response surface analysis

中图分类号: TS255

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)11-0224-07

蔬菜自然发酵过程中, 以乳酸菌的活动贯穿发酵的全过程。不同乳酸菌在发酵中呈现一定消长规律^[1-3]。发酵初期主要是肠膜明串珠菌等异型发酵乳酸菌为主的发酵阶段, 此时它的数量多、且生长繁殖速度快, 但是它对酸的敏感性较强, 随着发酵的进行很快死去, 随后短乳杆菌、植物乳杆菌成为发酵的优势菌, 快速生长繁殖产生大量乳酸, 最后由耐酸的植物乳杆菌等同型发酵菌完成发酵。因此蔬菜发酵过程分发酵初期、中期、后期3个阶段, 发酵初期主要进行异型发酵, 代谢产物有乳酸、醋酸、二氧化碳等, 此时为产气阶段,

发酵中期既有异型发酵、又有同型发酵, 后期主要进行同型发酵, 代谢产物主要为乳酸, 是不产气阶段。

为了更好地控制蔬菜发酵, 人们在泡菜纯种发酵生产方面进行了大量研究。一些研究者模拟自然发酵蔬菜过程中乳酸菌的消长变化规律, 以异型乳酸菌和同型乳酸菌混合为发酵剂发酵蔬菜。生产中采用肠膜明串珠菌、短乳杆菌、植物乳杆菌的混合接种, 最终产品质量与不接种生产的产品质量相比无太大变化^[4-6]。但是, 有时接种后的生产要优于未接种的生产^[7-8], 有时相反。沈国华等^[9]为异型发酵和同型发酵乳酸菌之间的恰当比例

收稿日期: 2011-10-13

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31171743)

作者简介: 燕平梅(1968—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为食品科学与食品微生物学。E-mail: yanpingmei@sohu.com

对生产优质泡菜是必需的^[9],但目前这一比例尚不清楚。沈国华等^[9-10]进行了采用植物乳杆菌或干酪乳杆菌单加或以1:1的比例混合的蔬菜接种发酵。蒋和体^[11]则认为植物乳杆菌与干酪乳杆菌为3:1比较合适。研究结果差异性存在的可能是由于蔬菜原料不同、处理方式不一样、发酵条件不同,所选菌种不同所致。

本实验以从四川泡菜老汤中分离的植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、戊糖乳杆菌(*Lactobacillus pentosus*)、肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)3种菌以单一和不同配比混合组合成16组组合的发酵剂发酵甘蓝,通过测定发酵速度、产酸、亚硝酸盐含量及感官评定选择优良的发酵菌株的配比形式,作为甘蓝发酵的发酵剂,并研究此发酵剂接种发酵甘蓝的最适发酵条件。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

甘蓝来自中国农业大学附近的菜市场。本实验所用的乳酸菌是从四川泡菜老汤和泡菜卤中分离所得,包括植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*, 编号bC1)、戊糖乳杆菌(*Lactobacillus pentosus*, 编号SPc)、肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*, 编号nPb)。

