

盐度对紫甘蓝自然发酵过程中细菌多样性及品质的影响

柳凯, 解双瑜, 李智, 孙波*

(东北农业大学食品学院 哈尔滨 150030)

摘要 以不同盐度水平(1%,3%,5%,10%)下自然发酵的紫甘蓝为研究对象,利用 16S rRNA 扩增子测序技术分析其自然发酵过程中细菌多样性的变化规律,同时对其自然发酵过程中理化特性的变化及感官品质进行研究。结果表明:4 种盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜均以变形菌门和厚壁菌门为主,主要优势菌属为乳杆菌属、肠杆菌属。除此之外,1%盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜的优势菌属还有乳球菌属,而 3%盐度有泛菌属,5%和 10%盐度则有明串珠菌属。不同盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜在自然发酵过程中 pH 值随发酵时间呈下降趋势,总酸均随发酵时间增加,还原糖含量和亚硝酸盐含量则随发酵时间呈先升高后下降的趋势。相关性分析显示,乳杆菌属、肠杆菌属、乳球菌属等菌属与理化特性的相关性较大。综上,3%盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜样品细菌多样性丰度较高,总酸累积最高,且感官品质较好,较适合紫甘蓝的发酵。

关键词 紫甘蓝酸菜; 细菌多样性; 自然发酵; 盐度; 品质

文章编号 1009-7848(2022)11-0379-11 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2022.11.039

紫甘蓝(*Purpura brassica*)酸菜是以新鲜紫甘蓝为原料,采用传统东北酸菜发酵工艺制作,利用自然环境中各种微生物菌群以及紫甘蓝原料表面附带的一些内生菌群进行代谢转化,进而产生独特风味的发酵蔬菜制品^[1-2]。大多数工业化生产或家庭自制紫甘蓝酸菜通常是将紫甘蓝洗净后,浸入装有盐水的发酵罐中,压实密封后,在自然状态下进行发酵^[3]。紫甘蓝由于含有大量花青素,具有较高的抗氧化特性^[4],同时具有抗癌、抗衰老等功效^[5],且经过发酵后其口感更佳,同时富含活性乳酸菌等有益菌群,越来越受到消费者的喜爱。

紫甘蓝酸菜的发酵过程分为同型发酵和异型发酵,主要由乳酸菌主导^[6-7],然而,紫甘蓝原料中附带的其它内生菌群种类繁多,对其发酵至关重要。早期对于紫甘蓝酸菜中微生物群落的鉴定多采用传统平板分离法,而这种方法存在较大的局限性,无法检出所有的微生物,使微生物菌群数量和多样性偏低。随着现代分子生物学的不断进步,16S rRNA 高通量测序技术现已应用于各种发酵食品的细菌多样性研究中,例如泡菜^[8]、酸萝卜^[9]、香肠^[10]、豆酱^[11]等,在甘蓝泡菜等发酵蔬菜方面对微生物群落的研究也逐渐增多。Zabat 等^[12]利用 16S rRNA 扩增子测序技术分析甘蓝泡菜发酵过

程中的微生物群落变化,结果表明,明串珠菌(*Leuconostoc*)和乳酸菌(*Lactobacillus*)是甘蓝泡菜发酵过程中主要的优势菌群。Liu 等^[13]收集了 10 种中国发酵蔬菜,利用 16S rRNA 测序研究细菌多样性,鉴定出 12 个门、223 个属、348 个种,其中厚壁菌门(Firmicutes)和变形菌门(Proteobacteria)是主要的优势菌门,而乳杆菌(*Lactobacillus*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus versmoldensis*)、芽孢杆菌(*Bacillus*)、魏斯氏菌(*Weissella*)是厚壁菌门中的优势菌属,色盐杆菌属(*Chromohalobacter japonicus*)、盐单胞菌(*Halomonas jeotgali*)、片球菌属(*Pediococcus*)、弧菌属(*Vibrio*)是变形菌门中的优势菌属。

盐在紫甘蓝酸菜发酵过程中起着至关重要的作用,其能够提供一定的渗透压力,使细胞中的水分和可溶性固形物外渗,同时也对微生物群落的生长有一定的影响^[14]。由于紫甘蓝中各种内生菌群对盐度的敏感程度不同,因此盐度对于紫甘蓝酸菜中微生物群落结构以及优势菌属的生长顺序会有极大的影响^[15-17],进而对其风味及品质产生一定的影响。盐度过高,一些耐盐性较差的异型发酵乳酸菌的生长受到抑制,这使得紫甘蓝酸菜发酵过程中优势菌群的生长顺序发生改变^[18],同时导致紫甘蓝酸菜的发酵速率变慢;盐度过低,导致病原微生物和腐败微生物的生长繁殖不能得到有效控制^[19],同时会减缓同型乳杆菌的生长,甚至会导

收稿日期: 2021-11-05

第一作者: 柳凯,男,硕士

通信作者: 孙波 E-mail: bosun1962@163.com

致紫甘蓝酸菜的腐烂。因此,适宜的盐度水平才能使得紫甘蓝酸菜中乳酸菌快速增长,同时使有害微生物的生长得到有效抑制^[20],进而促进紫甘蓝酸菜的正常发酵,保证紫甘蓝酸菜的产品质量以及独特风味。目前,关于酸菜、泡菜等发酵蔬菜中细菌多样性的研究虽然较多,但是不同盐度对紫甘蓝酸菜细菌多样性的影响鲜有研究报道。

