

不同条件无接种发酵蔬菜的显微表征与抗氧化活性

周冰洋, 吕嘉桢, 伍金金, 罗潇

(陕西科技大学食品与生物工程学院, 陕西西安 710021)

摘要: 本试验以红萝卜、黄瓜、莲花白等为主要原料, 以调味料和药食同源物为辅料, 研究了自然发酵蔬菜过程中对于不同的加水量 (3000 mL、3500 mL)、不同的配方 (调味料、药食同源物、调味料及药食同源物) 发酵液和菜体菌群的显微表征、抗氧化活性。结果表明: 加水量少时, 发酵前中期好氧杂菌较多, 发酵中后期酵母菌减少。加水量多时, 前期以球菌和短杆菌为主, 中期球菌减少, 后期以短杆菌为主。发酵过程中抗氧化活性逐渐上升, 加水量少时 SOD 活性和 DPPH 自由基清除率较高, 分别在第 6 d 和第 4 d 达到最大值分别为 16.32 ± 1.31 U/mL、 $95.60 \pm 0.15\%$, 其中, 加水量对发酵蔬菜还原力影响较小。不同配方条件下发酵前期杆菌与球菌共存, 中期球菌逐渐增多, 后期球菌减少杆菌增多, 但调味料及药食同源组球菌较多。发酵过程中抗氧化活性逐渐升高, 但调味料组还原力在第 2 d 略有下降, 药食同源物组 SOD 活性和 DPPH 自由基清除率最高, 均在发酵第 7 d 达到最大值分别为 16.58 ± 1.37 U/mL、 $97.15 \pm 0.60\%$ 。最终得出, 球菌更易附着在蔬菜表面、黄瓜表面粗糙菌体更易附着; SOD 活性会随着发酵蔬菜中典型球菌数量增加而升高。

关键词: 自然发酵; 蔬菜; 显微表征; 抗氧化活性; 调味料; 药食同源物

文章编号: 1673-9078(2020)10-68-78

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.10.0193

Microscopic Characterization and Antioxidant Activity of Non-inoculated Fermentation Vegetables under Different Conditions

ZHOU Bing-yang, LYU Jia-li, WU Jin-jin, LUO Xiao

(School of Food and Biological Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, China)

Abstract: In this study, the main raw materials included Carrots, Cucumbers, Cabbage, while seasonings, medicine and food homologues were added as auxiliary materials. In the natural fermentation vegetables process, microscopic characterization and antioxidant activity of flora of fermentation broth and vegetable were studied using different water addition (3000 ml, 3500 ml) and different formulations (seasoning, medicine and food homologues). The results showed that more aerobic bacteria existed in the early and middle stage of fermentation, and the yeast decreased in the middle and end stage of fermentation, after less water was added. When more water were added, coccus and short bacillus was the dominant species in the early stage of fermentation. Coccus was found to be decreased in the middle stage and short bacillus was the dominant species in the end. During the fermentation process, the antioxidant activity increased gradually. When less water was added, the SOD activity and DPPH free radical scavenging rate were the highest, reaching the maximum of (16.32 ± 1.31) U/mL and $(95.60 \pm 0.15)\%$ on the 6th and 4th days respectively. The reducing power of fermentation vegetables was slightly influenced by the amount of added water. Under different formula conditions, bacteria and cocci coexisted in the early stage of fermentation, the number of cocci increased gradually in the middle stage, decreased in the late stage, and increased in the later stage, but there were more bacteria in the seasoning, medicine and food homologous groups. During the fermentation process, the antioxidant activity increased too. But the reductive power of the seasoning group decreased slightly on the 2nd day. The SOD activity and DPPH free radical scavenging rate in the medicine and food homologues group were the highest, reaching the

引文格式:

周冰洋, 吕嘉桢, 伍金金, 等. 不同条件无接种发酵蔬菜的显微表征与抗氧化活性[J]. 现代食品科技, 2020, 36(10): 68-78

ZHOU bing-yang, LYU Jia-li, WU jin-jin, et al. Microscopic characterization and antioxidant activity of non-inoculated fermentation vegetables under different conditions [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(10): 68-78

收稿日期: 2020-03-02

基金项目: 陕西省重点研发计划项目 (2019NY-123)

作者简介: 周冰洋 (1995-), 男, 在读硕士, 研究方向: 生物工程

通讯作者: 吕嘉桢 (1964-), 女, 教授, 研究方向: 食品微生物

maximum of (16.58±1.37) U/mL and (97.15±0.60)% respectively on the 7th day. The results showed that Coccus were more likely attached to the surface of vegetables, and the rough surface of cucumber was likely attached by flora. SOD activity increased with the increase of typical coccus in fermentation vegetables.

Key words: natural fermentation; vegetable; microscopic characterization; antioxidant activity; seasoning; medicine and food homology

自然发酵蔬菜制品主要包括泡菜、酸菜、浆水菜、酱腌菜等^[1-5]。自然发酵蔬菜的菌群主要来自于蔬菜自身携带的各种乳酸菌和酵母菌等菌群,发酵过程中这些菌群的变化常常因为发酵原辅料组成不同以及发酵条件的变化而发生改变,从而使得自然发酵不同阶段的产品风味口感各异,甚至有时候会出现腐败的异常发酵^[6-8]。因此,对不同原辅料于不同条件下自然发酵蔬菜过程中菌群结构的分析和风味质量的研究,以及对优质自然发酵条件的控制和混菌的纯种发酵具有重要意义。目前,对自然发酵菌群的研究主要集中在通过传统菌群分离鉴定、高通量测序以及变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)等方法对发酵过程中的菌群变化进行研究^[9-11],取得了一定的成果,但这些方法耗时、耗资、耗力。对自然发酵蔬菜风味质量的研究主要为产酸、产亚硝酸盐、感官等方面研究较多,对其抗氧化活性中的DPPH自由基清除率、还原力等方面也有研究,但对抗氧化活性中的代表性指标SOD酶活性研究较少^[12-14]。本试验研究采用简便的显微表征方法,以自然发酵蔬菜中常用的胡萝卜、黄瓜和莲花白等蔬菜为主料,以花椒、红辣椒和姜等为常用辣料调味料辅料,以八角、茴香、肉桂、丁香和肉豆蔻等为常用调味料辅料,以山药、枸杞、党参、黄芪和桂圆等为药食同源物辅料,通过对发酵过程中发酵液和菜体中菌群的显微表征及其SOD酶等抗氧化活性的研究,揭示发酵蔬菜过程中菌群的变化对发酵风味及质量的影响。显微表征方法具有简便、可在线检测、实用性强等诸多优点,对发酵蔬菜生产实践具有重要的实际意义。

1 材料与方法

1.1 试验原材料

莲花白、黄瓜、红萝卜、花椒、红辣椒、姜、山药、枸杞、党参、黄芪、桂圆、八角、茴香、肉桂、丁香、肉豆蔻、食盐购于陕西西安华润万家超市。

1.2 仪器与设备

Phenom ProX-飞纳扫描电镜,复纳科学仪器(上海)有限公司;DM750-LEICA数码显微镜,北京瑞科中仪科技有限公司;HC-3018R高速冷冻离心机,

安徽中科中佳科学仪器有限公司;UV-2600紫外可见分光光度计,尤尼柯上海仪器有限公司;HHW21-600电热恒温水箱,天津市泰斯特仪器有限公司;DSX-280A高压蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂;BS 224 S电子天平,北京赛多利斯仪器系统有限公司。

