

泡菜中乳酸菌的分离鉴定及其耐 NaCl 胁迫与产酸能力研究*

杨振泉,张咪,王晓霖,梅秋艳,周海波

(扬州大学 食品科学与工程学院,江苏 扬州,225127)

摘要 比较了 NaCl 含量为 2.0% (低盐) 和 8.0% (高盐) 的泡菜在自然发酵过程中 pH 值、菌落总数、大肠菌群以及乳酸菌数的变化趋势,并对高盐泡菜中的乳酸菌进行了分离鉴定,探讨了不同分离株在蔬菜汁模型中耐 NaCl 胁迫能力与产酸特性。结果表明,高浓度 NaCl 对蔬菜自然携带的菌群具有明显抑制作用,高盐泡菜的起始菌落总数、乳酸菌总数、大肠菌群数以及 pH 下降速度均显著低于低盐泡菜,但发酵 144 h 后两者均能使产品 pH 达到 3.5~3.8,大肠菌群数 ≤ 90 MPN/100 g。从高盐泡菜不同发酵阶段的卤水中分离获得 1 株屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*, M0) 和 4 株植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*, M1、M3、M4 和 M6)。菌株在 0~10% NaCl 蔬菜汁中的生长动力学参数具有显著差异,其中 *E. faecium* M0 具有最高的生长速度和耐 NaCl 胁迫能力。以菌株 *E. faecium* M0 和 *L. plantarum* M3 按 1:1 接种 8.0% NaCl 蔬菜汁产酸速度最快,发酵 48 h pH 值降至 3.5,显著低于对照组和其他菌株接种组 ($P < 0.05$)。

关键词 泡菜;乳酸菌;氯化钠胁迫;产酸能力

蔬菜泡制不仅是一种良好的蔬菜保藏途径,而且形成的泡菜产品清淡爽口、具有独特的风味。蔬菜泡制可以直接添加有机酸进行酸化,也可以通过微生物厌氧发酵酸化,我国泡菜主要是通过后者形成^[1]。发酵酸化不仅对蔬菜的营养物质破坏较小,而且发酵过程中形成的多种氨基酸、维生素、酶,以及对人体健康有益的乳酸菌可以提高发酵蔬菜的营养价值^[2-3]。泡菜发酵中盐浓度控制是产品品质和安全性的重要影响因素。高浓度盐产生的高渗透压作用能够使微生物细胞发生质壁分离,导致微生物生长抑制或者死亡,从而有效控制蔬菜中有害微生物的数量^[4]。另一方面,高浓度的盐对蔬菜携带的发酵菌群系(主要是乳酸菌)的生长繁殖产生抑制,导致产酸量减少,发酵周期延长^[5]。近年来接种发酵技术被应用于泡菜的生产,接种纯乳酸菌或者复合菌种发酵剂比自然发酵产酸的能力强,大大缩短了泡菜的生产周期,保持了产品质量的稳定性^[6-7]。筛选繁殖快、产酸能力强并且对发酵蔬菜环境适应性好的菌种是制备高品质泡菜发酵剂的前提。微生物的耐盐胁迫能力与其在含盐环境中的繁殖和代谢能力密切相关^[8-10],研究耐盐性微生物在泡菜发酵过程中的消长规律可以指导泡菜工艺的改进,同时有利于获得

适合不同盐含量泡菜发酵的优良菌种。本文研究了不同盐浓度的泡菜在自然发酵过程中 pH 值、菌落总数、大肠菌群以及乳酸菌数的变化规律,并对高盐泡菜中的乳酸菌进行分离鉴定,探讨不同分离株在蔬菜汁模型中耐 NaCl 胁迫能力与产酸特性,为提高不同盐度泡菜发酵产酸速度、缩短成熟周期提供合适菌种。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料

泡菜制备所需新鲜胡萝卜、黄瓜、白菜以及食盐均采购于扬州当地市场。

1.1.2 培养基与试剂

营养肉汤琼脂培养基、伊红美蓝琼脂、MRS 培养基均为广州环凯生物试剂有限公司产品;分子生物学试剂蛋白酶 K、10 × Buffer、dNTPs、*Taq* 酶、DNA Marker 等购自上海生工生物工程有限公司;细菌 16S rDNA 扩增引物 8F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 15R:5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3',由上海生工生物工程有限公司合成;其他化学试剂均为国产分析纯。

1.1.3 主要仪器与设备

PHS-3C pH 计,上海精密科学仪器有限公司;FP-110-C 自动生长曲线分析仪,芬兰 Bioscreen 公司;XSP-BM-12CAC 显微镜,上海彼爱姆光学仪器制造公

