

多菌协同发酵萝卜过程中不同盐浓度对菌相的影响

黄道梅^{1,2}, 胡露², 贾秋思², 郑秀艳¹, 孟繁博¹, 陈曦¹, 李国林¹, 李咏富¹, 林茂¹, 刘书亮^{2*}

1(贵州省现代农业发展研究所, 贵州 贵阳, 550006)

2(四川农业大学 食品学院, 四川 雅安, 625014)

摘 要 采用传统培养计数方法结合变性梯度凝胶电泳 (polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE) 技术, 以自然发酵 12% 盐度的工业化盐渍萝卜为对照, 对多菌协同发酵不同盐度 (8%、10%、12%) 工业化盐渍萝卜过程中 (188 d) 菌相变化进行了分析。结果表明: 4 种发酵方式盐渍水中菌落总数均维持在 $10^5 \sim 10^8$ CFU/mL 左右, 并呈现先上升后下降最后缓慢上升至平稳的变化趋势。乳酸菌受盐度影响较大, 其数量随着盐度升高而降低, 其中自然发酵盐渍萝卜比多菌协同发酵萝卜乳酸菌数低; 酵母菌因其耐盐性较强受盐度影响较小, 但受温度影响较大, 随着温度的升高, 其数量不断增加, 且 4 种发酵方式之间酵母菌数无明显差异。4 种方式盐渍萝卜中的细菌种类及真菌种类相似, 优势细菌包括 *Weissella cibaria*、*Lactobacillus curvatus*、*Leuconostoc mesenteroides*、*Lactobacillus plantarum*、*Halomonas taeanensis* 等, 其中乳酸菌占绝大多数; 优势真菌包括 *Kodamaea ohmeri*、*Debaryomyces* sp.、*Candida* sp. 等, 酵母菌为主要菌群。发酵至 88 d 后, 自然发酵中的优势细菌种类略高于多菌协同发酵; 盐度的增加明显抑制了部分细菌的生长, 使细菌种类及数量明显降低。自然发酵与多菌协同发酵的真菌种类在发酵过程中无明显差异, 但酵母菌数量前者多于后者; 不同盐浓度的酵母菌并无明显差异, 发酵 28 d, 二次加盐使得酵母菌的种类及数量产生了差异, 盐度的增加抑制了部分酵母菌的生长。

关键词 盐渍萝卜; 多菌协同发酵; 菌相; 盐度

泡菜工业作为我国蔬菜加工的一大产业, 绝大多数泡菜是通过将新鲜蔬菜进行盐渍, 待盐渍发酵成熟, 将盐渍蔬菜进行整形、脱盐、调味、灌装、灭菌等工艺加工制成。盐渍蔬菜作为泡菜的第一道关键工序, 对泡菜风味品质的形成尤为重要。由于蔬菜季节性较强, 集中在冬季收获, 绝大多数泡菜企业为了满足市场的大量需求, 不得不加大食盐浓度 (通常采用 15% 左右食盐浓度) 来达到延长盐渍蔬菜贮藏期的目的。但泡菜生产带来的高盐废水排放问题已不能满足日益被重视的环境保护要求, 限制了泡菜行业的可持续发展^[1-3]。为了满足行业可持续发展要求和市场需求, 低盐化人工接种发酵蔬菜将逐渐成为绝大多数泡菜企业的发展趋势^[4]。

近几年来, 为了满足我国泡菜行业的发展需求, 国内众多研究者也开始对泡菜微生物多样性进行研

究, 为我国泡菜产业的长足有效发展提供了理论基础。HYUN-JU EOM 等从各国泡菜发酵前期中分离出肠膜明串珠菌, 证明它是启动泡菜发酵的主要菌株^[5]。HARUT 等采用变性梯度凝胶电泳 (polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE) 技术分析了韩国泡菜发酵过程中的微生物, 结果表明乳酸菌为主要微生物^[6]。代道芳实验表明, 传统培养和 PCR-DGGE 方法结合能够互相取长补短, 更好地获得微生物的多样性^[7]。郑炯等利用 PCR-DGGE 方法分析了低盐和高盐腌制笋中的细菌多样性, 低盐的优势菌多为益生菌, 如食窦魏斯氏菌、乳球菌属、乳酸球菌属, 高盐的优势菌则为抗性较强菌属^[8]。本文采用工业化生产工艺, 对企业规模化生产泡菜发酵过程中的菌相变化进行解析研究, 为其生产过程中的质量控制和品质提升提供数据参考和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

圆根萝卜 (*Raphanus sativus* L.)、食盐、盐渍池: 均由某泡菜企业提供。菌种: 植物乳杆菌 3m-1 (*Lac-*

第一作者: 硕士研究生 (刘书亮教授为通讯作者, E-mail: lsliang999@163.com)。

基金项目: 黔科合院所创能 [2012] 4002; 黔科合条 (X [2014] 4001); 黔科合条 (NY [2013] 3051); 四川省农业科技成果转化资金项目 (14NZ0012)

