

四川泡菜母水的微生物群落与理化特性分析

胡此海^{1,2}, 杨 絮², 郭全友^{2*}, 郑 尧², 李保国^{1*}, 范逸文^{1,2}

(¹上海理工大学健康科学与工程学院 上海 200093

²中国水产科学研究院东海水产研究所 上海 200090)

摘要 为明确泡菜母水中的优势微生物与理化特性的相关性,采用高通量测序技术分析母水中的微生物群落结构,并进行相关性分析。结果表明:泡菜母水的总酸含量为 3.00~18.90 g/kg,pH 值为 3.27~4.71,盐含量为 11.00~15.50 g/100 g,检出草酸、苹果酸、琥珀酸和乳酸等 7 种有机酸。微生物主要群落包括厚壁菌门和子囊菌门 2 个门,占比均超过 99.00%。优势细菌是乳杆菌属、片球菌属,优势真菌是毕赤酵母属、哈克斯坦酵母属、德巴利酵母属。相关性分析表明,乳酸杆菌属与乳酸呈显著正相关关系($P<0.05$),与乙酸呈极显著正相关关系($P<0.01$)。片球菌属与苹果酸呈极显著正相关关系($P<0.01$)。结论:乳酸杆菌和片球菌是泡菜母水的优势微生物,研究结果为泡菜母水高效发酵菌株的选育和泡菜工业化生产提供试验参考。

关键词 泡菜母水;高通量测序;微生物多样性;理化特性;相关性

文章编号 1009-7848(2024)02-0281-11 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.02.027

泡菜是以新鲜蔬菜等为主要原料,添加或不添加辅料,经食用盐或食盐水泡渍发酵等工艺加工而成的蔬菜制品。蔬菜在高渗透压的食盐溶液中,利用乳酸菌产酸,共同抑制其它有害微生物的生长^[1]。四川泡菜是我国最著名的发酵蔬菜之一,有“川菜之骨”的美称^[2],其加工工艺简单,原料成本低廉,成品鲜香味独特,具有开胃理气,降低胆固醇和促进肠道内菌群生态平衡等功效^[3-4]。常见的泡菜发酵方式包括自然发酵、接种发酵和母水发酵。自然发酵存在周期较长和产品质量难以标准化等问题,而接种发酵的泡菜风味欠佳。母水是泡菜发酵成熟后取出泡菜剩下的液体,以母水作为发酵剂循环使用的方式称为母水发酵。母水发酵泡菜中丙二醇、甘油、甘露醇、乳酸和草酸等含量较高,且氨基酸种类更丰富,比自然发酵和接种发酵具有更好的风味和口感^[5]。然而,不同来源的泡菜母水微生物群落结构和理化特性均不同,目

前主要用于小作坊式自制泡菜,尚未大规模工业化标准化生产。

泡菜发酵过程中的微生物群落影响成品的理化特性,并最终影响泡菜品质。目前,高通量测序技术为解析微生物群落提供一种高效、便捷的方法,其具有测序快捷、基因信息量大以及微生物分析全面等特点,已应用在白酒^[6]、醋^[7]和发酵鱼^[8]等食品中的微生物分析。研究发现乳酸菌(LAB)如明串珠菌、乳杆菌和魏斯氏菌被确定为泡菜发酵过程中微生物群落的主要微生物^[9]。Rao 等^[10]采用高通量测序揭示了不同发酵阶段萝卜泡菜的微生物群落,结果表明泡菜发酵成熟后期的微生物群落属水平主要是乳酸杆菌属和毕赤酵母属。Yang 等^[11]对泡菜微生物与理化特性相关性进行研究,发现植物乳杆菌、醋酸乳杆菌、魏氏乳杆菌和假肠系膜明串珠菌与理化特性(pH 值、总酸、质构、有机酸和游离氨基酸)具有显著相关性。An 等^[12]发现发酵蔬菜中醋杆菌和葡糖杆菌与总酸呈显著正相关关系,与盐浓度呈显著负相关关系($P<0.05$)。

目前对母水发酵泡菜方式的研究大多针对泡菜成品,对泡菜母水研究较少,且集中于发酵过程中微生物和风味物质的变化,忽视了不同来源泡菜母水中微生物群落的共有微生物,以及微生物群落与其理化特性间的关系。泡菜母水是发酵后期的产物,微生物群落较为稳定,是筛选母水发

收稿日期: 2023-02-07

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31871872);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2021M01);中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助项目(2023TD73)

第一作者: 胡此海,男,硕士生

通信作者: 郭全友 E-mail: dhsguoqy@163.com

李保国 E-mail: lbaoguo@126.com

酵泡菜菌株的优良来源。本研究以优选传统发酵泡菜母水为对象,分析其理化特性,采用高通量测序技术解析微生物的群落结构,并用相关性分析法探究传统四川泡菜母水中微生物群落与理化特性的关系,为高效发酵菌株的选育和工业化生产提供参考。

1 材料与amp;方法

表 1 泡菜感官评分标准

Table 1 Pickles sensory scoring criteria

项目	好	较好	一般	差
色泽 (30分)	红色均匀,颜色诱人 (30~26分)	呈暗红色或者浅红色 (25~21分)	红色不明显,或者较清澈 (20~15分)	颜色较浑浊 (15分以下)
香气 (30分)	发酵香气浓厚 (30~26分)	发酵香气较好 (25~21分)	发酵香气一般,无异味 (20~15分)	有异味或发馊 (15分以下)
滋味 (40分)	酸味较为鲜美,咸度适中 (40~31分)	较鲜美,没有蔬菜味, 咸度可接受 (30~21分)	较酸或酸味较淡, 咸度不适 (20~10分)	过酸过咸或生蔬菜味 明显 (10分以下)

表 2 样品信息

Table 2 Sample information

采样地点	样品编号	发酵时间/年	原料品种
四川成都蒲江县	A	1	心里美萝卜
四川成都大邑县	B	2	心里美萝卜
四川成都大邑县	C	4	心里美萝卜
四川成都郫都区	D	2	樱桃萝卜
四川成都金堂县	E	3	心里美萝卜

