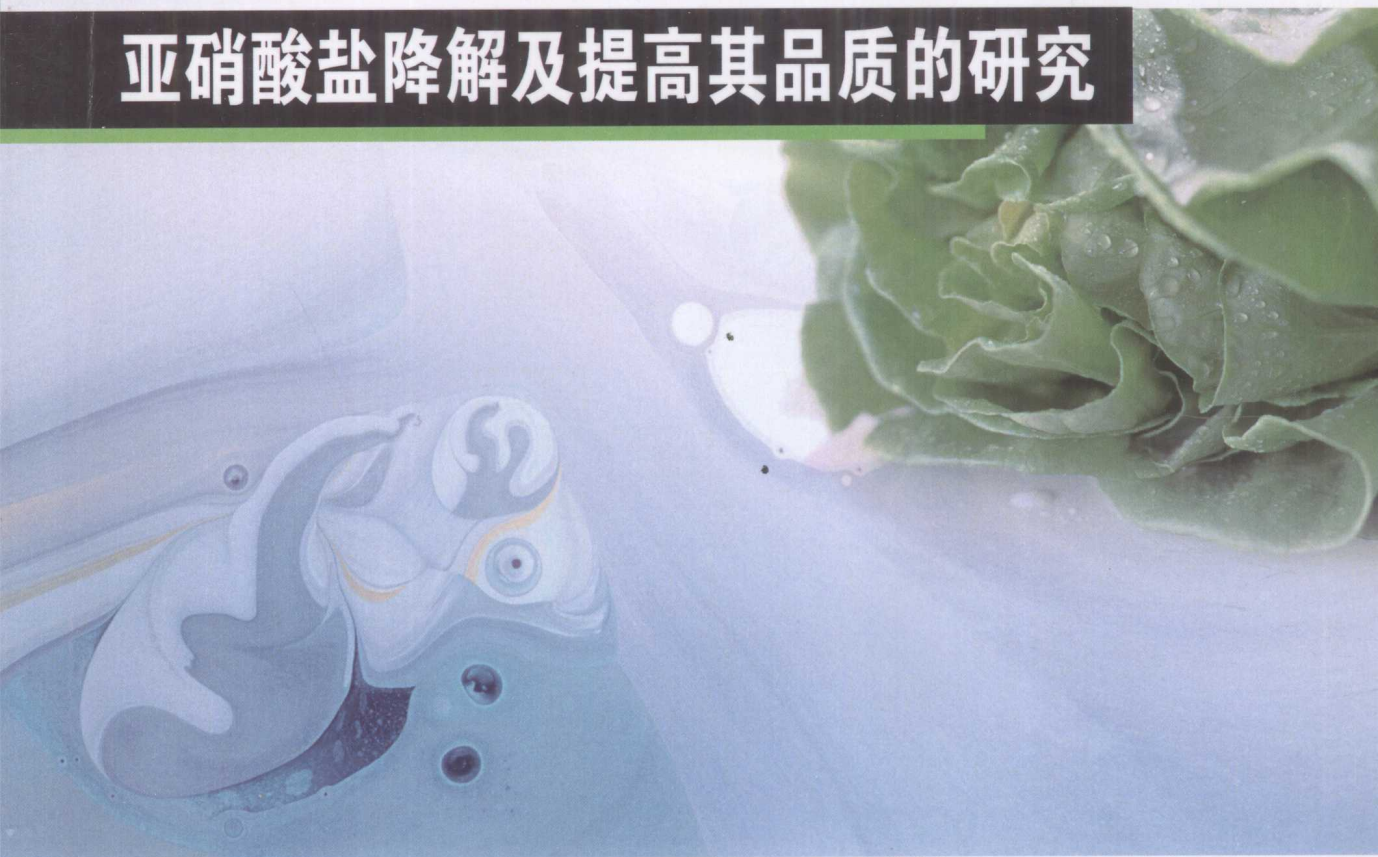


张庆芳 迟乃玉 著

# 乳酸菌发酵蔬菜

亚硝酸盐降解及提高其品质的研究



# 乳酸菌发酵蔬菜亚硝酸盐降解及 提高其品质的研究

张庆芳 迟乃玉 著

辽宁科学技术出版社

沈阳

## 图书在版编目(CIP)数据

乳酸菌发酵蔬菜亚硝酸盐降解及提高其品质的研究 / 张庆芳, 迟乃玉著. —沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2010.4

ISBN 978-7-5381-6398-8

I. ①乳… II. ①张… ②迟… III. ①乳酸菌发酵—蔬菜加工 IV. ①TS255.5

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 059191 号

---

出版发行: 辽宁科学技术出版社

(地址: 沈阳市和平区十一纬路 29 号 邮编: 110003)

印刷者: 沈阳天择彩色广告印刷有限公司

经销者: 各地新华书店

幅面尺寸: 185mm × 260mm

印 张: 9

字 数: 200 千字

出版时间: 2010 年 4 月第 1 版

印刷时间: 2010 年 4 月第 1 次印刷

责任编辑: 郭敬斌

封面设计: 辛晓习

版式设计: 袁 舒

责任校对: 刘 玉

---

书 号: ISBN 978-7-5381-6398-8

定 价: 25.00 元

联系电话: 024-23280336

邮购电话: 024-23284502

<http://www.lnkj.com.cn>

本书网址: [www.lnkj.cn/uri.sh/6398](http://www.lnkj.cn/uri.sh/6398)