1.3 主要试剂及配制

pH 8.20 0.1 mol/L 三甲基氨基甲烷(Tris)-盐酸缓冲溶液(内含1 mmol/L EDTA·2Na):称取1.2114 g Tris和37.2 mg EDTA·2Na溶于62.4 mL 0.1 mol/L 盐酸溶液中,用蒸馏水定容至100 mL。

4.5 mmol/L 邻苯三酚盐酸溶液:56.7 mg 邻苯三酚溶于少量10 mmol/L 盐酸溶液并定容至100 mL。

2.5%戊二醛溶液:用pH 7.2、0.1 mol/L 磷酸缓冲液将戊二醛25%溶液稀释10倍。

磷酸缓冲溶液(pH 7.2、0.1 mol/L):360 mL A+140 mL B定容至1000 mL。其中,母液A:0.2 mol/L的Na₂HPO₄溶液(NaH₂PO₄·12H₂O 71.6 g用蒸馏水溶解并定容至1000 mL);母液B:0.2 mol/L的NaH₂PO₄溶液(NaH₂PO₄·2H₂O 1.21 g用蒸馏水溶解并定容至1000 mL)。

0.2 mmol/L DPPH溶液:称取7.88 mg DPPH,用无水乙醇溶解并定容至100 mL。

1.4 试验方法

1.4.1 原辅料处理

新鲜蔬菜的处理包括称量、自来水清洗、切分等预处理后,用冷却至室温的沸水浸泡10 min,晾干备用,此外莲花白应剥去外叶。辅料预处理后称量,用水煮沸浸提30 min,浸提液灭菌晾凉备用。

1.4.2 不同加水量对发酵蔬菜过程中菌群显微表征及抗氧化活性的影响

设置两个加水量,分别为3000 mL、3500 mL。根据前期预试验结果,称取莲花白300 g、黄瓜400 g、红萝卜300 g,按1.4.1原辅料处理方式处理,切适当大小装于发酵罐内,将加盐量定为3%。密闭发酵。于0、1、2、3、4、5、6、7 d取样在扫描电镜下观察发酵液以及菜体菌群显微表征,并检测SOD活性、DPPH自由基清除率及还原力的大小。

1.4.3 不同配方对发酵蔬菜过程中菌群显微表征及抗氧化活性的影响

根据前期调研结果发现发酵蔬菜原料主要以莲花白为主, 辅料绝大部分为调味料, 因此设置调味料

组。此外, 在前期工作中发现药食同源物不仅对益生菌增菌效果显著, 对风味改善也有非常好的作用, 因此设立药食同源组。最终配方设置为调味料组、药食同源物组、调味料及药食同源物组, 具体如下表所示。

表1 不同配方原辅料表

Table 1 Table of raw materials and accessories with different formulas

配方	组成
配方 1	莲花白 300 g、黄瓜 400 g、红萝卜 300 g、姜 10 g、花椒 20 g、红辣椒 10 g、水 3500 mL、盐 105 g
配方 2	莲花白 300 g、黄瓜 400 g、红萝卜 300 g、山药 20 g、枸杞 10 g、党参 10 g、黄芪 10 g、桂圆 20 g、水 3500 mL、盐 105 g
配方 3	莲花白 300 g、黄瓜 400 g、红萝卜 300 g、八角 10 g、茴香 10 g、肉桂 20 g、丁香 10 g、肉豆蔻 10 g、水 3500 mL、盐 105 g

原辅料按 1.4.1 原辅料处理方式处理, 装入发酵罐内, 密封后于 30 °C 发酵。于 0、1、2、3、4、5、6、7 d 取样在扫描电镜下观察发酵液以及发酵第 7 d 菜体表面菌群显微表征, 并检测 SOD 活性、DPPH 自由基清除率及还原力的大小。

1.5 分析检测内容与方法

1.5.1 发酵液的显微表征分析

显微表征采用扫描电子显微镜观察, 如下^[15]:

待观测样品的预处理: 取待测样品发酵液 6000 r/min 离心 10 min, 倒掉上清液, 再加入发酵液进行离心 (离心条件同上), 多次离心直至有较多菌体沉淀在离心管底部。

固定: 将上述步骤中的菌体沉淀物用 2.5% 戊二醛溶液 (稀释溶液为 pH 7.2、0.1 mol/L 磷酸缓冲液) 固定 2 h 以上, 固定结束时 6000 r/min 离心 10 min 去上清。

清洗: 用磷酸缓冲液 (pH 7.2、0.1 mol/L) 清洗 3 次, 20 min/次。每次清洗结束后 6000 r/min 离心 10 min 去除上清液。

脱水: 采用乙醇梯度脱水的方式, 浓度依次为 30%、70%、100%, 每个浓度脱 3 次, 20 min/次, 每次脱水结束时 6000 r/min 离心 10 min 去上清。

干燥: 将样品放入烘箱, 50 °C 烘干。

喷金: 利用真空镀膜设备对样品镀金以增加导电性。

观察: 将处理好的样品在扫描电子显微镜下观察。

1.5.2 发酵菜体的显微表征分析

待观测样品的预处理: 用灭菌的镊子夹取小块发酵蔬菜样品。其余步骤同 1.5.1。

1.5.3 SOD 活性

根据国标 GB/T 5009.171-2003《保健食品中超氧

化物歧化酶 (SOD) 活性的测定》^[16]对样品中 SOD 活性进行测定。

1.5.4 还原力

根据文献 Lin M Y 等《Antioxidative ability of lactic acid bacteria》的还原力测试方法^[17], 将 Vc 配置成浓度分别为 10、20、30、40 和 50 μg/mL。分别取 0.2 mL 上述溶液, 加入 0.8 mL 蒸馏水、2.5 mL pH 6.6、0.2 mol/L 磷酸缓冲液及 2.5 mL 质量分数为 1% 的铁氰化钾, 50 °C 水浴 20 min, 然后加入 2.5 mL 质量分数为 10% 的三氯乙酸, 4000 r/min 离心 10 min。取离心后的上清液 2.5 mL, 加入 2.5 mL 蒸馏水及 2.5 mL 质量分数为 0.1% 的 FeCl₃。混匀后静置 10 min, 测定 700 nm 波长条件下的吸光值并绘制标准曲线。样品中还原力大小与上述方法相同, 结果换算为 Vc 当量表示。还原力标准曲线如下图所示。

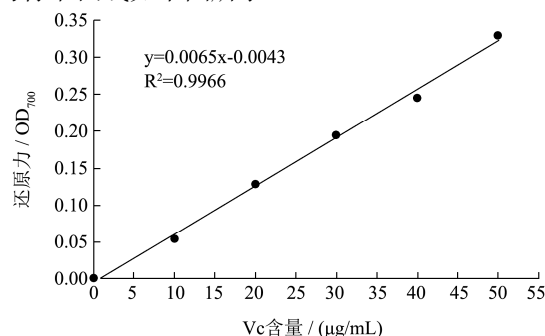


图1 还原力标准曲线

Fig.1 Standard curve of reducing force

1.5.5 DPPH 自由基清除率

根据文献 Lin M Y 等《Antioxidative ability of lactic acid bacteria》的 DPPH 自由基清除率测试方法^[17], 取 2 mL 样品加 2 mL 0.2 mmol/L DPPH 溶液, 混匀后避光反应 30 min, 在 517 nm 波长条件下测定吸光值。结果计算:

$$\text{DPPH 自由基清除率} = \left[1 - \frac{A_{\text{样}} - A_{\text{空}}}{A_{\text{对}}} \right] \times 100\%$$