氢氧化钠、酚酞、铬酸钾、硝酸银标准滴定溶液等化学试剂(均为分析纯级),国药集团化学试剂有限公司;乳酸、草酸、乙酸、柠檬酸、酒石酸、琥珀酸、苹果酸,德国 LGC 公司;OMEGA 土壤 DNA 试剂盒,美国 OMEGA 公司;MiSeq Reagent Kit v3 测序试剂盒,美国 Illumina 公司。

1.2 仪器与设备

1260 型高效液相色谱仪,美国 Agilent 公司;pHS-3C 型 pH 计,上海雷磁仪器厂;ABI-2720 型聚合酶链式反应仪,美国 ABI 公司;Bio-Red 电泳仪,美国 Bio-Rad 公司;Illumina Miseq 测序仪,美国 Illumina 公司。

1.1 材料与试剂

泡菜母水:2021 年 5 月从四川成都等地不同工厂采集 1 年以上泡菜母水 30 份,并通过感官评价泡菜。总分 100 分,色泽和香气各占 30 分,滋味占 40 分,选择 10 位专业人员进行评定,通过盲评分,对泡菜色泽、香气、滋味进行打分,具体评分标准见表 1。筛选得分超过 90 分的泡菜,取其液体分别编号为 A、B、C、D、E,样品信息见表 2。无菌取样,贮存于无菌三角瓶中,低温运至实验室。

1.3 方法

1.3.1 理化指标测定 取 25 mL 样品混匀,用 pH 计测定样品 pH 值^[13]。参照 GB/T 12456-2008《食品中总酸的测定》,采用酸碱滴定法测定样品总酸^[14]。盐含量的测定参照 GB 5009.44-2016《食品安全国家标准 食品中氯化物的测定》中的银量法测定^[15]。

1.3.2 有机酸检测 参照 Liu 等^[16]的方法稍作修改,吸取 5 mL 泡菜母水于离心管中,于 75 °C 超声处理,在 12 000 r/min 离心 15 min,取 1.5 mL 上清液用 0.22 μm 滤膜过滤至进样瓶中待测。

色谱条件:C18 色谱柱 (Zorbax SB-AQ, 250 mm×4.6 mm, 5 μm), 紫外检测器波长为 210 nm, 流动相为 0.02 mol/L 磷酸二氢钠-乙腈(99:1, 体积比, pH 2), 流速 0.8 mL/min, 柱温 25 °C, 进样量为 10 μL。

1.3.3 DNA 提取和聚合酶链式反应(PCR)扩增 吸取 20 mL 泡菜水,于 400 r/min 离心 10 min,取上清液,于 8 000 r/min 离心 10 min 取菌泥,使用 OMEGA 土壤 DNA 试剂盒(D5625-01)按照说明书提取总基因组 DNA 样品,储存在-20 °C。采用正向引物 338F (ACTCCTACGGGAGGCAGCA) 和反

向引物 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT), 对细菌 16S-rRNA 的 V3-V4 区域进行 PCR 扩增。将 PCR 反应所需的成分配置完后, 在 PCR 仪上于 98 °C 预变性 5 min, 使模板 DNA 充分变性, 然后进入扩增循环。在每一个循环中, 先于 98 °C 保持 30 s 使模板变性, 然后将温度降到 53 °C, 保持 30 s, 使引物与模板充分退火; 在 72 °C 保持 45 s, 使引物在模板上延伸, 合成 DNA, 完成一个循环。重复循环 25 次, 使扩增的 DNA 片段大量累积。最后, 在 72 °C 保持 5 min, 使产物延伸完整, 4 °C 保存。同样, 使用正向引物 ITS5F (GGAAGTAAAAGTCG-TAACAAGG) 和反向引物 ITS2R (GCT-GCGTTCCTTCATCGATGC), 对真菌 ITS-V1 区域进行 PCR 扩增。

1.3.4 基因测序 扩增结果进行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 切取目的片段然后用 Axygen 凝胶回收试剂盒回收目的片段。采用 Illumina MiSeq 平台和 MiSeq Reagent Kit v3 进行双端 2×250 bp 测序, 测序由上海派森诺生物科技有限公司完成。

1.3.5 生物信息学分析 细菌 16S rDNA 基因序列基于 Silva 数据库^[17], 真菌 ITS 基因序列基于 U nite 数据库^[18]。使用 QIIME2 2019.4 进行, 使用 DADA2 插件对序列进行质量过滤、去噪、合并和去除嵌合体。进行扩增子序列变异体 (Amplicon sequence variants, ASV) 与 mafft 对比, 并用于构建具有 fasttree2 的系统发育。采用 RDP Classifier 贝叶斯算法对 100% 相似水平的 ASV 代表序列进行分类学分析、 α 多样性和分类学地位注释。

1.4 统计分析

试验重复测定 3 次, 结果以平均值±标准差表示。通过统计软件 SPSS 26 中进行方差分析及显著性分析 (置信区间为 95%), 利用 Origin 2021 b 软件和派森诺基因云平台绘图。微生物群落与理化特性采用采用斯皮尔曼相关分析方法, 利用 R 语言绘图 (置信区间为 99% 和 95%)。

2 结果与分析

2.1 泡菜母水理化特性

2.1.1 pH 值、总酸含量和盐含量的测定 总酸 (Total acid, TTA) 和 pH 值影响泡菜发酵过程中微生物生长和代谢产物, 是泡菜成熟度的评判指

标^[19-20]。由表 3 可知, 泡菜母水 pH 值在 3.27~4.71 之间, B 样品 pH 值 (4.71±0.01) 显著 ($P<0.05$) 高于其余 4 份样品 pH 值 (3.27~3.65)。云琳等^[21]研究发现卤水泡菜的 pH 值稳定在 3.7 左右, 与本试验研究一致。5 份样品总酸含量在 3.00~18.90 g/kg 均具有显著性差异 ($P<0.05$)。传统发酵泡菜母水的 pH 值和总酸含量存在差异性, 可能与微生物群落、发酵工艺、发酵时间有关。