# 摘要

本文研究了蔬菜腌渍过程中乳酸菌发酵规律和其降解亚硝酸盐机制及影响因素；探寻了细菌、乳酸球菌、乳酸杆菌在蔬菜自然发酵过程中生长、衰亡与环境 pH 变化的规律；分析了蔬菜腌渍发酵乳酸菌降解亚硝酸盐的机制；研究了各因素对乳酸菌降解亚硝酸盐的影响；确定了发酵初期乳酸菌降解亚硝酸盐的最佳条件；还对亚硝酸盐抑制乳酸发酵的原因进行了深入的探讨。在此基础上，选育出了亚硝酸盐降解能力强的乳酸菌株，并研制出蔬菜发酵的乳酸菌剂，以该菌剂进行蔬菜发酵，使发酵过程及菜中无亚硝酸盐生成。此外，还对酸白菜生产的原料——大白菜进行加工品种的筛选，筛选出了适合酸白菜生产的大白菜品种。具体如下：

1. 蔬菜自然发酵过程中微生物区系及 pH 的变化规律：在蔬菜自然发酵前期，伴随着乳酸菌的生长，细菌也大量生长，当乳酸菌产酸使汤汁 pH 降为 5.0 时，细菌量达到最大值；而后随着 pH 降低，细菌生长受到抑制，当 pH < 4.0 时，细菌大部分被抑制。在蔬菜自然发酵过程中，乳酸菌是发酵过程的主要菌群，乳酸菌的生长分成两个阶段：第一阶段（发酵前期，发酵菜汤汁 pH > 5.0），乳酸球菌起主要作用，乳酸球菌活动早，繁殖快。当汤汁 pH 降至 5.0，由于球菌耐酸性差，其生长受到抑制。第二阶段（发酵后期，发酵菜汤汁 pH < 5.0），由于乳酸杆菌耐酸性强，当发酵菜汤汁 pH < 5.0，乳酸杆菌逐渐成为优势菌，当汤汁 pH < 4.0 时，还有一定量的乳酸杆菌、酵母菌存在。

2. 乳酸菌降解亚硝酸盐的机制：乳酸菌对亚硝酸盐的降解分为酶降解和酸降解两个阶段。在发酵前期，培养液 pH > 4.5 时，这期间乳酸菌对亚硝酸盐降解以酶降解为主；在发酵后期，由于乳酸菌本身产生酸，使培养液 pH 降低，当 pH < 4.0 后，亚硝酸盐的降解主要以酸降解为主。由于乳酸杆菌产酸能力强于球菌，乳酸杆菌降解亚硝酸盐能力大于乳酸球菌，而在发酵前期，杆菌与球菌降解亚硝酸盐能力并无差别。

3. 环境 pH、发酵温度、接种量、底物浓度、氯化钠含量对乳酸菌酶降解亚硝酸盐的影响。结论是乳酸菌对亚硝酸盐的酶降解最适 pH 为 6.0~5.0，最适温度为 30℃。在其他条件不变的情况下，发酵初期亚硝酸盐的酶降解量随接种量的增加而增加，最适接种量为 5%。在 0~200mg/L 底物浓度范围内，乳酸菌对亚硝酸盐的酶降解量与底物浓度成正比，两者有良好的线性关系，根据米氏方程求得亚硝酸盐还原酶的米氏常数  $K_m$  为  $10^{-2}$ mol/L。氯化钠可能是亚硝酸盐还原酶的抑制剂，且这种抑制作用与氯化钠浓度有极显著的相关性。在不同温度和不同 pH 下，乳酸菌对亚硝酸盐的酶降解作用与菌数的相关性不大。

4. 观察到亚硝酸盐对乳酸发酵有抑制作用。原因有两点：第一，亚硝酸盐抑制了乳酸菌生长，从而抑制了乳酸发酵；第二，可能是在发酵初期亚硝酸盐还原酶的作用，使亚硝酸盐酶解生成  $\text{NH}_3$ ， $\text{NH}_3$  中和了乳酸菌生成的酸 ( $\text{H}^+$ )，从而使环境 pH 的下降和酸的积累变得缓慢。

5. 选育出 4 株对亚硝酸盐有很强降解能力的乳酸菌。其中 M8 菌株，对亚硝酸盐的酶降解能力最强，10h 对亚硝酸盐的降解率达 58.11%；其次对亚硝酸盐酶降解能力较强的是 Ln 菌株，10h 对亚硝酸盐的降解率达 51.32%。24h 后，M3 菌株和 Lb 菌株对亚硝酸盐的降解能力最强，48h 这两个菌株对亚硝酸盐的降解率达 100%。

6. 初筛出适用于生产发酵蔬菜的 S1、L1、M5、M8、M4 5 株乳酸菌。然后用 5 株乳酸菌进行不同组合来发酵蔬菜，确定出蔬菜最佳的发酵菌剂为两株乳酸杆菌 L1、M8 和两株乳菌球菌 M5、S1，按 1 : 1 : 1 : 1 组合。在实验条件下接种该发酵菌剂 S1L1M5M8 (1 : 1 : 1 : 1)，发酵速度快，生产出的酸白菜口感适合（总酸为 0.83%），菜色正常，特别是在发酵期间检测不出亚硝酸盐，菜中无亚硝酸盐残留。

