

优势乳酸发酵菌株筛选、鉴定及对发酵萝卜风味品质的影响

Screening of dominant lactic acid fermentation strains, identification and effect on flavor quality of fermented radish

阿丽亚·阿达力 梅时勇 张冀芳 贺正金

A Dali A Liya MEI Shiyong ZHANG Jifang HE Zhengjin

(中国农业科学院麻类研究所, 湖南 长沙 410000)

(Institute of Bast Fiber Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changsha, Hunan 410000, China)

摘要: [目的] 筛选优良乳酸菌菌株以构建萝卜专用的泡菜发酵菌种。[方法] 从不同地区收集萝卜老坛泡菜母水, 采用稀释涂布法从泡菜母水中分离乳酸菌, 通过生理鉴定、形态学鉴定 (菌落观察和, 革兰氏染色法)、16S rDNA 基因测序和系统发育树构建确定种类并对其生长特性、耐受能力和风味物质进行检测。[结果] 分离筛选结合生理鉴定共获得 120 株菌株, 其菌落为圆形凸起, 镜检呈杆状或球状且均为革兰氏阳性菌。进一步通过产酸能力测试获得 15 株产酸能力较强的菌株。分子鉴定表明, 1 株为芽孢杆菌属、13 株为植物乳杆菌属, 1 株为戊糖片球菌属。对不同类型发酵菌株进行生长特性分析, 发现菌株 LA-8 与 LA-11 的生长速度比其他菌株快; 菌株 LA-8 的产酸能力强, 耐 10% 盐和 15% 蔗糖。4 株不同类型菌株均具有较强的降解亚硝酸盐能力。萝卜发酵初试试验表明, 菌株 LA-8 和 LA-11 的发酵能力较强, 产酸速度快。4 株不同类型乳酸菌发酵萝卜所产生的挥发性物质存在差异。[结论] 从不同地区萝卜老坛泡菜母水中筛选得到 3 个不同类型的优势发酵菌, 可作为萝卜泡菜产业生产的菌种来源。

关键词: 老坛泡菜; 乳酸菌; 发酵; 筛选; 鉴定

Abstract: [Objective] This study aimed to screen the excellent lactic acid bacteria strains to construct a special pickle

fermentation strain for radish. [Methods] Lactic acid bacteria were isolated from the pickle brines of Laotan sauerkraut collected from different regions by dilution coating method. The species were determined by physiological identification, morphological identification (colony observation, Gram staining), 16S rDNA gene sequencing and phylogenetic tree construction, and their growth characteristics, tolerance and flavor substances were detected. [Results] Isolation, screening, and physiological identification yielded 120 colonies of round, convex bacteria, which appeared rod-shaped or spherical under the microscope and were all Gram-positive strains. Further 15 strains with high acid production capacity were obtained by acid production capacity test. By molecular sequencing, 1 strain was identified as *Bacillus*, 13 strains as *Lactobacillus plantarum* and 1 strain as *Pediococcus pentosus*. Among them, *L. plantarum* was the dominant lactic acid fermentation strain screened in Sichuan, Chongqing, Liaoning, Guizhou, Hunan and Nanping of Hubei province, and *Bacillus* and *P. pentosus* were screened in Tuanbao area of northern Hubei Province. The growth characteristics of different types of fermentation strains were analyzed, and the growth rate of strains LA-8 and LA-11 was faster than other strains; Strain LA-8 had the highest acid production capacity, and was resistant to 10% salt and 15% sucrose. All four strains had the ability to degrade nitrite. Strains LA-4 and LA-6 were able to produce 15% sucrose, and their growth rate and acid-producing capacity were slightly lower than that of *L. plantarum*. The initial experiment of radish fermentation showed that LA-8 and LA-11 had stronger fermentation ability and faster acid production. The electronic nose detection technology was used to detect the fermentation flavor of radish, and it was found that the volatile substances produced by four strains of different types of lactic acid bacteria

基金项目: 中国农业科学院科技创新工程 (编号: ASTIP_IBFC); 湖南省重点领域研发计划 (编号: 2022NK2003)

作者简介: 阿丽亚·阿达力, 女, 中国农业科学院麻类研究所在读硕士研究生。

通信作者: 梅时勇 (1965—), 男, 中国农业科学院麻类研究所研究员。E-mail: hbvegt@163.com

张冀芳 (1985—), 女, 中国农业科学院麻类研究所副研究员, 博士。E-mail: smilehome@163.com

收稿日期: 2024-04-15 **改回日期:** 2024-05-28

were different. [Conclusion] Three different types of dominant fermentation strains were screened from the mother water of radish laotan pickle in different regions, which could be further used as the source of strains for the production of radish pickle industry.

Keywords: old jar pickles; lactic acid bacteria; fermentation; screening; identification

中国发酵蔬菜历史悠久,种类丰富,不同地区发酵蔬菜的类型不同,如四川泡菜、东北酸菜、朝鲜族泡菜、湘西泡菜等。目前,中国大部分地区泡菜采用传统的自然发酵方式,操作简单,生产周期长。此外,由于原料及环境带杂菌或操作不规范,很容易导致泡菜腐坏变质,可控程度低,产生有害产物的风险增加^[1]。

根据制作方法、地区、原料种类、发酵环境的不同^[2-4],自然发酵形成的泡菜发酵菌群呈现多样性和特异性。发酵蔬菜是以乳酸菌等微生物菌群为主^[5]。乳酸菌在发酵过程中既不会破坏植物细胞组织,也不会降低蔬菜原料的营养价值^[6],且对致病菌具有拮抗作用;可维持体内肠道微生物菌群平衡,有利于身体健康;还可利用原料中可溶性物质代谢产生的多种氨基酸、维生素和酶,提高发酵制品的营养价值与风味^[7-8]。

泡菜自然发酵过程中由于杂菌所含的硝酸还原酶导致亚硝酸盐含量增加,阻碍了传统泡菜的产业发展^[9]。人体摄入过量的亚硝酸盐会导致不同程度的损害^[10],长期摄入可能会提高患癌几率^[11-12]。而乳酸菌具有降解亚硝酸盐的能力^[13],还可抑制其他产亚硝酸盐微生物的生长,从而有效抑制亚硝酸盐的生成^[14-16]。因此,合理开发与利用乳酸菌用于蔬菜发酵产业越来越受到重视^[17]。