本研究在不同盐度(1%,3%,5%,10%)下分别自然发酵紫甘蓝酸菜,使用16S rRNA扩增子测序分析盐度对发酵紫甘蓝酸菜细菌多样性的影响,并测定其理化特性以及感官品质的变化,旨在研究不同盐度下紫甘蓝酸菜自然发酵过程中细菌多样性的动态变化规律,为提升紫甘蓝酸菜的品质提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜紫甘蓝,购于黑龙江省哈尔滨市香坊区忠君连锁超市;TIANamp Bacteria DNA Kit 细菌基因组DNA提取试剂盒、溶菌酶,北京天根生化科技有限公司;琼脂糖,西班牙biowest公司;食盐,中国盐业集团有限公司;氢氧化钠、氯化钠、盐酸、氨水、亚铁氰化钾、硫酸锌、正辛醇、3,5-二硝基水杨酸(均为分析纯级),天津市科密欧化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

Illumina NovaSeq6000 PE250 高通量测序仪,美国Illumina公司;UVP凝胶成像仪,美国Bio-Rad公司;DYY-10C电泳仪,北京市六一仪器厂;FA2004电子天平(0.001 g),上海衡平仪器仪表厂;PHS-3C型精密pH计,上海精密科学仪器有限公司;TU-1800型紫外-可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;DH2500A型电热恒温培养箱,天津泰斯特仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 原料制备 选择色泽鲜艳的新鲜紫甘蓝,去除根部和烂叶,再用清水冲洗干净,然后切丝。称取切丝后的紫甘蓝2 kg,分别装入4个洗净的5 L玻璃罐中,边放菜边进行压实,再分别加入等量盐度为1%,3%,5%,10%的盐水,盐水需完全覆盖紫甘蓝原料,然后在20℃的恒温培养箱中发酵

60 d。

1.3.2 样品采集 在发酵第3,30,60天时,在玻璃罐的同一部位进行取样,以保证每次取样的一致性,移取紫甘蓝酸菜盐水发酵液50 mL置于无菌离心管中,用于细菌多样性的测定与分析。同时,在玻璃罐的同一位置,于发酵第0,3,15,30,45,60天时进行取样,收集紫甘蓝酸菜的盐水发酵液50 mL和酸菜样品50 g,用于pH值、总酸、还原糖含量、亚硝酸盐含量以及感官品质的测定和分析。

1.3.3 总DNA提取及高通量测序 采用TIANamp Bacteria DNA Kit 细菌基因组DNA提取试剂盒进行提取,然后使用1%琼脂糖凝胶电泳定量检测DNA样品的纯度、完整性、片段大小和浓度,检测电压为100 V,电泳时间为40 min。根据琼脂糖凝胶电泳所测定的质量浓度,使用无菌水稀释紫甘蓝酸菜样本DNA至1 ng/ μ L。以上述基因组DNA为模板,使用特异引物(314F 5'-CCTAYGGGR-BGCASCAG-3'和806R 5'-GGACTACN-NGGGTATCTAAT-3')扩增产出16S V3-V4区域的16S rRNA基因。每个扩增体系由30 μ L混合物组成,其中包含15 μ L Phusion Master Mix (2 \times),3 μ L引物,10 μ L模板DNA(1 ng/ μ L),2 μ L水。PCR扩增反应程序:首先进行98℃变性1 min,然后进行30个循环步骤(98℃,10 s;50℃,30 s;72℃,30 s;72℃,5 min)。每个紫甘蓝酸菜样本DNA重复3次操作,然后根据PCR产物的浓度,将3次所重复的紫甘蓝酸菜样本PCR产物进行等量混样。将上述紫甘蓝酸菜样本PCR产物进行充分混匀后,使用2%的琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,检测电压为80 V,电泳时间为40 min。

1.3.4 理化特性测定 紫甘蓝酸菜盐水发酵液的pH值用pH计进行测定,并使用pH值分别为4.00,6.86,9.18的标准缓冲液进行校准。总酸参考GB 12456-2021《食品安全国家标准 食品中总酸的测定》中的pH计电位滴定法进行测定。还原糖含量参考NY/T 2742-2015《水果及制品可溶性糖的测定 3,5-二硝基水杨酸比色法》进行测定。亚硝酸盐含量参照GB 5009.33-2016《食品安全国家标准 食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定》中紫外分光光度法进行测定。

1.3.5 感官评价 参考GB 2714-2015《食品安全

国家标准《酱腌菜》和 DBS22/025-2014《食品安全地方标准 酸菜》中的感官质量评鉴细则,选用 10 名专业人员组成评价小组,对不同盐度下紫甘蓝酸菜样品进行气味、滋味、质地、色泽的感官评价,依次按照 30%,30%,20%,20%的权重计算出总

分。称取 50 g 样品,置于盘中,观察其色泽和质地,闻其气味,漱口后品其滋味。样本按随机顺序进行盲测试验,在每次随机测试之前,用清水冲洗口腔后,再品尝下一个样品,具体评分标准见表 1。

表 1 紫甘蓝酸菜感官品质评分标准

Table 1 Sensory quality evaluation standard of fermented red cabbage

项目	评分标准	得分
气味(30%)	有酸香味及菜体清香,整体香气醇厚柔和	8~10
	酸香味、清香一般,整体香气一般	4~7
	无酸香味和清香,有腐烂味	1~3
滋味(30%)	滋味浓郁,酸、咸味爽口宜人	8~10
	滋味一般,酸、咸味尚可	4~7
	滋味差,有苦涩味和异味	1~3
质地(20%)	菜帮柔韧,组织致密,质地脆嫩	8~10
	菜帮较硬,组织较致密,质地略微软烂	4~7
	菜帮软烂,组织松散,质地软烂	1~3
色泽(20%)	菜叶呈紫红色	8~10
	菜叶呈紫色	4~7
	菜叶呈淡紫色	1~3

1.4 数据分析

根据 QIIME(V 1.9.1)质量控制程序,在特定条件下对原始序列进行质量过滤,得到高质量的清洁数据(Clean Tags)。使用 UCHIME 算法将上述序列与 Silva 参考数据库进行比对,去除嵌合体,最终获得有效序列。对所有紫甘蓝酸菜样本的全部有效序列基于一定相似度的分类单元(Operational taxonomic units, OTUs)进行聚类,再对 OTUs 序列进行物种注释。试验数据采用 SPSS 22.0 分析处理,以平均值±标准差表示,进行显著性分析,当显著水平 $P < 0.05$ 时,具有统计学意义。采用 Origin 9.0 软件处理作图,所有试验重复测定 3 次。

