

酸白菜腌制过程中优势乳酸菌及菌群演替规律研究

张义奎, 曹梦茜, 李俊丽, 王梦洋, 赵慧竹, 刘变芳*

(西北农林科技大学食品科学与工程学院 陕西杨凌 712100)

摘要 以陕西杨凌地区大白菜为原料,切碎,添加 2.5%食盐,在 22 ℃进行半厌氧自然发酵酸泡菜。发酵过程中在不同时间取泡菜液,测定泡菜 pH 值、乳酸菌落和菌落总数变化,分离鉴定优势乳酸菌株,检测酸白菜微生物多样性,探究酸白菜腌制过程中菌群的演替变化规律。结果表明:泡菜自然发酵,从第 0 天到第 7 天,pH 值从初始的 6.0 降到 4.2,乳酸菌数由 4.65 lg(CFU/mL)增至 7.86 lg(CFU/mL),菌落总数由 9.11 lg(CFU/mL)减至 8.65 lg(CFU/mL)。在不同发酵阶段共分离鉴定出 27 株乳酸菌,分别为 10 株明串珠菌,7 株魏斯氏菌,4 株乳酸乳球菌,4 株弯曲乳杆菌和 2 株戊糖片球菌。泡菜发酵起始优势乳酸菌种属为魏斯氏菌,发酵中期优势乳酸菌逐渐变成乳酸乳球菌,肠膜明串珠菌演替成优势乳酸菌。整个泡菜发酵阶段异型乳酸发酵菌种占据主导地位,发酵中、后期(5 d 后)同型乳酸发酵菌种参与泡菜发酵。

关键词 酸白菜; 自然发酵; 乳酸菌分离鉴定; 演替规律; 微生物多样性分析

文章编号 1009-7848(2023)07-0363-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.07.037

酸泡菜的独特风味和口感的形成是由乳酸菌为主的菌群在厌氧环境下发酵而产生的^[1]。泡菜经过发酵之后风味得到改善,可以增进人的食欲,营养价值也会提升^[2]。产生的口感和风味主要受原料的种类、微生物的种类以及环境因子的影响^[3]。泡菜实际生产过程主要包括:原料选择→清洗→沥干→切配→装坛→注水→封坛→发酵 8 个步骤^[3]。如传统四川泡菜将新鲜的当季蔬菜清洗、沥水后切成条状,加入调味料、纯净水,在密闭条件下常温发酵^[4]。发酵所用乳酸菌来自于蔬菜附生菌落或前代泡菜母水。其中,调味料的加入使泡菜发酵体系更为复杂,菌种演替也受到影响。自然发酵泡菜可以避免由于调味料带来的不稳定因素,通过仅添加食盐来维持泡菜液的渗透压,利用蔬菜中存在的天然菌落进行自然发酵,即可获得成品泡菜^[5]。在自然发酵环境下,探究乳酸菌优势菌种的变化情况。

根据泡菜发酵过程中优势菌的变化情况,将发酵过程分为发酵初期、中期和后期。李文斌等^[6]发现泡菜发酵初期主要以不抗酸的大肠杆菌和酵母菌占优势作用,产生乳酸^[7]、乙醇、二氧化碳和乙酸,当 pH 值降到 5 左右时,菌群发生变化,以肠

膜明串珠菌等异型乳酸菌发酵为主,这类乳酸菌可最先适应发酵环境并产酸,抑制其它有害菌的生长,环境中的 pH 降低。早期的异型发酵几乎不形成风味物质,然而会产生一些乙酸,乙酸是具有挥发性的酸类化合物,可与其它化合物结合,促进发酵中、后期泡菜风味物质的形成^[8]。中期发酵以乳杆菌和植物乳杆菌为代表的同型乳酸菌发酵为主,这类乳酸菌会产生大量的乳酸,使泡菜表现微酸性^[9]。后期随着乳酸的大量积累,乳酸菌受到抑制,耐酸性强的酵母和霉菌分解蔬菜中的有机酸,使 pH 值回升,腐败菌大量生长,分解环境中得蛋白质,造成泡菜的腐败变质^[10]。

我国蔬菜的种类多种多样,不同的地区发酵的泡菜方法和风味不尽相同,难以统一生产标准以实现工厂化量产。传统酸白菜制作通常将新鲜白菜经过筛选、清洗、切段、添加辅料后再添加盐水进行发酵,制得成品^[11]。民间泡菜的做法大致相同,在添加盐水阶段常会加入泡菜母水以增加泡菜发酵起始的发酵速度,增添风味。而工业做法是将民间泡菜做法中成分未知的泡菜母水替换成商用发酵剂,以提高产品稳定性,让泡菜发酵过程更加安全可控^[12]。大多数传统生产泡菜的方式主要依靠制作者的经验和乳酸菌的自然发酵,不仅具有健康隐患,而且发酵周期长,不利于发展规模化生产^[11]。我国泡菜的工业化生产起步较晚,缺少包含多种微生物和风味物质的复合型发酵产品。深

收稿日期: 2022-07-16

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31972043)

第一作者: 张义奎,男,硕士生

通信作者: 刘变芳 E-mail: bfliu9509@163.com

入研究泡菜在无外界条件影响时仅靠白菜自带附生菌种在高渗透压环境下的演变规律十分重要。

本研究在白菜中仅添加盐,22℃自然发酵7 d,用涂布方法记录发酵液中菌群变化规律。采用划线、涂布、革兰氏染色、过氧化氢酶试验、二氧化碳产气试验的方法分离泡菜液中的乳酸菌。使用分子生物学 16S rRNA 鉴定分离乳酸菌菌株,构建系统发育树,辨别分离菌株的亲缘关系。使用 16S rRNA 基因高通量测序对发酵完成的泡菜液进行微生物多样性分析。为泡菜的深度加工利用与乳酸菌在泡菜发酵过程中的演变规律作进一步探索。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

白菜,购自陕西省杨凌区好又多超市。

PCA 琼脂,海博生物技术有限公司;MRS 琼脂,海博生物技术有限公司;MRS 肉汤、APT 肉汤,北京陆桥技术股份有限公司;革兰氏染液,北京陆桥技术股份有限公司;3%过氧化氢溶液,海博生物技术有限公司;2xTaq PCR Master Mix,近岸蛋白质科技有限公司;通用引物 1492R 和 27F,5kb DNA Ladder 2000,近岸蛋白质科技有限公司;琼脂糖,厦门海晋生物有限公司;凝胶红 DNA 染料,笛医生物有限公司。