乳酸、醋酸(均为色谱纯) 美国Sigma公司;对氨基苯磺酸、N-1-萘基乙二胺(分析纯) 北京化学试剂公司。

1.2 仪器与设备

SCL-10AVP 高效液相色谱仪、UVmini-1240 紫外-可见分光光度计 日本岛津公司;F-23 pH计 日本Horiba有限公司。

1.3 方法

1.3.1 发酵剂和接种发酵甘蓝的制备

冰箱保存菌→转接活化→扩大培养(30℃培养20h左右)→4000r/min离心5min→称质量

称取50g冲洗干净沥干的甘蓝,放入灭菌的三角瓶中,加入质量浓度5g/100mL食盐水100mL煮沸凉到室温,接入乳酸菌发酵剂,30℃培养箱中厌氧发酵。

1.3.2 发酵菌种组合

将3株菌种按表1接种到发酵甘蓝中,于30℃条件下发酵,定期取发酵甘蓝测亚硝酸盐含量,取发酵菜汁测pH值和可滴定酸,并比较感官的不同。

表1 发酵剂筛选试验处理

Table 1 Single strains and their combinations

组合	发酵菌种组合	质量比	组合	发酵菌种	质量比
1	bC1		9	nPb:SPc	2:1
2	SPc		10	bC1:SPc	1:1
3	nPb		11	bC1:SPc	1:2
4	nPb:bC1	1:1	12	bC1:SPc	2:1
5	nPb:bC1	1:2	13	nPb:bC1:SPc	1:1:1
6	nPb:bC1	2:1	14	nPb:bC1:SPc	2:2:1
7	nPb:SPc	1:1	15	nPb:bC1:SPc	1:1:1
8	nPb:SPc	1:2	16	nPb:bC1:SPc	1:1:2

1.3.3 发酵甘蓝中亚硝酸盐和可滴定酸的测定

可滴定酸的测定:由0.1mol/L氢氧化钠滴定,酚酞为滴定终点指示剂^[12];泡菜卤pH值测定:用数字pH计,pH计的校准用厂商供给的pH值为4.0和7.0的标准缓冲溶液;亚硝酸盐的测定:按GB/T 5009.33—1996《食品中亚硝酸盐和硝酸盐的测定方法》测定^[13]。

1.3.4 乳酸和醋酸相对比值的测定

采用HPLC法:色谱系统包括:LC-10AT溶剂输送泵、SPD-10AV_{VP}紫外检测器、CTO-10AV_{VP}柱温箱、DG12A自动脱气机、SCL-10AV系统控制器、C-R8A积分仪。

色谱条件:色谱柱:Lichrosper 100RP-18(4.6mm×25cm, 5μm);流动相:0.5%磷酸氢二铵;流量:1mL/min;检测波长:214nm;柱温:40℃;进样量:20μL;分析时间:10min。

1.3.5 感官指标评定

综合评分时,按加权系数:颜色25%、滋味25%、香气25%、质地25%,满分100(表2),每次评分请消费者10人,实验前不接触或避免使用有气味的化妆品、洗涤剂,避免感受器官受强烈刺激,于实验区对发酵甘蓝作出评价。记录数据分析,判断处理间差异显著性。

1.3.6 发酵条件对发酵甘蓝pH值和可滴定酸的影响

1.3.6.1 不同温度条件下发酵剂发酵甘蓝实验

筛选出的两组优良发酵剂以0.10%的接种量接入到质量浓度4g/100mL食盐的发酵甘蓝中,分别于15、20、25、37℃温度条件下发酵,定期取甘蓝卤测pH值和可滴定酸。

表2 甘蓝发酵产品感官指标评分标准

Table 2 Standards for sense evaluation of fermented cabbage

感官指标	5分	4分	3分	2分	1分
颜色	茎叶亮白色,边叶亮黄色	茎叶白色,边叶黄色	茎叶白色,边叶浅黄色	茎叶灰白色,边叶黄色	茎叶灰白色,边叶暗黄色
香气	酸香浓郁、醇厚柔和,有酯香及菜体清香	酸香味略淡,酯香,清香略差,较柔和	酸香味淡但正,无酯香、清香	酸香味淡且不正,无酯香	无香气
滋味	酸味浓且正,有鲜味,无异味,口感脆嫩	酸味浓较正,鲜味少,无异味,口感脆嫩	酸味浓略有刺激味,无异味,口感较脆	酸味差,有刺激味,不正,口感不脆,有辛辣味	酸味极少,有刺激味或霉味,恶臭味,无脆感
质地	茎叶柔韧,边叶有较大弹性	茎叶柔韧,叶弹性略差,但不烂	茎叶较硬,菜叶略微烂	茎叶个别处软,表面叶软烂	茎叶及菜心均烂,叶软烂

1.3.6.2 不同接种量对发酵速度的影响

以 nPb:SPc 组合为接种材料, 以不同的接种量接种到质量浓度 4g/100mL 食盐的发酵甘蓝中, 于 25℃ 发酵, 定期测发酵菜液的 pH 值和可滴定酸度。从经济和发酵速度考虑选择合适的接种量。