式中: $A_{\text{样}}$: 2 mL 样品与 2 mL DPPH 溶液反应后的吸光值; $A_{\text{空}}$: 2 mL 样品与 2 mL 无水乙醇在 517 nm 波长条件下的吸光值; $A_{\text{对}}$: 2 mL DPPH 溶液与 2 mL 蒸馏水在 517 nm 波长条件下的吸光值。

1.6 数据分析

用 Origin 8.0 软件对数据进行处理和图表绘制, 并用 SPSS 21 来统计分析显著性差异。

2 结果与分析

2.1 不同加水量对发酵蔬菜过程中菌群显微

表征及抗氧化活性的影响

2.1.1 菌群显微表征

2.1.1.1 发酵液菌群显微表征

不同加水量发酵过程中菌群变化情况如图 2、3 所示。

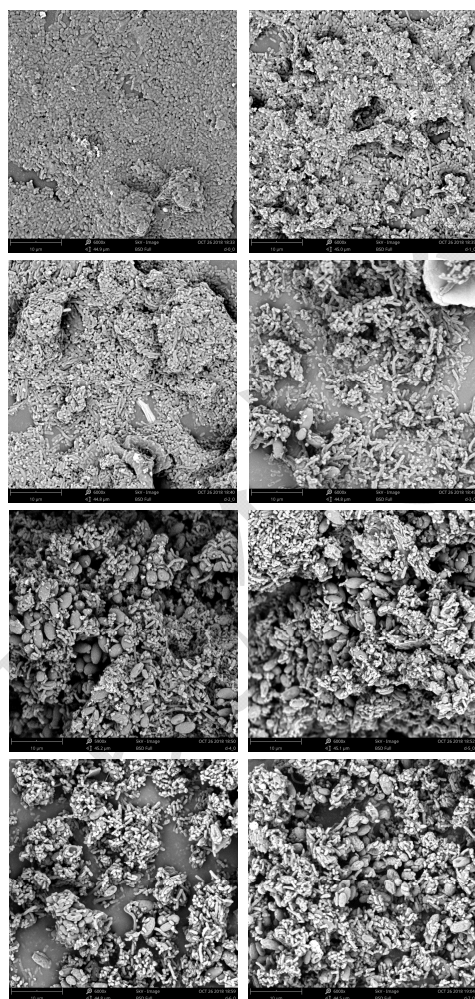


图 2 加水量为 3000 mL 发酵过程中菌群变化

Fig.2 Change of microflora in fermentation with 3000 ml water addition

注: a: 第 0 d; b: 第 1 d; c: 第 2 d; d: 第 3 d; e: 第 4 d; f: 第 5 d; g: 第 6 d; h: 第 7 d, 图 3 同, 图 9~11 同。

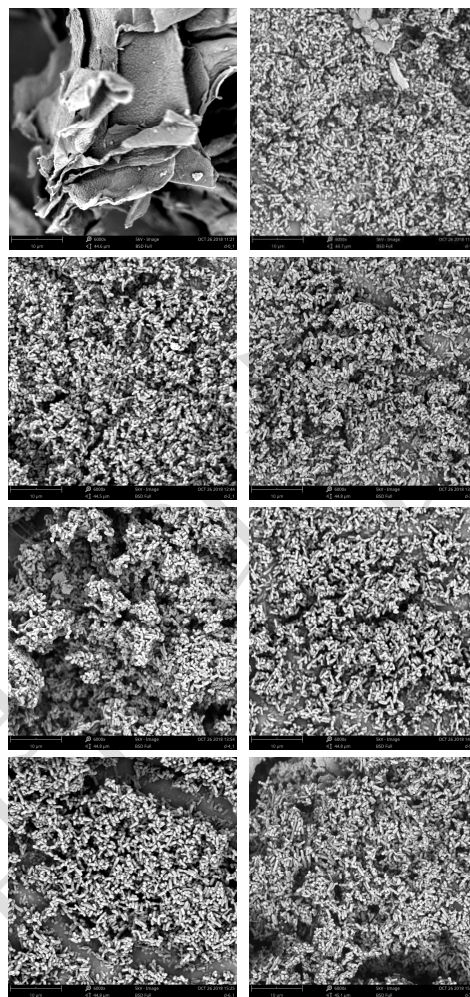


图 3 加水量为 3500 mL 发酵过程中菌群变化

Fig.3 Change of microflora in fermentation with 3500 ml water addition

图 2 为加水量 3000 mL 发酵蔬菜第 0~7 d 的扫描电镜图。由图可以看出, 发酵开始前发酵液中有少量短杆菌, 为蔬菜本身携带的菌。发酵一天后菌群明显增加, 主要为短杆菌, 此外还有少量球菌。2 d 菌群组成与 1 d 相似, 3 d 时杂菌较多, 杆菌形态多样。第 4 d 发酵液中酵母菌较多, 第 5 d、6 d 酵母菌明显减少, 第 7 d 再次增多。乌日娜^[18]等, 通过聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳 (PCR-DGGE) 对东北自然发酵酸菜过程中微生物菌落变化进行研究, 结果表明东北酸菜的发酵过程中发酵前期明串珠菌占优势, 发酵中后期优势菌群是植物乳杆菌。而发酵过程中也存在汉逊德巴利酵母、热带假丝酵母、扩展青霉等且真菌数量和种类随发酵时间的变化而不断变化。而上述结果也表明对发酵过程菌群的显微表征同样可以对发酵过程中菌群的变化进行研究且操作难度更小, 结果更加直观。而发酵后期酵母菌增多是因为加水量较少时,

氧气含量较多, 适合酵母菌的生长, 因此发酵蔬菜容易受到污染。结合 SOD 活性变化可知, 酵母菌减少时 SOD 活性明显增加了 4 倍, 说明该酵母菌能够抑制发酵液中 SOD 活性。

图 3 为加水量 3500 mL 发酵蔬菜第 0 d~7 d 的扫描电镜图。由图可以看出, 发酵第 0 d 样品中菌体较少, 电镜下仅观察到菜体形态。发酵一天后细菌大量生长繁殖, 发酵第 1、2 d 发酵液中球菌和短杆菌占优势, 球菌主要为单球菌和双球菌。第 3、4、5 d 球菌所占比例逐渐减少, 杆菌占优势, 并且杆菌形态较多样。第 6、7 d 短杆菌占优势并且菌种形态较为单一。结合 SOD 活性变化情况, 典型球菌出现后 SOD 活性有所升高, 但 SOD 活性不会随着球菌减少而降低。

2.1.1.2 发酵结束后菜体表面显微表征

不同加水量发酵结束时蔬菜表面显微表征如图 4、5 所示。

图 4 从左到右依次是加水量 3000 mL 发酵结束时红萝卜、黄瓜、莲花白表面显微结构。由图可以看出, 红萝卜和黄瓜表面附着有大量菌体, 并且主要为酵母菌。莲花白表面菌体附着较少, 主要为杆菌。

