

发酵辣椒中降解亚硝酸盐菌种筛选、鉴定及发酵性能分析

刘林新^{1,2}, 王修俊^{1,2*}, 张二康^{1,2}, 于沛^{1,2}, 杨丽平^{1,2}, 聂黔丽^{1,2}, 陈颜红^{1,2}

¹贵州大学酿酒与食品工程学院, 贵州 贵阳

²贵州省发酵工程与生物制药重点实验室, 贵州 贵阳

Email: 596606643@qq.com, 15770086152@163.com, *775298123@qq.com

收稿日期: 2020年8月18日; 录用日期: 2020年9月4日; 发布日期: 2020年9月11日

摘要

以贵州自然发酵辣椒为原料, 从中筛选分离出优势菌株制备成复合菌剂研究其发酵性能。试验分离筛选出80株疑似乳酸菌菌株, 以亚硝酸盐(NIT)降解能力及生长活力、产酸能力为指标筛得两株优势菌, 进行16S rDNA鉴定, 并和研究团队前期筛得的一株生长习性相近的植物乳杆菌LP-7501S进行复配, 评价综合发酵性能。结果表明, 自然发酵辣椒中两株优势菌株鉴定为发酵乳杆菌, 分别命名为LF-8001和LF-8002; 其生长能力和产酸能力优于其他菌株且NIT降解率达到95.86%和98.69%; 当LF-8001:LF-8002:LP-7501S以3:3:2复配时, 用于发酵辣椒后NIT含量为0.25 mg/kg, 综合发酵性能远高于单一菌株, 品质优良。本研究可为开发具有高降解NIT复合直投式发酵剂提供科学支撑。

关键词

发酵乳杆菌, 筛选鉴定, 贵州发酵辣椒, 直投式发酵剂, 16SrDNA

Screening, Identification and Fermentation Performance Analysis of Nitrite Degrading Strains in Fermented Pepper

Linxin Liu^{1,2}, Xiujun Wang^{1,2*}, Erkang Zhang^{1,2}, Pei Yu^{1,2}, Liping Yang^{1,2}, Qianli Nie^{1,2}, Yanhong Cheng^{1,2}

¹School of Liquor and Food Engineering, Guizhou University, Guiyang Guizhou

²Guizhou Provincial Key Laboratory of Fermentation Engineering and Biopharmacy, Guiyang Guizhou

Email: 596606643@qq.com, 15770086152@163.com, *775298123@qq.com

*通讯作者。

文章引用: 刘林新, 王修俊, 张二康, 于沛, 杨丽平, 聂黔丽, 陈颜红. 发酵辣椒中降解亚硝酸盐菌种筛选、鉴定及发酵性能分析[J]. 微生物前沿, 2020, 9(3): 103-113. DOI: 10.12677/amb.2020.93016

Abstract

Using Guizhou naturally fermented pepper as raw material, the dominant strains were screened and isolated from it to prepare a compound inoculum to study its fermentation performance. 80 strains of suspected lactic acid bacteria were isolated and screened out. Two dominant strains were screened using nitrite (NIT) degradation ability, growth activity and acid production capacity as indicators, and the 16SrDNA identification was carried out, and they were grown with the first strain obtained by the research team. *Lactobacillus plantarum* LP-7501S with similar habits was compounded to evaluate the comprehensive fermentation performance. The results showed that the two dominant strains in naturally fermented pepper were identified as *Lactobacillus fermentum*, named LF-8001 and LF-8002 respectively; their growth ability and acid production ability were better than other strains, and the NIT degradation rate reached 95.86% and 98.69%; when LF-8001:LF-8002:LP-7501S is compounded at 3:3:2, the NIT content after fermenting pepper is 0.25 mg/kg, the comprehensive fermentation performance is much higher than that of a single strain, and the quality is excellent. This research can provide scientific support for the development of high-degradable NIT compound direct-investment starter.