研究拟对不同地区萝卜泡菜母水进行发酵菌株筛选与鉴定,筛选出每个地区的优势发酵菌株,经分子鉴定分类后分析比较不同类型发酵菌株之间的生长特性、耐受能力以及降解亚硝酸盐能力,以期筛选出适合萝卜泡菜专用的高效发酵菌株,为规模化开发萝卜泡菜产业提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

萝卜泡菜母水:从不同地区收集(见表 1);

MRS 琼脂培养基、MRS 肉汤培养基和细菌 DNA 提取试剂盒:北京索莱宝科技有限公司;

葡萄糖、碳酸钙、亚硝酸钠、过氧化氢、氯化钠、对位二甲基氨基苯甲醛:分析纯,国药集团药业股份有限公司;

醋酸铅纸条:上海麦克林生化科技股份有限公司;

亚硝酸盐速测试纸:北京智云达科技股份有限公司;

表 1 萝卜泡菜母水来源信息

Table 1 Information on the source of radish pickle brines

编号	采样地	采样数
SC1-SC4	四川	4
HB1-HB6	湖北	6
CQ1-CQ2	重庆	2
HLJ-1	黑龙江哈尔滨	1
LN-1	辽宁铁岭	1
HN-1	湖南怀化	1
GZ-1	贵州遵义	1

革兰氏染色液:湖南比克曼生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

紫外可见分光光度计:UV9100 型,北京莱伯泰科有限公司;

光学显微镜:BX53 型,日本奥林巴斯株式会社;

pH 计:PHSJ-3F 型,上海仪电科学仪器股份有限公司;

电子鼻:PEN3 型,德国 Airsense 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 菌株筛选 将 1 mL 萝卜泡菜母水加入至 9 mL 无菌生理盐水中,梯度稀释。选取适宜稀释度,分别涂布 MRS 固体培养基(3% CaCO₃),30 ℃ 培养 48 h。在无菌环境下挑取生长速度较快且具有溶钙圈的菌株进行分离纯化,多代划线纯化保存。

1.3.2 菌株生理鉴定 参照《常见细菌系统鉴定手册》^[18]和《伯杰细菌鉴定手册》^[19]。

(1) 触酶试验:用接种环挑取菌株于干净载玻片上,滴加 3% H₂O₂ 观察是否有大量气泡产生。有大量气泡产生为阳性菌株,反之为阴性菌株。

(2) 吡啶试验:在干净滤纸上,滴加 1.0~1.5 mL 对位二甲基氨基苯甲醛试剂于滤纸上使其变湿,取 18~24 h 琼脂平板培养物涂布于浸湿的滤纸上,1~3 min 内观察。棕色试剂由紫红变为红色即为阳性。

(3) H₂S 试验:将待试菌接种于一般营养肉汤培养基中,将醋酸铅纸条悬挂于培养基上方,35 ℃ 培养 5 d。纸条变黑为阳性。

(4) 形态学鉴定:待测菌株多代划线后进行革兰氏染色镜检。阳性菌株呈蓝紫色,阴性菌呈红色。

(5) 分子鉴定:使用细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取菌株的基因组 DNA,使用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增反应(表 2)。反应程序:95 ℃,5 min;95 ℃,50 s;55 ℃,

表 2 PCR 扩增体系

Table 2 PCR amplification system

组分	用量/ μL	组分	用量/ μL
DNA 模版	1.0	10 $\times$ PCR Buffer	5.0
dNTP	2.0	Taq DNA 酶	0.125
27F(10 $\mu\text{mol/L}$)	2.0	ddH ₂ O	13.875
1429R(10 $\mu\text{mol/L}$)	2.0	总体积	20.0

45 s;72 $^{\circ}\text{C}$,1 min;循环 30 次。PCR 扩增产物由擎科生物技术有限公司测序。将测序结果与 GenBank 数据库进行 BLAST 比对分析,使用 MEGA 软件进行序列分析并构建发育树。

1.3.3 生长特性分析 将菌株以 2% 的接种量接入到 MRS 液体培养基中,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h,每隔 6 h 测量 OD_{600 nm} 值和 pH 值,绘制生长曲线并计算产酸能力。

1.3.4 耐受性试验

(1) 耐盐能力:将菌株以 2% 的接种量接入到分别含有 6%,8%,10% NaCl 的 MRS 液体培养基中,每隔 6 h 测量 OD_{600 nm} 值。

(2) 亚硝酸盐降解能力:将菌株以 2% 的接种量接入到含有 40 mg/kg 亚硝酸钠溶液的 MRS 液体培养基中,每隔 6 h 进行一次亚硝酸盐含量检测。用洁净干燥的容器取适量样品,将试纸块全部浸入样液后立即取出,将试纸块朝上水平放置,2 min 时与色卡比较。

(3) 耐糖能力:将菌株以 2% 的接种量接入到分别含有 6%,10%,15% 葡萄糖的 MRS 液体培养基中,每隔 6 h 测量 OD_{600 nm} 值。

1.3.5 优势菌株萝卜发酵初试及风味物质检测 以白萝卜为原材料,将上述筛选得到的优势乳酸菌纯种发酵制作萝卜泡菜,对照组为自然发酵。每隔 1 d 检测其 pH 值变化情况,观察其发酵时产气情况,并对发酵 3 d 后的风味品质进行评价。

萝卜泡菜制作流程:

新鲜萝卜→预处理→清洗晾干→切块分装(接种乳酸菌)→加盐水→密封发酵

风味物质检测:取 20 mL 对照组和样品组于 50 mL 顶空瓶中,30 $^{\circ}\text{C}$ 平衡 5 min 后检测其香气成分,每个样品重复 3 次。电子鼻参数设置:电子鼻样品预进样时间 5 s、自动归零时间 5 s、清洗时间 120 s、检测时间 120 s。电子鼻传感器阵列及其性能见表 3。

1.3.6 数据处理 每组试验重复测定 3 次,采用 Excel 2021 对数据进行整理和作图,用 Origin 2021 软件作图,利用 IBM SPSS Statistics 26 软件进行显著性分析($P < 0.05$)。