7. 选用超级白菜、青丰、白丰、158、8801、沈农 TR21 快菜 6 个大白菜品种为原料，进行自然发酵。通过测定腌渍发酵前后白菜中主要成分的含量，并对成品进行感官评价。评定结果认为，6 个大白菜品种中，超级白菜和白丰最适合腌渍发酵，生产出的酸白菜色泽、质地、风味均优于其他品种；腌渍发酵产品质量最差的是沈农 TR21 快菜。

# 前言

“民以食为天”，随着生活水平的提高，人类越来越重视饮食结构的调整。如今人类食物的发展趋势是以植物性食物为主，科学地搭配动物性食物。蔬菜是人类摄取维生素、矿物质、粗纤维等营养成分的重要来源，是其他任何食物不可替代的。但蔬菜是地区性、季节性很强、容易腐烂的植物性食物，如贮存不善，损失率可达20%~30%。目前我国用于深加工的蔬菜还不到其总产量的10%，这就要求我们为蔬菜深加工寻找出路，生产出安全、快捷的加工制品。

蔬菜发酵制品是我国人民非常喜欢的传统食品，如东北的酸白菜、南方的酸泡菜、贵州省的独山盐酸菜、甘肃省的酸菜及浆水等都各具特色，是当地群众必备的辅助食品。蔬菜腌渍发酵制品是一种不加任何添加剂，而是依靠微生物发酵来完成整个生产过程的食品。它的营养价值除了原料以外，在发酵过程中还生成各种对人体有益的有机化合物及人体生理代谢不可缺少的各种酶。此外，其发酵的主要菌群——乳酸菌，是食品生产中经常应用的工业菌株，可利用乳糖、葡萄糖等可发酵性糖快速生成乳酸、乙酸等有机酸，是公认的GRAS级微生物，是人体肠道主要微生物菌群之一，已经在肉制品、乳制品和风味酸菜制品中广泛应用。

但蔬菜中还含有大量硝酸盐，可被大肠埃希菌等细菌还原成亚硝酸盐。蔬菜腌渍发酵过程中，硝酸盐还原生成亚硝酸盐的现象是不可避免的，这早已被大量实验所证实。亚硝酸盐是一种有害的毒性物质，可以使人中毒、致癌、婴儿致畸。主要表现在以下3个方面：①亚硝酸盐通过食物摄入，造成呼吸困难、中枢神经系统损伤、循环衰竭，使人中毒；②妊娠期亚硝酸盐体内富集，通过胎盘使婴儿致畸；③亚硝酸盐在体内转化为强致癌物的亚硝胺类化合物，使人致癌。流行病学调查表明，亚硝胺类物质与食道癌、胃癌、膀胱癌等癌症的发病有直接关系。

传统的蔬菜腌渍发酵工艺是利用天然附着于菜体表面的各种微生物来发酵，发酵周期长，易腐烂变质，并会有大量亚硝酸盐生成。近年来，为了缩短发酵周期，改善发酵蔬菜的品质，对人工接种技术进行了研究和应用。人们在接种乳酸菌腌渍发酵菜实验中，发现接种发酵能显著地降低亚硝酸盐生成。1978年，Smith认为植物乳酸杆菌的某些菌株具有还原亚硝酸盐能力；1989年，郭晓红等认为乳酸杆菌能降解亚硝酸盐；1999年，孟宪军等也认为乳酸杆菌可降解亚硝酸盐。

目前关于乳酸菌降解亚硝酸盐的作用机制、降解亚硝酸盐能力强的乳酸菌株的选育工作以及乳酸菌降解亚硝酸盐分子基础的研究在国际上未见报道，国内这一领域更无人

研究。本书有幸对此领域进行了一些有益的探讨。

子在川上曰：“逝者如斯夫！”风雨几载，已成一瞬。我深感庆幸，能在人生的路上与善良、正义和智慧的人们为伍，有了他们的支持与关心，增添了我战胜困难、超越自我的勇气和力量，使本论文得以顺利完成。借此机会，向他们表示衷心的感谢。

编者

## 文献综述

蔬菜腌渍发酵制品是一种不加任何添加剂,而是依靠微生物(主要是乳酸菌)的发酵来完成整个生产过程的食品。它的营养价值除了原料中含有的矿物质、维生素、粗纤维外,最可贵的营养价值在于蔬菜发酵过程中生成的各种有机化合物,主要有乳酸、胆碱、乙酰胆碱、激糖素及人体生理代谢必不可少的各种酶等。这些发酵产物在人体保健及防病抗病方面,具有其他蔬菜不可比拟的功能。除了营养成分外,其发酵的主要菌群——乳酸菌,是人体肠道的正常微生物菌群,是公认的 GRAS 级微生物,可调节人体肠道的微生态平衡,抑制有害菌生长及其毒素的产生,增强人体免疫力,其保健作用已越来越被人们所认识。蔬菜腌渍发酵制品还是我国人民非常喜欢的传统食品,据《诗经》记载,距今 2400 年前,我国就有蔬菜发酵制品。东北的酸白菜、南方的酸泡菜、贵州省的独山盐酸菜、甘肃省的酸菜及浆水等都各具特色,是当地群众必备的辅助食品。蔬菜发酵制品的生产对推动整个蔬菜业的发展及满足人体营养需求、医疗保健方面都具有重大意义。