PCA 培养基(用于菌落总数测定):胰蛋白胨 5.0 g,酵母浸粉 2.5 g,葡萄糖 1.0 g,琼脂 15.0 g,pH 7.0±0.2,25℃。

MRS 琼脂培养基(用于乳酸菌检验与培养):蛋白胨 10.0 g,牛肉粉 5.0 g,酵母粉 4.0 g,葡萄糖 20.0 g,柠檬酸三铵 2.0 g,乙酸钠 5.0 g,MgSO₄ 0.2 g,MnSO₄ 0.05 g,K₂HPO₄ 2.0 g,吐温 80 1.0 mL,pH 6.5±0.2。

APT 肉汤(用于同型异型乳酸发酵区分):酵母浸粉 7.5 g,酪蛋白胨 12.5 g,葡萄糖 10.0 g,柠檬酸钠 5.0 g,盐酸硫胺素 0.001 g,氯化钠 5.0 g,磷酸氢二钾 5.0 g,氯化锰 0.14 g,硫酸镁 0.8 g,亚硫酸铁 0.04 g,吐温 80 0.2 g,pH 6.7±0.2。

MRSS 琼脂培养基(用于肠膜明串珠菌的筛选培养):蛋白胨 10.0 g,牛肉粉 5.0 g,酵母粉 4.0 g,葡萄糖 50.0 g,柠檬酸三铵 2.0 g,乙酸钠 5.0 g,

MgSO₄ 0.2 g,MnSO₄ 0.05 g,K₂HPO₄ 2.0 g,吐温 80 1.0 mL,pH 6.5±0.2。

1.2 仪器与设备

Motic B 显微镜,麦克奥迪实业集团有限公司;2720 热循环仪,Life Technologies;JY600C 电泳仪,北京君意东方电泳设备公司;JY04S-3C 紫外透射仪,北京君意东方电泳设备公司;JY-SPCT 凝胶电泳槽,北京君意东方电泳设备公司;MX-S 涡旋混匀器,S1010E 微型旋转离心机,美国赛洛捷克公司。

1.3 试验方法

1.3.1 酸泡菜的制作 戴上洁净手套,切掉新鲜大白菜根部,除去腐烂外层叶片、病变及破损组织,保留完整的白菜组织。先用自来水冲洗所有器具,再用纯净水冲洗 2 次。将白菜从中间切成两半,再切长约 5 cm 长的小块。称量大白菜的质量,按质量比 2.5%称取食盐,将盐与大白菜混匀。放入灭菌的广口瓶中,约占总体积的 80%。罐装后轻轻按压将空气挤出,避免破坏白菜的组织,用盖子密封。将泡菜罐子放入 22℃培养箱发酵。

在泡菜发酵的第 0,1,3,5,7 天用微量取样器吸取 250 μL 泡菜液放入无菌 eppendorf 管中,保存备用,检测相关指标。首先用枪头吸取少量备用泡菜原液样品,用 pH 计测定泡菜液 pH 值。

1.3.2 乳酸菌数与细菌总数检测 取 100 μL 泡菜液加到 900 μL 无菌生理盐水中,做系列梯度稀释。选取 10⁻⁴~10⁻⁷ 稀释度的稀释液 100 μL 涂布于 PCA 平板,37℃培养 48 h,选取菌落数适宜的平板(30~300)计数,统计菌落总数。选取 10⁻¹~10⁻³ 稀释度的稀释液 100 μL 涂布于 MRS 平板,37℃培养 48 h,选取菌落数适宜的平板(30~300)计数,统计乳酸菌数。

1.3.3 乳酸菌的分离纯化 用接种环取泡菜原液(未稀释)在 MRS 平板上连续划线分离乳酸菌单菌落,37℃培养 48 h。

选取划线培养的 MRS 平板和 1.3.2 节中涂布的 MRS 平板,观察其优势菌落。挑取优势菌落进行革兰氏染色,同时检测其过氧化氢酶,经初步筛选疑似乳酸菌。用无菌牙签挑去少量细胞于载玻片上,滴加 30%过氧化氢 1 滴,观察是否产生气泡。产气者为过氧化氢酶阳性,不产气泡的为过

氧化氢酶阴性。

选择革兰氏染色阳性,同时过氧化氢酶阴性的初筛疑似乳酸菌株,在 MRS 平板上划线纯化为单菌落。将纯化后的菌株编号,将含 20%(体积分数)甘油的 MRS 肉汤 -80°C 保存,备用。

1.3.4 肠膜明串珠菌分离纯化 用接种环取泡菜原液(未稀释)在 MRSS 平板上连续划线分离乳酸菌单菌落, 37°C 培养 48 h。利用肠膜明串珠菌在 MRSS 培养基上菌落特点为粗大、光滑、黏稠的特性,48 h 培养后分离 MRSS 培养基上具有该特点的菌株,按照 1.3.3 节所述方法分离纯化为单菌落。将纯化的菌株编号,使用体积分数 20%的甘油保存在 MRS 肉汤中,储存在 -80°C 冰箱中备用。

1.3.5 疑似乳酸菌生化鉴定 对分离菌株进行革兰氏染色,在显微镜下确定所有挑选菌株的形态,以及是否为革兰氏阳性菌。同时选用 30%过氧化氢溶液做触酶试验。不产生气泡为过氧化氢酶阴性,符合乳酸菌菌落的特征。为了对筛选菌株的分离产物进行分类,做二氧化碳发酵试验,将无菌的达勒姆管倒置在灭菌试管中,加入 10 mL APT 肉汤,将候选菌接种到 APT 肉汤中,培养 48 h 后观察小管内是否产生气泡。