表 3 电子鼻传感器阵列及其性能

Table 3 Electronic nose sensor array and its performance

编号	传感器名称	性能描述
R1	W1C	对芳香成分、苯类灵敏
R2	W5S	对氮氧化合物很灵敏
R3	W3C	对氨类、芳香成分灵敏
R4	W6S	对氢化物有选择性
R5	W5C	对短链烷烃、芳香成分灵敏
R6	W1S	对甲基类灵敏
R7	W1W	对无机硫化物灵敏
R8	W2S	对醇类、醛酮类灵敏
R9	W2W	对芳香成分、有机硫化物灵敏
R10	W3S	对长链烷烃灵敏

2 结果与分析

2.1 乳酸发酵菌株的筛选

由图 1 可知,大部分菌落呈凸起、湿润、表面光滑、边缘整齐,颜色多为乳白色,少部分菌落颜色为黄色。在无菌条件下,挑取培养基上所有不同颜色、大小和形态的单个菌落 563 个进行多代纯化,选择 48 h 内出现溶钙圈速度且明显的 169 个单菌株用于后续试验。

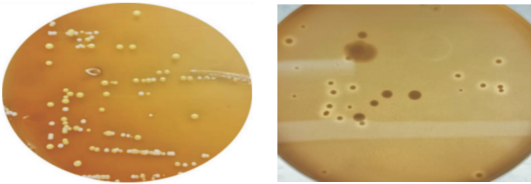


图 1 泡菜样品中分离乳酸菌的形态及溶钙圈
Figure 1 Morphology and calcium-solubilizing circle of isolated lactic acid bacteria from kimchi samples

2.2 乳酸发酵菌株的生理鉴定分析

2.2.1 触酶试验 向 169 个菌株菌落中滴加 3% H₂O₂, 其中有 12 个菌株有大量气泡产生,鉴定为阳性菌株,其余 157 个无气泡产生,鉴定为阴性菌株,选取阴性菌株用于后续吲哚试验。

2.2.2 吲哚试验 将 157 株菌株涂布于浸湿的滤纸上,其中有 9 个菌株由紫红色变为红色,鉴定为阳性菌株;其余 148 个菌株无颜色变化,鉴定为阴性菌株,选取阴性菌株用于后续 H₂S 试验。

2.2.3 H₂S 试验 将 148 个菌接种于营养肉汤培养基,再将醋酸铅纸条悬挂于培养基上方,35 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5 d 后,有 23 个菌株变黑,鉴定为阳性菌株,125 株菌株无颜色变化,鉴定为阴性菌株,选取阴性菌株用于后续试验。

2.3 乳酸发酵菌株的形态学分析

利用革兰氏染色法对上述 125 个生理阴性菌进行染

色,在 100 倍油镜下观察其细胞形态,得到 120 株呈蓝紫色阳性菌株。进一步对这些菌株进行产酸能力测试,每个地区筛选出一株产酸能力较强的菌株用于形态学鉴定(图 2)。由表 4 和图 3 可知,有 14 株为杆状菌,1 株为球状菌;1 株菌落颜色为黄色,14 株菌落颜色为白色。

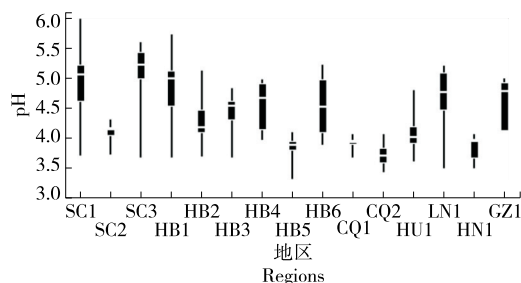


图 2 120 株菌株产酸能力箱式图

Figure 2 Box diagram of acid production capacity of 120 strains

表 4 乳酸菌的形态学鉴定结果

Table 4 Results of morphological characterization of lactic acid bacteria

菌株编号	菌株来源	菌落颜色	细胞形态	革兰氏染色
LA-1	CS1	白色	杆状	+
LA-2	CS2	白色	杆状	+
LA-3	CS3	白色	杆状	+
LA-4	HB1	白色	球状	+
LA-5	HB2	白色	杆状	+
LA-6	HB3	白色	杆状	+
LA-7	HB4	白色	杆状	+
LA-8	HB5	黄色	杆状	+
LA-9	HB6	白色	杆状	+
LA-10	CQ1	白色	杆状	+
LA-11	CQ2	白色	杆状	+
LA-12	HLJ1	白色	杆状	+
LA-13	LN1	白色	杆状	+
LA-14	HN1	白色	杆状	+
LA-15	GZ1	白色	杆状	+

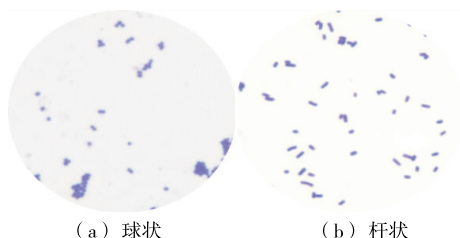


图3 乳酸菌的细胞形态

Figure 3 The cell morphology of lactic acid bacteria ($100\times$)

2.4 乳酸发酵菌株的分子鉴定

由图 4 可知, LA-4 菌株与戊糖片球菌属 (*Pediococcus pentosaceus*) 菌株的同源性最高(99%)、LA-6 与芽孢杆菌属 (*Bacillus subtilis*) 菌株的同源性最高(90%), 其余 13 株与植物乳杆菌属 (*Lactiplantibacillus plantarum*) 菌株的同源性最高(99%)。结合形态学和生理生化试验结果判定 1 株为戊糖片球菌、1 株为芽孢杆菌、13 株为植物乳杆菌。其中, 四川、重庆、辽宁、贵州、湖南、湖北南坪等地区筛选到的乳酸发酵菌株为植物乳杆菌属, 湖北团堡地区筛选到的芽孢杆菌和戊糖片球菌可能是同一地区因制作方法、发酵温度、发酵时间的不同存在差异。