盐含量使泡菜母水具有较高的渗透压, 高渗透压会抑制腐败菌的生长, 有利于泡菜的保存, 因此泡菜母水发酵的泡菜具有较长的货架期。表 3 可见, 5 份样品盐含量为 11.00~15.50 g/100 g, 其中 A 样品的盐含量 (15.50±0.71 g/100 g) 显著高于其余样品 ($P<0.05$), 而 B、C、D 和 E 样品的盐含量无显著差异 ($P>0.05$), 总体显示泡菜母水的盐含量较为一致。邓维琴等^[22]发现所有代数泡菜母水中盐度无显著性差异 ($P>0.05$), 说明泡菜母水中盐度是稳定的, 与本试验研究较为一致。

表 3 泡菜母水的理化指标

Table 3 Physicochemical index of pickle brine

样品	pH 值	总酸/g·kg ⁻¹	盐含量/ g·(100 g) ⁻¹
A	3.63 ± 0.01 ^c	8.73 ± 0.89 ^d	15.50 ± 0.71 ^a
B	4.71 ± 0.01 ^a	3.00 ± 0.05 ^e	13.00 ± 1.41 ^b
C	3.65 ± 0.01 ^b	16.35 ± 1.92 ^b	12.00 ± 0.02 ^b
D	3.27 ± 0.01 ^c	13.92 ± 1.22 ^c	12.50 ± 0.71 ^b
E	3.37 ± 0.01 ^d	18.90 ± 0.63 ^a	11.00 ± 0.01 ^b

注: 同一指标同列肩标小写字母不同表示差异显著 ($P<0.05$)。

2.1.2 有机酸含量测定 由表 4 可见, 样品中检测出草酸 (Oxalic acid)、酒石酸 (Tartaric acid)、苹果酸 (Malic acid)、乙酸 (Acetic acid)、柠檬酸 (Citric acid)、琥珀酸 (Succinic acid) 和乳酸 (Lactic acid) 7 种有机酸。乳酸在不同泡菜母水中的含量差异较大, 其中 A 样品含量最低为 (0.30±0.01) mg/mL, C 样品含量最高为 (3.10±0.43) mg/mL, 其它样品的含量在 1.02~1.76 mg/mL 之间。乳酸主要是乳酸菌通过糖类物质代谢产生, 主要有同型发酵和异型发酵, 其酸味柔和爽口, 赋予泡菜独特的风味。草酸含量为 2.62~5.37 mg/mL, 其中 D 和 E 样品草酸含量显著高于其它样品 ($P<0.05$)。琥珀酸含量为 5.35~7.42 mg/mL, 其中 E 样品琥珀酸含

量【(7.42±0.18)mg/mL】显著高于其它样品 ($P<0.05$)。草酸和琥珀酸也是泡菜中重要的风味物质,主要来源是泡菜原料,因此泡菜母水中的含量普遍较高。邓维琴等^[22]发现琥珀酸含量在泡菜母水中逐渐上升,后期泡菜母水含量差异较小,与本试验研究一致。酒石酸含量为 0.09~1.35 mg/mL,其中 C 样品中含量显著高于其余样品 ($P<0.05$),A 样品中未检出。C 样品乙酸含量【(2.89±0.04)mg/mL】和 B 样品中乙酸含量【(2.50±0.05)mg/mL】显著高于其余样品 ($P<0.05$)。柠檬酸含量为 0.59~2.

14 mg/mL,样品之间存在显著差异 ($P<0.05$)。酒石酸、乙酸和柠檬酸的产生和积累主要取决于糖类物质的代谢和原料提供的底物,对泡菜独特的风味形成具有重要作用。黄岩等^[23]研究表明酒石酸、苹果酸、柠檬酸和琥珀酸等味道柔和、刺激性小,可显著改善泡菜风味,比例协调、多种有机酸共同作用可使泡菜风味更加醇和与丰富。研究发现样品中草酸随着发酵时间的增长而减少,而乳酸含量与发酵时间成正比。样品中有机酸含量不相同的原因,可能是原料不同和微生物组成差异导致^[11,24]。

表 4 泡菜母水有机酸含量
Table 4 Organic acid content of pickle brine

有机酸	呈味特征	有机酸含量/mg·mL ⁻¹				
		A	B	C	D	E
草酸	略有涩感,酸味强烈	3.31 ± 0.06 ^b	3.29 ± 0.09 ^b	2.62 ± 0.06 ^c	5.35 ± 0.08 ^a	5.37 ± 0.15 ^a
酒石酸	略有涩感,酸味强烈	-	0.09 ± 0.01 ^c	1.35 ± 0.03 ^a	0.88 ± 0.10 ^b	0.12 ± 0.00 ^c
苹果酸	爽快、微苦	0.67 ± 0.02 ^{ab}	0.08 ± 0.01 ^c	0.22 ± 0.00 ^c	0.52 ± 0.18 ^a	0.77 ± 0.08 ^a
乙酸	刺激性强	0.38 ± 0.00 ^d	2.50 ± 0.05 ^b	2.89 ± 0.04 ^a	0.36 ± 0.00 ^d	0.96 ± 0.03 ^c
柠檬酸	温和爽快,有新鲜感	1.67 ± 0.01 ^b	0.97 ± 0.02 ^d	0.59 ± 0.02 ^c	2.14 ± 0.05 ^a	1.21 ± 0.04 ^c
琥珀酸	酸、鲜	5.35 ± 0.09 ^c	6.18 ± 0.24 ^b	5.49 ± 0.11 ^c	5.92 ± 0.05 ^b	7.42 ± 0.18 ^a
乳酸	酸味柔和	0.30 ± 0.01 ^c	1.76 ± 1.24 ^b	3.10 ± 0.43 ^a	1.02 ± 0.34 ^{bc}	1.47 ± 0.12 ^b