2 结果与分析

2.1 不同盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜细菌多样性分析

2.1.1 不同盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜细菌多样性序列数据概述 如表 2 所示,不同盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜中细菌 OTUs 数目的变化有所不同,其中 1%盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜

OTUs 数目呈现先升高后减小的趋势,3%和 5%盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜则呈现先减少后升高的趋势,而 10%盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜的 OTUs 数目随着发酵时间不断增大。除观察 OTUs 数目外,Shannon 指数值和 Simpson 指数值越大,说明细菌群落多样性越高;Chao1 指数值和 ACE 指数值越大,代表物种丰度越大。对不同盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜样品中细菌群落多样性进行分析,随着紫甘蓝酸菜发酵的不断进行,1%盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜样品的细菌群落多样性呈现先升高后减小的趋势,而 3%,5%和 10%盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜则呈现先减少后升高的趋势。对不同盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜样品中细菌群落的丰度进行分析,随着发酵时间的推移,1%盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜样品的细菌群落丰度呈现先升高后减小的趋势,3%和 5%盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜样品则呈现先减少后升高的趋势,而 10%盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜样品虽呈现持续升高的趋势,但其丰度始终较低,这可能与盐度较高有关。所有紫甘蓝酸菜样本的测序深度指数均在 0.999 以上,这说明测序

所得的结果能够完整地反映紫甘蓝酸菜样品细菌群落组成的全部信息。综上所述,不同盐度下自然

发酵的紫甘蓝酸菜细菌群落组成较为丰富,物种多样性存在明显差异。

表 2 不同盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜样品的细菌群落的 α -多样性

Table 2 α -Diversity of bacterial community in naturally fermented red cabbage samples under different salt concentrations

盐度/%	样品编号	OTUs 数目	Shannon 指数	Simpson 指数	Chao1 指数	ACE 指数	测序深度指数
1	GL1.D3	85	3.132	0.815	87.800	89.485	1.000
	GL1.D30	102	3.251	0.836	109.500	107.333	1.000
	GL1.D60	97	2.756	0.767	106.429	104.251	1.000
3	GL3.D3	133	3.030	0.795	210.500	162.919	0.999
	GL3.D30	83	2.117	0.597	98.167	91.693	1.000
	GL3.D60	118	2.753	0.721	127.100	125.232	1.000
5	GL5.D3	119	2.968	0.807	122.300	124.556	1.000
	GL5.D30	76	2.029	0.571	80.500	82.697	1.000
	GL5.D60	101	2.258	0.617	104.882	108.268	1.000
10	GL10.D3	57	2.301	0.683	59.500	60.514	1.000
	GL10.D30	68	1.758	0.526	69.750	73.072	1.000
	GL10.D60	81	2.246	0.662	94.333	93.725	1.000

2.1.2 不同盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜物种多样性曲线分析 由稀释曲线图(图 1)可以看出,随着测序数据量的增加,OTUs 数前期急剧增长,最后曲线趋于平坦,这表明测序数据量渐进合理,更多的数据量只会产生少量新的物种,说明紫甘

蓝酸菜样品中大多数的细菌类型都能够被鉴定出来,测序深度已经基本覆盖到样品中所有的物种。图 2 中的等级聚类曲线宽度较大,趋势较为平缓,这表明紫甘蓝酸菜样品中的物种丰富度较高,物种分布也较为均匀。

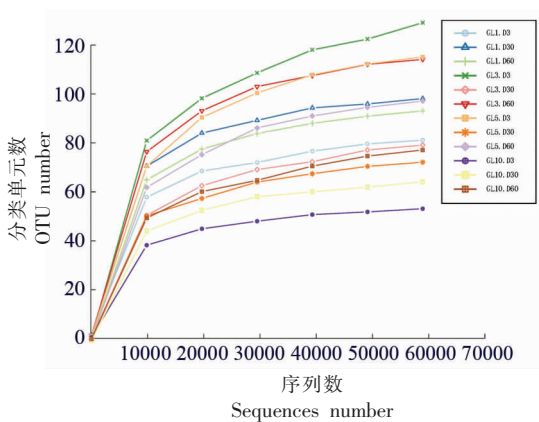


图 1 不同盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜在不同发酵时期细菌群落的稀释曲线

Fig.1 Dilution curves of bacterial communities of naturally fermented red cabbage under different salt concentrations during different fermentation periods

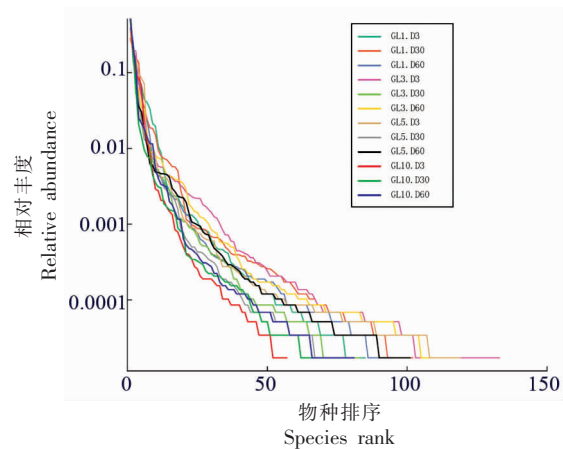


图 2 不同盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜在不同发酵时期细菌群落的等级聚类曲线

Fig.2 The hierarchical clustering curve of the bacterial community of naturally fermented red cabbage under different salt concentrations at different fermentation periods