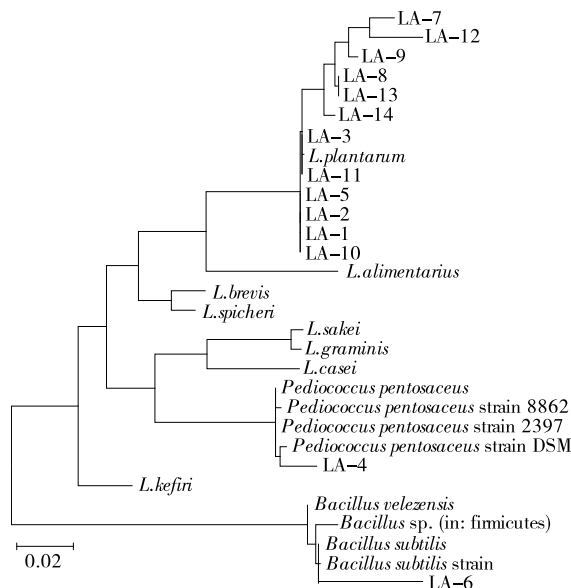


图 4 乳酸菌菌株系统进化树

Figure 4 Phylogenetic tree of lactobacillus strains

2.5 生长特性分析

2.5.1 优势菌株生长曲线 从湖北、湖南、贵州、四川、辽宁等地区泡菜母水中筛选得到的菌株在 30 ℃ 下生长良好,从黑龙江的泡菜母水中筛选到一株低温(4 ℃)下生长的菌株,但该菌株生长速度缓慢,难于富集培养。对其余 14 株菌株进行生长能力分析,结果如图 5 所示。由图 5 可知,部分菌株在前 0~6 h 为适应期,6~24 h 为对数期,24 h 后进入稳定期。

2.5.2 优势菌株产酸能力 乳酸菌利用发酵底物产生乳酸等有机酸^[20],使得发酵环境 pH 值下降^[21],其利用酸环境从而实现抑制不耐酸的有害微生物的作用^[22-23]。因此,乳酸菌的产酸能力也是鉴定乳酸菌发酵能力的重要指标。

由图 6 可知,菌株在适应期时液体培养基 pH 值无明显下降,不断生长达到指数期时 pH 值达到最低值,进入

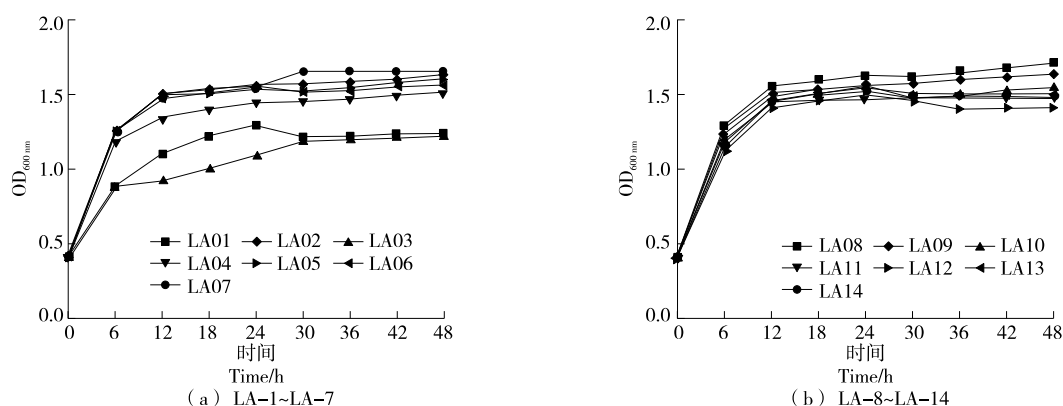


图5 乳酸菌生长曲线

Figure 5 Growth curve of four strains of lactic acid bacteria

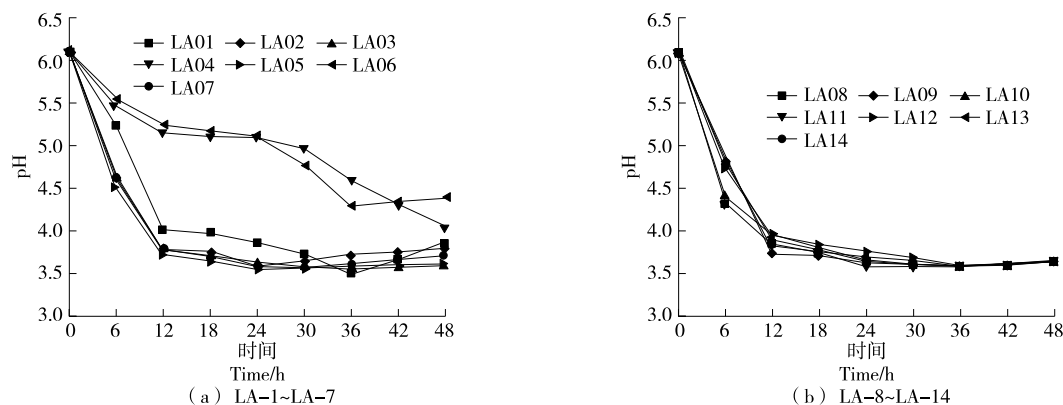


图6 乳酸菌生长过程中 pH 值的变化

Figure 6 Changes of values pH during the growth of lactic acid bacteria

稳定期后, pH 值趋于稳定并无明显变化。结果表明, 生长速率越快, 乳酸菌产乳酸等有机酸速率越快, 菌株产酸能力越强。

2.5.3 不同类型菌株生长特性 为进一步比较不同类型乳酸发酵菌株的发酵能力, 结合生长曲线和产酸能力曲线, 选择 LA-4(戊糖片球菌)、LA-6(芽孢杆菌)、LA-8(黄色植物乳杆菌)、LA-11(白色植物乳杆菌)进行生长特性及耐受性分析。为确保试验准确性, 将菌液 OD 值调到一致进行后续试验。

由图 7 可知, LA-4 和 LA-6 在前 12 h 为适应期、12~30 h 为对数期、30 h 后进入稳定期。LA-8 和 LA-11 在前 6 h 为适应期、6~24 h 为对数期, 24 h 后进入稳定期。LA-4 和 LA-6 的生长能力明显低于 LA-8 和 LA-11 的。LA-4 和 LA-6 的平均 OD_{600 nm} 为 1.26, LA-8 和 LA-11 的平均 OD_{600 nm} 为 1.62。

由图 8 可知, LA-4、LA-6 发酵至稳定期时 pH 值无明显下降趋势, 结合生长曲线可以发现其生长速率较慢、最低 pH 可达 3.78; LA-8 和 LA-11 的产酸能力接近且较强, 发酵至 48 h 时 pH 最低(3.50)。