1.3.6 乳酸菌 16S rRNA 鉴定与系统发育树构建

样品 DNA 按照生工试剂盒说明书进行提取,使用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F(5'AACTGAGTTTGATCCTGGCTC-3')和 1492R(5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'),通过 PCR 扩增分离菌株的 16S rRNA 基因的可变区,凝胶电泳分析 PCR 产物。PCR 条件: 95°C 预变性 6 min,在 94°C 下变性 30 s,在 55°C 下退火 30 s, 72°C 延伸 2 min,循环 30 次, 72°C 延伸 10 min, 4°C 保存备用。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测合格后,在紫外投射仪中照胶并保存图片,PCR 产物送至热默尔生物科技公司(中国西安)测序。对测序结果手动校准完成后与 NCBI 上 GenBank 数据库中的已知序列进行同源性比对分析(Basic Local Alignment Search Tool,http // blast. ncbi. nlm. nih. Gov / Blast.cgi)。参照丛敏等^[13]方法,使用 Mega X 程序,通过临近相连法编辑,建立系统发育树,并用 bootstrap 检验系统发育树,自展数(Boot Strap)为 1 000。

1.3.7 酸泡菜产品的微生物多样性分析 取发酵 7 d 的泡菜液,采用高通量测序检测微生物多样性。验证发酵 7 d 后泡菜液环境中微生物群体在各属水平上的数目和频率分布差异,揭示泡菜液中菌群结构与功能的联系。

1.3.8 数据分析 泡菜制作设置 4 组平行,pH 的测定重复 3 次,PCA 平板与 MRS 平板菌落计数重复 3 次,物种丰度算法采用 RDP classifier 对 OTU 聚类进行比对,采用 Excel、Graphpad prism 8.0 及 Origin 2019b 进行图表绘制与数据处理。

2 结果与分析

2.1 pH、菌落总数与乳酸菌数量变化

泡菜自然发酵过程中 pH、菌落数量与乳酸菌数量变化如图 1 所示。7 d 内泡菜液 pH 值从初始 6.0 降到第 7 天的 4.2,属正常发酵蔬菜的 pH 范畴^[14]。在发酵初期(0~1d)pH 值降低不显著,这是由于泡菜罐中的高渗透压使白菜组织液渗出,为泡菜组织中附着的菌落提供了生长环境,包括乳酸菌在内的各种菌类的生长繁殖。此时乳酸菌还不是体系中的优势菌种,发酵启动速度较慢。第 1~3 天泡菜液 pH 值下降显著,乳酸菌数量从第 1 天的 $6.62 \lg(\text{CFU}/\text{mL})$ 上升到第 3 天的 $7.45 \lg(\text{CFU}/\text{mL})$,说明乳酸菌在第 1~3 天生长迅速,菌落总量略微下降,发酵已启动。3 d 后,乳酸菌发酵不断产生乳酸,导致 pH 值下降,为乳酸菌的生长

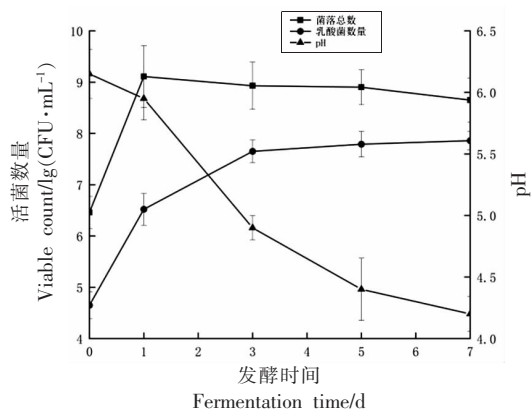


图 1 泡菜发酵过程中 pH、菌落总数、乳酸菌数量变化
Fig.1 The changes in pH, viable counts of LAB and total viable bacterial counts in kimchi during fermentation

提供了适宜的环境条件,同时抑制了杂菌生长,乳酸菌数量大幅增加。之后几天,乳酸菌占据泡菜汁中的绝大部分,其总数约为 $7.86 \lg$ (CFU/mL),菌落总数先增后降,从 $9.11 \lg$ (CFU/mL)降到 $8.65 \lg$ (CFU/mL)。

2.2 乳酸菌的形态学鉴定结果

对泡菜液样品在 MRS 平板上多次划线,得到单菌落,进行过氧化氢酶试验与革兰氏染色。选出

过氧化氢酶阴性,即不产气泡的菌落,编号并保存在体积分数为 20%的甘油管中,置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。对分离菌株进行二氧化碳产气试验,产 CO_2 的分离株为异型乳酸发酵乳酸菌,不产 CO_2 的分离株为同型乳酸发酵乳酸菌。表 1 列出发酵 0~7 d,从泡菜液中分离的 27 株分离菌株的生理生化特性鉴定结果,图 1 为分离菌株的显微镜油镜观察图。

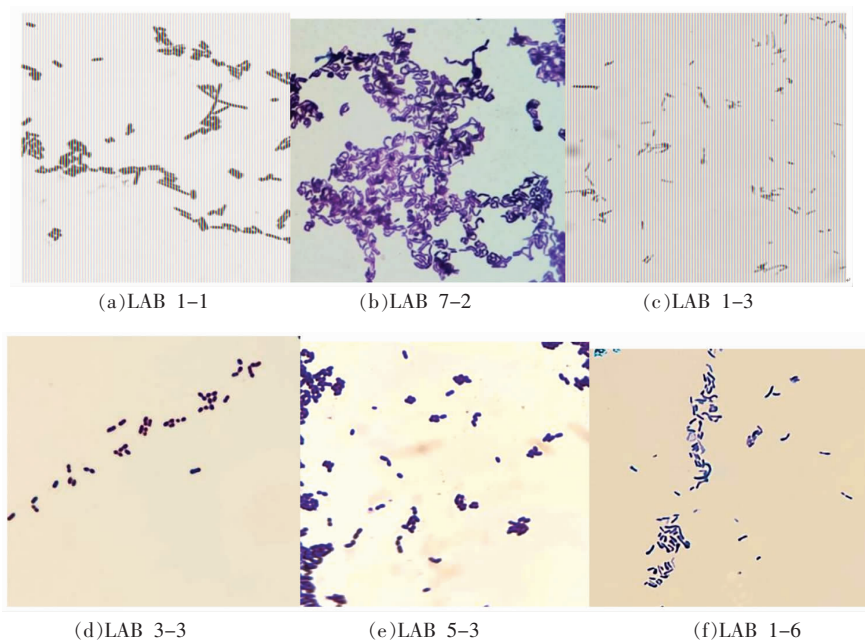


图 2 6 株菌的细胞形态图

Fig.2 Cell morphology of 6 bacterial strains

表 1 分离乳酸菌生理生化鉴定结果

Table 1 Physiological and biochemical identification of isolated lactic acid bacteria