收稿日期: 2015-12-24, 改回日期: 2016-02-25

tobacillus plantarum 3m-1)、植物乳杆菌 N2(*Lactobacillus plantarum* N2)、肠膜明串珠菌 8m-9(*Leuconostoc mesenteroides* 8m-9)、食窦魏斯氏菌 SJ14(*Weissella cibaria* SJ14),均由四川农业大学食品学院食品微生物实验室提供。培养基:改良 MRS 液体培养基^[8];系列合成培养基(MRS、孟加拉红、营养琼脂、BGLB 肉汤、VRBA 肉汤),均为生化试剂(BR)。试剂:Tris 碱、甲醛、硝酸银、乙二醇四乙酸二钠、丙烯酰胺、双丙烯酰胺、去离子甲酰胺、尿素、过硫酸铵、TEMED 等均为分析纯;液氮;TIANDZ 柱式细菌 DNAOUT,购于四川省绵阳天泽基因工程有限公司;Taq PCR Master Mix、6×Loading Buffer、Marker2000 等,购于宝生物工程(大连)有限公司;引物^[14](F338-GC、R518、F1427-GC、R1616)由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。

LDZX-40AI 型立式自动电热压力蒸汽灭菌锅 上海三申医疗核子仪器厂;PCR 仪 My Cycler™ Thermal Cycler, Bio-Rad;凝胶成像系统 Quantity One system, Bio-Rad; Milli-Q Gradient 超纯水系统 Millipore; Thermo BR4i 型冷冻离心机 Thermo Electron Corporation;变性梯度凝胶电泳仪 美国 C. B. S. Scientific。

1.2 试验方法

1.2.1 盐渍萝卜制作

将萝卜按某企业二次盐渍发酵工艺放入盐渍池中进行盐渍发酵,发酵 7 d 时,将菌株 3m-1、N2、8m-9、SJ14 以 2:1:1:1 的比例添加到盐渍萝卜中,通过循环泵循环混匀,密封发酵,并设置不同盐浓度(8%、10%、12%),以自然发酵(12%盐)为对照^[11]。

1.2.2 样品及其处理

用洁净塑料管沿循环管道伸入盐渍池底部采集水样,摇匀分装 -20℃ 保存。取样时间点为:0、7、14、21、28、38、48、58、68、78、88、108、128、158、188 d。

1.2.3 菌相变化分析

1.2.3.1 传统培养计数分析 无菌吸取 25 mL 样品

于装有 225 mL 无菌生理盐水的三角瓶中,制成 10^{-1} 稀释液后于试管内进行梯度稀释至适宜稀释度,进行以下各种微生物的分离培养与计数。菌落总数:参照 GB 4789.2—2010;乳酸菌数:参照 GB 4789.35—2010;酵母菌数与霉菌数:参照 GB 4789.15—2010;大肠菌群计数:参照 GB 4789.3—2010。

1.2.3.2 PCR-DGGE 技术分析 参考文献^[13]中略加改动:取 30 mL 萝卜盐渍水样品,2 000 r/min 离心 5 min,收集上清,8 000 r/min 高速离心 15 min,弃上清,收集菌体沉淀,收集的菌体用 20 mL 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 7.0)悬浮,8 000 r/min 离心 15 min,重复洗涤 3 次,洗净的菌体悬浮在 3 mL 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)中,用移液器吹打后均匀,平均分装 3 份于 2 mL EP 管中,-20℃ 冻存;按照天恩泽真菌 DNA 提取试剂盒的使用说明结合液氮研磨方法提取微生物总 DNA。将提取的总 DNA 溶液,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,-20℃ 保存备用;以提取的总 DNA 为模板,按表 1 对细菌 16S rDNA V3 区和真菌 18S rDNA 进行 PCR 扩增,以一次 PCR 产物为模板按需进行二次 PCR 扩增,PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,剩余产物于 -20℃ 冰箱保存备用;对 PCR 扩增所得产物采用美国 C. B. S. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis System 进行电泳分离(电泳条件:DGGE 变性聚丙烯酰胺浓度 8%,变性剂溶液线性梯度 40%~50%;电泳程序:60℃、200 V 预电泳 30 min,60℃、120 V 电泳 16 h/18 h)。电泳完成后,取下胶板先后进行固定、银染、显影、终止显影,然后置于凝胶成像仪拍照(图像用 NTSYSpc2.1 软件进行聚类分析),将优势条带进行切割收集,送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行后续的回收纯化、PCR 扩增、克隆测序等步骤,最后测序结果通过 BLAST 程序与 GenBank 基因库中的核酸数据进行同源性比对分析,并将序列用 MEGA 6 软件绘制系统发育树。

表 1 真菌和细菌 PCR 扩增程序

Table 1 The PCR amplification program of bacteria and fungus

名称	反应体系	反应条件
16S rDNA V3 区	Taq PCR Master Mix 25 μL, DNA 模板 0.5 μL, 引物各 0.5 μL, ddH ₂ O 23.5 μL	(94℃, 5 min) + {(94℃, 1 min) + (66℃, 1 min) + (72℃, 20 s)} × ₃₀ + (72℃, 10 min)
18S rDNA	Taq PCR Master Mix 25 μL, DNA 模板 1.5 μL, 引物各 1.5 μL, ddH ₂ O 20.5 μL	(94℃, 5 min) + {(94℃, 30 s) + (69~60℃, 30 s) + (-1℃/次) + (72℃, 1 min)} × ₁₀ + {(94℃, 30 s) + (59℃, 30 s) + (72℃, 1 min)} × ₂₀ + (72℃, 10 min)