2.1.3 不同盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜细菌群落组成分析 对不同盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜在不同发酵时期的各样品中细菌的 OTUs 在门水平上进行分析,得到物种组成比例情况,详细结果如图 3 所示。高通量测序结果表明,所有紫甘蓝酸菜样品的细菌群落中的主要菌门包括厚壁菌门、变形菌门、疣菌门(Verrucomicrobiota)、拟杆菌门(Bacteroidota)、弯曲杆菌门(Campilobacterota)、放线菌门(Actinobacteriota)、未识别的细菌(unidentified_Bacteria)、蓝细菌门(Cyanobacteria)、栖热菌门(Deinococcota)、脱硫杆菌门(Desulfobacterota)等。其中,优势菌群为厚壁菌门、变形菌门。在整个自然发酵过程中,4 个盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜样品中均由变形菌门和厚壁菌门起主导作用,这也与之前报道的中国传统发酵蔬菜中细菌多样性动态变化的相关研究一致,例如泡菜^[21]、盐菜^[22]、酸辣椒^[23]。随着发酵的不断进行,4 种盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜样品中的厚壁菌门均呈现先增大后减小的趋势,而变形菌门则呈现先减小后增大的趋势。发酵初期,10%盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜样品中厚壁菌门的相对丰度最小,变形菌门的相对丰度最大。发酵中期,4 种盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜样品中厚壁菌门的相对丰度均达到最大值,而变形菌门的相对丰度则为最小值,并且随着盐度的增大,厚壁菌门的相对丰度不断增加,变形菌门的相对丰度不断减小。发酵结束时,10%盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜样

品中厚壁菌门的相对丰度最大,而变形菌门的相对丰度最小,并且厚壁菌门与变形菌门随盐度的变化趋势与发酵中期基本一致。

对不同盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜不同发酵时期的各紫甘蓝酸菜样品细菌的 OTUs 在属水平上进行分析,得到物种组成比例情况,详细结果如图 4 所示。在不同盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜样品中,以高丰度检测到的属包括乳杆菌属、肠杆菌属(*Enterobacter*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、明串珠菌属、沙雷氏菌属(*Serratia*)、魏斯氏菌属、泛菌属(*Pantoea*)、哈夫尼亚-肥杆菌属(*Hafnia-Obe-sumbacterium*)、链球菌属(*Streptococcus*)、杜氏杆菌属(*Dubosiella*)等。如图 4 所示,不同盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜在发酵过程中的优势菌群为乳杆菌属、肠杆菌属、乳球菌属以及明串珠菌属,这也与之前报道的传统自制东北酸菜中细菌多样性基本保持一致^[24]。在发酵前期,1%,3%,5%盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜样品的优势菌属分别是乳杆菌属、肠杆菌属,而 10%盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜样品中乳杆菌属的相对丰度较低,主要由肠杆菌属和明串珠菌属主导。随着发酵的不断进行,1%,3%,5%,10%盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜样品的乳杆菌属呈现先上升后下降的趋势,在发酵中期达到峰值。然而,在发酵中后期,乳杆菌属的下降趋势并不大,与中期的最大峰值基本保持一致。出现上述结果的原因可能是紫甘蓝酸菜在自然发酵过程中由于乳杆菌属迅速增殖,有机

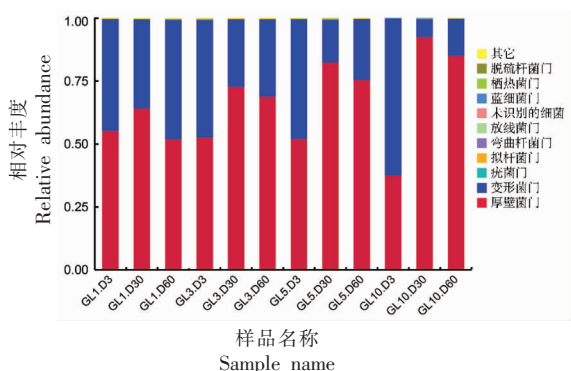


图 3 不同盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜在不同发酵时期门水平上的物种分布

Fig.3 Species distribution of naturally fermented red cabbage under different salt concentrations at the phylum level during

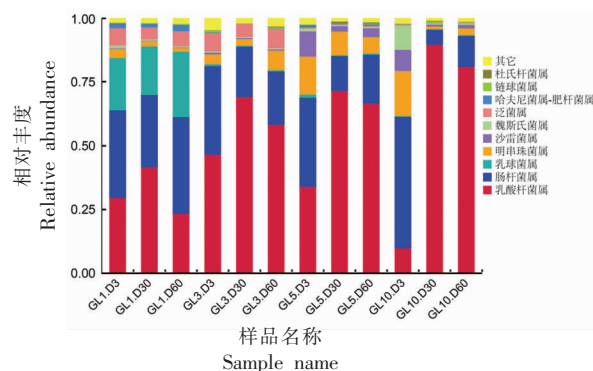


图 4 不同盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜在不同发酵时期中属水平上的物种分布(前 10)

Fig.4 Species distribution of red cabbage naturally fermented under different salt concentrations at the genus level during different fermentation periods (Top 10)

酸不断积累使得耐酸性较差的微生物生长受到抑制^[25]。乳酸菌对于食品的风味和质地等特性有重要的影响,能够提供酸味,同时与醇、醛和酮等化合物相互作用以产生更多独特的风味,并且乳酸菌与人体健康息息相关,具有抗菌、抗炎、抗病毒、抗癌等生物功能特性^[26]。另外,4种盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜样品中的肠杆菌属呈现先下降后上升的趋势,在发酵中期达到最小值,这可能与紫甘蓝原料自身附着的微生物菌群有关^[27]。值得注意的是,相较于其它盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜样品,1%盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜样品中乳球菌属的丰度相对较高,在发酵第3,30,60天分别达到0.205,0.191,0.256,这可能是由于乳球菌属的生长繁殖更适合较低的盐度环境。明串珠菌属在紫甘蓝酸菜的整个自然发酵过程相对含量都比较丰富,对紫甘蓝酸菜的发酵起着促进作用,其在1%,5%盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜中随着发酵时间的增长呈现持续下降的趋势,而在3%,10%盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜中呈现先下降后上升的趋势。