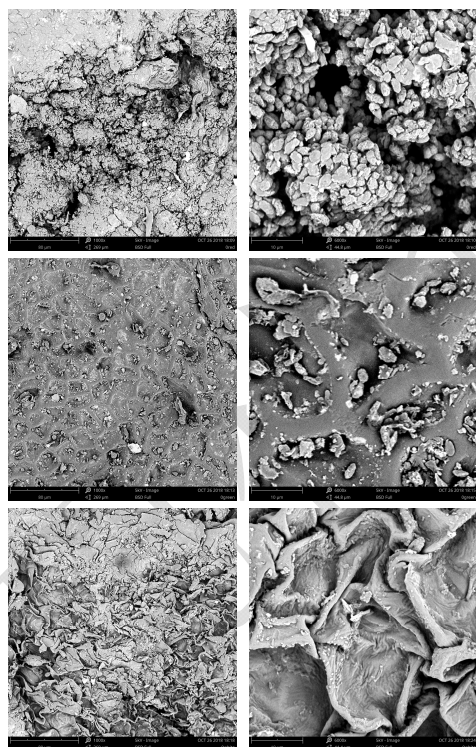


图 4 加水量 3000 mL 发酵蔬菜表面显微表征

Fig.4 Adhesion of bacteria on the surface of fermented vegetable with 3000 mL water

注: a: 红萝卜 1000×; b: 红萝卜 6000×; c: 黄瓜 1000×; d: 黄瓜 6000×; e: 莲花白 1000×; f: 莲花白 6000×, 图 5, 图 12~14 同。

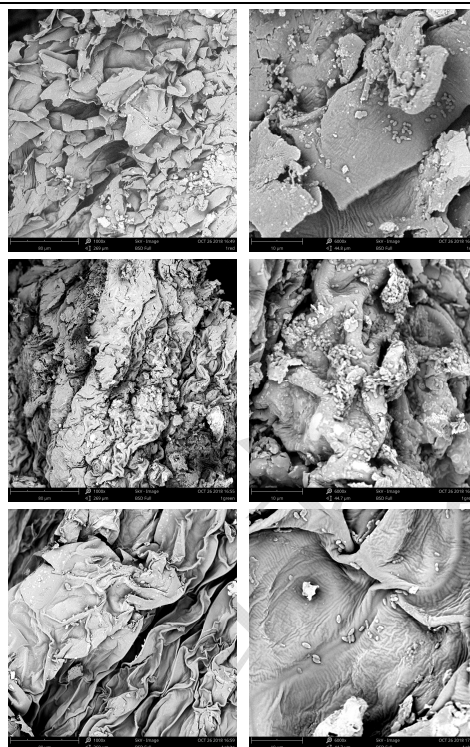


图 5 加水量 3500 mL 发酵蔬菜表面显微表征

Fig.5 Adhesion of bacteria on the surface of fermented vegetable with 3500 mL water

图 5 从左到右依次是加水量 3500 mL 发酵结束时红萝卜、黄瓜、莲花白表面显微表征。由图可以看出, 红萝卜和莲花白表面附着菌体较少, 黄瓜表面菌体附着较多, 并且都以球菌为主。

2.1.2 抗氧化活性分析

不同加水量发酵蔬菜过程中抗氧化活性的变化 (SOD 活性、还原力、DPPH 自由基清除率) 如图 6~8 所示。如图 6 所示, 加水量为 3000 mL 时, SOD 活性检出较早, 前期增幅较小, SOD 活性波动幅度较大。加水量为 3500 mL 时, SOD 活性检出较晚, 变化较为稳定, 发酵结束时蔬菜色泽和气味也较好。加水量较少时, 在发酵第 6 d SOD 活性达到最大值, 为 16.32 U/mL。最终, 加水量较多的样品发酵液中 SOD 活性较高。发酵结束时 SOD 分别为 10.79 U/mL、12.89 U/mL。分析可知, 相较于添加调味料及药食同源物组和添加调味料组的 SOD 活性最高值 7.79 U/mL 和 0.99 U/mL, 加水量较多时发酵罐中厌氧环境较为理想, 兼性厌氧的乳酸菌生长旺盛, 样品中 SOD 酶活力较高, 说明发酵蔬菜中乳酸菌活动能够产生 SOD 酶活力, 这与刘洋^[19]等人所做试验得出乳酸菌在胞内和胞外均可产生 SOD 活性的结论是一致的。并且产酶能力高于好氧杂菌。

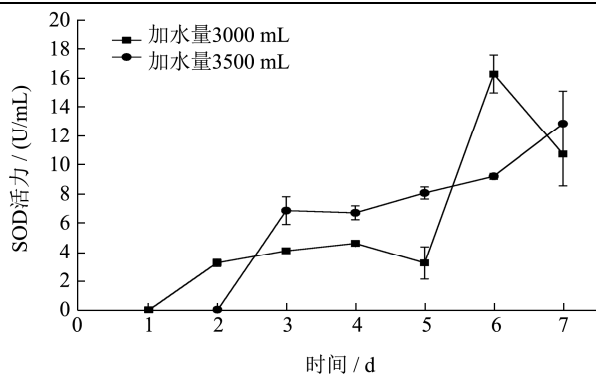


图6 不同加水量对发酵过程 SOD 活性的影响

Fig.6 Effect of water addition on SOD activity of fermented vegetables

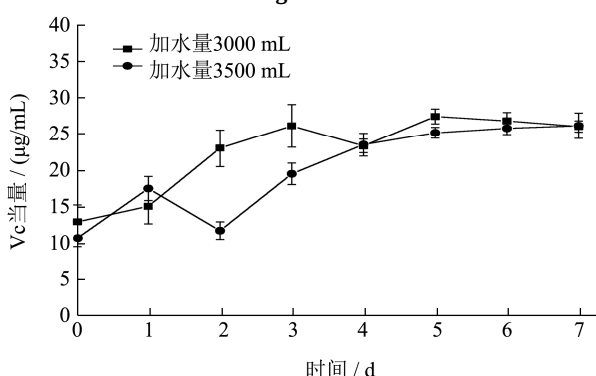


图7 不同加水量对发酵过程还原力的影响

Fig.7 Effect of water addition on reducing power of fermented vegetables

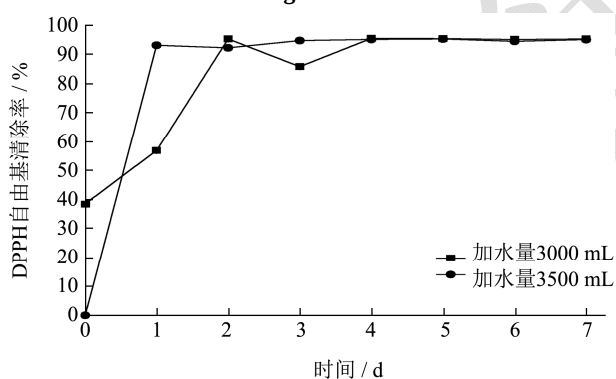


图8 不同加水量对发酵蔬菜 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.8 Effect of water addition on DPPH free radical scavenging rate of fermented vegetables