1.2.4 数据处理

试验数据及其图表绘制采用 EXCEL、Origin 8.1、SPSS 19.0、MEGA 6、NTSYSpc 2.1 等软件进行处理。

2 结果与分析

2.1 传统培养方法检测结果分析

由图 1 可知,在发酵过程中,4 种发酵方式的盐渍池水中的菌落总数变化趋势基本一致,发酵初期快速上升 ($P < 0.05$),14 d 时,达到最大值,四者均接近 10^8 CFU/mL。随后由于二次盐渍致使其盐度骤然升高,抑制了大量微生物的生长,致使菌落总数快速下降 ($P < 0.05$),28 d 后,随着微生物对不同盐度环境的慢慢适应,菌落总数开始逐渐增加 ($P < 0.05$),58 d 后,菌落总数开始逐渐下降 ($P < 0.05$),可能是环境 pH 的降低抑制了部分微生物的生长,发酵 88 d 后,随着盐渍贮藏时间的继续延长,环境温度的不断升高使得其他微生物开始繁殖且自然发酵中的微生物种类丰富,菌落总数开始增加 ($P < 0.05$)。

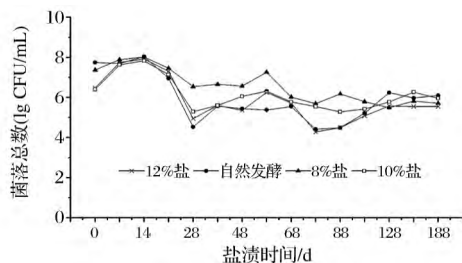


图 1 不同时期萝卜盐渍水的菌落总数变化

Fig. 1 Changes of total bacterial count in salt juice during fermentation

虽然不同发酵方式菌落总数的总体变化趋势基本一致,但自然发酵与多菌协同发酵之间、不同盐度发酵之间的菌落总数差异显著 ($P < 0.05$),其中,在发酵前期,多菌协同发酵大于自然发酵,在 88 d 后贮藏期,自然发酵大于多菌协同发酵。提高食盐浓度可以抑制微生物的生长,低盐度盐渍池水中的菌落总数高于高盐度盐渍池水。

由图 2 可知,发酵初期,由于低温兼酸性环境会抑制大部分细菌的生长,乳酸菌为主要细菌菌群,乳酸菌数的变化趋势和菌落总数保持一致,发酵初期迅速上升 ($P < 0.05$),14 d 时达到最大,4 者均大于 10^8 CFU/mL,随后二次盐渍致使乳酸菌数快速下降 ($P < 0.05$),随后随着微生物对不同盐度环境的慢慢适应,乳酸菌数开始逐渐增加 ($P < 0.05$),68 d 后,乳酸菌数开始逐渐下降 ($P < 0.05$),88 d 后,乳酸菌数开

始增加 ($P < 0.05$),发酵 158 d 后乳酸菌数开始下降 ($P < 0.05$)。同样由结果分析可知,自然发酵与多菌协同发酵之间、不同盐度发酵之间的乳酸菌数差异显著 ($P < 0.05$),多菌协同发酵大于自然发酵,低盐度盐渍池水中的乳酸菌数高于高盐度盐渍池水,且不同盐度对乳酸菌数的影响明显大于菌落总数。

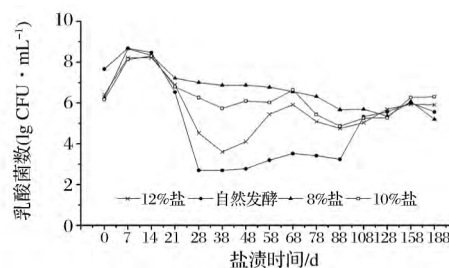


图 2 不同时期萝卜盐渍水的乳酸菌数变化

Fig. 2 Changes of lactic acid bacterial count in salt juice during fermentation

由图 3 可知,在发酵过程中,酵母菌数总体呈现先增加后减少的变化趋势,发酵 88 ~ 188 d 贮藏期,酵母菌数又呈现不断上升趋势。由于酵母菌的耐盐能力较强,因此,发酵过程中的二次盐渍对其数量影响较小,小幅度下降后随即迅速上升。由结果分析可知,酵母菌数并不同于菌落总数、乳酸菌数一样在自然发酵与多菌协同发酵之间、不同盐度发酵之间呈现一定规律性,且发酵中后期,4 种发酵方式的酵母菌数均在 10^5 CFU/mL 以上,这可能是因为酵母菌的好氧性,而大型的盐渍池无法严格达到厌氧环境,从而给酵母菌提供了有利生长条件。

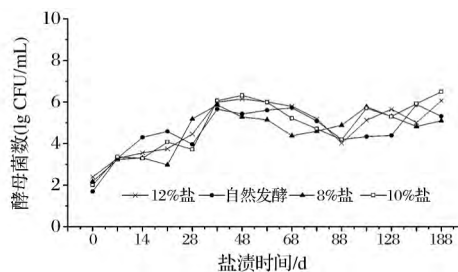


图 3 不同时期萝卜盐渍水的酵母菌数变化

Fig. 3 Changes of yeast count in salt juice during fermentation

由表 2 可知,发酵前 1 周,大肠菌群数较高,随着发酵的进行,酸度不断增加,从而抑制了大肠菌群的生长,发酵 58 d,4 种发酵方式盐渍池水中的大肠菌群数均小于 0.3 MPN/mL,从而也保证了成熟后盐渍萝卜的食用安全性。整个发酵过程中,4 种发酵方式盐渍水中霉菌数均小于 10 CFU/mL。