第一作者:博士,副教授。

* 国家自然科学基金(31371806);江苏省重点实验室开放课题;江苏省青蓝工程资助项目。

收稿日期:2014-11-09,改回日期:2015-03-10

司;UV-2401PC 紫外分光光度计,日本岛津公司;TG16-WS 型台式高速离心机,湘仪离心机仪器有限公司;DGX-9053B-2 型生化培养箱,上海福玛实验仪器有限公司;PTC-100 型 PCR 仪,美国 MJ 公司;DYY-SB 型稳压稳流电泳仪,北京市六一仪器厂;Tanon-2500 凝胶成像系统,上海天能科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 泡菜自然发酵

挑选新鲜、没有蛀虫及腐烂现象的蔬菜,切除头部用清水洗净,晾干。将白菜和配料切成 3~4 cm 的长条或薄片,混合均匀,放入泡菜坛,压实。将已经冷却的 20 g/L 和 80 g/L 的盐水倒入坛中,盐水高出料面 2 cm,将泡菜坛的盖紧,在室温下自然发酵,定期取样分析,第 1 天的 0~12 h 每隔 2 h 取样 1 次,24 h 后每隔 1 天取样 1 次。

1.2.2 pH 值测定

用无菌吸量管取 10 mL 的泡菜卤水,用 pH 计测量泡菜的 pH 值,取 3 组平行的平均值描述泡菜 pH 随时间的变化趋势。

1.2.3 菌落总数测定

无菌吸取泡菜卤水 1 mL 注入含有 9 mL 灭菌生理盐水的试管中,经充分振摇后做成 1:10 的均匀稀释液。再按上述方法,做 10 倍递增稀释。选择 5 个适宜的稀释度,取 250 μ L 的稀释液于营养肉汤琼脂培养基,每个稀释度做两个培养皿,将营养肉汤琼脂板倒置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 24 h 后,人工计数并计算菌落总数 (CFU/mL)。

1.2.4 大肠菌群测定

无菌吸取泡菜卤水 1 mL 注入含有 9 mL 灭菌生理盐水的试管中,经充分振摇后做成 1:10 的均匀稀释液,10 倍递增稀释。选择 3 个合适的稀释度接种于乳糖胆盐发酵管内,每个稀释度接种 3 管,置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 24 h。产气管划线接种于伊红美蓝琼脂平板,37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 24 h,观察菌落形态,挑取典型菌落做革兰氏染色和证实试验,根据大肠菌群阳性管数,查 MPN 检索表报告大肠菌群的最大可能数 (MPN/100 mL)。

1.2.5 乳酸菌分离与鉴定

1.2.5.1 乳酸菌的计数与分离

发酵卤水样品充分混匀后用灭菌生理盐水 10 倍稀释。吸取 250 μ L 不同稀释度样品液涂布含有 0.75% CaCO_3 的 MRS 平板,放入厌氧罐,37 $^{\circ}$ C 恒温培养 48 h,选择分离程度较好的平板对有溶钙圈的菌

落计数,计算乳酸菌数量 (CFU/mL)。取菌落进行革兰氏染色,镜检细胞形态,挑取单菌落在 MRS 平板上反复划线纯化,挑取单菌落接种于 MRS 液体培养基,置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱厌氧培养 24 h 后, -20 $^{\circ}$ C 冻存备用。

1.2.5.2 乳酸菌生理生化鉴定

按文献^[11]所述的方法对接触酶阴性、产酸的革兰氏阳性菌进行耐盐性、温度、耐酸碱、动力学以及糖和氨基酸发酵试验,细菌的细胞微观形态采用显微镜拍摄观察。

1.2.5.3 16S rDNA 扩增及测序鉴定

乳酸菌基因组 DNA 的提取方法参照文献^[12]所述的 CTAB 法提取。以基因组 DNA 为模板进行 16S rDNA 的 PCR 扩增。PCR 反应体系 (50 μ L) 包括:模板 (50 ng/ μ L) 2.0 μ L、dNTPs (10 mmol/L) 2.0 μ L、25 pmol/ μ L 引物 8F 和 15R 各 2.0 μ L、10 \times Buffer 5.0 μ L、 MgCl_2 (25 mmol/L) 2.0 μ L、Tag 酶 (5 U/ μ L) 0.3 μ L,最后加 ddH₂O 补足至 50 μ L。热循环参数为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 50 $^{\circ}$ C 退火 50 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2.0 min, 35 次循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 7.0 μ L PCR 产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测片段大小,其余 PCR 产物委托上海生物工程有限公司测序,所得序列在 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库中进行在线比对,序列同源性大于 99% 设为相同种。