如图7所示,发酵开始前加水量3000 mL及3500 mL还原力分别为12.97 μg/mL、10.71 μg/mL Vc当量。发酵结束时分别为26.05 μg/mL、26.15 μg/mL。加水量3000 mL样品还原力在第三天达到最大值26.12 μg/mL。相比SOD活性,加水量多少对发酵蔬菜还原力影响较小,加水量3000 mL与3500 mL发酵液中还原力均呈现波动性变化,整体呈上升趋势。相比加水

3000 mL,加水量较多时还原力变化幅度较大。这是由于加水量较少时,氧气较多,好氧菌与兼性厌氧菌共同存在相互竞争,各菌群达到平衡后还原力变化逐渐稳定。加水量较多时,前期好氧菌生理生化反应占主导地位,氧气消耗完全后,乳酸菌占优势,代谢产生的抗氧化物质使得还原力继续升高,这与王刚^[20]等人所研究的乳酸菌能够产生还原活性是一致的。

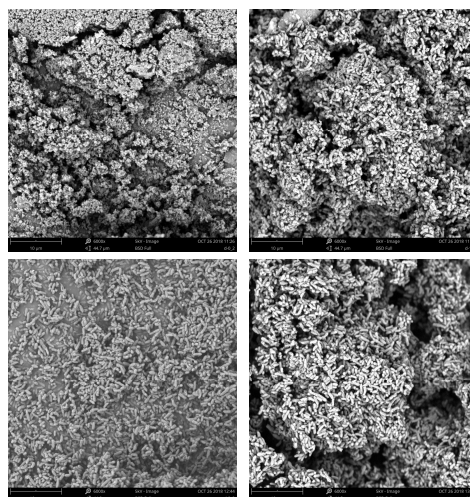
如图8所示,不同加水量发酵蔬菜时,DPPH自由基清除率先迅速增加,4 d后趋于稳定。加水量3000 mL时,发酵前DPPH自由基清除率为(38.80±0.80)%,而加水量为3500 mL时DPPH自由基清除率未检出。可能的原因是:蔬菜加水后,虽然没有开始发酵,但其中具有抗氧化活性的水溶物质溶于无菌水中,因此检测出了DPPH自由基清除率。加水量较多时,活性物质被稀释,浓度较低,因此未能检出。此外,加水量较多时厌氧环境较理想,DPPH自由基清除率较稳定,加水量少时自由基清除率波动较大。二者分别在发酵第4、5 d清除率达到最大值,为(95.60±0.15)%、(95.37±0.12)%。发酵结束时二者相差不大,分别为(95.40±0.20)%和(95.18±0.26)%。

2.2 不同配方对自然发酵蔬菜过程中菌群显微表征及抗氧化活性的影响

2.2.1 菌群显微表征

2.2.1.1 发酵液菌群显微表征

选取三个配方分别为调味料组(姜、花椒、红辣椒)、药食同源物组(山药、枸杞、党参、黄芪、桂圆)、调味料及药食同源物组(八角、茴香、肉桂、丁香、肉豆蔻)。不同配方自然发酵蔬菜过程中发酵液中菌体显微表征如图9~11所示。



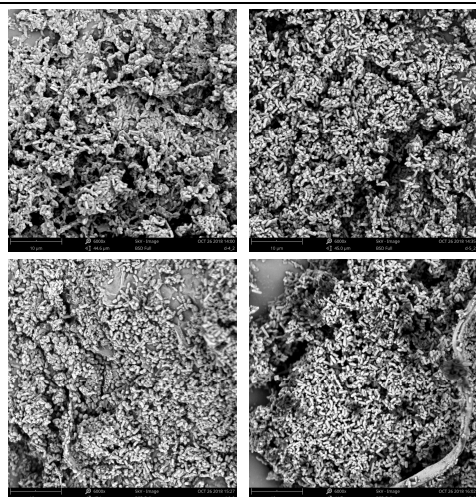


图9 添加调味料自然发酵蔬菜过程中菌群显微表征

Fig.9 Change of bacterial morphology in vegetable fermentation by adding seasonings

图9为添加调味料自然发酵蔬菜过程中第0~7 d发酵液的扫描电镜图。由图可以看出,发酵第0 d样品中菌体较少,电镜下主要为调味料成分。发酵第1、2 d细菌生长迅速,发酵液中短杆菌占优势,并观察到少量球菌。第3、4 d杆菌仍占优势但形态较杂,第5、7 d与1、2 d较为相似,第6 d观察到大量球菌。结合SOD活性变化,发酵液中出现大量球菌后,SOD活性明显升高。

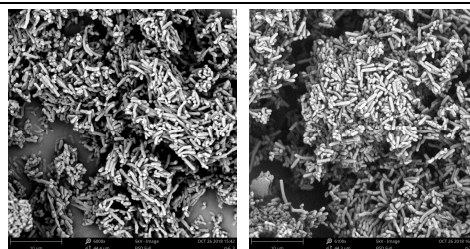
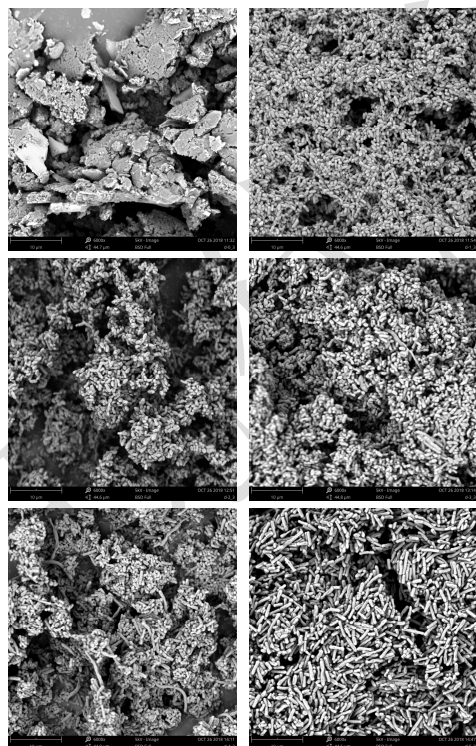
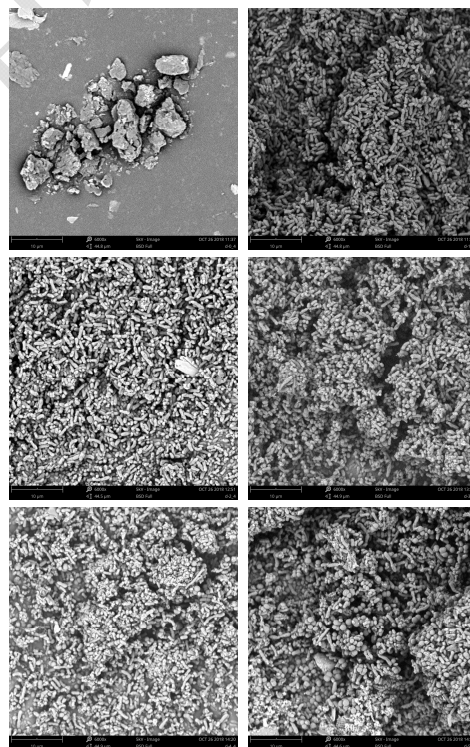


图10 添加药食同源物质自然发酵蔬菜过程中菌群显微表征

Fig.10 Changes of microflora in vegetable fermentation by adding medicinal and food homologous substances