2.1.4 不同盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜细菌多样性 PCA 分析 采用主成分分析(PCA)来反映不同盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜样品细菌群落结构的差异和距离,两个样本在图中的位置越近,它们之间的细菌组成越相似。在4种盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜样品中,每种样品在不同发酵时期的细菌群落组成具有显著性差异($P < 0.05$)。如图5所示,横、纵坐标PC1和PC2分别表示第1主成分和第2主成分,第1主成分对样品的贡献为17.13%,第2主成分为14.86%。相较于其它两种盐度,1%和10%盐度下自然发酵的第3,30,60天的紫甘蓝酸菜样品之间的距离相对较近,说明该盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜在发酵过程中细菌群落结构较为相似;3%和5%盐度下自然发酵的第3,30,60天的紫甘蓝酸菜样品之间的距离相对较远,说明该盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜在发酵过程中细菌群落结构差异比较大。发酵前期,5%盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜样品中细菌群落组成与其它3种盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜样品相距较远,表明其细菌群落组成与其它3组存在一定的差异;发酵中期,3%,5%盐度下自然发

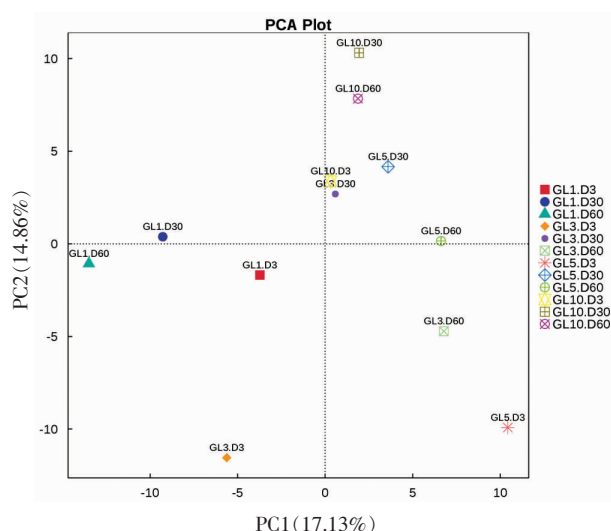


图5 不同盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜在不同发酵时期中PCA分析

Fig.5 PCA analysis of naturally fermented red cabbage under different salt concentrations during different fermentation periods

酵的紫甘蓝酸菜样品之间聚集较为紧密,说明2种盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜样品中细菌群落组成差异并不大,而1%,10%盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜样品中距离其它2种盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜样品较远,表明其细菌群落的组成与其它2组相差较大;发酵后期过程中,4种盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜样品比较分散,说明4组紫甘蓝酸菜样品的细菌群落存在显著性差异。

2.2 不同盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜理化特性的变化

由图6a和图6b可知,不同盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜在自然发酵过程中pH值随发酵时间呈下降趋势,在发酵前期下降迅速,发酵后期下降的速度又逐渐缓慢。发酵30d直至发酵结束,pH值的变化没有显著性差异,发酵结束时1%,3%,5%,10%盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜的pH值分别为3.36,3.27,3.32,3.42。相应的,4种盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜中总酸均随发酵时间增加,最终1%,3%,5%,10%盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜的总酸分别保持在1.26,1.63,1.42,0.9g/100mL。这是由于乳杆菌属、乳球菌属、明串珠菌属、链球菌属、魏斯氏菌属等能够产生乳酸的乳酸菌在紫甘蓝酸菜的发酵前期丰度较低,使得总

酸的含量较低。然而,在紫甘蓝酸菜发酵的中后期,乳杆菌属迅速增殖,产酸量持续增大,同时随着总酸的持续增大,一些耐酸性较差的菌群和杂菌的丰度逐渐减小,使得乳杆菌在发酵中后期占据着绝对优势地位。

如图 6c 所示,4 种盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜在自然发酵过程中还原糖的变化随着发酵时间的进行呈现出先升高后下降的趋势,这可能与不同盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜中还原糖的溶出速率不同有关。发酵初期,由于细胞中的还原糖还没有完全溶出,因此还原糖的含量较低。此时,乳杆菌属、乳球菌属、明串珠球菌属、链球菌属、魏斯氏菌属等能够产生乳酸的乳酸菌由于没有足够的营养物质,生长速度较为缓慢。随着发酵的不断进行,还原糖在盐的胁迫下溶出速率不断增大,在发酵第 3 天达到最大值。发酵后期,4 种盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜中乳杆菌属迅速增殖,还原

糖也随其增长不断被消耗,最后转化为乳酸。发酵结束时,乳杆菌属的丰度已经稳定在最大值附近,使得还原糖已经消耗至较低值,这同时也表明 4 种盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜基本发酵成熟。

紫甘蓝酸菜中的亚硝酸盐含量与产品的安全性息息相关,因为亚硝酸盐食用过多,会导致高铁血红蛋白症,增加癌症的发病率,甚至可能会致死^[28]。由图 6d 可以看出,4 种盐度下紫甘蓝酸菜在自然发酵过程中亚硝酸盐的变化随着发酵时间的进行先升高,并在发酵前期达到最大值,然而,最终 4 种盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜中的亚硝酸盐都降低至较低水平,并趋于平稳。本研究中的所有紫甘蓝酸菜样品中的亚硝酸盐含量远远低于欧盟限量标准和世界卫生组织推荐的摄入量,因此本研究中的紫甘蓝酸菜样品均达到安全可食用的标准。在紫甘蓝酸菜的发酵前期,一些硝酸盐还原菌快速增殖,使得亚硝酸盐含量急速增长。到了发酵