Keywords

Lactobacillus fermentum, Screening and Identification, Guizhou Fermented Pepper, Direct Injection Starter, 16SrDNA

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

鲜辣椒在发酵制成泡菜的过程中, 原料中的大部分营养成分没有被破坏[1] [2], 如丰富的膳食纤维、硫酸素等, 其中存在的这些物质还具有保肝利胆、降低胆固醇等作用[3] [4] [5], 益于身体健康。尽管发酵辣椒对人体有诸多益处, 但仍然存在自然发酵为主的发酵辣椒中亚硝酸盐的积累引起的发酵辣椒产品稳定性、安全性问题, 存在亚硝酸盐(nitrites, NIT)形成及过量残留等问题; 有研究指出单次摄入 0.3~0.5 gNIT 就可导致中毒, 摄入超过 3 g 会导致死亡[6], NIT 进入人体后, 与食物或胃中的胺产生反应, 生成亚硝胺等亚硝基化合物, 此类化合物是一种很强的致癌物质, 且可诱发各种部位的癌症, 如鼻咽癌、胃食道癌及肝癌等[7] [8] [9] [10]。

植物乳杆菌、短乳杆菌等均具有较强的降解 NIT 的能力[11], 王笋张二康等筛选出乳杆菌属、肠膜明串珠菌属等作复合发酵菌剂, 可以缩短蔬菜发酵周期、降低NIT的含量[12] [13], 发酵蔬菜口感更佳[14]。因此筛选具有优良的 NIT 能力的乳酸菌, 并制成复合发酵剂进行发酵, 是降低发酵蔬菜中 NIT 含量, 保证产品品质的有效方法。本研究以贵州自然发酵的辣椒为实验材料, 以产酸能力、亚硝酸盐降解能力、生长能力为指标, 对其进行筛选, 筛选优势菌株, 再结合研究团队前期研究得到的一株性能同样优良且生长习性相近的植物乳杆菌 LP-7501S 进行复配, 探究综合发酵性能最优配比组合, 为发酵辣椒直投式发酵剂提供实践基础。

2. 材料与仪器

2.1. 试验材料

试验原料：鲜辣椒、大蒜、食盐(食品级)、生姜，贵阳花溪沃尔玛超市；植物乳杆菌 LP-7501S (*Lactobacillus plantarum* 7501S)，贵州大学发酵工程与生物制药重点实验室，菌株 CCTCC NO:M 2019535。

实验主要试剂：MRS 培养基，上海博微生物科技有限公司；碳酸钙、过氧化氢、亚硝酸钠葡萄糖、硫酸镁、硫酸锰、磷酸氢二钾，乙酸钠、柠檬酸氢二铵、硼酸钠、亚铁氰化钾、乙酸锌、对氨基、苯磺酸钠、盐酸萘乙二胺，均为分析纯，北京索莱宝科技；吐温 80 分析纯，中国医药上海化学试剂公司。

2.2. 主要试验仪器与设备

YX280B 手提式不锈钢蒸汽灭菌锅，上海三申医疗器械；VORTEX 涡旋混合器，上海达姆有限公司；722 型 722 分光光度计，上海佑科仪表；GZX-GF101-3-BS-II 电热鼓风恒温干燥箱，上海贺德；GL-20G-II 高速冷冻离心机，上海安亭科学仪器厂；LS-1F 超净工作台，上海索普仪器；78-1 磁力加热搅拌器，常州博远实验分析仪器厂。

3. 试验方法

3.1. 试剂的配制

0.1 mol/L NaOH 标准滴定溶液：参照 GB/T601—2016 化学试剂标准滴定溶液的制备[15]；测定亚硝酸盐所需试剂的配制方法参照 GB/T5009.33-2016[16]。

3.2. 菌种的分离和纯化

将贵州品质较好的发酵辣椒，连同发酵液各取 50 g，匀浆，取 5 ml 匀浆液于试管，加入 5 ml 灭菌生理盐水混匀，然后梯度稀释 10^{-2} ~ 10^{-9} ，将各稀释液分别涂布于加有 1% CaCO_3 的 MRS 固体培养基上，于 37℃ 恒温培养 48 h，挑取有溶钙圈且直径在 2~4 mm 的菌落，反复划线纯化得到单菌落后，进行革兰氏染色和过氧化氢酶试验，将革兰氏染色阳性、过氧化氢酶试验阴性菌种保存备用。

3.3. 菌种初筛

将各菌株接种于 50 mL MRS 液体培养基中，37℃ 培养 24 h，测定其 pH 及 OD600 值。

3.4. 菌种复筛

将初筛得到的菌种接种于含 150 mg/L 亚硝酸钠的 150 ml MRS 培养基中，于 37℃ 恒温培养箱中培养 24 h 后，测定发酵液中亚硝酸盐含量，计算亚硝酸盐降解率[17]。

3.5. 生长曲线测定

将活化后的 LJ1 和 LJ8 分别接种至 MRS 液体培养基进行培养，以不接种的 MRS 液体培养基作为空白对照，每隔 2 h 测定其 OD600 值，以培养时间为横坐标，OD600 值为纵坐标，绘制各菌株生长曲线。