图10为添加药食同源物自然发酵蔬菜第0~7 d的扫描电镜图。由图可以看出,发酵开始时发酵液中菌群较少,扫描电镜下观察到菜体结构。发酵1 d观察到大量球菌且菌群较纯,对比其他两组发酵初期菌种较杂,说明所添加的药食同源物对大部分杂菌有很好的抑制作用。第2、3 d球菌占优势,同时也观察到较多短杆菌。第4 d菌群较杂,除较多球菌、短杆菌外还观察到较多长杆菌。第5 d短杆菌占优势并且视野内菌群较纯,主要为短杆菌。第6 d长杆菌、球菌、短杆菌较多,菌群种类较少。第7 d与第6 d菌群相似,但长杆菌较少。结合SOD活性变化,出现典型球菌后,SOD活性开始检出,得出与不同加水量组相同的结论。



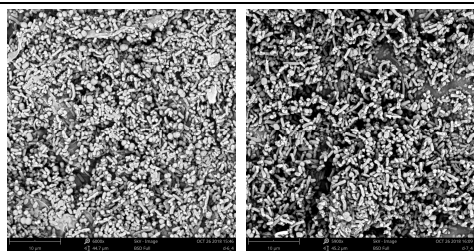


图 11 添加调味料及药食同源物质自然发酵蔬菜过程中的菌群显微表征

Fig.11 Changes of microflora in vegetable fermentation by adding seasonings and medicinal and food homologous substances

图 11 为添加调味料及药食同源物自然发酵蔬菜第 0~7 d 的扫描电镜图。由图可以看出, 发酵开始前几乎没有菌体。第 1、2 d 以短杆菌为主, 第 3 d 可以观察到大量球菌。与其他几组不同的是, 3 d 后球菌一直占优势, 发酵结束时仍以球菌为主且形态较多样。SOD 从第三天开始检出, 与其他几组相比, SOD 活性并没有随着球菌种类的增加而升高, 说明发酵过程中只有典型球菌可以产生 SOD 活性。

2.2.1.2 发酵结束后菜体表面显微表征

对上述试验中发酵终点的样品菜体显微表征进行观察, 结果如图 12~14 所示。

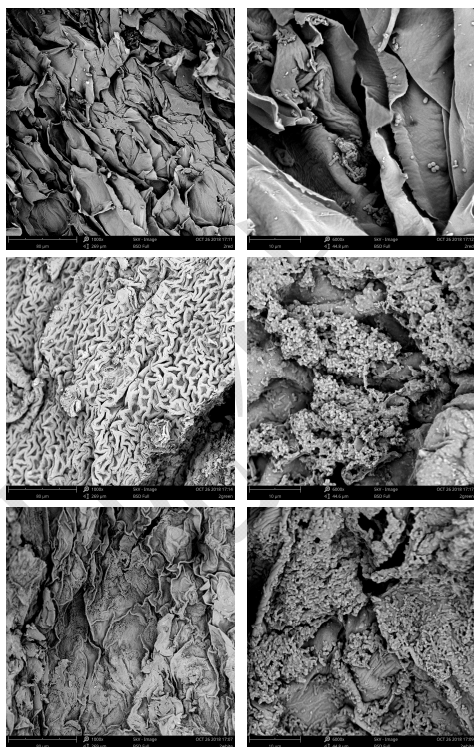


图 12 添加调味料自然发酵蔬菜菜体表面显微表征

Fig.12 Attachment of bacteria on vegetable surface fermented with seasonings

图 12 是添加调味料发酵结束时红萝卜、黄瓜、莲

花白表面显微表征。由图可以看出, 红萝卜表面附着有少量四联球菌和短杆菌, 黄瓜和莲花白表面附着有大量球菌。

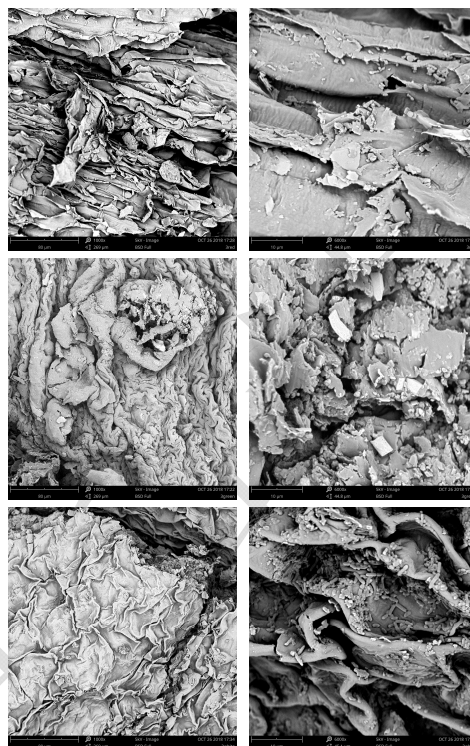
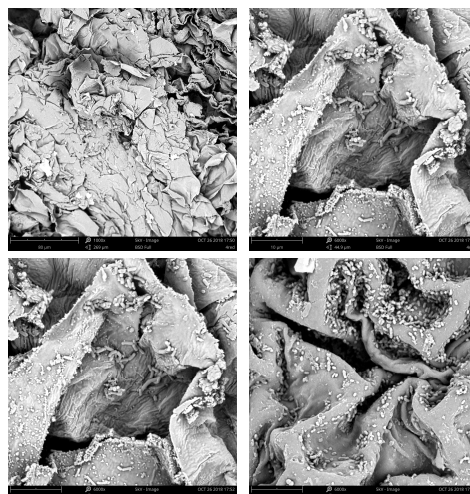


图 13 添加药食同源物质自然发酵蔬菜菜体表面显微表征

Fig.13 Adherence of bacteria on vegetable surface fermented with medicinal and edible homologous substances

图 13 从左到右依次是添加药食同源物发酵结束时红萝卜、黄瓜、莲花白表面显微表征。与前几组相同, 红萝卜表面菌体较少, 黄瓜和莲花白表面菌体较多且主要为球菌。

图 14 从左到右依次是添加调味料及药食同源物发酵结束时红萝卜、黄瓜、莲花白表面显微表征。由图可以看出, 红萝卜表面附着有少量杆菌, 黄瓜表面球菌较多, 莲花白表面菌体较少。



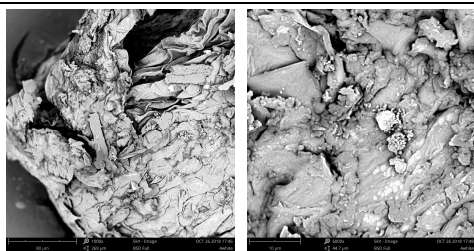


图 14 添加调味料及药食同源物质自然发酵蔬菜表面显微表征

Fig.14 Attachment of bacteria on vegetable surface fermented with seasonings and medicinal and edible homologous substances

2.2.2 抗氧化活性分析

不同配方自然发酵蔬菜过程中 SOD 活性、还原力及 DPPH 自由基清除率进行测定, 结果如图 15~17 所示。

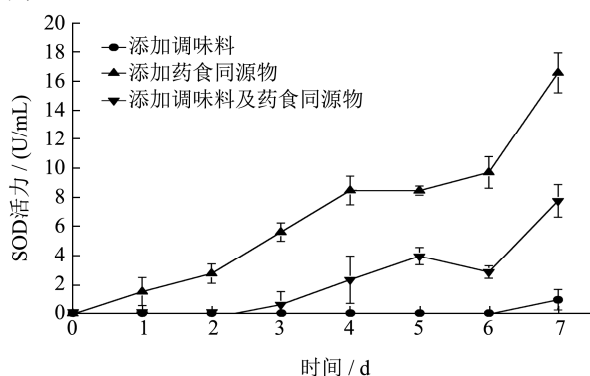


图 15 不同配方对自然发酵蔬菜 SOD 活性的影响

Fig.15 Effects of supplementary materials on SOD activity of fermented vegetables