表2 不同时期萝卜盐渍水的大肠菌群数
Table 2 Coli group count in salt juice during fermentation

盐渍池	大肠菌群数/(MPN·mL ⁻¹)										
	0	7天	14天	21天	28天	38天	48天	58天	68天	78天	88天
自然发酵	>110	>11 000	<300	<100	>110	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3
12%盐	>110	2 400	740	<100	46	2.3	2.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3
10%盐	>110	2 400	<300	<100	>110	0.36	4.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3
8%盐	>110	>11 000	<300	<100	46	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3

2.2 PCR-DGGE 检测结果分析

2.2.1 PCR 扩增结果

采用液氮研磨结合真菌 DNA 提取试剂盒的方法分别对不同样品菌体沉淀进行微生物总 DNA 提取。以提取的总 DNA 为模板,采用引物 F338 - GC、R518 和 F1427 - GC、R1616 分别对细菌 16S rDNA V3 区和真菌 18S rDNA 进行 PCR 扩增,产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测,结果见图 4、5。细菌、真菌 PCR 扩增产物电泳条带清晰明亮,特异性好,片段大小接近 250 bp,与目标条带(约 230 bp)吻合,能够达到 DGGE 分析要求,保证其准确可靠。

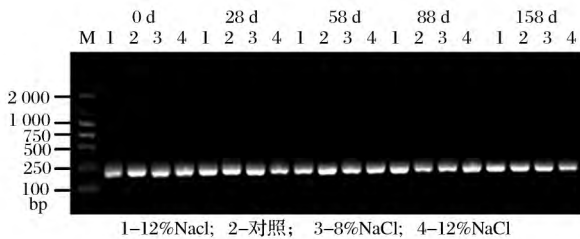


图4 细菌 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 4 Electrophoretogram for the PCR products of bacteria

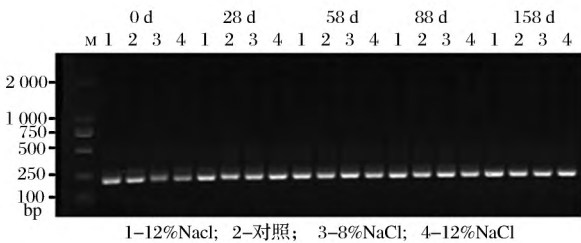


图5 真菌 PCR 扩增产物电泳图

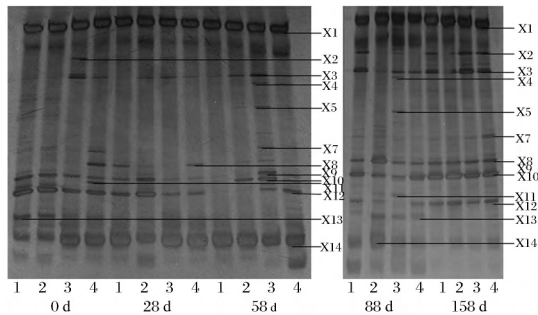
Fig. 5 Electrophoretogram for the PCR products of fungus

由图 4、图 6、表 3 可知,不同发酵方式不同发酵时期盐渍萝卜样品中优势细菌存在差异,但由优势细菌条带测序比对结果分析可知乳酸菌为盐渍萝卜中的绝对优势菌群,整个发酵过程中,4 种发酵方式盐渍萝卜的细菌丰度呈现先下降后升高的趋势,这可能与低温和盐度对细菌生长的影响有关,发酵前 28 d,4 个池子的细菌种类及其优势菌株无明显差异,随着二次加盐量的不同,58 d 时 4 个池子的细菌种类及其优势菌株

明显不同,盐度较低的细菌种类较为丰富,随着发酵的持续进行,由于环境温度的逐渐升高、盐渍水中的盐分逐渐向萝卜中渗透,受低温和高盐抑制的部分微生物开始大量繁殖,从而使发酵后期细菌种类增多。

表3 四种发酵方式盐渍萝卜发酵过程中细菌 DGGE 优势条带测序结果
Table 3 Sequencing results of superior bacteria during pickled radish fermentation with four ways

条带编号	最大相似菌株	最相近序列接受号(NCBI)	最大相似度/%
X ₁	<i>Weissella cibaria</i>	KP213179	100
X ₂	<i>Lactobacillus curvatus</i>	KP062949	100
X ₃	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	KC959401	100
X ₄	<i>Staphylococcus</i>	KF113452	99
X ₅	<i>Lactobacillus pentosus</i>	KP189214	100
X ₆	<i>Lactobacillus acetotolerans</i>	NR_044699	100
X ₇	<i>Lactobacillus namurensis</i>	KP189208	100
X ₈	<i>Lactobacillus graminis</i>	KJ921824	100
X ₉	<i>Lactobacillus alimentarius</i>	KJ737424	100
X ₁₀	<i>Lactobacillus furfuricola</i>	AB910350	100
X ₁₁	<i>Lactobacillus nodensis</i>	KC815024	100
X ₁₂	<i>Lactobacillus plantarum</i>	AB819501	100
X ₁₃	<i>Pediococcus ethanolidurans</i>	KJ994507	100
X ₁₄	<i>Halomonas taeanensis</i>	HE655448	100