1.3.6.3 不同质量浓度食盐对发酵的影响

以 nPb:SPc 组合为接种材料, 接种量为 0.10%, 取不同质量浓度食盐的发酵甘蓝于 25℃ 发酵, 定期测发酵菜液的亚硝酸盐含量。从发酵蔬菜的安全性和和发酵速度考虑选择合适的盐质量浓度。

1.3.7 发酵条件的优化试验及最佳发酵模式的建立

表 3 三因素二次正交旋转回归试验设计

Table 3 Factor and levels of quadratic orthogonal rotary regression design

因素	编码及水平		
	- 1	0	1
X ₁ 发酵温度 /℃	20	25	30
X ₂ 接种量 /%	0.1	0.2	0.3
X ₃ 食盐质量浓度 /(g/100mL)	2	4	6

采用响应面分析法, 因素水平编码见表 3。在单因素试验基础上, 以发酵甘蓝的总酸度为指标, 以发酵温度、接种量、食盐质量浓度 3 个因素为自变量, 设计三因素三水平共 15 个试验点的响应面分析试验, 优化人工接种发酵甘蓝的工艺条件。

1.3.8 统计分析方法

采用 SAS 8.0 软件进行方差分析和中心组合设计分析。

2 结果与分析

2.1 优良发酵剂的筛选

2.1.1 不同菌种组合发酵甘蓝亚硝酸盐含量的变化

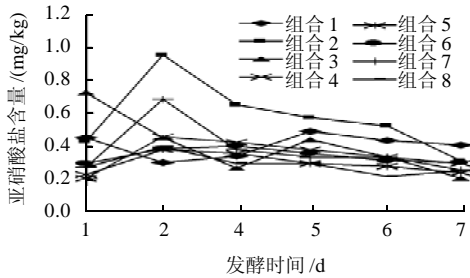


图 1 菌种组合 1~8 发酵甘蓝菜中亚硝酸盐含量的变化
Fig.1 Change in nitrite concentration in fermented cabbage during fermentation

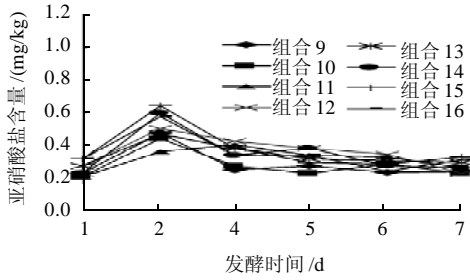


图 2 菌种组合 9~16 发酵甘蓝菜中亚硝酸盐含量的变化
Fig.2 Change in nitrite concentration in fermenting cabbage during fermentation

图 1、2 表示 16 组发酵剂发酵甘蓝中亚硝酸盐含量变化情况, 组合 2 和组合 3 发酵甘蓝菜中亚硝酸盐含量

表 4 不同菌种组合的发酵剂接种发酵甘蓝总酸变化情况

Table 4 Total acidity changes in fermented cabbage brine during fermentation

组合	1d		3d		5d		7d		9d		11d		13d	
	总酸度 /%	pH	总酸度 /%	pH	总酸度 /%	pH	总酸度 /%	pH	总酸度 /%	pH	总酸度 /%	pH	总酸度 /%	pH
1	0.32	4.32	0.38	4.38	0.53	4.29	0.58	4.20	0.66	3.88	0.68	3.83	0.72	3.63
2	0.30	4.29	0.35	4.20	0.45	4.13	0.51	3.99	0.58	3.60	0.65	3.63	0.76	3.51
3	0.32	4.36	0.36	4.40	0.39	4.29	0.49	3.89	0.49	3.64	0.57	3.74	0.58	3.61
4	0.54	4.06	0.62	3.92	0.59	3.86	0.66	3.79	0.65	3.75	0.62	3.61	0.67	3.51
5	0.39	4.02	0.46	3.99	0.42	3.91	0.44	3.79	0.54	3.78	0.57	3.73	0.62	3.65
6	0.48	4.09	0.30	3.88	0.41	3.80	0.32	3.74	0.35	3.74	0.46	3.52	0.55	3.47
7	0.40	4.07	0.22	3.85	0.21	3.80	0.22	3.74	0.22	3.74	0.37	3.56	0.47	3.53
8	0.48	4.07	0.44	3.83	0.45	3.81	0.48	3.79	0.52	3.75	0.62	3.68	0.97	3.33
9	0.44	3.97	0.44	3.90	0.46	3.77	0.53	3.70	0.53	3.68	0.63	3.74	0.75	3.71
10	0.35	4.24	0.26	3.83	0.32	3.81	0.35	3.76	0.41	3.76	0.72	3.64	0.72	3.53
11	0.33	4.10	0.43	3.92	0.50	3.87	0.48	3.79	0.45	3.75	0.75	3.84	0.87	3.78
12	0.37	4.08	0.66	3.95	0.64	3.85	0.68	3.75	0.66	3.74	0.80	3.79	0.86	3.75
13	0.41	4.05	0.58	3.90	0.59	3.88	0.60	3.80	0.60	3.72	0.62	3.70	0.75	3.64
14	0.48	4.07	0.58	3.87	0.6	3.86	0.66	3.84	0.67	3.79	0.72	3.68	0.73	3.63
15	0.44	3.96	0.71	3.94	0.75	3.91	0.81	3.80	0.66	3.78	0.79	3.70	0.84	3.55
16	0.48	4.05	0.78	3.85	0.81	3.82	0.82	3.79	0.85	3.79	0.75	3.65	0.90	3.54