3.6. 分子生物学鉴定

将菌株 LJ1 和菌株 LJ8 送至生物工程(上海)股份有限公司测定进行 16S rRNA 序列测定；用 MEGA7.0 软件使构建系统发育树。

3.7. 复合发酵剂配比的确定

挑选优质新鲜的红辣椒洗净、烫漂处理后放入泡菜坛，将 LF-8001、LF-8002、LP-7501S 进行活化培养后按表 1 的菌种配比进行辣椒发酵，其中食盐添加量为 4%，辅以适量大蒜、生姜、酒等辅料，辣椒：卤水 = 1:1.5，菌剂接种量为 4%，30℃ 恒温发酵[18]，发酵成熟时(72 h)测定发酵辣椒中的亚硝酸盐含量、pH、总酸，同时进行感官评定，以自然发酵 72 h 和自然发酵成熟的两种辣椒作为对比，筛选出最佳菌种配比。

Table 1. Fermentation strains combination
表 1. 发酵菌种组合

编号	菌种	菌种比例	编号	菌种	菌种比例
1	自然发酵 72 h	-	8	LF-8001:LF-8002:LP-7501S	1:3:3
2	自然发酵至成熟	-	9	LF-8001:LF-8002:LP-7501S	2:1:2
3	LF-8001	-	10	LF-8001:LF-8002:LP-7501S	2:2:3
4	LF-8002	-	11	LF-8001:LF-8002:LP-7501S	2:3:1
5	LP-7501S	-	12	LF-8001:LF-8002:LP-7501S	3:1:3
6	LF-8001:LF-8002:LP-7501S	1:1:1	13	LF-8001:LF-8002:LP-7501S	3:2:1
7	LF-8001:LF-8002:LP-7501S	1:2:2	14	LF-8001:LF-8002:LP-7501S	3:3:2

3.8. 测试方法

- 1) pH：使用酸度计进行测定。
- 2) OD600 值：用 722 分光光度计，于波长 600 nm 处进行测定。
- 3) 亚硝酸盐标准曲线的绘制及亚硝酸盐含量的测定
根据文献[19]盐酸萘乙二胺比色法绘制标准曲线。
发酵辣椒中的亚硝酸盐的测定采用分光光度计法，参照食品安全国家标准 GB/T 5009.33—2010《食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定》中的盐酸萘乙二胺比色法测定发酵辣椒中的亚硝酸盐含量[16]。
- 4) 总酸：根据 GB/T 12456-2008，选用 pH 电位法测定发酵液中总酸的含量[20]。
- 5) 发酵辣椒的感官评分：根据表 2 进行感官评价。

Table 2. The sensory evaluation standard of fermented pepper
表 2. 发酵辣椒的感官评价标准

评价项目	评价标准	评价项目	评价标准
色泽(25)	自然鲜红色	滋味(25)	酸咸辣各味协调，味道纯正
	暗红色		酸、咸、辣味比较协调
	深暗红色		酸、咸、辣味不协调风味失衡
香气(25)	发酵香味浓厚	口感(25)	质地均匀一致，无皮肉分离现象
	发酵香味不浓郁		质地较均匀，有轻微皮肉分离
	基本无发酵香味		质地不均匀，皮肉分离，汤汁过多

4. 结果与分析

4.1. 菌种的分离与初筛

通过 MRS 培养基培养观察是否产生溶钙圈，革兰氏染色，过氧化氢酶试验，从自然培养的发酵辣椒

及其发酵液中分离出 80 株疑似乳酸菌, 乳酸菌在生长过程中会产生乳酸, 在相同培养条件下, pH 越低其乳酸含量越高, 因此为加快试验效率, 可通过 pH 的高低来反映这 80 株疑似乳酸菌产酸能力的强弱, 比较这 80 株疑似乳酸菌的 pH 和 OD₆₀₀ 值, 以对比其产酸能力和生长能力, 实验结果如表 3。