1 - 12% NaCl; 2 - 对照; 3 - 8% NaCl; 4 - 10% NaCl

图6 不同发酵时期盐渍水中 16S rDNA 扩增产物的 DGGE 图谱

Fig. 6 DGGE profile of 16S rDNA amplified in pickled juice during fermentation

自然发酵盐渍萝卜(12%盐+未接菌)在整个发酵过程中的优势细菌主要包括 *Weissella cibaria*、*Lactobacillus graminis*、*Lactobacillus alimentarius*、*Lactobacillus plantarum*、*Halomonas taeanensis* 等,其中 *Weissella cibaria* 虽然并未人工添加,却一直存在于整个发酵时期且基本无交替变化,这说明 *Weissella cibaria* 为盐渍萝卜中的一类优势细菌,具有较强的耐盐和耐低温能力; *Lactobacillus graminis*、*Lactobacillus alimentarius* 主要出现于发酵后期,前期无明显踪迹,可能此两类菌株受温度及盐度影响较大; *Lactobacillus plantarum* 在发酵前 28 d 时数量较多,随着二次加盐以及发酵的进行,数量急剧减少至消失,发酵 88 d 时,又开始出现,随着发酵的延长再一次增长为优势细菌;耐盐能力极强的 *Halomonas taeanensis* 在发酵前 88 d 一直处于优势地位,发酵至 158 d 时,数量开始有所减少。

多菌协同发酵盐渍萝卜(12%盐+接菌、10%盐+接菌)在发酵过程中的优势细菌为 *Weissella cibaria*、*Lactobacillus curvatus*、*Leuconostoc mesenteroides*、*Lactobacillus graminis*、*Lactobacillus alimentarius*、*Lactobacillus plantarum*、*Pediococcus ethanolidurans*、*Halomonas taeanensis* 等。其中 *Weissella cibaria* 一直存在于整个发酵时期且基本无交替变化; *Lactobacillus curvatus*、*Leuconostoc mesenteroides*、*Lactobacillus graminis*、*Lactobacillus alimentarius* 这 4 类细菌受温度及盐度影响较大均活跃在发酵后期; *Halomonas taeanensis* 变化趋势与自然发酵中一致; 12% 盐度中 *Lactobacillus plantarum* 变化趋势同自然发酵,而在 10% 盐度中一直存

上述 3 种盐渍萝卜中的优势细菌外,还出现了 *Staphylococcus*、*Lactobacillus pentosus*、*Lactobacillus acetotolerans*,其中 *Staphylococcus* 在中后期数量较多, *Lactobacillus pentosus* 基本上只存在于中期, *Lactobacillus acetotolerans* 只在发酵 88 d 时出现, *Weissella cibaria*、*Halomonas taeanensis*、*Leuconostoc mesenteroides*、*Lactobacillus plantarum* 一直存在于整个发酵时期且基本无交替变化,其他优势细菌变化趋势与多菌协同发酵盐渍萝卜(10%盐+接菌)无明显差异。

综上所述,自然发酵与多菌协同发酵盐渍萝卜之间相比较,由于高盐低温环境,在发酵前中期两者中的优势细菌种类以及数量并无明显差异,发酵至 88 d 后,自然发酵中的优势细菌种类略高于多菌协同发酵,但自然发酵中并未检测到 *Leuconostoc mesenteroides* 的存在或极少量存在。对比不同盐度多菌协同发酵盐渍萝卜之间,盐度的增加明显抑制了部分细菌的生长,使细菌种类及数量明显降低。

表 4 四种发酵方式盐渍萝卜发酵过程中真菌 DGGE 优势条带分析结果

Table 4 Sequencing Results of superior fungus during pickled radish fermentation with four ways

条带编号	最大相似菌株	最相近序列接受号(NCBI)	最大相似度 / %
Z ₁	<i>Kodamaea ohmeri</i>	KM006493	100
Z ₂	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	HG316786	100
Z ₃	<i>Debaryomyces hansenii</i>	EF192227	99
Z ₄	<i>Ambrosiozyma monospora</i>	JQ698881	98
Z ₅	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KJ806314	99
Z ₆	<i>Candida</i> sp.	DQ839395	99
Z ₇	<i>Myxozyma udanii</i>	DQ519026	98
Z ₈	Uncultured <i>Debaryomyces</i>	KM872056	99
Z ₉	Uncultured fungus	HG796060	100
Z ₁₀	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	FJ896141	98
Z ₁₁	<i>Pichiasp</i>	JQ419913	99
Z ₁₂	<i>Kodamaea ohmeri</i>	KM006493	100
Z ₁₃	<i>Debaryomyces</i> sp.	AM992944	100
Z ₁₄	<i>Kazachstania siamensis</i>	AB270533	99
Z ₁₅	<i>Candida lactis-condensi</i>	AB018144	99

由图 5、图 7、表 4 可知,不同发酵方式不同发酵时期盐渍萝卜样品中优势真菌存在差异,但由优势真菌条带测序比对结果分析可知酵母菌为盐渍萝卜中的绝对优势菌群,在整个发酵过程中,4 种发酵方式盐渍萝卜的真菌丰度呈现逐渐升高的趋势,与细菌的变化趋势存在差异,分析原因可能是大部分酵母菌具有较强的耐盐能力,其生长受盐度影响较小,随着环境温度的逐渐升高,其种类及数量也逐渐升高。