1.2.6 乳酸菌在不同盐浓度黄瓜汁中的生长曲线测定

从 -70 $^{\circ}$ C 冰箱里取出菌种,0 $^{\circ}$ C 解冻,无菌吸取 200 μ L 菌液于 5 mL MRS 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 厌氧培养 36 h 后取培养物划线接种 MRS 固体平板,37 $^{\circ}$ C 厌氧培养 36 h,挑取单菌落接种于培养基中,37 $^{\circ}$ C 厌氧培养 24 h,离心取菌体,灭菌生理盐水洗涤 2 次后,调节 OD_{600nm} = 0.5。取菌悬液进行梯度稀释后涂布 MRS 平板,37 $^{\circ}$ C 厌氧培养 36 h 后进行菌落计数。分别取 15 mL 澄清透明的黄瓜汁 (50%, V/V) 于 7 根试管中,分别加入 0、0.3、0.6、0.9、1.2 和 1.5 g NaCl 于试管中振荡溶解,用 0.45 μ m 滤器过滤除菌,分装备用。取 20 μ L 不同菌悬液接种 2.0 mL 不同 NaCl 浓度的黄瓜汁中充分混匀,转移至多孔培养板,每孔 400 μ L,每样 3 孔平行,未接种黄瓜汁作为空白对照;将接菌后的培养板盖上盖子,放入 Bioscreen 自动生长曲线分析仪中,参数设置为 30 $^{\circ}$ C 培养 60 h,波长 580 nm,每 60 min 读取 1 次数据。以 OD_{580nm} 平均值

为纵坐标,时间为横坐标,绘制生长曲线。

1.2.7 乳酸菌的生长动力学参数计算

生长动力学参数计算参考文献^[13]进行,通过 Sigmaplot 10.0 软件中的非线性拟合程序中的参数 Gompertz 模型对生长曲线进行拟合,拟合方程转换成 $N_t = A + C \times \exp\{-\exp[-B(t-M)]\}$, 菌株最大生长速度 $\mu_{\max} = B \times C/e$, 其中 e 取 2.718, 单位 h^{-1} ; 最大群体密度 $N_{\max} = A + C$, 单位 OD_{580nm} 。

1.2.8 乳酸菌分离株产酸能力测定

乳酸菌复苏、培养以及悬液制备同 1.2.6, 将用于自然发酵的泡菜原料匀浆制成蔬菜汁培养基, 起始盐浓度为 8% (W/V), 每管分装 15 mL 用于接种发酵, 每管接种浓度分别为 10^6 和 10^8 CFU/mL, 分为对照组(未接种); M0、M1、M3、M4 和 M6 单独接种组; M0 + M3(1:3)、M0 + M3(1:1)、M0 + M3(3:1)、M0 + M6(1:3)、M0 + M6(1:1) 和 M0 + M6(3:1) 组合接种组。每隔 24 h 各取 3 管测量 pH, 取平均值描述 pH 随发酵时间的变化。

2 结果与讨论

2.1 盐含量对泡菜发酵过程中 pH 值变化的影响

对低盐和高盐泡菜在发酵过程中 pH 值变化的测定结果如图 1 所示。高浓度盐(8.0%)可明显减缓泡菜的 pH 值的下降, 延长泡菜的发酵周期。一般来说, 泡菜液 pH 值达到 3.5~3.8 即可认为泡菜已发酵成熟^[14]。本研究中起始盐含量为 2.0% 的泡菜产酸速度较快, 在 24 h 卤水 pH 下降了 3.0 个单位, 发酵 72 h 后 pH 维持在 3.5 左右; 而起始盐含量 8% 的泡菜产酸速度显著减小, 发酵至 144 h 卤水 pH 值才降低到 3.6, 结果表明高浓度盐抑制了乳酸菌的生长代谢, 导致酸化速度减慢。