注:-. 未检出;同一指标,同行肩标小写字母不同表示差异显著 ($P<0.05$)。

2.2 泡菜母水微生物群落

2.2.1 Alpha 多样性分析 利用 MiSeq 测序方法对 5 种来源泡菜母水样品进行分析,根据样品的扩增子序列变体 (Amplicon sequence variants, ASV) 数据结果作图。如图 1 所示。随着样品的测序深度增加,香农指数 (Shannon) 逐渐增加,曲线逐渐从上升趋于平坦,提示所测序的深度可以囊括泡菜母水样品中大多数的菌落,并且能够较完整地反映样品微生物群落多样性^[25]。

Alpha 多样性是指局部均匀生境下的物种在丰富度 (Richness)、多样性 (Diversity) 和均匀度 (Evenness) 等方面的指标。为能较全面评估微生物群落的 alpha 多样性,以 Chao 1 和可观察物种指数表征丰富度,以香农指数和辛普森指数表征多样性。表 5 可知,A 的细菌 Chao 1 指数 (3 445.56±104.77) 和可观察物种指数 (3 199.30±194.40) 显著高于其它样品 ($P<0.05$);A 的细菌香农指数 (7.90±0.24) 和辛普森指数 (0.97±0.00) 显著高于其它样品 ($P<0.05$)。A 的细菌多样性最高,B 和 D 的真菌

Chao 1 指数和可观察物种指数显著高于其它样品 ($P<0.05$);E 的真菌香农指数 (1.51±0.08) 和辛普森指数 (0.50±0.02) 显著高于其它样品 ($P<0.05$)。在真菌方面,B 和 D 具有较高的丰富度,而 E 的真菌多样性高于其余样品。综合考虑丰富度和多样性的指标,A 样品泡菜母水中的细菌微生物丰度和 Alpha 多样性较为突出,而 D 样品的真菌丰度和 Alpha 多样性较为突出。可能是原料和发酵工艺不同导致不同泡菜母水具有不同的丰富度和多样性。

为研究不同样本间共有物种,根据各处理组在 100% 序列相似水平下的 ASV 生物信息统计,绘制泡菜母水样品的韦恩图^[26]。图 2a 为不同样品的细菌群落韦恩图,A 样品含有细菌 ASV 7 513 个,B 样品含有细菌 ASV 217 个,C 样品含有细菌 ASV 150 个,D 样品含有细菌 ASV 150 个,E 样品 214 个,其中 5 种样品共有细菌 ASV 4 个。A 样品含有的细菌 ASV 数目最多,远大于其它组样品,与 Alpha 多样性结果一致。图 2b 为不同样品得真

菌群落韦恩图,A 样品含有真菌 ASV 9 个,B 样品含有真菌 ASV 37 个,C 样品含有真菌 ASV 12 个,D 样品含有真菌 ASV 53 个,E 样品含有真菌

ASV 21 个,其中 5 种样品共有真菌 ASV 2 个。D 样品的真菌 ASV 数目最多,与 Alpha 多样性结果一致。

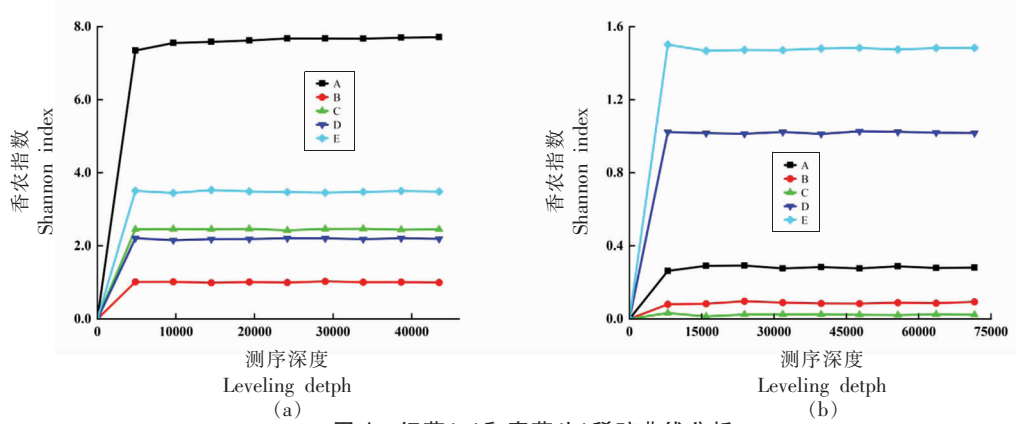


图 1 细菌(a)和真菌(b)稀疏曲线分析

Fig.1 Rarefaction curve analysis of bacteria (a) and fungi (b)

表 5 泡菜母水中微生物 Alpha 丰富度指数和多样性指数

Table 5 Microbial Alpha richness index and diversity index in pickle brine

项目		A	B	C	D	E
Chao1	细菌	3 445.56 ± 104.77 ^a	171.34 ± 33.38 ^b	161.89 ± 8.15 ^b	190.52 ± 6.04 ^b	240.88 ± 23.89 ^b
	真菌	8.34 ± 2.24 ^c	26.03 ± 6.48 ^{ab}	10.35 ± 4.34 ^c	30.67 ± 10.05 ^s	18.81 ± 3.60 ^{bc}
可观察物种指数	细菌	3 199.30 ± 194.40 ^a	155.07 ± 27.17 ^b	156.20 ± 6.39 ^b	80.93 ± 6.43 ^b	228.63 ± 19.26 ^b
	真菌	8.23 ± 2.22 ^b	25.10 ± 6.52 ^a	10.07 ± 3.94 ^b	29.60 ± 10.02 ^a	18.57 ± 3.46 ^{ab}
香农指数	细菌	7.90 ± 0.24 ^a	1.01 ± 0.07 ^d	2.34 ± 0.11 ^c	2.21 ± 0.04 ^c	3.45 ± 0.12 ^b
	真菌	0.19 ± 0.08 ^c	0.06 ± 0.03 ^c	0.03 ± 0.01 ^c	0.76 ± 0.26 ^b	1.51 ± 0.08 ^a
辛普森指数	细菌	0.97 ± 0.00 ^a	0.21 ± 0.01 ^e	0.49 ± 0.02 ^d	0.57 ± 0.00 ^c	0.69 ± 0.01 ^b
	真菌	0.05 ± 0.02 ^c	0.01 ± 0.01 ^c	0.00 ± 0.01 ^c	0.30 ± 0.15 ^b	0.50 ± 0.02 ^a