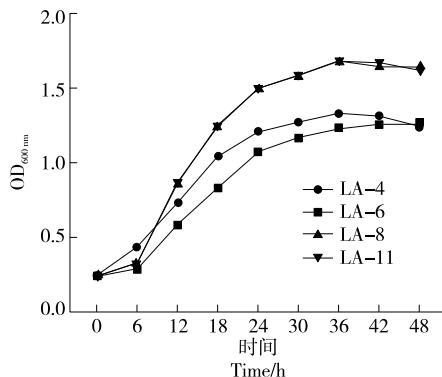


图7 4 株不同类型菌株的生长曲线

Figure 7 Growth curves of four different types of strains

2.6 优势乳酸发酵菌株的耐受试验

2.6.1 耐盐能力 由图 9 可知, 不同盐含量下, 发酵菌株的生长能力受到不同程度的影响。对照组中, LA-4 和 LA-6 在前 12 h 为适应期、12~30 h 为对数期、30 h 后为稳定期。LA-8 和 LA-11 在前 6 h 为适应期、6~24 h 为对数期, 24 h 后进入稳定期。LA-4 在 6% NaCl 含量下受

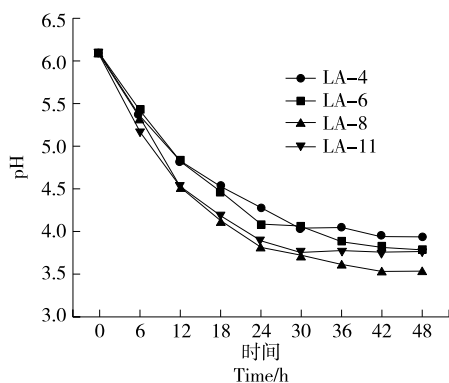
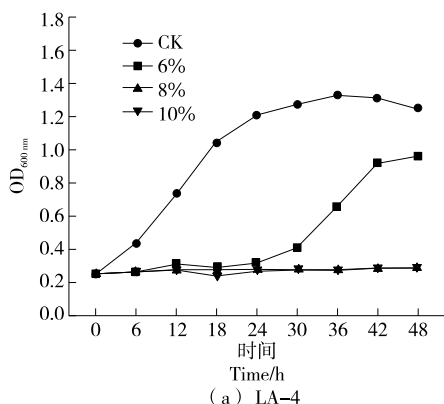
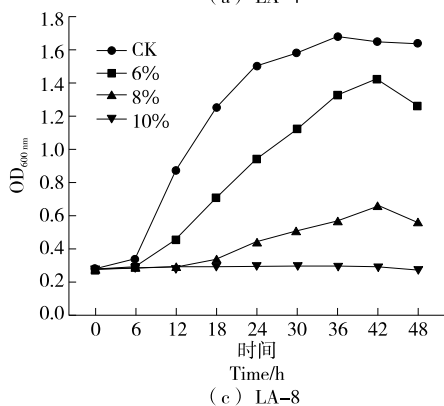


图 8 4 株不同类型菌株的产酸能力

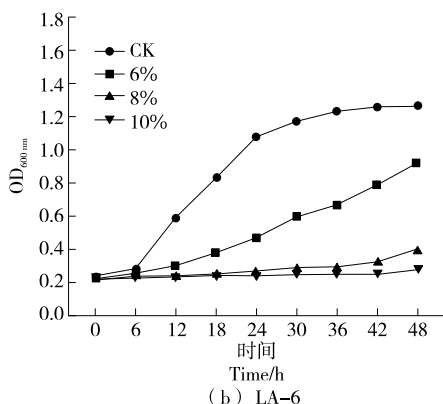
Figure 8 Acid-producing capacity of four strains of different types of bacteria



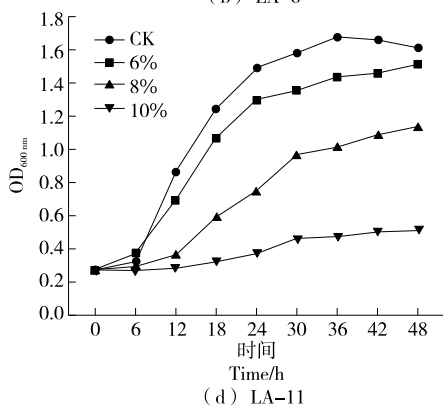
(a) LA-4



(c) LA-8



(b) LA-6



(d) LA-11

图 9 4 株菌株的耐盐能力曲线

Figure 9 Salt-tolerance curves of four different strains

酵蔬菜中亚硝酸盐含量不得超过 20 mg/kg,因此发酵菌种对亚硝酸盐的降解能力非常重要。试验结果表明,4 株菌株均具有较高的降解 NaNO_2 能力,培养 12 h 后,亚硝酸盐含量由 40 mg/kg 降至 0 mg/kg。

2.6.3 耐糖能力 由图 10 可知,与对照组相比,乳酸菌在高糖渗透压下的生长会受到限制。在 6%,10%,15% 的糖含量中各菌株均能生长,生长速度为 6% > 10% > 15%,均表现较好的耐受性。黄色植物乳杆菌在不同糖

到抑制,生长速率缓慢;在 8%,10% NaCl 含量下不生长。LA-6 在不同 NaCl 含量下生长适应期均变长,在 6%,8% NaCl 含量下生长速率受到抑制,生长速度缓慢;在 10% NaCl 含量下停止生长。LA-8 在 6% NaCl 含量时,前 12 h 为适应期,42 h 达到最大值,生长良好;在 8% NaCl 含量下,生长速率明显受到抑制,生长速度缓慢,适应期变长;在 10% NaCl 含量下不生长。LA-11 在不同 NaCl 含量中均表现出较强的耐受性,在 6% NaCl 含量下生长速率较快,生长良好;在 8% NaCl 含量下菌株适应期为 12 h,生长速度缓慢;在 10% NaCl 含量下生长虽受到抑制,但仍能生长,说明具有一定的耐盐性,具有作为发酵菌株的潜力。