如图 15 所示, 各组 SOD 活性均呈现出上升趋势。发酵开始前, 三组 SOD 活性均未检出。发酵过程中 SOD 活性顺序为: 添加药食同源物组>添加调味料及药食同源物组>添加调味料组。第 7 d 各组 SOD 活性由高到低依次为 16.58 U/mL、7.79 U/mL、0.99 U/mL。发酵过程中, 各反应的进行、产物的积累离不开菌群的活动。添加调味料组乳酸菌生长被抑制, SOD 活性在 0~6 d 内未检出。

如图 16 所示, 除添加调味料组还原力在第 2 d 后略有下降外, 另两组还原力逐渐升高。还原力在 0~2 d 时, 添加调味料及药食同源物组>添加调味料组>添加药食同源物组。第 3 d 以后, 添加调味料及药食同源物组>添加药食同源物组>添加调味料组。发酵开始时, 三组还原力 (以 Vc 当量表示) 由高到低分别为 40.51 $\mu\text{g/mL}$ 、37.12 $\mu\text{g/mL}$ 、26.97 $\mu\text{g/mL}$ 。第 7 d 各组还原力由高到低依次为 70.46 $\mu\text{g/mL}$ 、54.31 $\mu\text{g/mL}$ 、46.35 $\mu\text{g/mL}$ 。添加调味料组还原力在第 5 d 达到最大值 47.28 $\mu\text{g/mL}$ 。

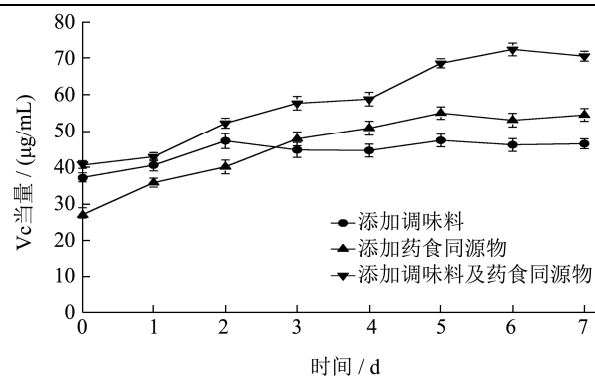


图 16 不同配方对自然发酵蔬菜还原力的影响

Fig.16 Effect of Supplementary Materials on Reductive Ability of Fermented Vegetables

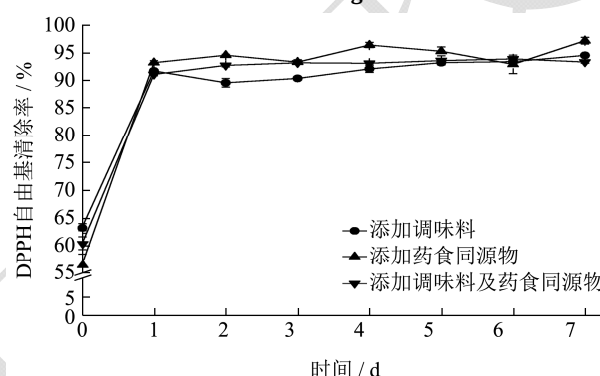


图 17 不同配方对自然发酵蔬菜 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.17 Effect of supplementary materials on DPPH free radical scavenging rate

如图 17 所示, 添加不同辅料发酵蔬菜均有较强的 DPPH 自由基清除能力。发酵前 DPPH 自由基清除率: 添加调味料组>添加调味料及药食同源物组>添加药食同源物组, 依次为 63.35%、60.40%、56.62%。0~1 d 内增长趋势明显, 发酵 1 d 后, 各组 DPPH 自由基清除率均大于 90%, 分别为 91.67%、91.05%、93.18%。添加调味料及药食同源物组清除率在第 6 d 达到最大值为 93.86%, 其余两组样品在发酵结束时达到最大值。第 7 d DPPH 自由基清除率: 添加药食同源物组>添加调味料组>添加调味料及药食同源物组, 依次为 97.15%、94.50%、93.29%。

3 结论

试验研究了自然发酵蔬菜中菌群的显微表征及抗氧化活性, 结果表明, 加水量少时, 发酵前中期好氧杂菌较多, 发酵中后期酵母菌减少。而加水量多时, 前期杂菌较少以球菌和短杆菌为主, 中期球菌减少, 后期以短杆菌为主。说明加水量少时发酵蔬菜容易感染好氧杂菌, 结合抗氧化活性变化, 酵母菌减少 SOD 活性明显增加, 球菌出现时 SOD 活性有所升高, 说明球菌能增加 SOD 活性, 加水量少时, 体系中氧气

含量高酵母菌能够抑制球菌的生长从而抑制 SOD 活性增加。且加水量多时 SOD 活性变化稳定,发酵结束时蔬菜色泽和气味也较好。添加调味料组,发酵前中期短杆菌占优势但形态较杂,后期出现大量球菌。添加药食同源组,发酵前期球菌占优势且菌种较纯,中期后菌种变杂但球菌依旧占优势,最终以短杆菌和球菌为优势菌种。说明药食同源物在发酵初期能够抑制杂菌的生长。添加调味料组及药食同源组,发酵前期以短杆菌为主,中后期球菌占优势但最终球菌种类较多。结合抗氧化活性分析,在典型球菌出现并明显提高成为优势菌种时,SOD 活性明显提高,得出和不同加水量条件下相同的结论且 SOD 活性不会随着球菌种类的增加而升高。加水量的多少以及不同辅料的添加对发酵蔬菜的还原力和 DPPH 自由基清除率影响较小。发酵结束时蔬菜样品表面菌体的附着情况与蔬菜的种类并无绝对联系,蔬菜表面附着的菌种较为单一,并且球菌比杆菌更容易附着。三组样品中,相对于其余两种蔬菜,黄瓜表面更为粗糙,菌体更易附着。对发酵液和菜体菌群的显微表征很好的研究了发酵液和菜体菌群的构成以及发酵过程中菌群的变化,结合抗氧化活性的变化可以将具体的菌种与产生抗氧化活性物质联系起来,为提高发酵蔬菜品质、纯种发酵和工业化生产提供理论依据。