蔬菜腌渍发酵制品的生产是以蔬菜为原料,利用有益微生物活动的生成物,控制一定生产条件,对蔬菜进行保藏的一种方式。发酵过程主要是乳酸菌的活动,同时还有其他微生物的辅助作用,并且伴随着化学成分的变化和形成,赋予了产品特殊的风味和营养价值。在蔬菜腌渍发酵过程中,由微生物引起的发酵作用,不但能抑制有害微生物的活动而起到防腐作用,还能使制品产生酸味和香味。这些发酵作用以乳酸发酵为主,辅以轻度的酒精发酵和醋酸发酵,相应的生成乳酸、酒精、醋酸。乳酸发酵是蔬菜腌渍发酵过程中最主要的发酵作用。乳酸菌广布于空气、蔬菜表面、加工用水及容器用具的表面等,种类甚多,有球菌、杆菌,属兼性厌氧性,一般最适生长温度为 26~30℃。乳酸菌将原料中的糖分,主要是单糖、双糖转化成乳酸及其他代谢产物。在蔬菜腌渍发酵过程中存在着酒精发酵,乙醇含量可达 0.5%~0.7%,对乳酸发酵并无影响。酒精发酵生成的乙醇,可与乳酸反应,生成乳酸乙酯,使制品具有香味。在蔬菜腌渍发酵过程中也有微量的醋酸形成。醋酸的主要来源是由醋酸菌氧化乙醇而生成的,这一作用称为醋酸发酵。极少量的醋酸不但无损于腌制品的品质,反而有利于产品风味的形成,只有在含量过多时才会影响成品的品质。供腌渍的蔬菜除含糖外,还含有一定量的蛋白质和氨基酸,在腌渍发酵期间,其所含的蛋白质受微生物的作用和蔬菜原料本身所含蛋白质水解酶的作用而逐渐被分解为氨基酸,这一变化在蔬菜腌渍发酵期间是十分重要的生物化学变化,也是腌制品产生一定色泽、香气和风味的主要来源,但其变化缓慢而复杂。例如大白菜腌渍发酵后制成的酸白菜,氨基酸总量显著增多,而且种类达 17 种之多。发酵后谷氨酸、天冬氨酸含量明显高于原料中含量,使酸白菜具有一定的清鲜味。氨基酸和醇都



具有一定香气，在腌渍发酵中能进一步形成醛酯等物质，使香气更浓。乳酸菌将糖发酵生成乳酸，同时还生成具有芳香气味的双乙酰、醇、高级酮等。各种香气成分融混在一起，形成更为复杂的香味。经孟宪军等分析测定，在腌渍发酵后，菜中增加了多种挥发性成分，如双乙酰、乙酸乙酯、乙缩醛、正乙醛、2-庚酮、2-壬醇等。

### 一、蔬菜腌渍发酵的研究进展

关于蔬菜腌渍发酵的研究主要始于 20 世纪 80 年代，研究主要集中在以下方面：

#### (一) 发酵工艺的改进

传统的蔬菜腌渍发酵工艺是利用天然附着于菜体表面的各种微生物来发酵，不可避免地带有大量杂菌，阻碍乳酸菌生长，发酵周期长，易腐烂变质。近年来，对人工接种技术进行了研究和应用，张建军等（1986 年）首先在我国应用纯种接种技术进行甘蓝和莴笋乳酸发酵的研究，提高产品的发酵速度，改善产品品质；赵书欣等（1998 年）也应用接种技术，观察到由于人工接入乳酸菌，发酵初期乳酸菌生长迅速，使环境 pH 快速降低，缩短发酵周期；蒋和体等（1994 年）采用乳酸菌混合菌株进行四川泡菜袋装发酵研究，证明产品成熟快，产酸量大；钟之绚（1995 年）也曾采用乳酸菌纯种接种发酵技术，证明通过接种能增强发酵系统乳酸菌群优势，调整微生物菌群结构，形成有利于乳酸菌生长的环境，加快发酵速度。以上这些研究，都为蔬菜腌渍发酵接种工艺的应用奠定理论基础。牟君富等（1990 年）对酸白菜的加工原理和技术进行研究，指出乳酸菌生长最适温度为 26~30℃，在此温度下乳酸发酵快，周期短。在 25~30℃时，7d 左右就能完成发酵；10~14℃则需 18d 左右；在 7℃左右时，经 1 个半月才能完成发酵。范利华等（1994 年）研制番茄乳酸发酵饮料时确定最适发酵温度分别为 28℃、40℃。陈惠音等（1994 年）研究超低盐多菌种快速腌渍时，探讨最适培养条件进行乳酸发酵，根据菌种特性，初期以球菌为主发酵，温度为 25~27℃；以后以杆菌为主，提高至 35~37℃。孟宪军等（1999 年）研究认为，大白菜乳酸发酵最适发酵温度为 25~30℃。

盐度和 pH 也是影响蔬菜腌渍发酵的两个主要因素。牟君富等用 2%~3% 的食盐腌渍酸白菜取得良好的效果，认为 2%~3% 的盐不仅强有力地抑制有害微生物，而且食盐会使菜体糖分、水分外渗，供应发酵营养。陈惠音等也采用 1%~1.5% 的超低盐，配合添加适量的蔗糖、葡萄糖、乙醇等增加营养及渗透压来促进蔬菜发酵。贺稚非等（1994 年）研究发酵酸白菜变质原因时指出，变质后 pH 有上升趋势，可通过提高酸度的方法加以补救。钟耀广等（1994 年）认为，可通过降低 pH 来抑制腌制品中有害微生物的形成。