注:同一指标,同行肩标小写字母不同表示差异显著(P<0.05)。

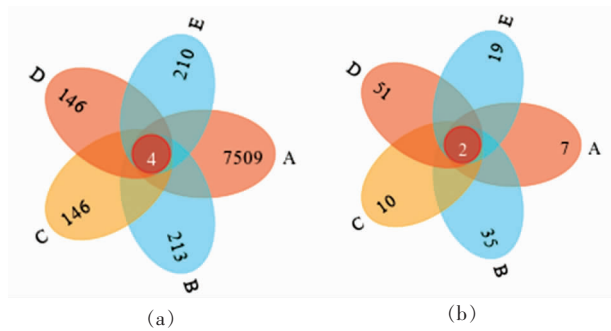


图 2 泡菜母水样品细菌群落(a)和真菌群落(b)韦恩图

Fig.2 Venn diagram of bacterial community (a) and fungal community (b) of pickle brine

2.2.2 细菌群落结构分析 5 种泡菜母水样品序列通过 RDP Classifier 贝叶斯算法对 100%相似水平的 ASV 代表序列进行分类,并对样本中的相对丰度前 10 进行分类学分析。在群落组成分析中,将相对丰度大于 1%的物种归为优势菌。在门水平上,其样品群落组成如表 6 所示,发现样品 B、C、D、E 中主要由厚壁菌门(Firmicutes)组成,均超过 99%,而 A 样品与其它 4 种差异较大,厚壁菌门相对丰度为 22.64%,优势门还有拟杆菌门、变形菌门、放线菌门,分别占比为 71.27%,2.08%和 2.17%。郭壮等^[27]利用高通量技术对泡菜水进行研究,发现厚壁菌门是泡菜水的

优势门,与本文研究结果相同。

在属分类水平上,样品群落组成如表6所示,泡菜母水中的细菌菌属主要是乳杆菌属(*Lactobacillus*)和片球菌属(*Pediococcus*)。B和C样品的细菌菌属组成较相似,其乳杆菌属的占比分别是99.17%和99.95%;D和E样品较相似,其中D样品中片球菌属的占比为97.09%,乳杆菌属的占比为2.27%,E样品中的片球菌属的占比为78.29%,乳杆菌属的占比为18.93%。A样品的细菌群落较为丰富,普氏菌属(*Prevotella_9*)41.33%、拟杆菌属(*Bacteroides*)15.98%、鼠杆菌属(*Muribaculaceae*)9.94%、粪杆菌属(*Faecalibacterium*)5.94%、考拉杆菌属(*Phascolarctobacterium*)3.67%、乳杆菌属(*Lactobacillus*)2.81%、无杆菌属(*Agathobacter*)

1.70%、另枝菌属(*Alistipes*)1.42%,这可能是其泡菜的原料和理化特性不同导致微生物群落不同。曹佳璐^[28]对126种老盐水进行研究,发现乳杆菌属是绝对优势菌属,耐酸乳杆菌、布氏乳杆菌、短乳杆菌和耐乙醇片球菌4种乳酸菌在所有样品中的检出率大于90%,是泡菜盐水样品的核心菌种。张安等^[29]在解析四川泡菜发酵过程中的细菌多样性发现乳杆菌属在发酵的中期和后期都是绝对优势菌。乳杆菌属和片球菌属也常见于各种发酵乳制品传统发酵食品,在发酵过程中代谢产生大量乳酸、降低pH值,抑制有害菌,并产生各种风味物质,最终使传统发酵食品具有其特征风味^[30-31]。

表6 不同样品中细菌在门水平和属水平的种类构成

Table 6 The composition of bacteria at the level of phylum and genus in different samples

分类水平	种属名称	物种的相对丰度/%				
		A	B	C	D	E
门水平	后壁菌门	22.64	99.36	99.98	99.96	99.69
	拟杆菌门	71.27	0.07	0.00	0.00	0.02
	变形菌门	2.08	0.45	0.01	0.03	0.26
	放线菌门	2.17	0.02	0.00	0.00	0.00
	疣微菌门	0.71	0.00	0.00	0.00	0.00
	蓝菌门	0.24	0.07	0.00	0.00	0.02
	绿弯菌门	0.29	0.00	0.00	0.00	0.00
	芽单胞菌门	0.09	0.00	0.00	0.00	0.00
	酸杆菌门	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00
	异常球菌-栖热菌门	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00
	* 其它	0.34	0.03	0.00	0.00	0.01
	属水平	乳杆菌属	2.81	99.17	99.95	2.27
片球菌属		0.01	0.09	0.03	97.09	78.29
普氏菌属		41.33	0.00	0.00	0.00	0.00
拟杆菌属		15.98	0.00	0.00	0.00	0.00
鼠杆菌属		9.94	0.05	0.00	0.00	0.00
粪杆菌属		5.94	0.00	0.00	0.00	0.00
考拉杆菌属		3.67	0.00	0.00	0.00	0.00
无杆菌属		1.70	0.00	0.00	0.00	0.00
另枝菌属		1.42	0.00	0.00	0.00	0.00
经黏液真杆菌属		0.80	0.00	0.00	0.00	0.00
* 其它		16.41	0.69	0.02	0.64	2.78