菌株编号	过氧化氢酶测试	革兰氏染色	CO_2 产气试验	菌落形态
LAB 0-1	Cat-	G+	+	光滑不透明、灰白色、边缘整齐、中央扁平
LAB 0-2	Cat-	G+	+	光滑不透明、灰白色、边缘整齐、中央扁平
LAB 0-3	Cat-	G+	+	光滑不透明、乳黄色、边缘整齐、中央隆起
LAB 0-4	Cat-	G+	+	光滑不透明、灰白色、边缘整齐、中央扁平
LAB 1-1	Cat-	G+	+	光滑不透明、灰白色、边缘整齐、中央扁平
LAB 1-2	Cat-	G+	-	光滑不透明、乳黄色、边缘整齐、中央隆起
LAB 1-3	Cat-	G+	+	光滑不透明、灰白色、边缘整齐、中央扁平
LAB 1-4	Cat-	G+	-	光滑不透明、乳黄色、边缘整齐、中央隆起
LAB 1-5	Cat-	G+	+	光滑不透明、灰白色、边缘整齐、中央扁平
LAB 1-6	Cat-	G+	+	光滑不透明、明黄色、边缘整齐、中央隆起
LAB 1-7*	Cat-	G+	+	光滑不透明、灰白色、边缘整齐、中央隆起
LAB 1-8	Cat-	G+	+	光滑不透明、乳黄色、边缘整齐、中央隆起
LAB 3-1	Cat-	G+	+	光滑不透明、灰白色、边缘整齐、中央扁平

(续表 1)

菌株编号	过氧化氢酶测试	革兰氏染色	CO ₂ 产气试验	菌落形态
LAB 3-2	Cat-	G+	+	光滑不透明、灰白色、边缘整齐、中央隆起
LAB 3-3	Cat-	G+	+	光滑不透明、灰白色、边缘整齐、中央隆起
LAB 3-4	Cat-	G+	-	光滑半透明、乳白色、边缘整齐、中央隆起
LAB 3-5	Cat-	G+	+	光滑不透明、明黄色、边缘整齐、中央隆起
LAB 5-1	Cat-	G+	-	光滑半透明、乳白色、边缘整齐、中央隆起
LAB 5-2	Cat-	G+	+	光滑不透明、灰白色、边缘整齐、中央隆起
LAB 5-3	Cat-	G+	+	光滑半透明、乳白色、边缘整齐、中央扁平
LAB 5-4	Cat-	G+	-	光滑半透明、乳白色、边缘整齐、中央隆起
LAB 5-5	Cat-	G+	+	光滑不透明、灰白色、边缘整齐、中央扁平
LAB 7-1	Cat-	G+	+	光滑不透明、灰白色、边缘整齐、中央隆起
LAB 7-2	Cat-	G+	+	光滑半透明、乳白色、边缘整齐、中央隆起
LAB 7-3	Cat-	G+	+	光滑不透明、明黄色、边缘整齐、中央隆起
LAB 7-4*	Cat-	G+	+	光滑不透明、灰白色、边缘整齐、中央隆起
LAB 7-5	Cat-	G+	+	光滑不透明、灰白色、边缘整齐、中央扁平

注: Cat-: 过氧化氢酶阴性; G+: 革兰氏阳性; +: 产 CO₂; -: 不产 CO₂。

由分离株的 CO₂ 产气试验结果可知分离株中异型乳酸发酵乳酸菌占比较高。22 个分离株组成主要有融合魏斯氏菌、肠膜明串珠菌、柠檬明串珠菌和乳酸乳球菌。乳酸乳球菌作为异型发酵的乳酸菌, 在无氧条件下从葡萄糖中产生乳酸、乙醇和二氧化碳^[15]。同型乳酸发酵乳酸菌由 5 个分离株组成, 不能利用葡萄糖产生气体, 主要产物为乳酸。测试 CO₂ 发现, 第 0 天全部为产气的异型发酵菌株, 第 1 天出现不产气的同型发酵菌株。整个发

酵过程中, 主要由异型发酵的菌株占主导地位, 促进泡菜的发酵进程。异型乳酸发酵在发酵初始阶段可快速改变发酵环境, 使同型乳酸菌快速繁殖。

2.3 分离菌株分子生物学鉴定结果

参照窦芳娇等^[16]的方法采用细菌通用引物 EU27F 和 1492R 对分离菌株的宏基因组 DNA 进行扩增。将测得的序列通过 16S rDNA 序列分析并在 NCBI 网站中 BLAST, 与 GenBank 数据库中已知菌株序列进行比对, 结果见表 2。

表 2 乳酸菌 16S rRNA 序列相似性比对

Table 2 Comparison of 16S rRNA sequence similarity of lactic acid bacteria

菌株编号	中文名	拉丁文名	菌株	相似度/%
LAB 0-1	融合魏斯氏菌	<i>Weissella confusa</i>	MT613585.1	99.74
LAB 0-2	融合魏斯氏菌	<i>Weissella confusa</i>	MT613567.1	98.41
LAB 0-3	乳酸乳球菌	<i>Lactococcus lactis</i>	MT645510.1	99.26
LAB 0-4	融合魏斯氏菌	<i>Weissella confusa</i>	MT613506.1	99.80
LAB 1-1	融合魏斯氏菌	<i>Weissella confusa</i>	MT613523.1	98.14
LAB 1-2	乳酸乳球菌	<i>Lactococcus lactis</i>	MT645510.1	100.00
LAB 1-3	食窦魏斯氏菌	<i>Weissella cibaria</i>	KC110687.1	99.10
LAB 1-4	乳酸乳球菌乳酸亚种	<i>Lactococcus lactis</i>	MT634253.1	97.88
LAB 1-5	融合魏斯氏菌	<i>Weissella confusa</i>	MT613585.1	98.90
LAB 1-6	柠檬明串珠菌	<i>Leuconostoc citreum</i>	MT573003.1	99.37
LAB 1-7	贺氏明串珠球菌	<i>Leuconostoc holzapfelii</i>	NR042620.1	97.90
LAB 1-8	乳酸乳球菌菌株	<i>Lactococcus lactis</i>	MT645510.1	99.55
LAB 3-1	融合魏斯氏菌	<i>Weissella confusa</i>	MT613585.1	98.76
LAB 3-2	肠膜明串珠菌	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	KT722809.1	98.67