较其他组合高,组合1在发酵初期亚硝酸盐含量较低,而发酵第5天亚硝酸盐含量较其他组合高。因此,从亚硝酸盐含量高低考虑,组合1~3这3种单一菌种不适宜作发酵剂。组合4~16为混合菌种发酵剂,发酵甘蓝菜中亚硝酸盐含量较组合1~3单一菌种低,组合7、14、15、16发酵甘蓝亚硝酸盐含量较其他混合组合高,未被作为发酵剂的候选对象。

2.1.2 不同菌种组合发酵甘蓝产酸和 pH 值变化情况

由表4可知,单一菌组合1~3发酵初期, pH 值下降较混合菌组慢,产酸慢。中、后期 pH 值和总酸度变化情况与混合菌组合无明显差异。说明混合菌启动发酵的作用强于单一菌种。含 nPb 菌的组合发酵初期 pH 值下降速度较快,产酸较快,中、后期与不含 nPb 菌的组合无明显的区别,说明 nPb 乳酸菌在初期生长旺盛,对发酵产酸起重要作用。

表5 不同菌种组合的发酵剂接种发酵甘蓝产酸情况和品质比较
Table 5 Acid production and sensory quality of fermented cabbage

菌种组合	产酸情况	感官品质
nPb	初期产酸较杆菌少, 较混合菌种少	酸香味淡,无酯香, 鲜味少,风味纯正
bC1, SPc, bC1:SPc	初期产酸 较球菌多	酸香味淡且不正, 无酯香,有刺激味
nPb:SPc, nPb:bC1	较单菌种 产酸多	酸香味较浓,有酯香, 清香味,较柔和
nPb:bC1:SPc	较单菌种 产酸多	酸香浓,醇厚柔和, 有酯香及菜体清香

由表5可知,单一菌种发酵时,球菌(nPb)较杆菌(bC1和SPc)产酸少,但前者风味明显优于后者。这与 Stamer 等^[14]使用单一纯乳酸菌发酵生产的酸菜汁风味研究的结果一致。混合菌种为发酵剂时,含球菌(nPb)较不含 nPb 产酸少,而风味好。含球菌(nPb)混合菌种发酵较单一菌种发酵风味柔和、醇厚丰满。

16组不同菌种组合发酵10d后取发酵甘蓝卤用高效液相色谱分离测定乳酸和醋酸,求其含量比值。结果见表6。蔬菜发酵过程中,以乳酸发酵为主,同时伴有微量醋酸的生成。极少量的醋酸不但无损于腌制品的风味,反而有利于风味的提高,如果醋酸含量过高,会影响制品的风味。乳酸、醋酸与乙醇生成具有芳香气味的酯类物质,给发酵菜增添特有的香味和滋味。发酵过程中乳酸的产量及乳酸与醋酸含量的比值是影响发酵蔬菜风味的重要因素。李基银^[15]认为酸度在0.45%~0.8%左右,乳酸与醋酸含量比值在4:1~10:1之间,发酵菜风味好。本实验16组发酵剂中组合8和13发酵甘蓝卤中乳酸与醋酸含量比小于10。其他组合是乳酸含量远远大于醋酸,其味道酸中带臭。