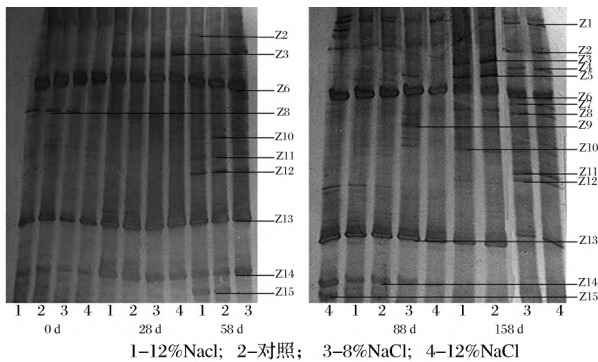


图 7 不同发酵时期盐渍水中 18S rDNA 扩增产物的 DGGE 图谱

Fig. 7 DGGE profile of 18S rDNA amplified in pickled juice during fermentation

且基本无交替变化。多菌协同发酵盐渍萝卜(8%盐+接菌)在发酵过程中的优势细菌较多,除了

自然发酵盐渍萝卜(12%盐+未接菌)在整个过程中的优势真菌主要有 *Debaryomyces hansenii*、*Ambrosiozyma monospora*、*Saccharomyces cerevisiae*、*Candida* sp.、*Uncultured Debaryomyces*、*Kluyveromyces marxianus*、*Kodamaea ohmeri*、*Debaryomyces* sp.、*Kazachstania siamensis*、*Candida lactis-condensi* 等,其中 *Saccharomyces cerevisiae*、*Debaryomyces* sp. 一直大量存在于整个发酵过程中且基本无交替变化,说明这两类酵母菌适应力极强,受温度、盐度影响较小;*Debaryomyces hansenii* 前期未出现,发酵至 28 d 时成为优势菌群,二次加盐后受高盐环境影响生长受到抑制,数量减少至消失,当发酵时间延长至 158 d 时,又一次成为优势菌群;*Saccharomyces cerevisiae* 在发酵 88 d 时开始出现,但数量较少,发酵至 158 d 时繁殖成为优势菌群;*Kodamaea ohmeri*、*Candida lactis-condensi* 在发酵 58~88 d 时出现且数量无明显差异;*Kazachstania siamensis* 发酵前 88 d 一直存在且处于优势地位,但发酵 88 d 后开始减少至消失。

多菌协同发酵盐渍萝卜(12%盐+接菌)在整个发酵过程中真菌的种类及其变化趋势与自然发酵并无明显差异,但各类优势菌的条带亮度均要低于自然发酵,这说明在人工添加菌株对其酵母菌的菌群交替并无显著影响,但对抑制酵母菌生长、减少酵母菌的数量有一定的作用。

多菌协同发酵盐渍萝卜(10%盐+接菌)在整个发酵过程中的优势真菌有 *Debaryomyces hansenii*、*Candida* sp.、*Debaryomyces* sp.、*Wickerhamomyces anomalus*、*Debaryomyces hansenii*、*Kodamaea ohmeri*、*Candida lactis-condensi* 等。其中, *Candida* sp.、*Debaryomyces* sp. 一直存在于整个发酵过程中且处于优势地位;*Wickerhamomyces anomalus*、*Kodamaea ohmeri* 发酵开始并未出现,发酵中期出现,发酵 88 d 时消失不见,发酵 158 d 时再次出现;*Debaryomyces hansenii* 仅出现于发酵 28 d;*Candida lactis-condensi* 仅出现在发酵 58 d 且处于优势。除上述优势菌群外,*Kluyveromyces marxianus* 少量存在于发酵 88~158 d;*Pichia manshurica*、*Myxozyma udanii*、*Uncultured Debaryomyces* 在发酵末期(158 d)少量存在。

多菌协同发酵盐渍萝卜(8%盐+接菌)由于盐度较低,在整个发酵过程中的优势真菌比其他三者多,有 *Kodamaea ohmeri*、*Wickerhamomyces anomalus*、*Debaryomyces hansenii*、*Ambrosiozyma monospora*、*Candida* sp.、*Kluyveromyces marxianus*、*Pichia manshurica*、

Debaryomyces sp.、*Kazachstania siamensis*、*Candida lactis-condensi* 等,其中, *Candida* sp.、*Debaryomyces* sp. 一直存在于整个发酵过程中且处于优势地位;*Wickerhamomyces anomalus* 发酵 28 d 时开始出现,后慢慢消失,发酵 88 d 后又出现;*Debaryomyces hansenii* 仅在发酵 28 d 时出现;*Kodamaea ohmeri*、*Ambrosiozyma monospora*、*Myxozyma udanii* 仅在发酵 158 d 出现;*Saccharomyces cerevisiae* 发酵 88 d 时出现,后慢慢消失;*Kluyveromyces marxianus* 在发酵 88~158 d 时出现;*Pichia manshurica* 在发酵 58 d 时出现,随后慢慢消失,当发酵 158 d 时再次出现;*Kazachstania siamensis* 在发酵前 88 d 一直存在,末期开始逐渐消失。

综上所述,自然发酵与多菌协同发酵盐渍萝卜之间相比,在整个发酵过程中两者在真菌菌群种类上无明显差异,但多菌协同发酵盐渍萝卜由于人工添加的菌株对酵母菌的生长有一定的抑制作用,因此在酵母菌数量上前者多于后者;对比不同盐度的多菌协同发酵盐渍萝卜之间,发酵前期并无明显差异,发酵 28 d 二次加盐后由于不同的盐环境使得酵母菌的种类及数量产生了差异,盐度的增加在一定程度上抑制了部分酵母菌的增长。