(续表 2)

菌株编号	中文名	拉丁文名	菌株	相似度/%
LAB 3-3	肠膜明串珠菌	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	MT572967.1	98.28
LAB 3-4	弯曲乳杆菌	<i>Lactobacillus curvatus</i>	MT597551.1	99.34
LAB 3-5	柠檬明串珠菌	<i>Leuconostoc citreum</i>	MT544678.1	98.57
LAB 5-1	弯曲乳杆菌	<i>Lactobacillus curvatus</i>	MT582141.1	99.40
LAB 5-2	乳明串珠菌	<i>Leuconostoc lactis</i>	MT604792.1	98.04
LAB 5-3	肠膜明串珠菌亚种	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp.</i>	MT597785.1	97.76
LAB 5-4	弯曲乳杆菌菌株	<i>Lactobacillus curvatus</i>	MT597519.1	98.62
LAB 5-5	戊糖片球菌	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	MK418636.1	98.24
LAB 7-1	乳酸明串珠菌株	<i>Leuconostoc lactis</i>	MT604792.1	100.00
LAB 7-2	弯曲乳杆菌菌株	<i>Lactobacillus curvatus</i>	MT597551.1	99.43
LAB 7-3	柠檬明串珠菌	<i>Leuconostoc citreum</i>	MT573003.1	98.16
LAB 7-4	贺氏明串珠球菌	<i>Leuconostoc holzapfelii</i>	NR042620.1	99.06
LAB 7-5	戊糖片球菌	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	MT604839.1	98.57

27株分离株的比对结果相似度均高于98%，可以判断属于对应的属。这些主导泡菜发酵的乳酸菌有肠膜明串珠菌、弯曲乳杆菌、戊糖片球菌、柠檬明串珠菌、融合魏斯氏菌、贺氏明串珠球菌。

由表2可知，第0天以魏氏菌为主导发酵泡菜，第1天乳酸乳球菌开始增加，逐渐成为主导泡菜发酵的菌株，第5天明串珠菌开始增多。这与张其圣等^[17]的研究结果一致，在泡菜的早期发酵阶段，具有异型发酵特点的大肠杆菌和酵母菌占主导地位。文献^[15]，^[18]，^[19]报道在泡菜发酵的前期和中期，肠膜明串珠菌等异型发酵的菌株占主导。当发酵液的pH值较低时，在泡菜发酵后期，具有兼性或同型发酵特性的乳酸杆菌占主导地位，明串珠菌逐渐消失。Xiong等^[20]研究发现，肠膜明串珠菌能加快泡菜发酵进程，第5天该菌消失。夏姣等^[21]研究表明，肠膜明串珠菌在泡菜发酵的第7天消失。肠膜明串珠菌不耐酸，在发酵后期乳酸大量产生，使环境pH值降到不适宜明串珠菌生存，其数量减少。发酵第3天和第5天分离出弯曲乳杆菌，该菌不仅能在pH 3~10的环境中生长，还能产生细菌素，抑制泡菜汁中革兰氏阳性腐败菌的生长^[22]，延长泡菜保质期。

2.4 系统发育树构建

将测得的16S rRNA序列经软件Mallard 1.02检测，去除掉异常序列，正常序列通过GenBank数据库做同源性BLAST分析及相关信息检

索^[23-24]。对相关种属的典型菌株16S rRNA基因序列用Clustal X程序进行完全序列比对，用MEGA5.0软件中的Neighbor-Joining法进行1000次步长计算^[25]，构建系统发育树，进行微生物多样性动态变化分析，结果见图3。7d发酵过程中分离的乳酸菌共有5个分支，与表2结果一致，可确定来自5个乳酸菌属。其中弯曲乳杆菌有4株分别在第3,5,7天的发酵液中分离得到，系统发育分析显示它们为不同菌株。LAB 0-3、1-2、1-8 BLAST结果显示为同一种，系统发育分析显示为不同菌株。两株片球菌是从第5和7天的发酵液中分离的，同源性较低，不属于同一个种。第0天与第1天分离的乳酸乳杆菌虽来自同一个种，但不是同一株。魏斯氏菌间的同源性低，不属于同一种，原因可能是魏斯氏菌在白菜样品附生菌落中数量较多，因此在发酵前、中期(0~3d)的占比较大，易被分离。本次发酵分离的明串珠菌分别属于肠膜明串珠菌、贺氏明串珠菌、柠檬明串珠菌、乳酸明串珠菌4个属，分布于不同发酵阶段的泡菜液中。

2.5 酸白菜微生物多样性分析

为探究发酵7d后酸泡菜液中的细菌组成，进行微生物多样性分析。参考安飞宇等^[26]的方法并稍作修改。3组平行酸白菜发酵液中细菌属水平分布，如图4所示。在发酵液中共鉴定出16个已知细菌属，只有欧文氏菌属、明串珠菌属、乳杆