2.6.2 降解亚硝酸盐能力 GB 2762—2017 中规定,发

含量下均能生长且生长速率明显优于其余菌株,表现出较强的生长能力和耐高糖的能力。

2.7 萝卜发酵初试及风味物质检测

2.7.1 萝卜发酵初试 按照发酵流程,选择新鲜的萝卜清洗干净,在无菌环境下切块分装于三角瓶中。100 g 的无菌水中加入 50 g 萝卜块、2% 盐、5% 优势菌株,置于 250 mL 的三角瓶中进行发酵。发酵 3 d 后,其 pH 值及感官评价见表 5、表 6。

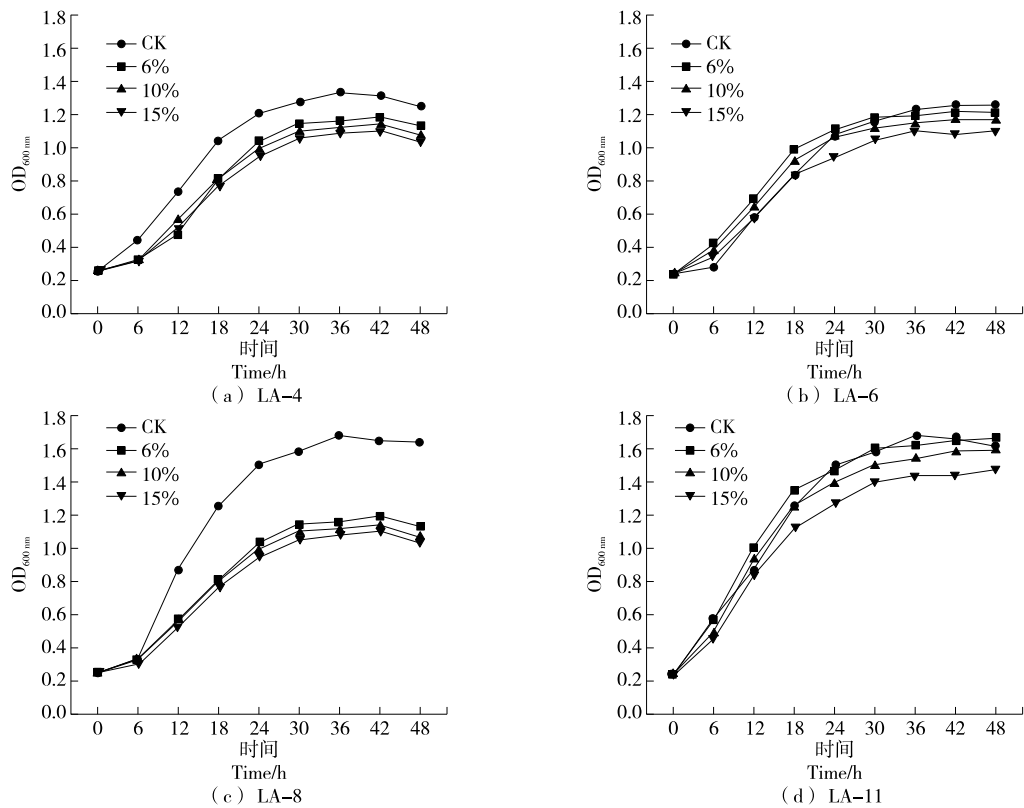


图 10 4 株菌株的耐糖能力曲线

Figure 10 Sugar tolerance curves of four strains of different types

2.7.2 风味物质检测 乳酸菌作为蔬菜发酵过程中的主要“动力”，其参与调控多种代谢途径而影响风味的形成^[24]。由图 11 可知，LA-4 和 LA-11 的样本具有交叉重叠现象；LA-6 和 LA-8 的数据均分布于不同区域，无重叠现象。PC1、PC2 的方差贡献率分别为 97.32% 和 2.25%，LD1、LD2 的方差贡献率分别为 96.68% 和 2.13%，LD1、

LD2 的总贡献率为 98.81%，说明 4 株菌株之间的挥发性气味有较大差异，PEN3 型电子鼻传感器能够准确识别出不同细菌的特征气味，采用 PCA 和 LDA 方法能对其进行较好的区分。

在 Loadings 负荷加载分析方法中，通过 10 个不同传感器对主成分 1 和主成分 2 上的贡献率进行分析，从而归属样品中挥发性成分类别。由图 12 可知，传感器 W1W(无机硫化物)和 W2W(有机硫化物)的作用最大，传感器 W1S(甲基类)、W2S(醇类、醛酮类)和 W5S(氮氧化合物)的作用次之，而传感器 W1C、W3C、W6S 和 W5S、W3S 的负载因子作用最小。

胡此海等^[25]通过高通量测序得知，四川泡菜中微生物主要群落为厚壁菌门和子囊菌门，占比>99%，优势细菌为乳杆菌属和片球菌；胡静等^[26]的研究结果也证实了这一点，与试验结果相似。赵玉娟等^[27]通过对东北地区泡菜母水筛选鉴定，发现乳杆菌是发酵中后期的优势菌株，与试验结果一致。植物乳杆菌能有效抑制有害肠杆菌，发酵速度快，发酵效果好。倪慧等^[28]对湖北恩施市 5 份泡萝卜中的乳酸菌进行分离鉴定，筛选得到 18 株菌株隶属于 2 属，分别为乳酸杆菌属和片球菌属，且植物乳杆菌为优势菌株，与试验结果既有相似之处也有不同。其相同点为：湖北地区筛选得到的优势乳酸菌为植物乳

表 5 发酵后 pH 值变化

Table 5 pH value changes after fermentation

菌株	发酵前	发酵后	菌株	发酵前	发酵后
LA-4	6.0	4.42	LA-11	6.0	2.97
LA-6	6.0	4.49	自然发酵	6.0	5.10
LA-8	6.0	3.05			

表 6 发酵后的感官评价

Table 6 Sensory evaluation after fermentation

菌株	气味/色泽	滋味/质地
LA-4、LA-6	有淡淡的泡菜清香味、无不良气味、色泽正常	萝卜较脆、不发软、无杂菌、口感适宜
LA-8、LA-11	有浓郁的泡菜清香味、无不良气味、色泽正常	脆嫩不发软、无杂菌、清爽可口
自然发酵	无明显泡菜气味，颜色较淡	萝卜较硬、不发软、无杂菌