Table 3. Strain of the pH and OD₆₀₀ value

表 3. 菌株 pH 值及 OD₆₀₀ 值

菌株编号	pH	OD ₆₀₀	菌株编号	pH	OD ₆₀₀	菌株编号	pH	OD ₆₀₀
LJ1	4.20	1.811	LJ28	4.79	1.375	LJ55	4.80	1.141
LJ2	4.31	1.822	LJ29	5.35	0.627	LJ56	4.49	1.466
LJ3	4.19	1.851	LJ30	4.22	1.693	LJ57	5.24	1.301
LJ4	4.19	1.694	LJ31	5.13	0.975	LJ58	5.63	0.722
LJ5	4.21	1.828	LJ32	4.18	1.811	LJ59	4.21	1.828
LJ6	4.18	1.767	LJ33	5.74	0.450	LJ60	5.31	1.774
LJ7	4.18	1.690	LJ34	4.69	1.633	LJ61	5.88	0.346
LJ8	4.19	1.800	LJ35	5.43	0.721	LJ62	4.34	1.701
LJ9	4.29	1.442	LJ36	4.55	1.461	LJ63	4.67	0.971
LJ10	4.18	1.825	LJ37	5.93	0.215	LJ64	5.38	0.723
LJ11	4.22	1.252	LJ38	5.58	0.554	LJ65	4.45	1.767
LJ12	4.24	1.397	LJ39	5.21	1.037	LJ66	5.62	0.568
LJ13	5.76	0.359	LJ40	5.78	0.453	LJ67	4.78	1.156
LJ14	4.22	1.580	LJ41	4.40	1.195	LJ68	4.40	1.680
LJ15	4.22	1.396	LJ42	5.69	0.557	LJ69	4.2	1.836
LJ16	4.32	1.393	LJ43	5.24	1.033	LJ70	5.78	0.786
LJ17	4.40	1.320	LJ44	4.33	1.822	LJ71	4.35	1.555
LJ18	5.82	0.407	LJ45	4.35	1.643	LJ72	5.71	0.310
LJ19	4.34	1.420	LJ46	5.90	0.644	LJ73	4.82	1.013
LJ20	4.29	1.384	LJ47	4.65	1.085	LJ74	5.35	0.655
LJ21	4.98	0.914	LJ48	4.58	1.132	LJ75	4.82	0.969
LJ22	4.37	1.421	LJ49	4.93	0.983	LJ76	4.48	1.599
LJ23	4.34	1.419	LJ50	5.83	0.340	LJ77	5.96	0.204
LJ24	4.25	1.558	LJ51	4.71	0.917	LJ78	4.57	1.690
LJ25	5.82	0.603	LJ52	4.19	1.851	LJ79	5.31	0.960
LJ26	5.82	0.370	LJ53	4.36	1.694	LJ80	5.20	0.938
LJ27	4.36	1.366	LJ54	4.53	1.467			

根据表 3 可知, 分离得到的 80 株疑似乳酸菌 37℃ 培养 24 h 后, 其 pH 都集中在 4.18~5.96 之间, OD₆₀₀ 值都在 0.215~1.851 之间, 在这 80 株菌中, 菌 LJ 1、LJ 3、LJ 5、LJ 6、LJ 8、LJ 10、LJ 32、LJ 52、LJ 59、LJ 69 在培养 24 h 后, 其 pH 较低, 都在 4.21 以下, 且增殖能力较强, OD₆₀₀ 值都在 1.700 以上。接种前, MRS 液体培养基的 pH 在 6.2~6.4 之间, 接种疑似乳酸菌后, 菌在其生长过程中产生乳酸, 导致发酵体系

pH 下降, MRS 培养基是乳酸菌选择性培养基, 乳酸菌在 MRS 培养基中生长良好, 且可以抑制其他细菌的生长, 因此初步选定产酸能力、繁殖能力优于菌株 LJ 1、LJ 3、LJ 5、LJ 6、LJ 8、LJ 10、LJ 32、LJ 52、LJ 59、LJ 69 这 10 株菌进行亚硝酸盐降解能力的试验。

4.2. 菌种复筛

按照 2.9 的方法绘制出亚硝酸盐标准曲线, 如图 1, 得到的标准曲线其 R^2 为 0.99953, 即所有观测点中有 99.953% 的点落在这条直线上, 因此标准曲线具有较高的可信度。

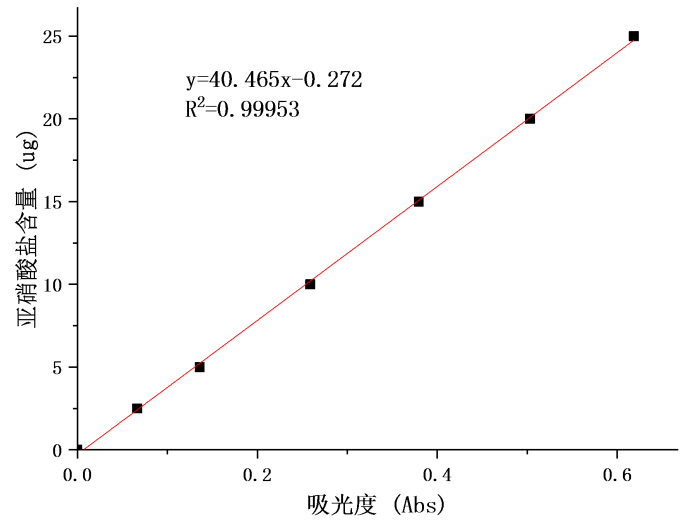


Figure 1. The standard curve of Sodium nitrite content determination
图 1. NIT 含量测定标准曲线