考虑到亚硝酸盐含量、产酸量及风味因素,最终选组合8和13为优良发酵剂,这两种发酵剂是异型发酵乳酸菌与同型发酵乳酸菌的不同配比。

表6 泡甘蓝卤中乳酸与醋酸含量的比值
Table 6 Lactic acid-to-acetic acid ratio in fermented cabbage brine

组合	乳酸峰面积	醋酸峰面积	乳酸/醋酸含量比值
1	5554121	172074	32.27751
2	6836345	51642	132.3796
3	7029091	59878	117.3902
4	7236296	69172	104.6131
5	7283287	72999	99.77242
6	7726369	83085	92.99355
7	7802540	90307	86.40017
8	1290419	200465	6.437129
9	5532343	215639	25.65557
10	7057841	199326	35.40853
11	7181036	62277	115.308
12	5542273	225438	24.58447
13	6561608	727575	9.018463
14	10687356	203066	52.62996
15	11901253	357537	33.28677
16	4783593	174158	27.46697

2.2 接种发酵条件的优化

2.2.1 不同温度下优良发酵剂发酵甘蓝产酸情况

发酵剂组合8、13在不同温度条件下发酵甘蓝, pH 值和总酸度的变化快慢不一样,在15、20、25、37℃发酵条件下,组合8到达发酵成熟的时间(pH 值为3.5)^[9]分别为5、3、2、2d。组合13到达发酵成熟的时间分别为5、3、2、1d。说明发酵温度越高,达到发酵成熟的时间愈短。反之,发酵温度愈低,达到成熟的时间愈长。温度高的优点为发酵快、生产周期短。缺点是发酵过程难以控制,容易出现过酸,并有异味,杂菌生长旺盛,变味腐败等问题,质量不稳定,风味较差。发酵温度低,不会出现过熟、污染杂菌等现象,且风味好。但发酵速度慢,生产周期长,经济效益低下。为了兼顾产品的品质和效益,选择25℃左右为发酵甘蓝合适温度。

2.2.2 不同接种量对发酵甘蓝产酸和 pH 值的影响

以 nPb:SPc 组合的发酵剂以不同的接种量接入甘蓝中发酵,从结果可知,接种量对发酵的影响很大,接种量高,发酵速度快,产酸多。0.05%和0.1%的接种量甘蓝需2d成熟,0.2%和0.35%的接种量,1d就能成熟。考虑到发酵的速度和经济性,以最大限度地使发酵技术的优势得以发挥,接种量为0.2%左右为最佳选择。

2.2.3 不同食盐质量浓度对接种发酵甘蓝亚硝酸盐含量的影响

从 nPb:SPc 组合为接种材料甘蓝在不同质量浓度的

食盐发酵过程中产生的亚硝酸盐量都有一个高峰期,且高峰期和峰值随食盐质量浓度和蔬菜的种类不同而异。结果表明甘蓝发酵过程中,食盐质量浓度低,“亚硝酸盐峰”出峰早,峰值大;食盐质量浓度高,“亚硝酸盐峰”出峰晚,峰值小。在2g/100mL食盐发酵条件下,“亚硝酸盐峰”出现在第1天,其值为37mg/kg,用4g/100mL食盐发酵条件下,“亚硝酸盐峰”出现在第2天,其值为23mg/kg,用6g/100mL食盐发酵条件下,“亚硝酸盐峰”出现在第3天,其值为11mg/kg。而且,高质量浓度的食盐比低质量浓度的食盐发酵甘蓝中亚硝酸盐含量降低的速度慢。从发酵甘蓝的亚硝酸盐含量和其降低的速度考虑选择4g/100mL的食盐。

2.2.4 nPb:SPc 组合发酵模型的建立和统计分析

为了研究不同条件对人工发酵甘蓝的影响和确定最佳的发酵条件,以nPb:SPc组合为接种材料在单因素试验基础上进行中心组合试验,对工艺参数进行优化,试验设计方案和结果见表7,15个试验点分为两类:其一是析因点,自变量取值在 X_1 、 X_2 、 X_3 所构成的三维定域,共有12个析因点;其二是零点,为区域中心点,零点试验重复5次,用来估计试验误差。