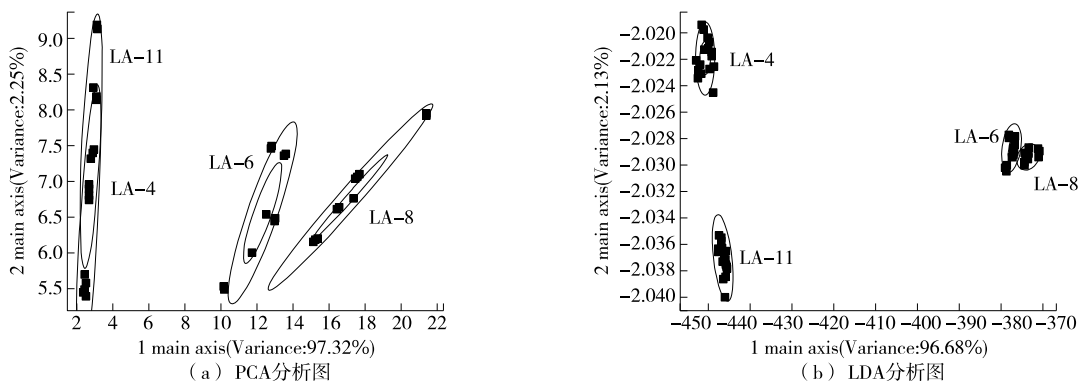


图 11 乳酸菌发酵 48 h 后的 PCA 分析和 LDA 分析

Figure 11 PCA analysis and LDA analysis after 48 h lactic acid bacteria fermentation

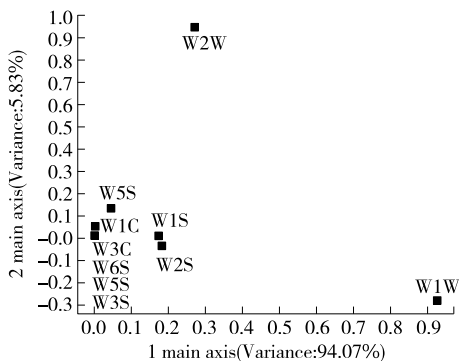


图 12 乳酸菌发酵 48 h 后的 Loadings 分析

Figure 12 Loadings analysis after lactic acid bacteria fermentation for 48 h

杆菌和戊糖片球菌。不同点为: 试验在该地区筛选到一株黄色植物乳杆菌, 该菌株生长能力、发酵能力、耐受性等强于白色植物乳杆菌。同时, 试验还筛选得到 1 株芽孢杆菌, 该菌株生长能力和发酵能力与植物乳杆菌相近, 耐受能力弱于植物乳杆菌。这可能是同一地区不同泡菜母水的制作方法、原材料、发酵温度不同导致的。

3 结论

对 15 份不同地区泡菜发酵母水进行了优势菌株初筛、复筛、生理鉴定、形态学鉴定等试验。结果表明, 各地区筛选到 1 株发酵能力较强的优势发酵菌株。16S rDNA 分子鉴定结果表明, 1 株为芽孢杆菌、13 株为植物乳杆菌, 1 株为戊糖片球菌。LA-8 菌株表现为生长速度快、产酸能力高、在 10% 盐和 15% 糖中生长能力强, 具备较强的降解亚硝酸盐能力。LA-11 菌株的生长速度和产酸能力与 LA-8 的一致。LA-11 菌株在 6%, 8% 盐和 15% 糖中生长能力好, 但在 10% 盐中生长能力较差。芽孢杆菌 LA-6 和戊糖片球菌 LA-4 在生长速度和产酸能力上均低于其他两株菌株, 其不同浓度的盐和糖下生长能力均较差。以筛选得到的 4 株菌株进行萝卜发酵试验, 发酵 3 d 后植物乳杆菌产酸能力强, 生长速度快。发酵 3 d 后

的萝卜色泽正常、无杂菌、无污染, 酸爽脆嫩。后续可利用该研究筛选到的优势乳酸发酵菌株进行萝卜泡菜规模化生产。

参考文献

- [1] JING P, SONG L H, SHEN S Q, et al. Characterization of phytochemicals and antioxidant activities of red radish brines during lactic acid fermentation[J]. *Molecules*, 2014, 19(7): 9 675-9 688.
- [2] 赵杰, 唐琴丽. 发酵蔬菜研究进展[J]. *食品工业*, 2023, 44(8): 225-230.
ZHAO J, TANG Q L. Research progress of fermentation vegetables [J]. *The Food Industry*, 2023, 44(8): 225-230.
- [3] 汪铃, 王亮. 传统发酵蔬菜制作工艺、品质特征及影响因素研究概况[J]. *中国酿造*, 2022, 41(7): 21-25.
WANG L, WANG L. Overview of production process, quality characteristics and influencing factors of traditional fermented vegetables[J]. *China Brewing*, 2022, 41(7): 21-25.
- [4] 陈镜如, 边鑫, 杨杨, 等. 中国传统发酵食品微生物多样性研究进展[J]. *中国调味品*, 2022, 47(2): 205-210.
CHEN J R, BIAN X, YANG Y, et al. Research progress on microbial diversity of traditional fermented food in China[J]. *China Condiment*, 2022, 47(2): 205-210.
- [5] TAMANG J P, WATANABE K, HOLZAPFEL W H. Review: diversity of microorganisms in global fermented foods and beverage [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 15-19.
- [6] 张杨. 两种来源乳杆菌的分离鉴定及遗传多态性研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2008: 1-2.
ZHANG Y. The isolation, identification and genetic diversity analysis of *Lactobacilli* of two sources [J]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2008: 1-2.
- [7] 王储炎, 张继刚, 杨柳青. 3 种乳酸菌发酵对蓝莓多酚、原花青素含量及抗氧化活性的影响[J]. *食品科学*, 2020, 41(24): 87-94.
WANG Z Y, ZHANG J G, YANG L Q. Comparative effects of fermentation with three species of lactic acid bacteria on polyphenol and proanthocyanidin contents and antioxidant activity of blueberry