初筛得到的 10 株菌株接种于含 150 mg/L 亚硝酸钠的 150 ml MRS 培养基中, 于 37℃ 恒温培养箱中培养 24 h 后, 测定培养液中亚硝酸盐剩余含量, 计算得到各菌株的亚硝酸盐降解率[17], 结果如图 2 所示。

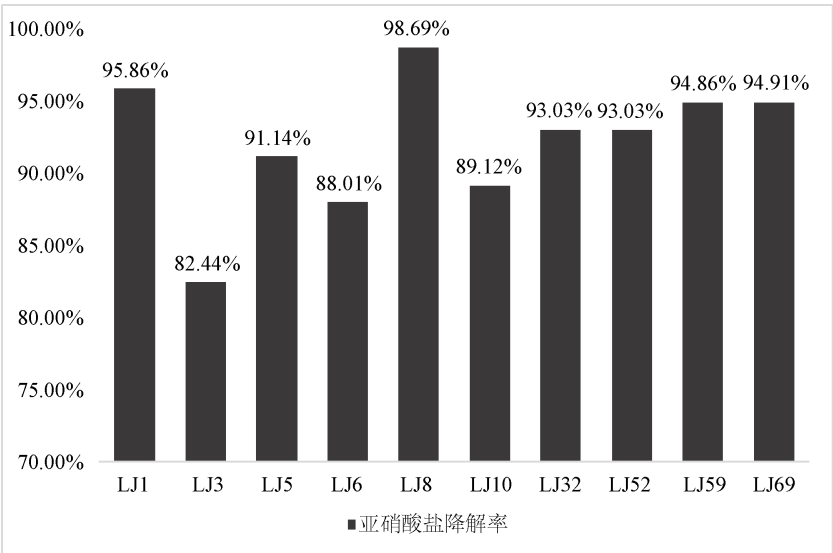


Figure 2. Nitrite degradation rate in screening strain
图 2. 亚硝酸盐降解率

根据图 2 可以看到, 初筛后的菌株对亚硝酸钠都有比较高的降解能力, 其亚硝酸盐降解率都在 80% 以上, 但不同菌株之间降解亚硝酸盐的能力有差异, 降解能力最低 LJ3 在 24 h 内亚硝酸盐降解率为 82.44%, 而 LJ8 在 24 h 的降解率达到了 98.69%, 亚硝酸盐降解能力强的菌, 制成发酵剂后, 能在较短的时间内将亚硝酸盐含量降低到一个安全的水平, 因此取亚硝酸盐降解率在 95% 以上的两株菌 LJ1 和 LJ8 进行下一步生长曲线的测定与鉴定。

4.3. 分离菌株生长曲线

LJ1 和 LJ8 的生长曲线如图 3 所示, 从图中可以看出, LJ1 在 9 h 之前处于对数生长期, 在此期间大量繁殖, 其 OD₆₀₀ 达到了 1.8, 此时的活菌数为 1.12×10^9 CFU/mL, 9 h 之后开始进入稳定期; LJ8 的生长曲线与 LJ1 大致相同, 都是在 9 h 之前处于对数生长期, 在此期间大量繁殖, 其 OD₆₀₀ 达到了 1.82, 此时的活菌数为 1.42×10^9 CFU/mL, 9 h 之后开始进入稳定期。结合 LP-7501S 的生长曲线[21], 三株菌株进入稳定期的时间相差不大, 且生长习性相近, 说明这三株菌株适宜进行复配。