以甘蓝发酵3d的pH值(Y_1)和总酸度(Y_2)为响应值,经回归拟合后,得到回归方程:

$$Y_1 = 3.203 - 0.250875X_1 - 0.225875X_2 + 0.0635X_3 + 0.130125X_1^2 + 0.10875X_1X_2 - 0.03X_1X_3 - 0.207375X_2^2 + 0.0445X_2X_3 - 0.079625X_3^2 \quad (1)$$

$$Y_2 = 0.506 - 0.009625X_1 + 0.00375X_2 + 0.035625X_3 - 0.08925X_1^2 - 0.00825X_1X_2 - 0.006X_1X_3 - 0.0285X_2^2 - 0.07525X_2X_3 + 0.04075X_3^2 \quad (2)$$

表7 三因素二次正交旋转回归试验设计试验及结果
Table 7 Box-Behnken design arrangement and results

试验号	X_1	X_2	X_3	Y_1 pH	Y_2 总酸度(以乳酸计)/%
1	-1	-1	0	3.572	0.387
2	-1	1	0	3.032	0.401
3	1	-1	0	3.002	0.392
4	1	1	0	2.897	0.373
5	0	-1	-1	3.187	0.417
6	0	-1	1	3.226	0.602
7	0	1	-1	2.517	0.585
8	0	1	1	2.734	0.469
9	-1	0	-1	3.486	0.411
10	1	0	-1	2.895	0.396
11	-1	0	1	3.672	0.531
12	1	0	1	2.961	0.492
13	0	0	0	3.224	0.507
14	0	0	0	3.179	0.513
15	0	0	0	3.206	0.498

表8 pH值为指标的回归方程各项的方差分析表
Table 8 Variance analysis for pH value

方差来源	自由度	平方和	均方	F_1 值	显著性
模型	9	1.261293	0.140144	8.870948	*
一次项	3	0.94392	0.31464	19.91639	*
二次项	3	0.258546	0.086182	5.455221	*
交互项	3	0.058827	0.019609	1.241234	
误差	5	0.07899	0.015798		
失拟项	3	0.077964	0.025988	50.65903	*
纯误差	2	0.001026	0.000513		
RMSE		0.12569			
R^2		0.9411			

注: *.差异显著($P < 0.05$)。下同。

表9 以总酸度为指标的回归方程各项的方差分析表
Table 9 Variance analysis for total acidity

方差来源	自由度	平方和	均方	F_2 值	显著性
模型	9	0.074246	0.00825	13.15608	*
一次项	3	0.011007	0.003669	5.851075	
二次项	3	0.040172	0.013391	21.35525	*
交互项	3	0.023067	0.007689	12.26191	*
误差	5	0.003135	0.000627		
失拟项	3	0.003021	0.001007	17.66813	*
纯误差	2	0.000114	0.000057		
RMSE		0.025041			
R^2		0.9595			

由表8、9可知,结合回归方程的方差分析中的失拟项均方和纯误差均方,对pH值回归方程的失拟性检验 $F_1 = 50.65903 > F_{0.05(3,2)} = 19.2$,说明差异显著,方程(1)对所有试验点拟合程度较差。总酸度回归方程失拟性检验 $F_2 = 17.66813 < F_{0.05(3,2)} = 19.2$,差异不显著,失拟性检验不显著,说明总酸度回归方程对所有试验点拟合程度较好。所以对总酸度回归方程进行显著性检验。用回归方程来描述总酸度与自变量的关系时,其非线性关系显著: $F_1 = 13.15608 > F_{0.05(9,5)} = 10.2$,差异显著,总酸度回归方程均通过 F_1 、 F_2 检验,说明由二次正交旋转设计所获得的模型能够反映实际规律是有效的。由酸度回归方程可知,一次项回归系数绝对值的大小依次为 $X_3 > X_1 > X_2$,说明食盐质量浓度对总酸度影响最大,发酵温度次之,接种量对其影响较小。