注:*. 相对丰度小于1%的丰度总计。

2.2.3 真菌群落结构分析 5种来源泡菜母水样品序列通过RDP Classifier贝叶斯算法对100%相似水平的ASV代表序列进行分类,并对样本中的

相对丰度前10进行分类学分析。在门水平上,其样品群落组成如表7所示。发现5种泡菜母水中的绝对优势菌群为子囊菌门(Ascomycota),相对

丰度分别为 99.99% ,99.91% ,99.99% ,99.92% 及 99.99% , 还有极少量的担子菌门(Basidiomycota)及其它的门类,而且菌群种类差别不大,表明在门水平上 5 种泡菜母水样品的真菌菌群丰富度差别不显著。李恒等^[32]四川地区泡菜研究结果表明,在泡菜发酵结束后真菌群落在子囊菌门占绝对优势,所占比例达到 99%以上,与本文的研究结果相同;吕嘉桡等^[33]传统自然发酵老坛泡菜研究结果表明子囊菌门是优势菌落,而其绝对优势菌落占比达到 77%以上,与本研究结果有一定差异,可能是发酵工艺、原辅料等不同所致。

在属分类水平上,其真菌群落组成如表 7 所

示,毕赤酵母属(*Pichia*)在 A、B、C 和 E 样品中相对丰度的占比均超过 99%;而 D 样品与其余 4 种差别极大,毕赤酵母属的占比只有 0.76%,远低于其它样品,优势真菌属为哈克斯坦酵母属(*Kazachstania*)和德巴利酵母属(*Debaryomyces*),占比为 80.28%和 18.44%,原因可能是原料的不同。唐丽等^[34]在不同发酵时间工业萝卜泡菜中发现毕赤酵母属是其中的优势真菌属;Rao 等^[10]在传统发酵萝卜泡菜中发现已鉴定的属中,毕赤酵母属表现出最高的优势,丰度为 96.23%,与本文结果相似。

表 7 不同样品中真菌在门水平和属水平的种类构成

Table 7 The composition of fungi at the level of phylum and genus in different samples

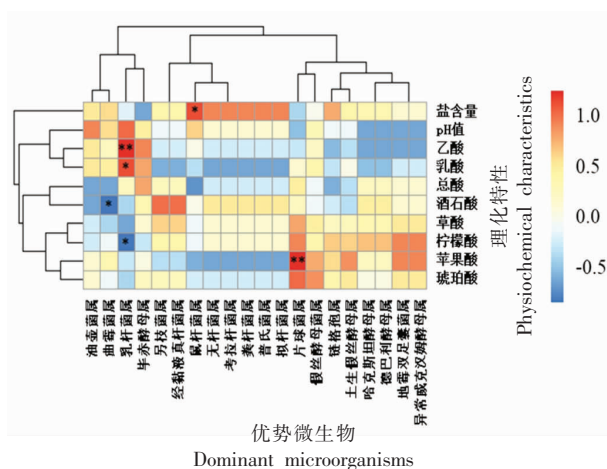
分类水平	种属名称	物种的相对丰度/%				
		A	B	C	D	E
门水平	子囊菌门	99.99	99.91	99.99	99.92	99.99
	担子菌门	0.00	0.03	0.01	0.04	0.01
	油壶菌门	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00
	被孢霉门	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	毛霉菌门	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00
	壶菌门	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	罗兹菌门	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	* 其它	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00
属水平	毕赤酵母属	99.20	99.73	99.78	0.76	99.95
	哈克斯坦酵母属	0.65	0.00	0.00	80.28	0.01
	德巴利酵母属	0.12	0.00	0.01	18.44	0.00
	地霉双足囊菌属	0.00	0.00	0.00	0.29	0.00
	假丝酵母菌属	0.00	0.14	0.00	0.00	0.02
	异常威克汉姆酵母属	0.00	0.00	0.00	0.06	0.00
	链格孢属	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00
	油壶菌属	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00
	曲霉菌属	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00
	土生假丝酵母属	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00
	* 其它	0.02	0.08	0.19	0.13	0.02

注:*. 相对丰度小于 1%的丰度总计。

2.3 优势微生物和理化特性的相关性分析

泡菜母水的优势菌属与理化特性之间的相关性见图 3。乳杆菌与乳酸具有显著正相关关系($P < 0.05$),与乙酸具有极显著正相关关系($P < 0.01$),与柠檬酸呈现显著负相关关系($P < 0.05$)。乳酸菌能

将糖类代谢成风味物质,并且是乳酸产生的主要来源。Ye 等^[35]研究微生物与腌制辣椒风味特性的关系,发现乳酸杆菌与有机酸(乙酸、琥珀酸、抗坏血酸和苹果酸)具有高度相关性。鼠杆菌与盐含量具有显著正相关性($P < 0.05$),鼠杆菌是一种有益



注:红色表示正相关,颜色越深表示正相关越强,蓝色表示负相关,颜色越深表示负相关越强;*. $0.01 < P < 0.05$, **. $0.001 < P < 0.01$ 。

图3 优势微生物与理化特性的相关性热图分析

Fig.3 Spearman correlation heatmap between physicochemical characteristics and dominant microorganisms

肠道菌,在代谢过程中主要产生丙酸^[36]。片球菌属与苹果酸具有极显著正相关关系($P < 0.01$),且与草酸、柠檬酸和琥珀酸呈正相关关系。毕赤酵母作为大多数样品中的主要真菌属,可能样品毕赤酵母相对丰度差异性不显著,导致与理化特性的相关性难以体现。结果表明,乳酸杆菌和片球菌与有机酸含量的相关性较高。

3 结论

对不同来源的泡菜母水中微生物群落和理化特性的分析,发现不同样品中的微生物群落较为相似,而理化特性存在一定差异。选取的优良泡菜母水样品 pH 值和盐含量较为稳定,总酸和有机酸含量不同,可能是由原料和微生物组成的不同以及循环使用代数不同所致。泡菜母水中主要存在的微生物在门水平为厚壁菌门和子囊菌门,在属水平是乳杆菌属、片球菌和毕赤酵母。通过对优势微生物和理化特性进行相关性分析得出,乳酸杆菌与乳酸和乙酸具有显著正相关关系,片球菌与苹果酸具极显著正相关关系,因此可以认为乳酸杆菌和片球菌是与有机酸相关的主要优势菌株。本研究通过对不同来源的泡菜母水的研究,期望得到有利于泡菜产品的发酵菌株,为筛选优势发酵菌株提供参考。