3 结论与讨论

乳酸菌、酵母菌是蔬菜发酵过程中的优势菌群,乳酸菌产酸使其乳酸含量不断积累,从而抑制腐败微生物的生长,部分酵母菌不断产生乙醇、酯类等风味物质,赋予独特的风味,另部分酵母菌会导致泡菜产膜生花,引起腐败,研究表明,毕赤酵母属(*Pichia* sp.)、假丝酵母属(*Candida* sp.)在酸性条件下易产膜,是导致泡菜在贮藏过程中生花的主要菌群^[13-14]。

微生物的生长很大程度上受环境因素影响,同一环境中不同微生物生长和不同环境中同种微生物生长均存在差异^[15]。本文中,盐度、温度是影响微生物生长的主要因素。在整个发酵过程中,4种发酵方式盐渍水中菌落总数均维持在 $10^5 \sim 10^8$ CFU/mL左右,呈现先上升后下降最后缓慢上升至平稳的变化趋势;乳酸菌受盐度影响较大,盐度高的盐渍萝卜比盐度低的乳酸菌数低,自然发酵盐渍萝卜比多菌协同发酵乳酸菌数低,这也是自然发酵、高盐度发酵滞后的主要原因之一;酵母菌因其耐盐性较强受影响较小,但受温度影响较大,随着温度的升高,酵母菌数不断增加;发酵 58 d 后,均未检测到霉菌和大肠菌群的存在,从而保证了成熟盐渍萝卜的使用安全性。在发酵过程

中,提高食盐浓度虽然能够抑制部分杂菌的生长,但同时抑制了乳酸菌的发展,延长了发酵时间,因此选择适宜的盐浓度是关键。

通过 PCR-DGGE 对发酵过程中的菌群变化分析,工业化盐渍萝卜发酵过程中优势细菌包括 *Weissella cibaria*、*Lactobacillus curvatus*、*Leuconostoc mesenteroides*、*Lactobacillus graminis*、*Lactobacillus alimentarius*、*Lactobacillus plantarum*、*Pediococcus ethanolidurans*、*Halomonas taeanensis* 等,其中乳酸菌占绝大多数,优势真菌包括 *Kodamaea ohmeri*、*Debaryomyces* sp.、*Candida* sp.、*Kazachstania siamensis* 等,酵母菌为主要菌群,这与众多学者研究结果相似^[13-18]。

在整个发酵过程中,*Weissella cibaria* 始终作为优势细菌大量存在,也成为自然发酵的主要菌群,说明 *Weissella cibaria* 本身就是盐渍萝卜发酵过程中的主要发酵菌株,LEE 等^[9]通过 DGGE 对不同发酵时期朝鲜泡菜检测,发现 *Weissella confuse*、*Lactobacillus sakei*、*Lactobacillus curvatus* 等为微生物群落的主要组成成员,赵永威等^[20]揭示了魏斯氏菌属为冬瓜腌制过程中的优势种群之一。而肠膜明串珠菌作为添加菌种之一,大量存在于多菌协同发酵盐渍萝卜的后期过程中,自然发酵中仅少量存在,推测肠膜明串珠菌的添加对改善风味有一定功效,有别于 PEDERSON 等^[21]、EON 等^[6]由肠膜明串珠菌启动发酵的研究结果,可能是肠膜明串珠菌受盐度影响较大所致。植物乳杆菌作为另一添加菌株广泛存在于整个发酵过程中,但在 58 d 时因受高盐抑制少量存在于 12% 盐度的盐渍水中。

Candida sp.、*Debaryomyces* sp. 这两类酵母菌大量存在于整个发酵过程中,研究表明 *Candida* sp. 在酸性条件下易产膜,因此发酵中后期池面产生大量膜状物,可能与 *Candida* sp. 的生长密切相关。*Kazachstania siamensis* 大量存在于发酵前 88 d,随着发酵的完成,开始慢慢减少至消失。在多菌协同发酵和自然发酵过程中,*Kodamaea ohmeri*、*Ambrosiozyma monospora*、*Pichia* sp.、*Kluyveromyces marxianus* 等菌不断交替变化产生的差异,导致最后泡菜风味品质的差异性。

本文采用工业化生产工艺,人工强化接种技术,并首次人工添加食窦魏斯氏菌属,对不同盐浓度泡菜多菌协同发酵过程中菌相变化进行解析研究。人工添加的菌株在发酵过程中起到了强化发酵的作用,其中食窦魏斯氏菌(*Weissella cibaria*)对不同盐浓度均有较强的耐受能力,可以作为优良发酵菌株广泛应用