- fruit[J]. Food Science, 2020, 41(24): 87-94.
- [8] 冉艳红, 杨春哲, 黄雪松. 乳酸菌在果蔬加工中的应用现状与前景[J]. 中国调味品, 2000(6): 10-13.
- RAN Y H, YANG C Z, HUANG X S. Lactic acid bacteria in fruit and vegetable food processing [J]. China Condiment, 2000 (6): 10-13.
- [9] HASHIMOTO T. The cause on the abnormal accumulation of nitrite in pickles of Chinese cabbage(*brassica pekinensis* rupr) [J]. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 2001, 48(6): 409-415.
- [10] COCKBURN A, BRAMBILLA G, FERNÁNDEZ M L, et al. Nitrite in feed: from animal health to human health[J]. Toxicology & Applied Pharmacology, 2013, 270(3): 209-217.
- [11] KARWOWSKA M, KONONIUK A. Nitrates/nitrites in food-risk for nitrosative stress and benefits[J]. Antioxidants, 2020, 9(3): 241.
- [12] WEITZBERG E, LUNDBERG J O. Novel aspects of dietary nitrate and human health[J]. Annual Review of Nutrition, 2013, 33(1): 129-159.
- [13] 邹辉, 刘晓英, 陈义伦, 等. 泡菜(白菜)腌制过程中有机酸对亚硝酸盐含量的影响[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(11): 29-32.
- ZOU H, LIU X Y, CHEN Y L, et al. Effect of organic acids on the concentration of nitrite during pickle (Chinese cabbage) fermentation[J]. Food and Fermentation Industries, 2013, 39(11): 29-32.
- [14] 皮佳婷, 刘冬敏, 王建辉, 等. 乳酸菌降解泡菜中亚硝酸盐的机制及应用研究现状[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(24): 301-307.
- PI J T, LIU D M, WANG J H, et al. Advances on nitrite degradation mechanisms of lactic acid bacteria in pickles[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(24): 301-307.
- [15] 胡蝶, 赵鑫, 张素平, 等. 降解亚硝酸盐乳酸菌的筛选鉴定及发酵特性研究[J]. 中国调味品, 2022, 47(6): 1-4, 9.
- HU D, ZHAO X, ZHANG S P, et al. Study on screening, identification and fermentation characteristics of nitrite-degrading lactic acid bacteria[J]. China Condiment, 2022, 47(6): 1-4, 9.
- [16] 忻晓庭, 刘大群, 张程程, 等. 我国特色发酵蔬菜降解亚硝酸盐菌株的筛选鉴定及应用[J]. 浙江农业学报, 2021, 33(2): 335-345.
- XIN X T, LIU D Q, ZHANG C C, et al. Screening, identification and application of high efficient nitrite degrading functional strains in chinese characteristic fermented vegetables [J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2021, 33(2): 335-345.
- [17] 张晓娟, 夏珊. 我国传统泡菜乳酸菌资源研究与开发[J]. 中国调味品, 2016, 41(1): 147-151.
- ZHANG X J, XIA S. Research and development of Chinese traditional pickles lactic acid bacteria resources [J]. China Condiment, 2016, 41(1): 147-151.
- [18] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 66-128.
- DONG X Z, CAI M Y. Common bacterial system identification manual[M]. Beijing: Science Press, 2001: 66-128.
- [19] BERGEY R E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8版. 中国科学院微生物研究所, 译. 北京: 科学出版社, 1984: 382-533.
- BERGEY R E. Bergey's manual of determinative bacteriology[M]. Version 8. Translated by Institute of Microbiology Chinese Academy of Science. Beijing: Science Press, 2001: 382-533.
- [20] ZHAO N, ZHANG C, YANG Q, et al. Multiple roles of lactic acid bacteria microflora in the formation of marker flavour compounds in traditional Chinese paocai[J]. RSC Advances, 2016, 92: 89 671-89 678.
- [21] 史巧, 刘毕琴, 汤回花, 等. 发酵蔬菜菌种应用及菌群调控研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(5): 273-281.
- SHI Q, LIU B Q, TANG H H, et al. Research progress on the application of starter strains and the regulation of microflora in vegetable fermentation[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(5): 273-281.
- [22] 杨晶, 黄玉军, 姚瑶, 等. 植物乳杆菌 5-7-3 发酵产生的有机酸对亚硝酸盐的降解作用研究[J]. 中国调味品, 2019, 44(3): 22-25.
- YANG J, HUANG Y J, YAO Y, et al. Degradation of nitrite by organic acids produced by *Lactobacillus plantarum* 5-7-3 fermentation[J]. China Condiment, 2019, 44(3): 22-25.
- [23] ZACHAROF M P, LOVITT R W. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article[J]. Apcbee Procedia, 2012, 2: 50-56.
- [24] 侯小艺, 王建辉, 邓娜, 等. 乳酸菌对发酵蔬菜风味影响研究进展[J]. 食品与机械, 2023, 39(4): 232-240.
- HOU X Y, WANG J H, DENG N, et al. Research progress on the effect of lactic acid bacteria on the flavor of fermented vegetables [J]. Food & Machinery, 2023, 39(4): 232-240.
- [25] 胡此海, 杨絮, 郭全友, 等. 四川泡菜母水的微生物群落与理化特性分析[J]. 中国食品学报, 2024, 24(2): 281-291.
- HU C H, YANG X, GUO Q Y, et al. Analysis of microbial community and physicochemical characteristics in sichuan pickle brine [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2024, 24(2): 281-291.
- [26] 胡静, 黄爱兰, 黄顺, 等. 四川泡菜中植物乳杆菌的筛选与鉴定[J]. 现代食品科技, 2022, 38(10): 86-91.
- HU J, HUANG A L, HUANG S, et al. Isolation and identification of *Lactobacillus plantarum* in Sichuan Paocai[J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(10): 86-91.
- [27] 赵玉娟, 刘才子, 高岩松, 等. 东北酸菜发酵乳酸菌的筛选及评价[J]. 现代食品科技, 2024, 40(3): 121-130.
- ZHAO Y J, LIU C Z, GAO Y S, et al. Screening and evaluation of lactic acid bacteria for Dongbei Suancai fermentation[J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(3): 121-130.
- [28] 倪慧, 王强, 魏冰倩, 等. 恩施市泡萝卜中乳酸菌的分离鉴定及其对品质的影响[J]. 食品工业科技, 2019, 40(17): 64-68, 78.
- NI H, WANG Q, WEI B Q, et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria from pickled radish in Enshi and its effects on quality[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(17): 64-68, 78.