#### (二) 蔬菜腌渍发酵微生物区系的研究

郭晓红等（1989 年）对甘蓝乳酸发酵初期微生物区系的变化进行了探讨。研究发现，在甘蓝自然发酵初期有多种微生物存在，细菌占大多数，还有一定数量的霉菌和酵母菌；

发酵 24h 后, 霉菌和酵母菌消失; 随着发酵的进行, 杂菌数量和种类减少, 乳酸菌数量迅速增加, 占细菌总数的比例不断增加。发酵 2d 后, 乳酸菌完全取代杂菌, 成为发酵中起主要作用的菌种, 主要为明串珠菌属、乳杆菌属和片球菌属。钟之绚 (1995 年) 对酸白菜发酵中乳酸菌群分析时也认为, 在整个发酵过程中除了大量细菌外, 还有霉菌和一类酵母菌——地霉属。发酵前期, 乳酸菌占少数; 随着发酵时间延长, 乳酸菌占细菌总数比例增大。发酵中期乳酸菌为植物乳杆菌, 中后期有植物乳杆菌和棉子糖链球菌。贺稚非 (1994 年) 在发酵酸白菜变质原因的微生物学探讨中, 对微生物群落进行分析, 认为在酸白菜发酵过程中, 首先是附着在原料上的杂菌不断生长繁殖, 主要有微球菌属、杆菌属、假单胞菌属、酵母菌属、肠杆菌属、棒杆菌属等; 同时, 乳酸菌也随之增殖, 主要为球状乳酸菌、链球菌、明串珠菌、片球菌等, 但产酸量低; 当发酵进入中期时, 乳酸菌大量生长繁殖, 不耐酸的细菌如肠杆菌属、克雷伯氏菌属等受到抑制, 霉菌也因无氧被抑制; 随着发酵的不断进行, 酸白菜中的微生物几乎都是乳酸菌和酵母菌, 乳酸菌大多为植物乳杆菌、短乳杆菌。Vaghn (1943 年) 研究了油橄榄的自然发酵过程, 提出在油橄榄乳酸发酵中, 发酵初期可分离到乳球菌、肠球菌和明串珠菌, 中后期是短乳杆菌和植物乳杆菌。Borbolla.Yaccaca 等 (1958 年) 的研究也得出类似的结果。

### (三) 蔬菜腌渍发酵接种技术的研究

钟之绚等认为, 蔬菜上存在多种乳酸菌, 但因为不是该微生物区系的优势菌群而无法显现。发酵前接入乳酸菌不是单靠它完成发酵全过程, 而是通过增强发酵系统中乳酸菌种群优势, 调整微生物种群结构, 形成有利于乳酸菌生长的环境, 使蔬菜上种类丰富的乳酸菌得以大量产生。蔬菜人工接种混合发酵是将两种或多种乳酸菌同时接种培养, 并用于蔬菜腌渍发酵的过程。张若飞等 (1984 年) 认为, 接种混合发酵可以合理地利用多种微生物的不同功能, 相互配合, 开拓新产品。范利华等 (1991 年) 在研究番茄乳酸发酵饮料时, 认为混合菌种发酵生产的番茄汁优于单一菌种发酵。陈惠音等 (1994 年) 在采用超低盐多菌种快速发酵腌酸白菜时, 采用肠膜状明串珠菌、植物乳杆菌和嗜酸乳杆菌 3 种菌混合发酵。其中, 肠膜状明串珠菌主要在发酵前期活动, 进行异型乳酸发酵, 产生乳酸、乙酸、乙醇和  $\text{CO}_2$  等。一方面使汁液 pH 很快下降, 抑制其他杂菌的生长; 另一方面该菌产生的  $\text{CO}_2$  替代了空气, 创造厌氧环境, 更有利于厌氧杆菌生长, 产生大量乳酸, 使大白菜中酸度迅速增加; 同时, 也有利于保持蔬菜的色泽和维生素 C 的稳定。产生的有机酸、醇类以及其他代谢产物互相配合, 使产品具有良好的风味。

李幼筠 (1996 年) 采用有 40 余年连续发酵周期的优质泡菜汁为菌源, 优选出两株泡菜乳酸菌纯种, 并应用于年产 500t 泡菜的工业化生产。侯红漫 (1997 年) 从酸白菜汁中分离出一株产酸能力强、发酵无异味的菌体, 经鉴定为植物乳杆菌。经发酵酸白菜生产小

规模实验，酸白菜酸度可达 1.8%。王禾等（1999 年）以白菜汁为基质，对乳酸菌株进行发酵研究，确定嗜酸乳杆菌为主要发酵菌株。

#### （四）亚硝酸盐问题的研究

##### 1. 蔬菜腌渍发酵生成亚硝酸盐

早在 1907 年，Richardson 等就指出蔬菜中有大量硝酸盐。蔬菜体内积累硝酸盐是其生长过程中的自然现象，它是植物吸收氮素的主要形态之一，可被同化为氨、氨基酸，作为植物合成蛋白质的氮源。有机肥料和无机肥料中的氨态氮，在土壤中硝化细菌的作用下转变成硝酸盐，植物吸收硝酸盐后，在自身一系列酶的作用下，重新转变成氨态氮，而后又进一步生成氨基酸和核酸，进而高分子化构成植物体。当吸收量超过其还原同化的量就造成硝酸盐的积累。特别是近年来过量地施用 N 肥，更造成了蔬菜体内硝酸盐的大量积累。据田丽萍（1994 年）、庞道华（1996 年）、杨惠芬（1989 年）、黄建国（1996 年）、周根娣（1989 年）、韩涛（1994 年）等对石河子市、济宁市、北京市、重庆市、上海市等地市场销售的蔬菜及几种常见野菜中硝酸盐含量进行测定，发现硝酸盐含量普遍较高，特别是常用于腌渍发酵加工的根菜类、叶菜类含量尤其高，平均含量在 1500mg/kg 左右。