参考文献

- [1] 中华人民共和国商务部. 泡菜: SB/T 10756-2012[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
Ministry of Commerce of the People's Republic of China. Paocai: SB/T 10756-2012[S]. Beijing: Standards Press of China, 2012.
- [2] 张林, 罗陶, 张华, 等. 四川泡菜分类归属及定义的分析与建议[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(5): 1250-1253.
ZHANG L, LUO T, ZHANG H, et al. Analysis and suggestion on category classification and definition of Sichuan Paocai[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 10(5): 1250-1253.
- [3] BEHERA S S, EL S A F, HAMMAMI R, et al. Traditionally fermented pickles: How the microbial diversity associated with their nutritional and health benefits?[J]. Journal of Functional Foods, 2020, 70: 103971.
- [4] 邹华军, 石磊, 张其圣, 等. 发酵泡菜对高脂血症大鼠的干预效果研究[J]. 现代预防医学, 2013, 40(23): 4309-4311.
ZOU H J, SHI L, ZHANG Q S, et al. Study on the intervention effect of fermented kimchi on hyperlipidemic rats [J]. Modern Preventive Medicine, 2013, 40(23): 4309-4311.
- [5] 鲜双, 姜林君, 李艳兰, 等. 不同方式发酵的哈密瓜幼果泡菜理化特性和氨基酸含量分析[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(5): 224-230.
XIAN S, JIANG L J, LI Y L, et al. Physicochemical properties and amino acid content of Hami melon fruitlet pickles fermented by different processes[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(5): 224-230.
- [6] TAN Y W, ZHONG H P, ZHAO D, et al. Succession rate of microbial community causes flavor difference in strong-aroma Baijiu making process[J]. International Journal of Food Microbiology, 2019, 311: 108350.
- [7] NIE Z Q, ZHENG Y, DU H F, et al. Dynamics and diversity of microbial community succession in traditional fermentation of Shanxi aged vinegar [J]. Food microbiology, 2015, 47: 62-68.
- [8] ZANG J H, XU Y S, XIA W S, et al. Dynamics and diversity of microbial community succession

- during fermentation of Suan yu, a Chinese traditional fermented fish, determined by high throughput sequencing[J]. *Food Research International*, 2018, 111: 565–573.
- [9] PARK S E, SEO S H, KIM E J, et al. Changes of microbial community and metabolite in kimchi inoculated with different microbial community starters[J]. *Food Chemistry*, 2019, 274: 558–565.
- [10] RAO Y, TAO Y F, CHEN X, et al. The characteristics and correlation of the microbial communities and flavors in traditionally pickled radishes[J]. *LWT*, 2020, 118: 108804.
- [11] YANG Y L, FAN Y, LI T, et al. Microbial composition and correlation between microbiota and quality-related physicochemical characteristics in chongqing radish paocai[J]. *Food Chemistry*, 2022, 369: 130897.
- [12] AN F Y, SUN H J, WU J R, et al. Investigating the core microbiota and its influencing factors in traditional Chinese pickles[J]. *Food Research International*, 2021, 147: 110543.
- [13] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品 pH 值的测定: GB 5009.237–2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. National food safety standard, determination of food pH value: GB 5009.237–2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.
- [14] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 食品中总酸的测定: GB/T 12456–2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
General Administration of Quality Supervision of the People's Republic of China, Standardization Administration of The People's Republic of China. Determination of total acid in food: GB/T 12456–2008[S]. Beijing: Standards Press of China, 2008.
- [15] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食盐指标的测定: GB 5009.42–2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. National food safety standard, determination of salt indicators: GB 5009.42–2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.
- [16] LIU A Q, YANG X, GUO Q Y, et al. Microbial communities and flavor compounds during the fermentation of traditional Hong Qu glutinous rice wine[J]. *Foods*, 2022, 11(8): 1097.
- [17] BOKULICH N A, SUBRAMANIAN S, FAITH J J, et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(1): 57–59.
- [18] ABARENKOV K, HENRIK NILSSON R, LARSSON K H, et al. The UNITE database for molecular identification of fungi—recent updates and future perspectives[J]. *New Phytologist*, 2010, 186(2): 281–285.
- [19] 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.
- [20] 赵楠. 四川泡菜的主要特性及其成因分析[D]. 无锡: 江南大学, 2017.
ZHAO N. Analysis of the main characteristics of Sichuan paocai and its formation mechanism [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017.
- [21] 云琳, 毛丙永, 崔树茂, 等. 不同发酵方式对萝卜泡菜理化特性和风味的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(13): 69–75.
YUN L, MAO B Y, CUI S M, et al. Effects of different fermentation methods on the physicochemical properties and flavor of pickles [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(13): 69–75.
- [22] 邓维琴, 伍亚龙, 陈功, 等. 多代发酵泡菜母水微生物多样性及其理化指标动态研究[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(8): 49–56.
DENG W Q, WU Y L, CHEN G, et al. Study on microbial diversity and physicochemical index of multi-generational fermented paocai brine[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2018, 44(8): 49–56.
- [23] 黄岩, 鲜双, 杜娟, 等. 不同温度与发酵方式制作的哈密瓜幼果泡菜品质比较[J]. *东北农业大学学报*, 2021, 52(11): 56–66.
HUANG Y, XIAN S, DU J, et al. Comparison of qualities of Hami melon fruitlet pickles made at different temperatures and fermentation methods [J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2021, 52(11): 56–66.
- [24] 黄存辉, 朴泓洁, 金清, 等. 肠膜明串珠菌发酵对四川泡菜中有机酸生成的影响[J]. *食品科技*, 2018, 43(6): 23–28.
HUANG C H, PIAO H J, JIN Q, et al. Effects of *Leuconostoc mesenteroides* fermentation on produc-