2.2.5 交互作用对人工接种nPb:SPc组合发酵甘蓝总酸度的影响

由图3可知,在温度一定时,随着接种量增加,总酸度先增加后减少。当接种量一定时,随着发酵温度增高,总酸度先增加后减少。适当发酵温度和接种量获得较高的总酸度。由图4可知,接种量(X_2)较低时,随着发酵用食盐质量浓度增加,总酸度增大,接种量(X_2)较高时,随食盐质量浓度增大,总酸度先高后低。用盐量(X_3)较少时,接种量(X_2)加大,总酸度随之增高,

用盐量(X_3)较高时,随着接种量的增大,而总酸度(Y_2)减少。较高的接种量和较低的用盐量可以得到较高的总酸度。由图 5 可知,食盐质量浓度(X_3)一定时,发酵温度(X_1)增高,发酵总酸度先增加后减少,发酵温度较中心值偏低时,发酵总酸度增加,发酵温度较中心值偏高时,发酵总酸度减少。发酵温度不变时,食盐质量浓度增加,总酸度增大。较低的发 酵温度和适当的食盐质量浓度可获得较高的总酸度。

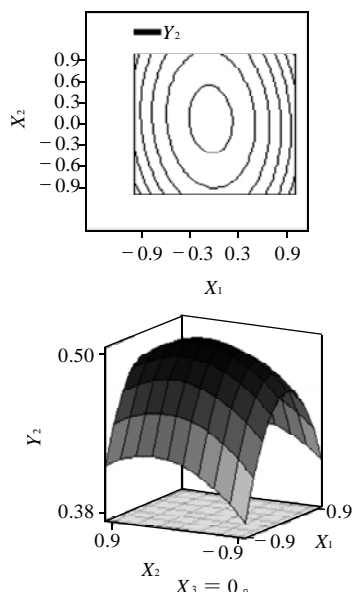


图 3 发酵温度与接种量对总酸度的影响

Fig.3 Response surface and contour plots of total acidity (Y_2) vs. fermentation temperature (X_1) and inoculum size (X_2)

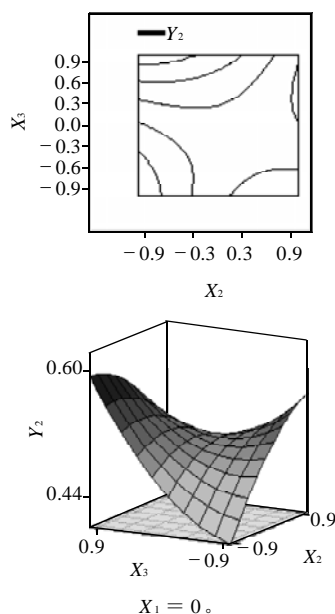


图 4 接种量与食盐质量浓度对总酸度的影响

Fig.4 Response surface and contour plots of total acidity (Y_2) vs. inoculum size (X_2) and salt concentration (X_3)

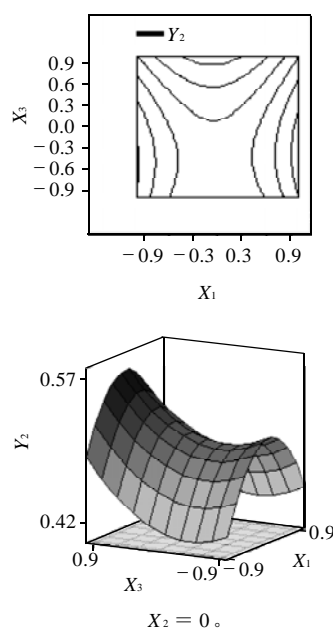


图 5 发酵温度与食盐质量浓度对总酸度的影响

Fig.5 Response surface and contour plots of total acidity (Y_2) vs. fermentation temperature (X_1) and salt concentration (X_3)

2.2.6 优化发酵条件的验证

经 3 次验证,实验所得的总酸度平均值为 0.51%,与预测值的总酸度 0.52% 接近,据报道^[16]发酵菜的总酸度为 0.5%~0.6% 是适合人们的口感,表明本实验采用响应面优化的发酵条件可靠。