于发酵蔬菜生产中。另外,盐浓度的增加对盐渍萝卜发酵过程中微生物的种类及数量都有一定的抑制作用,尤其是细菌,应适当降低盐浓度有助于发酵过程中微生物的生长,泡菜特殊风味的形成。该研究结果为泡菜的工业化生产中人工接种技术的应用及产膜生花的防治提供了数据参考。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] CHOI S M, JEON Y S, RHEE S H, et al. Red pepper powder and kimchi reduce body weight and blood and tissue lipids in rats fed a high fat diet [J]. Journal of Food Science and Nutrition,2002,7(2):162-167.
- [3] 田伟,张琦,邓珍珍,等. 利用 16S rRNA 分析传统四川发酵泡菜中的细菌多样性 [J]. 食品科学,2013,34(17):215-218.
- [4] 武晋海,王昌禄,王玉荣,等. 低盐腌渍黄瓜半固态纯种发酵工艺中试 [J]. 农业工程学报,2009,25(1):265-270.
- [5] EOM H J, SEO D M, HAN N S. Selection of psychrotrophic *Leuconostoc* spp. producing highly active dextranase from lactate fermented vegetables [J]. International journal of Food Microbiology, 2007,117(1):61-67.
- [6] HARUT E S, UENO S. Succession of bacterial and fungal communities during a traditional pot fermentation of rice vinegar assessed by PCR-mediated denaturing gradient gel electrophoresis [J]. International Journal of Food Microbiology,2006,109(7):79-87.
- [7] 代道芳. 基于宏基因组学技术的传统发酵泡菜中乳酸菌多样性研究 [D]. 南宁:广西大学,2011.
- [8] 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]. Journal of the Science of Food and Agriculture,2014,94(2):296-300.
- [9] 郑炯,夏雪娟,叶秀娟,等. PCR-DGGE 技术分析腌制麻竹笋中微生物多样性 [J]. 食品科学,2014,35(21):170-174.
- [10] 凌代文,东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法 [M]. 北京:中国轻工业出版社,1999.
- [11] 杜晓华,四川泡菜微生态研究及优良乳酸菌的分离、筛选 [D]. 雅安:四川农业大学,2012.
- [12] 李洁芝,王艳丽,张其圣,等. 蔬菜预处理和盐渍新工艺对泡菜生产用盐量的影响研究 [J]. 食品与发酵科技,2014,50(2):13-15.
- [13] 李小红. 低温乳酸菌的筛选鉴定及其发酵泡白菜的应

- 用研究 [J]. 雅安: 四川农业大学, 2014.
- [4] 敖晓琳, 蒲彪, 蔡义民, 等. 能抑制引起泡菜 "生花" 腐败菌的乳酸菌的筛选 [J]. 食品工业科技, 2014, 35 (14): 234 - 236.
- [5] 钟小廷, 樊君, 罗红刚, 等. 泡菜生花酵母的鉴定及生理特性研究分析 [J]. 食品与发酵科技, 2014, 50 (5): 19 - 22.
- [6] 罗周, 燕平梅, 岳虹, 等. 不同浓度的食盐/蒜对泡菜发酵中各种微生物的影响 [J]. 农产品加工学刊, 2010, 1: 56 - 59.
- [7] 范丽平, 林婷, 张海松, 等. 降亚硝酸盐乳酸菌的鉴定及生长特性的研究 [J]. 食品工业科技, 2012, 33 (18): 221 - 223.
- [8] 杜书. 酸菜自然发酵过程中风味及质地变化规律研究 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2013.
- [9] 王猛, 蒋云露, 杨建涛, 等. 不同盐质量浓度四川泡菜腐败前后微生物的分析比较研究 [J]. 食品科学, 2015, 13: 184 - 189.
- [20] LEE J S, HEO G Y, LEE J W, et al. Analysis of kimchi microflora using denaturing gradient gel electrophoresis [J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 102 (2): 143 - 150.
- [21] 赵永威, 吴祖芳, 沈锡权, 等. 冬瓜腌制过程中微生物多样性的分析 [J]. 中国食品学报, 2014 (6): 208 - 213.
- [22] TAMANG J P, SARKAR P K. Microbiology of mesu, a traditional fermented bamboo shoot product [J]. International Journal of Food Microbiology, 1996, 29 (1): 49 - 58.

Effect of different salinity on the microbial community diversity during strains synergism fermentation of pickled radish

HUANG Dao-mei^{1,2}, HU Lu², JIA Qiu-si², ZHENG Xiu-yan¹, MENG Fan-bo¹,
CHEN Xi¹, LI Guo-lin¹, LI Yong-fu¹, LI Mao^{1*}, LIU Shu-liang^{2*}

1 (Guizhou Institute of Modern Agricultural Development, Guiyang 550006, China)

2 (College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

ABSTRACT The traditional cultivate counting method combined with PCR-DGGE technique was adopted in this paper. Industrialized pickled radish with salinity of 12% from natural fermentation was used as control. The microbial community diversity in different salinity radishes from strains synergism fermentation was analyzed. The results showed that strains quantity was maintained at $10^5 \sim 10^8$ CFU/mL in the pickled water from four ways fermentation, and had a trend of increasing in the beginning and then went down and ascended steadily at last. Salinity had great influence on lactic acid bacteria. The lactic acid bacteria count of pickled radishes with high salinity were less than that of pickled radishes with low salinity, and that of pickled radishes from natural fermentation were less than that of pickled radishes from strains synergism fermentation. Yeast had a high ability of salt tolerance, but it was more vulnerable to temperature. By temperature increasing, yeast count was increased continuously. There was no significant difference in four ways fermentation. Using these four modes, bacteria and fungi species in pickled radishes were similar. The main advantage strains included *Weissella cibaria*, *Lactobacillus curvatus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Halomonas taeanensis* etc., most of them were lactic acid bacteria. The advantage fungi included *Kodamaea ohmeri*, *Debaryomyces* sp., *Candida* sp. etc., wherein yeast were the main microbial community. After 88 days, though the bacteria species during natural fermentation were slightly more compared with strains synergism fermentation, the increase of salinity obviously restrained part of bacterial growing. In fungal species, there was no significant difference between natural fermentation and strains synergism fermentation, but during the whole fermentation, the former fungal count was higher. There was no obvious difference among different salinity pickled radish from strains synergism fermentation during early stage fermentation, however, secondary addition of salinity led to variations of fungal species and its count after 28 days of fermentation. The increase of salinity inhibited the growth of some yeast.

Key words pickled radish; strains synergism fermentation; the microbial community diversity; salinity