参考文献

- [1] 邹慧芳,渠畅,吴昊,等.酸菜发酵过程中微生物多样性的研究进展[J].中国调味品,2013,11:111-116
ZOU Hui-fang, QU Chang, WU Hao, et al. Research progress of microbial diversity during the process of sauerkraut fermentation [J]. China Condiment, 2013, 11: 111-116
- [2] Fleming H P, Kyung K H, Breidt F. Vegetable Fermentations [M]. New York: Verlag Chemie, 1995
- [3] Nguyen D T L, Van Hoorde K, Cnockaert M, et al. A description of the lactic acid bacteria microbiota associated with the production of traditional fermented vegetables in Vietnam [J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 163(1): 19-27
- [4] 罗红霞,张杏媛,王建,等.复合蔬菜发酵的工艺研究[J].中国果菜,2018,38(12):17-20
LUO Hong-xia, ZHANG Xing-yuan, WANG Jian, et al. Study on the technology of fermenting compound vegetables with lactic acid bacteria [J]. China Fruit & Vegetable, 2018, 38(12): 17-20
- [5] Holzapfel W H. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries [J]. International Journal of Food Microbiology, 2002, 75(3): 197-212
- [6] 陈大鹏,郑娅,周芸,等.自然发酵与人工接种发酵法发酵泡菜的品质比较[J].食品工业科技,2019,40(18):368-372
CHEN Da-peng, ZHENG Ya, ZHOU Yun, et al. Quality comparison of pickled cabbage fermented by natural fermentation and artificial inoculation [J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(18): 368-372
- [7] 张卿,程文健,陈丽娇.自然发酵与人工接种发酵比较研究及展望[J].科技创新与应用,2020,5:46-47
ZHANG qing, CHENG Wen-jian, CHEN Li-jiao. Comparative study and prospect of natural fermentation and artificial inoculation fermentation [J]. Technology Innovation and Application, 2020, 5: 46-47
- [8] YANG Meng-lu, JIANG Ran, et al. Study of the probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Chinese traditional fermented pickles [J]. Journal of Food Processing & Preservation, 2017, 41(3): e1-e7
- [9] 叶陵,李勇,王蓉蓉,等.我国传统发酵蔬菜中乳酸菌多样性的研究进展[J].食品科学,2018,39(15):296-301
YE Ling, LI Yong, WANG Rong-rong, et al. Progress in research on the diversity of lactic acid bacteria in traditional Chinese fermented vegetables [J]. Food Science, 2018, 39(15): 296-301
- [10] 康建依,洪洁,高逸,等.山西地方自然发酵蔬菜发酵过程中细菌多样性分析[J].食品科学,2019,40(10):114-119
KANG Jian-yi, HONG Jie, GAO Yi, et al. Analysis of bacterial diversity during fermentation of naturally fermented vegetables in Shanxi [J]. Food Science, 2019, 40(10): 114-119
- [11] 燕平梅,乔宏萍,赵文婧,等.基于 PCR-DGGE 方法分析榨菜中乳酸菌群落结构[J].食品科学,2016,37(13):136-139
YAN Ping-mei, QIAO Hong-ping, ZHAO Wen-jing, et al. PCR-DGGE analysis of lactic acid bacterial community structure in pickled mustard tuber [J]. Food Science, 2016, 37(13): 136-139
- [12] 燕平梅,薛文通.乳酸菌与发酵蔬菜的风味[J].中国调味品,2005,2:11-14
YAN Ping-mei, XUE Wen-tong. Relation between lactic acid bacteria the flavor of fermented vegetable [J]. China Condiment, 2005, 2: 11-14
- [13] 姚荷,谭兴和,张春艳,等.发酵蔬菜中乳酸菌降解亚硝酸盐的研究进展[J].中国酿造,2018,37(7):22-25
YAO He, TAN Xing-he, ZHANG Chun-yan, et al. Research

- progress on nitrite degradation by lactic acid bacteria in fermented vegetables [J]. *China Brewing*, 2018, 37(7): 22-25
- [14] 李唤宇,高原,牟光庆,等.乳酸菌抗氧化活性研究进展[J]. *食品研究与开发*,2019,40(7):202-210
- LI Huan-yu, GAO Yuan, MOU Guang-qing, et al. Antioxidant activity of lactic acid bacteria [J]. *Food Research and Development*, 2019, 40(7): 202-210
- [15] 李颖,李明春.真菌生物学试验教程[M].北京:科学出版社, 2014
- LI Ying, LI Ming-chun. *An Experimental Course in Fungal Biology* [M]. Beijing: Science Press, 2014
- [16] GB/T 5009.171-2003,保健食品中超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定[S]
- [17] GB/T 5009.171-2003, Determination of superoxide dismutase (SOD) activity in health food [S]
- [18] LIN Meei-yn, YEN Chyuan-liang. Antioxidative ability of lactic acid bacteria [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, 47(4): 1460-1466
- [19] 乌日娜,于美玲,孟令帅,等.PCR-DGGE 分析东北自然发酵酸菜中的微生物多样性[J].*现代食品科技*,2014,10:8-12
- WU Ri-na, YU Mei-ling, MENG Ling-shuai, et al. PCR-DGGE analysis of the microbial diversity in naturally fermented suan-cai from northeast China [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 10: 8-12
- [20] 刘洋,郭宇星,潘道东.4 种乳酸菌体外抗氧化能力的比较研究[J].*食品科学*,2012,11:31-35
- LIU Yang, GUO Yu-xing, PAN Dao-dong. Comparative antioxidant activity of four species of lactic acid bacteria *in vitro* [J]. *Food Science*, 2012, 11: 31-35
- [21] 王刚,田丰伟,刘小鸣,等.2 株具有优良体外抗氧化能力乳酸菌的筛选与鉴定[J].*食品工业科技*,2013,15:113-117,121
- WANG Gang, TIAN Feng-wei, LIU Xiao-ming, et al. Screening and identification of two lactic acid bacteria strains with excellent antioxidant activities *in vitro* [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2013, 15: 113-117, 121
-
- (上接第 32 页)
- [17] 钱增堃,崔凡,凌云熹,等.泽泻多糖对糖尿病大鼠肝脏糖脂代谢的影响[J].*中国实验方剂学杂志*,2018,24(11):117-125
- QIAN Zeng-kun, CUI Fan, LING Yun-xi, et al. The effect of *Alisma* polysaccharide on the metabolism of hepatic glucose and lipid in diabetic rats [J]. *Chinese Journal of Experimental Formulas*, 2018, 24(11): 117-125
- [18] 贺映侠,朱虹,黄芩多糖对 2 型糖尿病大鼠骨骼肌氧化应激水平及 SIRT3 表达的影响[J].*中国老年学杂志*,2018,38(12): 3023-3025
- HE Ying-xia, ZHU Hong. Effects of *Astragalus* polysaccharide on skeletal muscle oxidative stress and SIRT3 expression in type 2 diabetic rats [J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2018, 38(12): 3023-3025
- [19] 王乾宇,何光志,黄高.杜仲多糖对糖尿病模型小鼠血清 SOD、GSH-Px 和 MDA 的影响[J].*江西中医药*,2016,47(4): 34-36
- WANG Qian-yu, HE Guang-zhi, HUANG Gao. Effects of *Eucommia ulmoides* polysaccharide on serum SOD, GSH-Px and MDA in diabetic model mice [J]. *Jiangxi Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2016, 47(4): 34-36
- [20] 覃春美,李刚,程宗华,等.山楂叶总黄酮调控肾组织 p38MAPK 信号通路干预糖尿病肾病大鼠氧化应激损伤的实验研究[J].*检验医学与临床*,2019,16(21):3131-3134
- QIN Chun-mei, LI Gang, CHENG Zong-hua, et al. Experimental study on the regulation of p38MAPK signal pathway in renal tissues by flavonoids from hawthorn leaves to interfere with oxidative stress injury in diabetic nephropathy rats [J]. *Laboratory Medicine and Clinic*, 2019, 16(21): 3131-3134