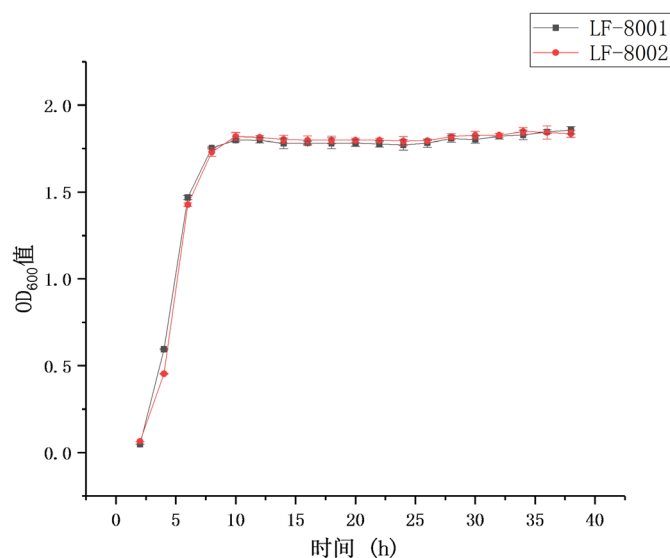


Figure 3. Strain growth curve
图 3. 生长曲线

4.4. 分离菌株的鉴定

将筛选得到的两株生长习性相近的疑似乳酸菌 LJ1 和 LJ8 进行分子生物学鉴定, 结果如下。

由图 4 的电泳图谱可以看出, LJ1 和 LJ8 在 1500 bp 均处出现了清晰且无杂带的荧光条带, 说明此次 PCR 扩增成功, 可用于后续的 16S rDNA 序列的测定。

1) 菌 LJ1 16SrDNA 测序结果及同源性对比分析

将 LJ1 的 16SrDNA 序列在核糖体数据库 RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>)上比对, 并在 NCBI 上进行 BLAST 序列比对, 菌 LJ1 跟发酵乳杆菌属 10 个不同菌种的 BLAST 序列进行比较, 其匹配度较高, 覆盖率都为 100%, E 值为零, 即完全匹配, 匹配一致性均在 99% 以上, 最高可达到 99.93%, 因此可以证明菌株 LJ1 属于发酵乳杆菌属的亚种, 命名为 LF-8001。

2) 菌 LJ8 16SrDNA 测序结果及同源性对比分析

将 LJ8 的 16SrDNA 序列在核糖体数据库 RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>)上比对, 并在 NCBI

上进行 BLAST 序列比对, 菌 LJ2 跟发酵乳杆菌属 8 个不同菌种的 BLAST 序列进行比较, 其匹配度较高, 覆盖率都为 99%, E 值为零, 即完全匹配, 匹配一致性均在 99% 以上, 最高可达到 99.93%, 因此可以证明菌株 LJ2 也属于发酵乳杆菌属的亚种, 命名为 LF-8002。

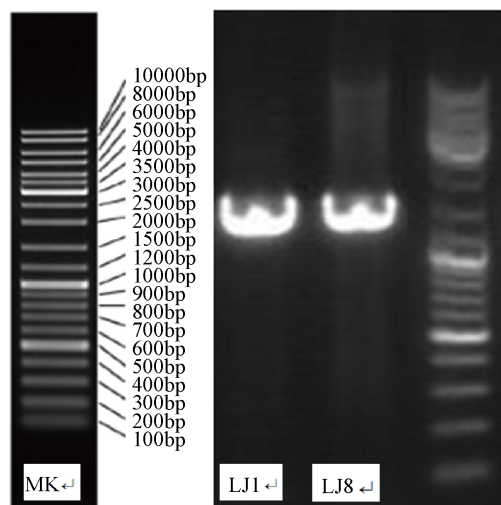


Figure 4. Electrophoresis map of PCR products of strains LJ1 and LJ8

图 4. 菌株 LJ1 和 LJ8 的 PCR 产物电泳图谱

由图 5 可以看出, 采用 The Neighbor-joining Method 法构建发育树, 菌株 LF-8001 和 LF-8002 与 NCBI 数据库中 *Lactobacillus fermentum* 属进行对比, 可信程度达到 100%, 基因相似性大于 99.93, 确定菌株 LF-8001 和 LF-8002 属于乳酸菌属发酵乳杆菌亚种。

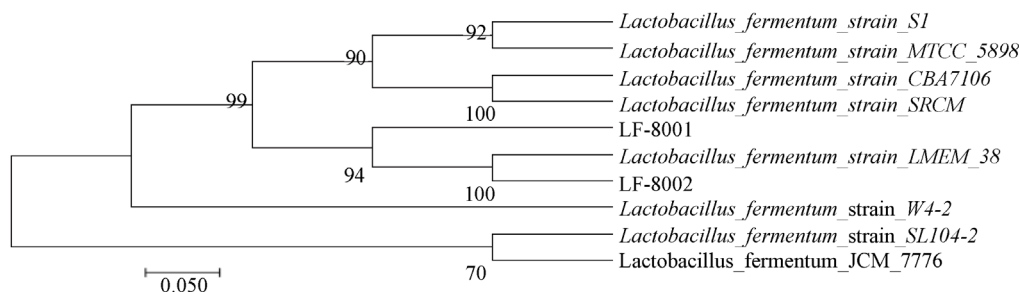


Figure 5. The phylogenetic tree of lactic *Lactobacillus fermentum* based on 16S rRNA gene sequences