3 结 论

本实验以从泡菜老汤和泡菜卤中分离的乳酸菌,植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、戊糖乳杆菌(*Lactobacillus pentosus*)、肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)这 3 种菌不同比例组合的 16 种组合接种发酵甘蓝,从发酵制品亚硝酸盐含量、产酸量及风味因素,最终选肠膜明串珠菌、戊糖乳杆菌组合,接种质量比例为 1:2 和肠膜明串珠菌、戊糖乳杆菌、植物乳杆菌组合,接种质量比例为 1:1:1 为优良发酵剂。

应用响应面分析法分析人工接种发酵甘蓝的条件,以总酸度建立数学模型,结合回归方程的方差分析,结果表明:以 pH 值为指标的回归方程对所有试验点拟合程度较差。说明总酸度回归方程对所有试验点拟合程度较好。所以以总酸度为测试指标验证发酵了条件。关于 pH 值拟合程度较差原因有待于进一步的研究。

应用响应面分析法优化了人工接种发酵甘蓝的条件,影响甘蓝发酵酸度的主要因素为食盐质量浓度,次要因素为发酵温度和接种量;发酵的适宜条件为食盐 4g/100mL、接种量 0.2%、发酵温度 25℃。

参考文献:

- [1] 燕平梅. 发酵蔬菜中亚硝酸盐含量及优良发酵菌种筛选的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2006.
- [2] 钟之绚, 郭剑. 酸白菜发酵中乳酸菌群的分析[J]. 微生物学报, 1995, 35(1): 74-76.
- [3] 燕平梅, 张惠, 薛文通, 等. 16S rRNA 基因序列方法分析传统发酵菜中乳酸菌多样性[J]. 中国食品学报, 2007, 7(2): 119-123.
- [4] KEIPPER C H, PETERSON W H, FRED E B, et al. Sauerkraut from pretreated cabbage[J]. Industrial and Engineering Chemistry, 1932, 24: 884-898.
- [5] LOPEZ A, SCHWARTZ M G, PRATT D E, et al. Nutritional supplementation of lactic acid flora of sauerkraut[J]. Food Research, 1954, 19: 564-574.
- [6] NARBORS W T, SALUNKHI D K. Pre-fermentation inoculations with *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus* on physico-chemical properties of fresh and dehydrated sauerkraut[J]. Food Technology, 1969, 23: 67-71.
- [7] YAN Pingmei, XUE Wentong, ZHANG Hui. Effect of inoculating lactic acid bacteria starter cultures on the nitrite concentration of fermenting Chinese paocai[J]. Food Control, 2008, 12: 51-55.
- [8] 燕平梅, 薛文通, 畅晓晖, 等. 自然发酵和接种发酵方法对白菜品质的影响[J]. 农业工程学报, 2008, 24(3): 286-290.
- [9] 沈国华, 卢英, 何丁喜, 等. 纯菌接种发酵技术在腌渍蔬菜加工上的应用研究(一)[J]. 中国调味品, 2002(3): 22-25.
- [10] 沈国华, 卢英, 何丁喜, 等. 纯菌接种发酵技术在腌渍蔬菜加工上的应用研究(二)[J]. 中国调味品, 2002(6): 24-31.
- [11] 蒋和体. 四川泡菜袋装发酵研究[J]. 食品工业科技, 1994(4): 32-34.
- [12] HELDRICH K. AOAC official methods of analysis of the association of official analytical chemists[G]. 15th ed. Virginia: Association of Official Analytical Chemists, 1990: 780; 842.
- [13] 黄伟坤. 食品检验与分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1989: 19-21.
- [14] STAMER J R, STOYLA B O, DUNCKEL B A, et al. Growth rates and fermentation patterns of lactic acid bacteria associated with the sauerkraut fermentation[J]. Journal of Milk and Food Technology, 1971, 34: 521-525.
- [15] 李基银. 蔬菜腌渍过程亚硝酸盐生成规律与危害防治[J]. 食品科学, 1988, 9(3): 1-6.
- [16] 刘敦华, 潘太安. 泡菜发酵工艺的研究[J]. 宁夏农学院学报, 1996, 17(1): 32-34.