早在 1943 年，Wilson 就指出蔬菜中的硝酸盐被细菌还原成亚硝酸盐。自然界能使硝酸盐还原的菌种有 100 多种，在蔬菜腌渍过程中最常出现的是大肠埃希菌、白喉杆菌、黏质塞氏杆菌等，这些菌具有硝酸还原酶，通常使之蓄积起来，这类菌通常为革兰氏阴性菌。从乳酸菌的生理生化特性来看，几乎所有的乳酸菌，都不能使硝酸盐还原为亚硝酸盐，因为它不具备细胞色素氧化酶系统。郭晓红等（1989 年）对甘蓝乳酸发酵初期微生物区系的细菌进行分类，并测定了他们的硝酸盐还原反应。结果表明，所有的乳酸菌（明串珠菌属、乳杆菌属和片球菌属）的硝酸盐还原反应都为阴性，而其他细菌属多为阳性（肠道细菌科、黄杆菌属、假单胞菌属、葡萄球菌属）。蔬菜腌渍发酵过程中存在的有害菌主要来自蔬菜本身自带菌。由于蔬菜在栽培过程中受大肠埃希菌等各种有害菌污染是在所难免的，虽然在加工时，菜体要经过清洗，但菜体上各种菌仍然大量存在；再者使用的器具不消毒或消毒不彻底也会使有害菌进入加工产品中，因此蔬菜腌渍发酵过程中，硝酸盐还原生成亚硝酸盐的现象是不可避免的，而且这种现象早已被大量实验所证实。郑继舜等（1986 年）对大白菜腌渍发酵加工中硝酸盐、亚硝酸盐含量变化规律进行研究，发现在发酵过程中，亚硝酸盐随时间变化曲线出现“亚硝峰”。李基银等（1988 年）在对蔬菜腌渍过程亚硝酸盐生成规律的研究中，也证明在蔬菜腌渍过程中，一般都出现“亚硝峰”现象。潘鹤枫（1988 年）、郭晓红（1989 年）、刘玉龙（1991 年）等先后在研究大白菜、甘蓝发酵的实验中也证明了这一事实。1995 年，我国卫生部食品卫生监督检验所对北京、河南、青岛、吉林地区的蔬菜、粮食、鲜鱼类、鲜肉类、鲜蛋类、食盐、酱腌菜、乳与乳

制品中亚硝酸盐分析, 调查结果表明, 市场供应的正常八大类食品均有亚硝酸盐被检出, 其中酱腌菜的检出率高达 94.7%, 最高值为 85.63mg/kg。

## 2. 亚硝酸盐对人体健康影响的研究

亚硝酸盐是一种有害的毒性物质, 可以使人中毒、致癌、婴儿致畸。主要表现以下 3 个方面:

(1) 亚硝酸盐被人体吸收进入血液, 将血红蛋白中的二价铁离子氧化为三价, 使亚铁血红蛋白 (正常) 转变成高铁血红蛋白, 而失去运氧机能, 使皮肤黏膜青紫。若血中 20% 的亚铁血红蛋白转变为高铁血红蛋白, 会造成缺氧症状, 引起呼吸困难、循环衰竭以及中枢神经系统损害, 严重者死亡。

(2) 亚硝酸盐可导致维生素 A 的氧化破坏并阻碍  $\beta$ -胡萝卜素转化为维生素 A, 致体内维生素 A 不足。

(3) 亚硝酸盐在体内转化为强致癌物亚硝胺类化合物。亚硝胺在体内先进行  $\alpha$ -位碳羟基化, 经过一些活性中间代谢产物作为烷化剂脱甲基后, 甲基 (或其他烷基) 使 DNA、RNA 等大分子中的鸟嘌呤等 O-处烷基化, 鸟嘌呤与烷基的配位键结合, 使 DNA 或 RNA 复制错误, 从而形成癌症。亚硝胺不仅多次长期摄入体内能致癌, 即使一次冲击也可致癌。在 19 世纪 60 年代, 人们就已知亚硝胺的毒性, 但直到 1954 年才发现二甲基亚硝胺使人发生肝硬化, 随即于 1956 年发现它是大鼠的致癌物质, 从这以后已研究的 300 多种亚硝胺, 约 80% 以上有致癌性。总体而言, 它可以诱发出大鼠、小鼠及地鼠的所有器官及组织的肿瘤。现已证明, 诱发肿瘤以肝、食管、胃等器官为主, 也可诱发脑、大小肠、皮肤、前胃、腺胃、肾、咽、肺、鼻腔、胰、脑、脊髓和外围神经系统引起癌变, 后来证实还可使乳腺、骨、心脏、生殖器等诱发肿瘤。除了用啮齿类动物做实验, 还曾用鱼类、鸟类、兔、豚鼠、猪、狗、蛙及猴做实验, 所有被试动物没有一种对亚硝胺的致癌性有抗力, 其中包括了对其他化学诱癌物不敏感的家兔和豚鼠。在实验中还发现, 亚硝胺可通过胎盘而使子代受损伤, 一般在受孕初期可使胎儿中毒死亡, 中期给毒可使胎儿发生畸形, 受孕后期给毒可使子代发生肿瘤, 亚硝胺还可以通过乳汁使子代患肿瘤。流行病学调查表明, 亚硝胺类物质与食道癌、胃癌、膀胱癌等癌症的发病有直接关系。