图 5. 发酵乳杆菌 16SrRNA 基因序列的系统发育树

4.5. 复合发酵剂对比对辣椒发酵效果的影响

按照 3.8 的方法, 得出复合发酵剂不同菌种对比对发酵辣椒成熟时 pH、总酸、亚硝酸盐含量影响的结果见表 4, 复合发酵剂不同对比对发酵辣椒成熟时感官影响的结果见表 5。

由表 4 和表 5 可以看到, 在相同发酵时间(72 h)内, 自然发酵辣椒与接种发酵辣椒相比其总酸较低、亚硝酸盐含量较高, 且基本无发酵辣椒的风味; 发酵成熟时, 自然发酵的辣椒和接种发酵的辣椒其亚硝酸盐含量均低于国标, 且第 14 组试验其亚硝酸盐含量最低, 结合感官评价可以看到, 单一菌种发酵制备的辣椒感官评分低于接种复合发酵剂制备的辣椒, 其主要是香气和滋味不足; 按照第 14 组试验的菌种配比, 接种发酵辣椒进行发酵, 其感官评价最接近于自然发酵至成熟的辣椒, 其得到的发酵辣椒颜色呈自

然鲜红色，发酵香味浓郁，酸辣适中，风味协调，质地较为均匀。因此，综合考虑产酸能力、亚硝酸盐降解能力和感官评价等指标，最佳复合发酵剂配方菌种比例为：LF-8001:LF-8002:LP-7501S = 3:3:2。

Table 4. The influence of fermentation strains combination for physical and chemical properties of Fermented Pepper
表 4. 发酵剂不同配比对发酵辣椒理化性质的影响

编号	菌种比例 LF-8001:LF-8002:LP-7501S	pH	总酸(%)	亚硝酸盐含量(mg/kg)
1	自然发酵 72 h	4.67	0.09	7.68
2	自然发酵至成熟	3.71	0.31	3.51
3	1:0:0(仅 LF-8001)	3.51	0.17	0.46
4	0:1:0(仅 LF-8002)	3.55	0.21	0.57
5	0:0:1(仅 LP-7501S)	3.49	0.18	0.49
6	1:1:1	3.46	0.26	0.50
7	1:2:2	3.31	0.24	0.29
8	1:3:3	3.40	0.21	0.46
9	2:1:2	3.39	0.21	0.33
10	2:2:3	3.38	0.21	0.38
11	2:3:1	3.47	0.16	0.25
12	3:1:3	3.41	0.20	0.58
13	3:2:1	3.46	0.30	0.70
14	3:3:2	3.38	0.27	0.25

Table 5. The influence of fermentation strains combination for Sense of Fermented Pepper
表 5. 发酵剂不同配比对发酵辣椒感官的影响

编号	菌种比例 LF-8001:LF-8002:LP-7501S	色泽	香气	滋味	口感	总分
1	自然发酵 72 h	23	8	9	20	60
2	自然发酵至成熟	23	24	24	20	91
3	1:0:0 (仅 LF-8001)	20	18	16	18	72
4	0:1:0 (仅 LF-8002)	19	18	15	19	71
5	0:0:1 (仅 LP-7501S)	20	17	17	18	72
6	1:1:1	22	22	18	18	80
7	1:2:2	20	21	20	18	79
8	1:3:3	20	23	15	18	76
9	2:1:2	21	21	19	17	78
10	2:2:3	22	22	20	18	82
11	2:3:1	21	21	20	18	80
12	3:1:3	19	20	22	17	82
13	3:2:1	20	22	21	18	81
14	3:3:2	23	23	20	19	85

5. 结论

本研究从发酵辣椒中分离的两株发酵乳杆菌, 分别命名为 LF-8001 和 LF-8002, 其亚硝酸盐降解能力都在 95%以上, 分别为 95.86%和 98.69%; 而 OD600 分别为 1.811 和 1.800, pH 分别为 4.20 和 4.19, 其生长能力和产酸能力均优于分离得到的其它菌株, 对其生长曲线进行测定发现与本研究团队前期筛得的植物乳杆菌 LP-7501S 生长习性相近, 以 LF-8001:LF-8002:LP-7501S = 3:3:2 此比例发酵时, 得到发酵辣椒亚硝酸盐含量远低于单一菌种发酵和自然发酵的辣椒, 且按此复合发酵剂配方进行发酵的辣椒其感官评价明显优于单一菌种发酵, 接近自然发酵至成熟的辣椒, 发酵辣椒颜色呈自然鲜红色, 质地较为均匀, 具有发酵辣椒特有的发酵香气, 香味浓郁, 酸辣适中, 风味协调, 可为后期直投式发酵剂制备提供科学支撑。