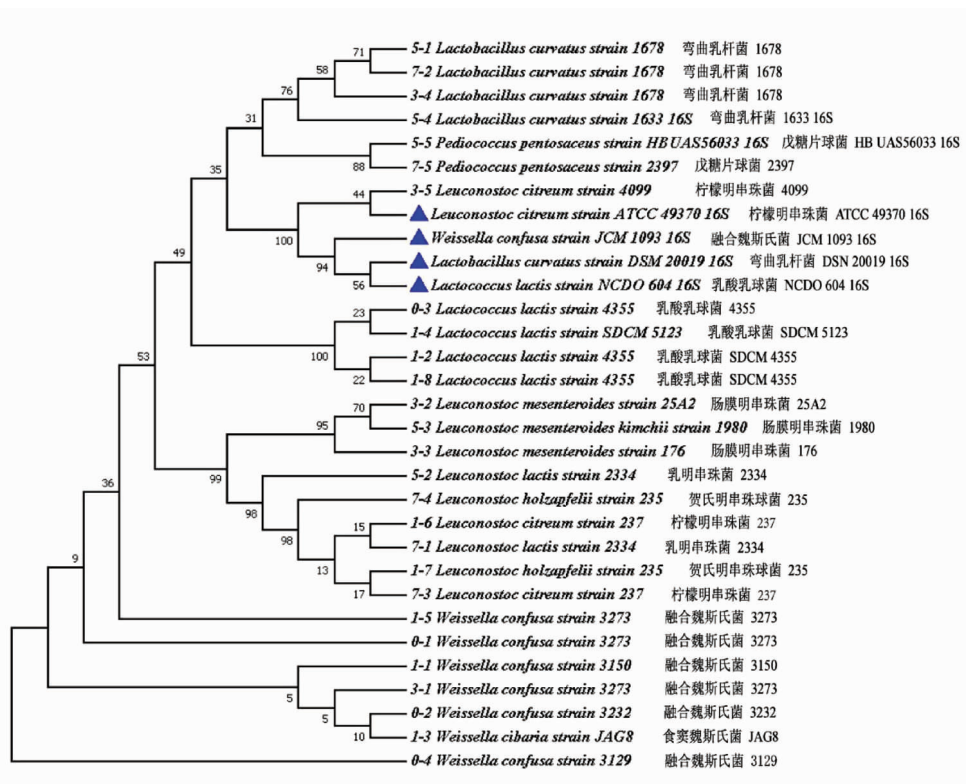


图 3 分离乳酸菌与 4 株标准菌株的系统发育树

Table 3 Phylogenetic tree of lactic acid bacteria isolated with 4 standard strains

菌属、片球菌属、魏斯氏菌属、假单胞菌属的丰度超过 1%。丰度最高的是欧文氏菌属,达 55.3%,是植物中常见的附生菌之一。也有研究表明欧文氏菌会导致腐败病害,属腐败菌^[27]。明串珠菌的丰度达到 21.1%, 肠膜明串珠菌对人和动物均无毒性和致病作用,且具有抗氧化,改善产品风味和拮抗致病菌的能力。研究表明肠膜明串珠菌是发酵中、后期的优势菌落,代谢产酸能力强,可为植物乳杆菌的生长繁殖创造低 pH 值的适宜环境^[28]。乳杆菌属的丰度为 19.2%,与其它文献报道一致^[29],是主导泡菜发酵的乳酸菌之一,可存在于低 pH 值环境中,利用葡萄糖和糖水化合物代谢产乳酸,然而,也会促进具有降解有机酸能力的真菌增殖。片球菌属丰度为 2.95%,与其它报道相比略低,乳酸片球菌耐盐能力较强,可通过代谢果糖、甘露糖等物质产有机酸,增强泡菜风味,还能产生胞外多糖^[29]。片球菌能合成片球菌素,被广泛用作天然抑菌剂。魏斯氏菌在发酵液中也有一定占比,较第 1 天更低。魏斯氏菌是发酵工业的重要乳酸菌,主要存在于新鲜果蔬和发酵制品中。刘佳琪等^[30]的研

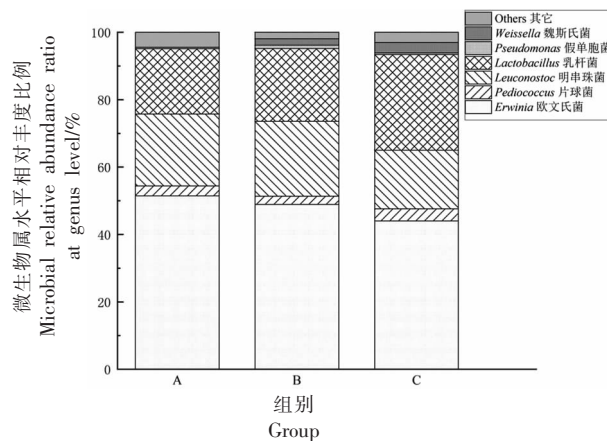


图 4 3 个样品在属水平上的细菌组成

Fig.4 The bacterial composition of three samples at genus

究表明融合魏斯氏菌具有富产胞外多糖的特性,常用于食品行业以改善食品的风味、质地与营养。魏斯氏菌还具有胆盐耐受性和抑菌效应,可在动物和人的肠道中定植并发挥益生功能。结果表明在乳酸菌中明串珠菌属与乳杆菌属的数量最多,在酸泡菜发酵中占据主要地位。片球菌属在发酵

后期(5 d后)也占有一定比例。欧文氏菌和假单胞菌作为非益生菌仍有少量存在于7 d后的泡菜液中,是潜在的食品安全隐患。

3 讨论与结论

经7 d的自然发酵,泡菜液中的pH值由初始6.0降到4.15,乳酸菌的数量由4.65 lg(CFU/mL)增至7.86 lg(CFU/mL),菌落总数先增后降,由9.11 lg(CFU/mL)降到8.65 lg(CFU/mL),变化趋势与Zhang等^[31]的报道一致。这是由于乳酸菌在发酵过程中产生大量的乳酸,营造了适合自身生长的环境,抑制了杂菌生长,导致菌落总数的变化。通过革兰氏染色、过氧化氢酶试验、二氧化碳试验以及16S rRNA测序成功鉴定出27株白菜中自然携带的乳酸菌,其中10株明串珠菌,7株魏斯氏菌,4株乳酸乳球菌,4株弯曲乳杆菌和2株戊糖片球菌。

与目前市场在售的酸泡菜相比,自然发酵酸泡菜发酵7 d后pH值(4.15)在泡菜的正常pH值(3.5~4.5)范围内^[14,32]。在益生菌组成方面,市售泡菜中除了戊糖片球菌、肠膜明串珠菌和魏斯氏菌外,植物乳杆菌也占有很大的比例,然而,植物乳杆菌在本试验中占比不高,可能的原因是自然发酵酸泡菜由于前期乳酸菌数量少,启动慢,没能及时抑制杂菌的生长,发酵7 d后仍未到达适宜植物乳杆菌生长的pH。在早期(3 d前)发酵阶段,魏斯氏菌占主导地位,是泡菜发酵过程中的主要菌种,在发酵过程中会产生各种酸和酶,增加泡菜的风味,而肠膜明串珠菌在保持泡菜独特风味和口味以及良好的品质方面有着重要作用^[33]。