目前, 农产品中亚硝酸盐残留日益严重。据统计, 我国化肥施用量达  $400\text{kg}/\text{hm}^2$  以上, 远远超出发达国家  $225\text{kg}/\text{hm}^2$  的死亡安全上限。氮肥过多施用导致农产品中积累大量硝酸盐, 进而使农产品富集了亚硝酸盐。市场供应的八大类食品都含有亚硝酸盐, 而且呈上升趋势。据我国卫生部食品卫生监督检验所对北京、河南、青岛、吉林等地区的蔬菜、粮食、鲜鱼类、鲜肉类、食盐、酱腌菜、乳及乳制品等市场供应的八大类食品亚硝酸盐调查结果, 亚硝酸盐均被检出; 蔬菜中亚硝酸盐含量都有较大幅度上升, 如重庆地区菠菜超标

率为 100%、大白菜为 30%、芹菜为 28.2%、甘蓝为 8.0%。姜宏伟等对市场上熟肉制品亚硝酸盐检测, 检出率由原来的 33% 上升至 98%。

我国卫生部按 WHO/FAO (1994 年) 规定硝酸盐和亚硝酸盐的 ADI 值分别为 5mg/kg 体重和 0.2mg/kg 体重。也就是说一个体重 70kg 的人, 每日允许摄入量为 14mg。依据我国食品中亚硝酸盐的含量, 提出我国食品中亚硝酸盐允许限量的卫生标准: 粮食 (大米、面粉和玉米) 3mg/kg, 蔬菜 4mg/kg, 鲜鱼类 3mg/kg, 鲜蛋类 5mg/kg, 鲜肉类 3mg/kg, 食盐 2mg/kg, 酱腌菜 20mg/kg, 奶粉 2mg/kg。

### 3. 控制蔬菜腌渍发酵亚硝酸盐含量的研究

李基银等在腌渍萝卜、白菜时发现, 调腌渍液 pH 为 5.0 的比未调的对照亚硝峰出现的时间早, 由第 10d (未调 pH 的) 提前到第 3d (调 pH 的), 峰值由 9.5mg/kg 降至 1.7mg/kg。张建军等 (1988 年) 在用大蒜对莴笋乳酸发酵中亚硝酸盐形成的抑制作用研究中认为, 大蒜很明显地抑制了莴笋乳酸发酵中亚硝酸盐的形成和积累。王勤等 (1999 年) 在维生素阻断腌渍蔬菜产生亚硝酸盐的研究中发现, 添加维生素 C 越多, 消除亚硝酸盐的效果越好。马兰等 (1995 年) 在研究酸菜鲜 (主要成分是脱氢乙酸钠) 对酸菜腌制过程微生物菌系及酸菜品质的影响时, 看到酸菜鲜对非产酸菌如大肠埃希菌等的抑制作用, 使发酵过程中亚硝酸盐生成量减少。刘玉龙等研究表明, 大白菜腌渍发酵采用熟渍方式能降低的峰值及全程含量。郭晓红、赵书欣等在接种乳酸菌腌渍发酵菜实验中, 看到接种发酵能降低亚硝酸盐的生成, 亚硝酸盐变化曲线相对平滑稳定, 峰值较低。同时, 陈惠音等 (1994 年) 在研究超低盐多菌种快速发酵腌菜技术中也说明了这一点。此后, 孟宪军、周彬等 (1999 年) 在大白菜腌渍发酵乳酸菌菌种选育及发酵特性的研究中同样看到这一现象。

## 二、蔬菜腌渍发酵研究存在的问题

### (一) 很多实验都证实了接种发酵有利于降低腌渍菜中亚硝酸盐的含量

在 1955 年, Costilow 及 Humphveys 的报告说某些乳酸菌是有还原亚硝酸盐作用。郭晓红等认为, 植物乳杆菌对亚硝酸盐有降解作用。孟宪军等也认为其选出的 UM6-2 乳酸杆菌能降解亚硝酸盐。Smith 也认为植物乳杆菌的某些菌株具有硝酸盐和亚硝酸盐的还原能力。此外在肉制品研究中, Dodds 和 Collins-Thompson 等认为, 从加工肉制品 (主要是香肠) 中分离出来的乳酸菌, 某些菌株可降解亚硝酸盐。但目前关于乳酸菌降解亚硝酸盐的作用机制及降解亚硝酸盐能力强的乳酸菌株的选育工作在国内尚未见详细报道, 国际上这一领域研究更少。

### (二) 蔬菜腌渍发酵亚硝酸盐生成规律及控制途径

关于这方面的研究很多, 但到目前为止, 在蔬菜腌渍发酵生产中还没有达到使蔬菜腌

渍过程中无亚硝酸盐生成或无亚硝酸盐残留,因此就如何使生产过程中所生成的亚硝酸盐达到快速、彻底地降解这一内容,有必要进行研究。

### (三) 发酵蔬菜生产缺乏专用的原料品种

近年来,随着工作节奏的加快和家务劳动社会化程度的提高,发酵蔬菜生产开始由家庭式向工厂化生产过渡,各地相继建立起大规模的发酵蔬菜生产企业。但在发酵蔬菜工厂化生产中,生产原料问题却一直被忽视。发酵蔬菜原料购进的随意性很大,随着市场原料品种不断变化,导致产品质量不稳定,甚至不合格。因此,筛选出具有腌渍发酵加工适应性的原料品种,是发酵蔬菜工厂化、规模化生产的迫切需要。