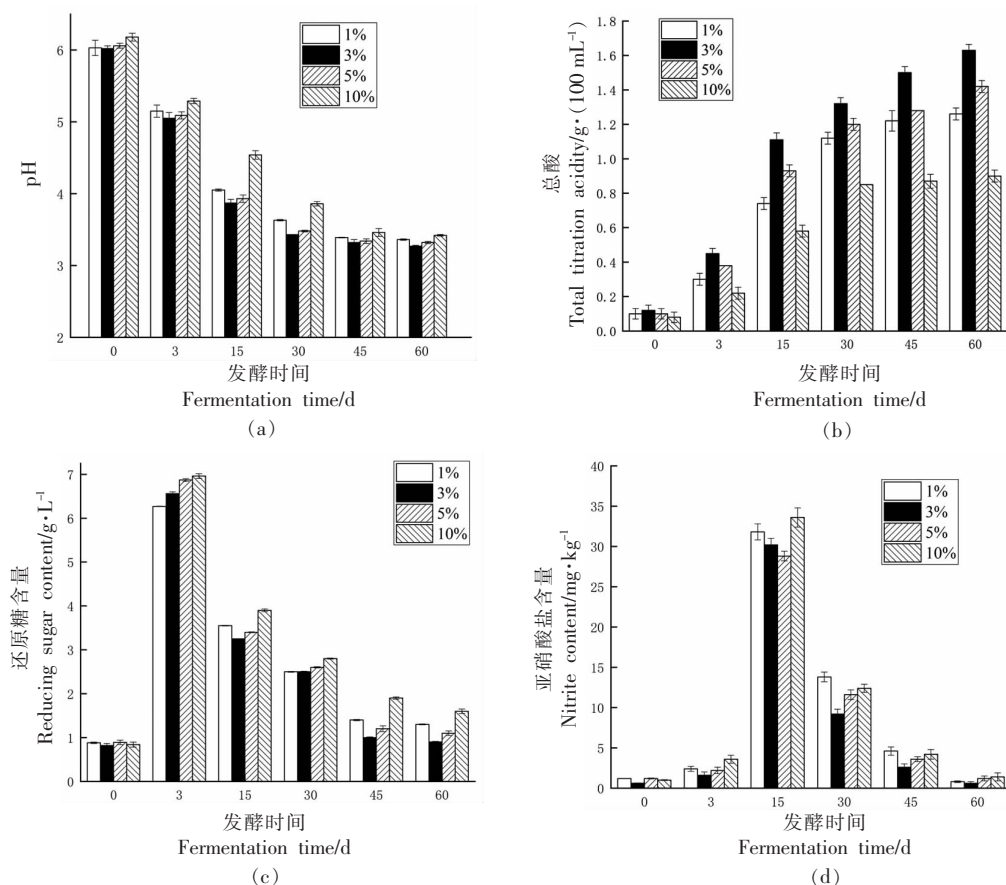


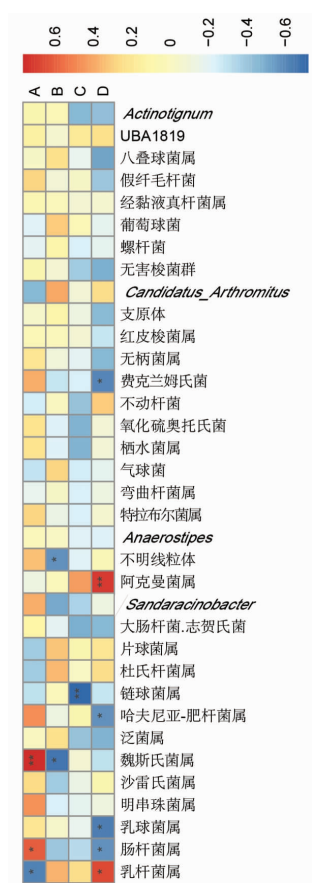
图 6 不同盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜在发酵过程中理化特性的变化

Fig.6 Changes in physicochemical properties of naturally fermented red cabbage under different salt concentrations during the fermentation process

中期,乳酸菌的大量繁殖使得还原硝酸盐的细菌生长受到抑制,同时乳酸菌能够将亚硝酸盐还原成二氧化氮、一氧化氮和氮气^[29]。

2.3 不同盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜细菌多样性与理化特性的相关性

不同盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜样品中所产生的细菌与理化特性的关系如图7所示。乳杆菌丰度与pH值呈显著负相关($P<0.05$),肠杆菌属与pH值呈显著正相关($P<0.05$),魏斯氏菌属与pH值呈极显著正相关($P<0.01$)。魏斯氏菌属、不



注:A. pH值,B. 总酸,C. 还原糖含量,D. 亚硝酸盐含量;中间热图对应的值为 Spearman 相关系数 r ,取值介于 $[-1, 1]$ 之间, $r<0$ 为负相关, $r>0$ 为正相关;*表示显著性检验 $P<0.05$,**表示显著性检验 $P<0.01$ 。

图7 不同盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜在发酵过程中理化特性与细菌多样性的相关性热图

Fig.7 The heat map of the correlation between the physicochemical indexes and microbial diversity of the naturally fermented red cabbage under different salt concentrations during the fermentation process

明线粒体与总酸呈显著负相关($P<0.05$)。链球菌与还原糖含量呈极显著负相关($P<0.01$)。乳杆菌与亚硝酸盐含量呈显著正相关($P<0.05$),阿克曼菌属与亚硝酸盐含量呈极显著正相关($P<0.01$),肠杆菌属、乳球菌属、哈夫尼亚-肥杆菌属、费克兰姆氏菌与亚硝酸盐呈显著负相关($P<0.05$)。