基金项目

项目名称: 贵州省科技计划项目(项目编号: 黔科合成果[2020] 1Y025)。

项目名称: 中央引导地方科技发展专项资金(项目编号: 项目编号黔科中引地[2018] 4020)。

参考文献

- [1] 王修俊, 王丽芳, 等. 贵州发酵辣椒中优良乳酸菌的分离鉴定及生长特性研究[J]. 食品科技, 2014, 39(10): 17-21.
- [2] 郭志华, 张兴桃, 等. 泡菜中降解亚硝酸盐乳酸菌的筛选及生物学特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(17): 66-72.
- [3] 张雪红, 李华昌. 姜辣素的研究进展[J]. 矿冶, 2003, 12(4): 96-98.
- [4] Markowiak, P. and Śliżewska, K. (2017) Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*, **9**, 1021. <https://doi.org/10.3390/nu9091021>
- [5] Kumar, P.J., Gitishree, D., Spiros, P. and Han-Seung, S. (2016) Kimchi and Other Widely Consumed Traditional Fermented Foods of Korea: A Review. *Frontiers in Microbiology*, **7**, 1493. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01493>
- [6] 王流国, 王雪蒙. 减少食品中亚硝酸盐危害的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(4): 1593-1598.
- [7] 陈长宏, 张科. 食品中硝酸盐和亚硝酸盐的污染及预防[J]. 现代农业科技, 2013(7): 327.
- [8] Ma, L., Nan, Q. and Fang, C. (2005) N-Nitrosamine Compounds and Food Safety. *Roducts Rocessing*, No. 12, 8-11+14.
- [9] Chow, C.K. and Hong, C.B. (2002) Dietary Vitamin E and Selenium and Toxicity of Nitrite and Nitrate. *Toxicology*, **180**, 195-207. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00391-8](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00391-8)
- [10] Lundberg, J.O., Gladwin, M.T., Ahluwalia, A., Benjamin, N., Bryan, N.S., Butler, A., Cabrales, P., Fago, A., Feelisch, M. and Ford, P.C. (2009) Nitrate and Nitrite in Biology, Nutrition and Therapeutics. *Nature Chemical Biology*, **5**, 865-869. <https://doi.org/10.1038/nchembio.260>
- [11] Paik, H. and Lee, J. (2014) Investigation of Reduction and Tolerance Capability of Lactic Acid Bacteria Isolated from Kimchi against Nitrate and Nitrite in Fermented Sausage Condition. *Meat Science*, **97**, 609-614. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.03.013>
- [12] 张二康, 王修俊, 等. 发酵萝卜中亚硝酸盐含量影响因素分析[J]. 中国调味品, 2019, 44(9): 33-38.
- [13] 王笋. 泡菜发酵用直投式发酵剂的研究[D]: [硕士学位论文]. 西安: 陕西科技大学, 2014.
- [14] Wu, C., Zheng, J., Huang, J. and Zhou, R. (2014) Reduced Nitrite and Biogenic Amine Concentrations and Improved Flavor Components of Chinese Sauerkraut via Co-Culture of *Lactobacillus Plantarum* and *Zygosaccharomyces rouxii*. *Annals of Microbiology*, **64**, 847-857. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0724-8>
- [15] GB/T 601-2016. 化学试剂标准滴定溶液的制备[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [16] 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[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [17] 叶陵, 李勇, 等. 剁辣椒中优良乳酸菌的分离鉴定及其生物学特性分析[J]. 食品科学, 2018, 39(10): 112-117.
- [18] 王丽芳. 发酵辣椒的发酵工艺及保藏技术研究[D]: [硕士学位论文]. 贵阳: 贵州大学, 2015.

-
- [19] 黄珊, 王修俊, 等. 复合菌剂对辣椒发酵过程中亚硝酸盐含量的影响[J]. 中国酿造, 2017, 36(7): 129-134.
- [20] GB/T 12456-2008. 食品中总酸的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [21] 商景天. 泡菜中降解亚硝酸盐菌种筛选及其降解机理研究[D]: [硕士学位论文]. 贵阳: 贵州大学, 2019.