- tion of organic acids in Sichuan pickle[J]. Food Science and Technology, 2018, 43(6): 23-28.
- [25] 刘巧, 罗强, 张明, 等. 利用 16S rDNA 分析不同地区传统发酵泡菜的细菌多样性[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(22): 91-97.
LIU Q, LUO Q, ZHANG M, et al. Bacterial diversity analysis of traditional naturally fermented pickles from different regions in China by 16S rDNA[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(22): 91-97.
- [26] 陶飞燕, 潘创, 陈胜军, 等. 基于高通量测序技术分析微冻凡纳滨对虾的微生物[J]. 南方水产科学, 2021, 17(2): 104-113.
TAO F Y, PAN C, CHEN S J, et al. Microbial analysis of *Litopenaeus vannamei* during partial freezing storage by Illumina high throughput sequencing[J]. South China Fisheries Science, 2021, 17(2): 104-113.
- [27] 郭壮, 吴璞颖, 赵楠, 等. 泡菜水品质和细菌类群的关联性[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(23): 47-51.
GUO Z, WU P Y, ZHAO N, et al. Relevance study between microbial structure and quality of Paocai brine[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(23): 47-51.
- [28] 曹佳璐. 传统四川泡菜盐水乳酸菌多样性的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2017.
CAO J L. Diversity of lactic acid bacteria in brine of traditional Sichuan paocai[D]. Beijing: China Agricultural University, 2017.
- [29] 张安, 梁会朋, 孟霞, 等. 应用 16S rDNA 克隆文库技术解析四川泡菜发酵过程中的细菌多样性[J]. 中国调味品, 2017, 42(2): 1-6.
ZHANG A, LIANG H P, MENG X, et al. Analysis of bacterial community structure in fermentation of Sichuan pickle by 16S rDNA clone library technology[J]. China Condiment, 2017, 42(2): 1-6.
- [30] 荆雪娇. 传统发酵蔬菜微生物群落结构分析[D]. 太原: 山西大学, 2016.
JING X J. Microbial community structure analysis of traditional fermented vegetables[D]. Taiyuan: Shanxi University, 2016.
- [31] XIAO M Y, XIONG T, PENG Z, et al. Correlation between microbiota and flavour in fermentation of Chinese Sichuan Paocai[J]. Food Research International, 2018, 114: 123-132.
- [32] 李恒, 陈功, 伍亚龙, 等. 高通量测序方法研究传统四川泡菜母水中微生物群落的动态变化[J]. 食品科学, 2018, 39(24): 131-138.
LI H, CHEN G, WU Y L, et al. Analysis of microbial community dynamics of traditional Sichuan Paocai brine by high-throughput sequencing[J]. Food Science, 2018, 39(24): 131-138.
- [33] 吕嘉彬, 晁倩文, 刘秉坤, 等. 传统老坛自然发酵泡菜中真菌群落结构多样性分析[J]. 陕西科技大学学报, 2019, 37(6): 53-59.
LÜ J L, CHAO Q W, LIU B K, et al. Diversity analysis of fungal community structure in natural fermented pickles of traditional altar[J]. Journal of Shaanxi University of Science & Technology, 2019, 37(6): 53-59.
- [34] 唐丽, 魏雯丽, 赵雅娇, 等. 工业萝卜泡菜发酵过程中理化特性及真菌群落多样性分析[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(6): 25-31.
TANG L, WEI W L, ZHAO Y J, et al. Physicochemical property and fungal diversity during the fermentation of industrial radish Paocai[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(6): 25-31.
- [35] YE Z, SHANG Z X, ZHANG S Y, et al. Dynamic analysis of flavor properties and microbial communities in Chinese pickled chili pepper (*Capsicum frutescens* L.): A typical industrial-scale natural fermentation process[J]. Food Research International, 2022, 153: 110952.
- [36] 孙二娜, 张小妹, 赵伊凡, 等. 副干酪乳杆菌 LC-37 乳酸菌饮料对人体的促消化和调节肠道菌群作用[J]. 中国食品学报, 2021, 21(10): 95-100.
SUN E N, ZHANG X M, ZHAO Y F, et al. Effect of *Lactobacillus paracasei* LC-37 *Lactobacillus beverage* on promoting digestion and regulating intestinal flora in Human[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(10): 95-100.

Analysis of Microbial Community and Physicochemical Characteristics in Sichuan Pickle Brine

Hu Cihai^{1,2}, Yang Xu², Guo Quanyou^{2*}, Zheng Yao², Li Baoguo^{1*}, Fan Yiwen^{1,2}

(¹School of Health Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093

²East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090)

Abstract To determine the correlation between dominant microorganisms and physicochemical characteristics of pickle brine. Analysis of the correlation between physicochemical properties and microbial communities was revealed, while the microbial community structure was investigated using high-throughput sequencing technology. The results showed that: The total acid content of pickle brine was 3.00–18.90 g/kg, the pH value was 3.27–4.71, the salt content was 11.00–15.50 g/100 g, and 7 kinds of organic acids including oxalic acid, malic acid, succinic acid and lactic acid were detected. The dominant microbial phylums include Firmicutes and Ascomycota, accounting for more than 99.00% of the total. The dominant bacterial genera were *Lactobacillus* and *Pediococcus*. The dominant fungal were *Pichia*, *Kazachstania* and *Debaryomyces*. The correlation analysis showed that *Lactobacillus* had a significant positive correlation with lactic acid ($P<0.05$) and acetic acid ($P<0.01$), and *Pediococcus* had a significant positive correlation with malic acid ($P<0.01$). In summary, *Lactobacillus* spp. and *Pediococcus* were the dominant microorganisms in the pickle brine. This provided a reference for the selection and breeding of efficient fermentation strains of pickle brine and industrialization of pickles.

Keywords pickle brine; high-throughput sequencing; microbial diversity; physicochemical characteristics; correlation