2.4 不同盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜感官品质的变化

紫甘蓝酸菜的感官评价能够良好的反应出产品的品质,感官品质与微生物的生长也有密切的联系^[30],本文从气味、色泽、滋味、质地等4个方面对不同盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜进行感官评价,评分统计结果如图8所示。1%,3%,5%,10%盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜的感官评价总分分别为6.0,9.1,7.3,5.3。其中,气味、滋味、质地等指标在不同盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜样品中差异明显,而色泽无显著性差异。在气味指标中,3%盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜样品气味醇厚柔和,而1%盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜则带有少许腐烂气息。3%盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜样品滋味中酸味较为柔和,而10%盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜样品则带有一些苦味。不同盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜质地变化显著($P<0.05$),其中3%盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜样品质地较脆,咀嚼性最佳,而10%盐度下自然发酵的紫甘

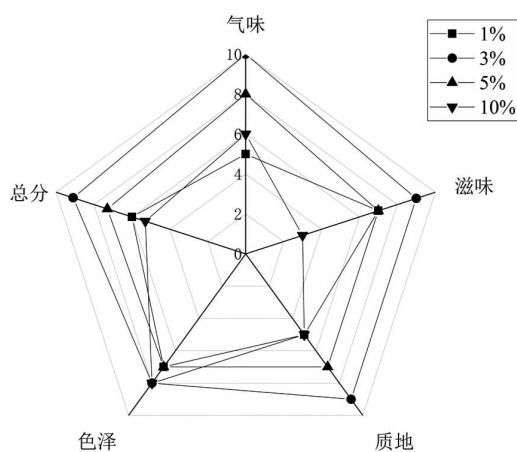


图8 不同盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜的感官评价分布图

Fig.8 Sensory evaluation distribution map of naturally fermented red cabbage under different salt concentrations

蓝酸菜样品质地略微有些软烂,1%盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜样品较硬。综上所述,3%盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜样品感官评价总体最佳,10%盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜样品感官评价总体较差。

3 结论

通过16S rRNA扩增子测序技术,在不同盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜样品中检测出大量有效序列,其具有丰富的细菌多样性,其中变形菌门和厚壁菌门是紫甘蓝酸菜自然发酵过程中的优势菌门,而乳杆菌属、肠杆菌属、乳球菌属以及明串珠菌属是紫甘蓝酸菜自然发酵过程中的优势菌属。盐度对于紫甘蓝酸菜自然发酵过程中优势菌属的顺序以及含量有显著影响,PCA分析的结果也表明其细菌多样性存在显著性差异。相关性结果表明,乳杆菌属、肠杆菌属、乳球菌属、魏斯氏菌属、链球菌属、阿克曼菌属与pH值、总酸、还原糖含量以及亚硝酸盐含量等理化特性的相关性较大。相对于1%,5%,10%盐度,3%盐度下自然发酵的紫甘蓝酸菜细菌多样性丰度较高,总酸积累最高,还原糖的消耗速率较快,能够快速通过亚硝酸盐最高峰,在口感方面也是最佳选择,较为适合紫甘蓝酸菜的发酵。该研究成果能够为提高紫甘蓝酸菜的产品质量以及产品安全性提供一定的参考价值。

参 考 文 献

- [1] 孔庆敏,孙波,赵晓,等. 臭氧在东北酸菜杀菌工艺中的应用[J]. 食品科学, 2016, 37(12): 71-75.
KONG Q M, SUN B, ZHAO X, et al. Application of ozone in the sterilization of Chinese northeast sauerkraut[J]. Food Science, 2016, 37(12): 71-75.
- [2] 王芮东,李楠,卫博慧,等. 高效液相色谱法测定甘蓝泡菜发酵过程中的有机酸[J]. 食品工业科技, 2018, 39(6): 236-240.
WANG R D, LI N, WEI B H, et al. Determination of organic acids in the fermentation process of cabbage kimichi by HPLC[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(6): 236-240.
- [3] XIAO Y S, HUANG T, HUANG C L, et al. The microbial communities and flavour compounds of Jiangxi yancai, Sichuan paocai and Dongbei suancai: Three major types of traditional Chinese fermented vegetables[J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 121(1): 108865.
- [4] WICZKOWSKI W, SZAWARA -NOWAK D, TOPOLSKA J. Changes in the content and composition of anthocyanins in red cabbage and its antioxidant capacity during fermentation, storage and stewing[J]. Food Chemistry, 2015, 167: 115-123.
- [5] DRAGHICI G A, LUPU M A, BOROZAN A B, et al. Red cabbage, millennium's functional food[J]. Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology, 2013, 17(1): 52-55.
- [6] SWAIN M R, ANANDHARAJ M, RAY R C, et al. Fermented fruits and vegetables of Asia: A potential source of probiotics[J]. Biotechnology Research International, 2014, 2014: 250424.
- [7] 燕平梅,赵文婧,宋敏丽,等. 人工接种发酵甘蓝工艺条件的优化[J]. 食品科学, 2012, 33(11): 224-230.
YAN P M, ZHAO W J, SONG M L, et al. Optimization of cabbage fermentation using starter culture[J]. Food Science, 2012, 33(11): 224-230.
- [8] SEONG-EUN P, SEUNG-HO S, EUN-JU K, et al. Changes of microbial community and metabolite in kimchi inoculated with different microbial community starters[J]. Food Chemistry, 2019, 274: 558-565.
- [9] CHEN A J, LUO W, PENG Y T, et al. Quality and microbial flora changes of radish paocai during multiple fermentation rounds[J]. Food Control, 2019, 106: 106733.
- [10] CHEN J X, HU Y Y, WEN R X, et al. Effect of NaCl substitutes on the physical, microbial and sensory characteristics of Harbin dry sausage[J]. Meat Sci, 2019, 156: 205-213.
- [11] YU H, BO S. Analysis of bacterial diversity and biogenic amines content during fermentation of farmhouse sauce from Northeast China[J]. Food Control, 2020, 108: 106861.
- [12] ZABAT M A, SANO W H, WURSTER J I, et al. Microbial community analysis of sauerkraut fermentation reveals a stable and rapidly established community[J]. Foods, 2018, 7(5): 77.
- [13] LIU D Q, TONG C. Bacterial community diversity