对发酵7 d后的泡菜液进行微生物多样性分析表明,虽然自然发酵泡菜中益生菌占比不低,但是仍存在数量很高的肠杆菌,如欧文氏菌一类在土壤中普遍存活的非益生菌。参考以往对白菜附生菌落的研究,肠球菌目的欧文氏菌属是白菜的附生菌,数量在3~3.5 lg(CFU/g)范围。自然发酵泡菜中若乳酸菌起始繁殖不够快,则会导致附生菌落如欧文氏菌假单胞菌等杂菌生长繁殖不受限,进而导致pH降低速度慢,泡菜品质不高等问题,也会导致传统发酵酸泡菜存在潜在食品安全问题^[34]。

参 考 文 献

- [1] HONG Y, YANG H S, LI J, et al. Identification of lactic acid bacteria in salted Chinese cabbage by SDS-PAGE and PCR-DGGE[J]. *J Sci Food Agric*, 2014, 94(2): 296-300.
- [2] BUTNARIU M, BUTU A. Chemical composition of vegetables and their products[M]. Heidelberg: Handbook of Food Chemistry, 2015: 627-629.
- [3] 张同建. 泡菜工业生产研究进展[J]. *现代食品*, 2020, 3(5): 73-75.
ZHANG T J. Research progress of pickle industry[J]. *Modern Food*, 2020, 3(5): 73-75.
- [4] 王金菊, 崔宝宁, 张治洲. 泡菜风味形成的原理[J]. *食品研究与开发*, 2008, 29(12): 163-166.
WANG J J, CUI B N, ZHANG Z Z. Flavor generation mechanism of pickle[J]. *Food Research and Development*, 2008, 29(12): 163-166.
- [5] 陈仲翔, 董英. 泡菜工业化生产的研究进展[J]. *食品科技*, 2004(4): 33-35.
CHEN Z X, DONG Y. Research progress of pickles commercial process[J]. *Food Science and Technology*, 2004(4): 33-35.
- [6] 李文斌, 宋敏丽, 唐中伟. 自然发酵泡菜微生物群落变化的研究[J]. *中国食物与营养*, 2008(11): 22-24.
LI W B, SONG M L, TANG Z W. Changes on the microorganisms community in pickles manufactured by natural fermentation[J]. *Food and Nutrition in China*, 2008(11): 22-24.
- [7] HAYEK S A, IBRAHIM S A. Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: A review[J]. *Food and Nutrition Sciences*, 2013, 4(11): 73-87.
- [8] 徐丹萍, 蒲彪, 卓志航. 传统泡菜中乳酸菌对风味的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2014, 40(2): 170-173.
XU D P, PU B, ZHUO Z H. Effects of lactic acid bacteria on flavor of traditional Paocai[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2014, 40(2): 170-173.
- [9] 马欢欢, 吕欣然, 白凤翎. 传统中韩泡菜乳酸菌菌相分析与风味物质组成的比较[J]. *食品与发酵工业*, 2015, 41(12): 184-190.
MA H H, LÜ X R, BAI F L. Comparison of flavor substances and analysis of lactic acid bacteria flora

- between Chinese paocai and Korean kimchi[J]. Food and Fermentation Industries, 2015, 41(12): 184-190.
- [10] 田伟. 四川传统泡菜与工业泡菜发酵过程中微生物群落结构解析[D]. 成都: 西华大学, 2013.
- TIAN W. Analysis of microorganism community structure in the fermentation process of Sichuan traditional pickles and industrial pickles[D]. Chengdu: Xihua University, 2013.
- [11] 刘洪. 自然发酵与人工接种泡菜发酵过程中品质变化规律的动态研究[D]. 成都: 西华大学, 2012.
- LIU H. Dynamic study of quality variation rule between the natural fermentation and artificial inoculation process of Kimchi[D]. Chengdu: Xihua University, 2012.
- [12] 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 D P, ZHENG Y, ZHOU Y, 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.
- [13] 丛敏, 李欣蔚, 武俊瑞, 等. PCR-DGGE 分析东北传统发酵酸菜中乳酸菌多样性[J]. 食品科学, 2016, 37(7): 78-82.
- CONG M, LI X W, WU J R, et al. PCR-DGGE analysis of lactic acid bacteria diversity of Chinese traditional Sauerkraut Northeast China[J]. Food Science, 2016, 37(7): 78-82.
- [14] 王文建, 闵锡祥, 李兰英, 等. 川式泡菜、韩式泡菜发酵过程中理化特性及微生物变化比较[J]. 食品科技, 2020, 45(6): 6-10.
- WANG W J, MIN X X, LI L Y, et al. Comparison of physicochemical and microbiological characteristics of Sichuan pickle and Korean Kimchi during fermentation[J]. Food Science and Technology, 2020, 45(6): 6-10.
- [15] JUNG J Y, LEE S H, JEON C O. Kimchi microflora: History, current status, and perspectives for industrial kimchi production[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, 98(6): 2385-2393.
- [16] 窦芳娇, 苏昊卫, 邓冬莲, 等. 低温长杆白菜泡菜中乳酸菌的分离鉴定与应用[J]. 食品工业科技, 2021, 42(5): 113-118.
- DOU F J, SU H W, DENG D L, et al. Isolation, identification and application of lactic acid bacteria in low temperature long-stemmed cabbage pickle[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(5): 113-118.
- [17] 张其圣, 陈功, 申文熹, 等. 低盐泡菜乳酸菌群落演变及其优势菌群的探讨[J]. 中国食品学报, 2018, 18(9): 109-119.
- ZHANG Q S, CHEN G, SHEN W X, et al. Evolution of lactic acid bacteria communities from low salt Paocai and discussion of the dominant communities[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(9): 109-119.
- [18] CHO J, LEE D, YANG C, et al. Microbial population dynamics of kimchi, a fermented cabbage product[J]. FEMS Microbiol Lett, 2006, 257(2): 262-267.
- [19] KIM M, CHUN J. Bacterial community structure in kimchi, a Korean fermented vegetable food, as revealed by 16S rRNA gene analysis[J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 103(1): 91-96.
- [20] XIONG T, GUAN Q, SONG S, et al. Dynamic changes of lactic acid bacteria flora during Chinese sauerkraut fermentation[J]. Food Control, 2012, 26(1): 178-181.
- [21] 夏姣, 蒲彪, 敖晓玲, 等. 传统四川泡菜发酵过程中明串珠菌的分离鉴定[J]. 食品工业科技, 2014, 35(4): 153-160.
- XIA J, PU B, AO X L, et al. Separation and identification of *Leuconostoc* during the fermentation of Sichuan pickles[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(4): 153-160.
- [22] 任丽, 刘国荣, 王成涛, 等. 产细菌素弯曲乳杆菌的分离鉴定及细菌素特性初步研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(6): 218-222.
- REN L, LIU G R, WANG C T, et al. Separation and identification of bacteriocin-producing *Lactobacillus curvatus* and characterization of its bacteriocin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(6): 218-222.
- [23] KUMAR S, TAMURA K, NEI M. MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers[J]. Computer Applications in Biosciences, 1994, 10(2): 189-191.
- [24] FELSENSTEIN J. Phylogenies and the comparative method[J]. The American Naturalist, 1985, 125(1): 1-15.
- [25] KUMAR S, STECHER G, LI M, et al. MEGA X:

- Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1547–1549.
- [26] 安飞宇, 姜静, 武俊瑞, 等. 自然发酵豆酱的滋味特性与微生物多样性分析[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(7): 207–215.
- AN F Y, JIANG J, WU J R. et al. Analysis of taste characteristics and microbial diversity of naturally fermented soybean paste[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(7): 207–215.
- [27] 郁杰, 谢晶. 高通量测序结合传统方法分析 4 °C 下鲜切菠菜的菌群变化[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(9): 183–189.
- YU J, XIE J. Analysis of microflora in freshcut spinach at 4 °C by high throughput sequencing combined with traditional methods[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(9): 183–189.
- [28] 保安安. 青藏高原不同地区垂穗披碱草青贮饲料中乳酸菌多样性及优势菌种的发酵特性研究[D]. 甘肃: 兰州大学, 2016.
- BAO A A. Study on biodiversity and fermentation characteristics of lactic acid bacteria in elymus nutans silage ensiled at different areas of the Qinghai-Tibetan Plateau[D]. Gansu: University of Lanzhou, 2016.
- [29] 佟婷婷, 田丰伟, 王刚, 等. 基于宏基因组分析四川泡菜母水作引子的泡菜发酵过程中细菌多样性变化[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(21): 173–177.
- TONG T T, TIAN F W, WANG G. Metagenomic analysis of bacterial diversity changes during vegeta-
- bles fermentation using Sichuan pickle water as starter[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2015, 36(21): 173–177.
- [30] 刘佳琪, 张和平. 融合魏斯氏菌的基因组学及其安全性研究进展[J]. *科学通报*, 2021, 66(23): 2920–2929.
- LIU J Q, ZHANG H P. Advances in genomics and safety studies of *Weissella confusa*[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2021, 66(23): 2920–2929.
- [31] ZHANG Q S, CHEN G, SHEN W, et al. Microbial safety and sensory quality of instant low-salt Chinese paocai[J]. *Food Control*, 2016, 59(1): 575–580.
- [32] 甘奕, 李洪军, 付杨, 等. 韩国泡菜品质特性[J]. *食品科学*, 2014, 35(19): 125–127.
- GAN Y, LI H J, FU Y, et al. Physico-chemical and microbiological characteristics of kimchi[J]. *Food Science*, 2014, 35(19): 125–127.
- [33] 朴泓洁, 黄存辉, 金清. 肠膜明串珠菌发酵对四川泡菜品质的影响[J]. *食品科技*, 2018, 43(8): 31–35.
- PIAO H J, HUANG C H, JIN Q. Effects of *Leuconostoc mesenteroides* fermentation on quality of Sichuan pickle[J]. *Food Science and Technology*, 2018, 43(8): 31–35.
- [34] 于文平, 张亚豪, 吴正云, 等. 青菜微生物群落结构变化分析[J]. *中国调味品*, 2019, 44(6): 30–35.
- YU W P, ZHANG Y H, WU Z Y, et al. Analysis of the change of microbial community structure in the process of industrial fermentation of pickled vegetable[J]. *China Condiment*, 2019, 44(6): 30–35.

Studies on the Dominant Lactic Acid Bacteria and Microbial Community Succession Law in Pickled Cabbage

Zhang Yikui, Cao Mengxi, Li Junli, Wang Mengyang, Zhao Huizhu, Liu Bianfang*
(College of Food Science and Engineering, Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi)

Abstract Taking Chinese cabbage as raw material, pickled cabbage was produced by natural fermentation at 22 °C with 2.5% salt. Collected the brine at different time during the fermentation process to measure the pH value, detect the number of lactic acid bacteria and total bacteria, isolate and identify the dominant lactic acid bacteria strain, analyze the microbial diversity and the succession of bacterial community during pickled cabbage. The results showed that during the natural fermentation of kimchi, the pH value of kimchi decreased from 6.0 to 4.15, the total number of lactic acid bacteria increased from 4.65 lg (CFU/mL) to 7.86 lg (CFU/mL), and the total number of bacteria decreased from 9.11 lg (CFU/mL) to 8.65 lg (CFU/mL). A total of 27 strains of lactic acid bacteria were isolated from different stages, in-

cluding 10 strains of *Leuconostoc*, 7 strains of *Weissella*, 4 strains of *Lactococcus lactis*, 4 strains of *Lactobacillus Campylobacter* and 2 strains of *Lactococcus pentosus*. During the 7-days fermentation of kimchi, the dominant species of lactic acid bacteria gradually changed from *Weissella* to *Lactococcus lactis*, and finally the mesenteric candida successively became the dominant lactic acid bacteria. The heteromorphic lactic acid fermentation bacteria occupied the dominant position in the whole kimchi fermentation stage, and the homologous lactic acid fermentation bacteria participated in the kimchi fermentation in the middle and later stage of fermentation.

Keywords pickled cabbage; naturally fermented; isolation and identification of LAB; succession law; microbial diversity