### (四) 其他

目前酸白菜工厂化生产常采用单一菌种或混合杆菌发酵,其制品缺乏自然发酵菜所具有的醇厚风味,并且有大量亚硝酸盐残留。

## 目 录

<b>第一章 蔬菜腌渍品种筛选及发酵过程中乳酸菌生长规律的研究</b> .....	001
<b>第一节 酸白菜生产原料——大白菜品种的筛选</b> .....	001
一、材料与amp;方法 .....	001
二、结果与分析 .....	003
三、讨论与amp;结论 .....	010
<b>第二节 蔬菜腌渍发酵乳酸菌生长规律的研究</b> .....	011
一、材料与amp;方法 .....	012
二、结果与分析 .....	013
三、结论 .....	016
<b>第二章 乳酸菌降解亚硝酸盐机制及影响因素的研究</b> .....	017
<b>第一节 乳酸菌对亚硝酸盐降解机制的研究</b> .....	017
一、材料与amp;方法 .....	017
二、结果与分析 .....	018
三、讨论与amp;结论 .....	025
<b>第二节 影响乳酸菌酶降解亚硝酸盐因素的研究</b> .....	026
一、材料与amp;方法 .....	026
二、结果与分析 .....	028
三、讨论与amp;结论 .....	041
<b>第三节 亚硝酸盐对乳酸菌发酵的影响</b> .....	043
一、材料与amp;方法 .....	043
二、结果与分析 .....	043
三、讨论与amp;结论 .....	045
<b>第三章 蔬菜腌渍发酵乳酸菌剂的研究</b> .....	047
<b>第一节 蔬菜自然发酵乳酸菌的分离</b> .....	047
一、材料与amp;方法 .....	047
二、结果与分析 .....	049
<b>第二节 降解亚硝酸盐乳酸菌株的筛选</b> .....	052
一、材料与amp;方法 .....	052
二、结果与分析 .....	053

三、讨论与结论 .....	056
第三节 蔬菜腌渍发酵乳酸菌剂的研究 .....	056
一、材料与amp;方法 .....	056
二、结果与分析 .....	057
三、讨论与结论 .....	062
<b>第四章 总讨论 .....</b>	<b>063</b>
一、乳酸菌降解亚硝酸盐机制及影响因素研究的意义 .....	063
二、蔬菜自然发酵过程中“亚硝峰”出现时间的探讨 .....	063
三、“亚硝峰”前亚硝酸盐进行大量酶降解的探讨 .....	063
四、蔬菜乳酸发酵过程影响亚硝酸盐因素的探讨 .....	064
五、关于蔬菜腌渍发酵硝酸盐问题的探讨及理想蔬菜发酵 生产工艺的构建 .....	065
<b>附录 .....</b>	<b>067</b>
附录 1 蔬菜腌渍发酵亚硝酸盐测定 ——盐酸萘乙二胺法预处理条件的研究 .....	067
附录 2 发表的相关文章 .....	071
<b>参考文献 .....</b>	<b>119</b>



# 第一章 蔬菜腌渍品种筛选及发酵过程中乳酸菌生长规律的研究

## 第一节 酸白菜生产原料——大白菜品种的筛选

在我国东北,不管是农村还是都市,家家腌渍酸白菜,户户食用酸白菜,可以说比任何其他蔬菜加工品的食用普及率都高。但近年来,随着人民生活水平的提高,居住环境的美化,工作节奏的加快,家务劳动社会化程度的提高,酸白菜生产开始由家庭式向工厂化过渡,各地相继建立起大规模的酸白菜生产企业。如长春、沈阳、阜新、大连等地的酸白菜腌制企业,已经进入现代化管理、工厂化生产的新阶段,产品正逐渐取代市场上家庭式生产的酸白菜。但在酸白菜工厂化生产中,原料问题却一直被忽视,目前各地酸白菜加工厂大白菜购进的随意性很大,随着市场大白菜生产品种不断变化,导致产品质量不稳定,甚至亚硝酸盐严重超标。因此,筛选出具有腌渍发酵加工适应性的大白菜优良品种是酸白菜工厂化、规模化生产的迫切需要,也是稳定产品质量、企业健康的发展的保证。目前,关于蔬菜腌渍发酵原料品种的研究尚未见报道,因此筛选酸白菜加工用的大白菜品种既有应用价值,又具有实践指导意义。

### 一、材料与方方法

#### (一) 实验材料

##### 1. 大白菜品种

超级白菜、青丰、白丰、158、沈农 TR21 快菜(简称快菜)、8801。沈阳农业大学蔬菜基地提供。

##### 2. 发酵容器

50L 带盖塑料圆桶。

##### 3. 大粒盐

沈阳农业大学商店食品部,优质食用大粒盐。

#### (二) 实验方法

##### 1. 大白菜腌渍发酵工艺流程

白菜→晾晒→整理→清洗→沥水→入桶→压石→注盐水→密封→保温发酵

盐水浓度:2%。

盐水:菜重为 1:1。

发酵温度:17~19℃。

每个处理设 3 个重复。