- of traditional fermented vegetables in China [J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 86: 40-48.
- [14] 李凤姿, 张媛, 吴昊, 等. 盐对发酵蔬菜微生物群落和发酵质量的影响[J]. 中国调味品, 2018, 43(3): 150-154, 200.
- LI F Z, ZHANG Y, WU H, et al. Effect of salt on microbial population and fermentation quality of fermented vegetables[J]. China Condiment, 2018, 43(3): 150-154, 200.
- [15] YANG X Z, HU W Z, XIU Z L, et al. Effect of salt concentration on microbial communities, physicochemical properties and metabolite profile during spontaneous fermentation of Chinese northeast sauerkraut [J]. Journal of Applied Microbiology, 2020, 129(6): 1458-1471.
- [16] GUAN Q Q, ZHENG W D, HUANG T, et al. Comparison of microbial communities and physicochemical characteristics of two traditionally fermented vegetables [J]. Food Research International, 2019, 128: 108755.
- [17] YANG X Z, HU W Z, XIU Z L, et al. Microbial dynamics and volatiline profiles during the fermentation of Chinese northeast sauerkraut by *Leuconostoc mesenteroides* ORC 2 and *Lactobacillus plantarum* HBUAS 51041 under different salt concentrations[J]. Food Research International, 2020, 130: 108926.
- [18] TAO X, LI J B, LIANG F, et al. Effects of salt concentration on Chinese sauerkraut fermentation[J]. LWT-Food Science Technology, 2016, 69: 169-174.
- [19] ALBARRACÍN W, SÁNCHEZ I C, GRAU R, et al. Salt in food processing; usage and reduction: A review[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2011, 46(7): 1329-1336.
- [20] 张兰威. 袋装酸菜贮藏和流通期间发生胀袋的微生物学研究及预防措施[J]. 食品科学, 2000, 20(5): 44-45.
- ZHANG L W. Microbiological study and preventive measures of bag swelling during storage and circulation of bagged sauerkraut[J]. Food Science, 2000, 20(5): 44-45.
- [21] LIU Z G, PENG Z, HUANG T, et al. Comparison of bacterial diversity in traditionally homemade paocai and Chinese spicy cabbage[J]. Food Microbiology, 2019, 83: 141-149.
- [22] XIAO Y S, HUANG T, HUANG C L, et al. The microbial communities and flavour compounds of Jiangxi yancai, Sichuan paocai and Dongbei suancai: Three major types of traditional Chinese fermented vegetables[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 121: 108865.
- [23] WANG J, WANG R, XIAO Q, et al. Analysis of bacterial diversity during fermentation of Chinese traditional fermented chopped pepper[J]. Letters in Applied Microbiology, 2019, 69(5): 346-352.
- [24] YANG H Y, W U H, GAO L J, et al. Effects of *Lactobacillus curvatus* and *Leuconostoc mesenteroides* on Suan Cai fermentation in Northeast China [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 26(12): 2148-2158.
- [25] XIONG T, LI J B, LIANG F, et al. Effects of salt concentration on Chinese sauerkraut fermentation[J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 69: 169-174.
- [26] MINJ J, CHANDRA P, PAUL C, et al. Bio-functional properties of probiotic *Lactobacillus*: Current applications and research perspectives [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2021, 61(13): 2207-2224.
- [27] XIAO Y S, TAO X, ZHEN P, et al. Correlation between microbiota and flavours in fermentation of Chinese Sichuan Paocai [J]. Food Research International, 2018, 114: 123-132.
- [28] DING Z, JOHANNINGSMEIER S D, PRICE R, et al. Evaluation of nitrate and nitrite contents in pickled fruit and vegetable products [J]. Food Control, 2018, 90: 304-311.
- [29] WANG Z X, SHAO Y Y. Effects of microbial diversity on nitrite concentration in pao cai, a naturally fermented cabbage product from China [J]. Food Microbiol, 2018, 72: 185-192.
- [30] 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: 575-580.

Effects of Salt Concentration on the Microbial Diversity and Quality of Red Cabbage during Natural Fermentation

Liu Kai, Xie Shuangyu, Li Zhi, Sun Bo*

(College of Food Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

Abstract In this study, the changes in microbial diversity during natural fermentation of red cabbage at different salt concentration levels (1%, 3%, 5% and 10%) were investigated by using 16S rRNA amplicon sequencing technology, and the changes in physicochemical properties during natural fermentation of red cabbage were determined, as well as the sensory evaluation of naturally fermented red cabbage at different salt concentrations was also carried out. The results showed that the red cabbage naturally fermented under different salt concentrations was dominated by Proteobacteria and Firmicutes, and the main genera are *Lactobacillus*, *Enterobacter*, and *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Serratia*, *Weissella*, etc. In addition, different salt concentrations had significant effects on the physicochemical properties of fermented red cabbage such as pH value, total acid, reducing sugars and nitrite, among which the fermented red cabbage at 3% salt concentration had the highest accumulation of total acid, faster consumption rate of reducing sugars and relatively faster decrease rate of nitrite. The correlation results showed that *Lactobacillus*, *Enterobacter*, *Lactococcus*, *Weissella*, *Streptococcus*, *Akkermansia* and pH value, total acid, reducing sugar, nitrite and other physical and chemical properties were highly correlated. According to the sensory evaluation, it was concluded that naturally fermented red cabbage samples at 3% salt concentration had the best taste, followed by 1% and 5% salt concentration, and 10% salt concentration had poor taste. Therefore, red cabbage samples naturally fermented at 3% salt concentration had higher microbial diversity abundance, highest accumulation of total acid, and better taste and flavor, which was more suitable for the fermentation of red cabbage.

Keywords red cabbage sauerkraut; microbial diversity; natural fermentation; salt concentration; quality