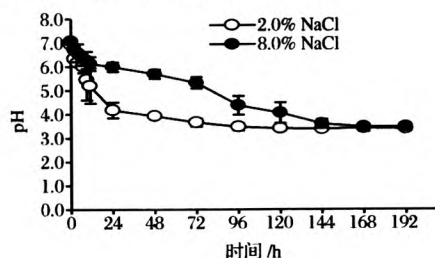


图 1 盐含量对泡菜发酵过程中 pH 变化的影响

Fig. 1 The effect of salt concentration on pH change during pickle fermentation

2.2 盐含量对泡菜发酵过程中菌落总数变化的影响

对不同盐含量的泡菜在发酵过程中的菌落总数

变化测定结果如图 2 所示。结果显示盐含量为 2% 的泡菜的起始菌落总数为 6.92 lg CFU/mL, 发酵 24 h 菌落总数上升至 8.05 lg CFU/mL, 之后随着 pH 下降菌落总数迅速下降到 4.45 lg CFU/mL, 表明有机酸的产生使酸敏感菌群迅速下降。在盐含量为 8% 的泡菜卤水中, 起始菌落总数为 3.11 lg CFU/mL, 随发酵进行(0~120 h)菌落总数缓慢上升到 5.56 lg CFU/mL, 在 144 h 开始下降, 最终降到 4.67 lg CFU/mL。结果表明: 尽管 8.0% NaCl 导致原料中盐敏感细菌的死亡, 减少细菌的初始数量, 但耐盐性细菌在 8.0% NaCl 条件下仍会缓慢生长, 同时高浓度盐也抑制了乳酸菌的生长和产酸, 最终导致菌落总数下降趋势并不明显。

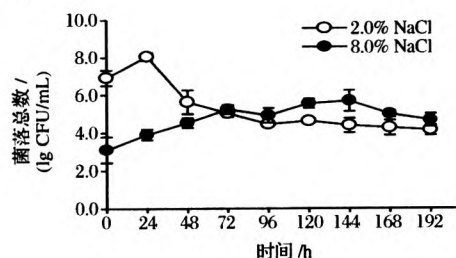


图 2 盐含量对泡菜发酵过程中菌落总数变化的影响

Fig. 2 The effect of salt concentration on the total number of colonies during pickle fermentation

2.3 盐含量对泡菜发酵过程中乳酸菌总数变化的影响

应用改良的 MRS 平板厌氧培养法测定泡菜卤水中的乳酸菌总数变化, 结果如图 3 所示。

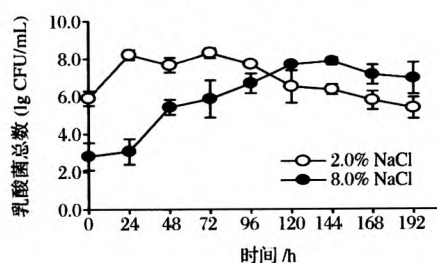


图 3 盐含量对泡菜发酵过程中乳酸菌总数的影响

Fig. 3 The effect of salt concentration on the lactic acid bacteria number during pickle fermentation

起始盐含量为 2.0% 和 8.0% 泡菜在发酵过程中乳酸菌数量变化趋势存在明显差异。在起始盐含量为 2.0% 的泡菜中, 乳酸菌数量总体上呈先增大后减小的趋势, 起始数量为 5.89 lg CFU/mL, 发酵 24 h 后上升到最高(8.21 lg CFU/mL), 72 h 开始逐渐下降, 到 192 h 减低至 5.35 lg CFU/mL, 表明发酵后期有机

酸的累积导致部分兼性厌氧菌的消亡。而 8% 盐浓度的泡菜在发酵 0 ~ 144 h 阶段,乳酸菌浓度从起始 2.92 lg CFU/mL 上升到 7.85 lg CFU/mL,随后缓慢下降,至 192 h 减低到 6.93 lg CFU/mL。结果表明,高浓度的盐抑制了泡菜原料中携带的盐敏感性菌群及乳酸菌的生长速度,但原料中存在的部分耐盐性乳酸菌仍然能够生长和产酸。

2.4 盐含量对泡菜发酵过程中大肠菌群变化的影响

对高盐和低盐泡菜发酵过程中大肠菌群测定结果如表 1 所示。不同盐含量泡菜发酵过程中大肠菌群数量随时间变化趋势均呈先增大后减小的趋势,在 NaCl 浓度为 2.0% 泡菜中,起始大肠菌群数为 110 000 MPN/100 g,第 24 h 上升到最高 (2.4×10^7 MPN/100g),随后逐渐下降到 40 MPN/100 g;在 NaCl 浓度为 8.0% 泡菜中,起始大肠菌群数为 < 30,第 72 h > 24 000,在 96 ~ 192 h 逐渐下降到 90 MPN/100 g,基本趋势与菌落总数的变化一致。结果表明 8.0% NaCl 对大肠菌群中的大多数种属具有抑制作用,但也存在少数耐盐性菌群早期缓慢生长,发酵后期随着酸度增加逐渐消亡,产酸速度是影响大肠菌群数量的主要因素。

表 1 盐浓度对泡菜发酵过程中大肠菌群的影响

Table 1 The effect of salt concentration on coliform during pickle fermentation

发酵时间/h	大肠菌群/[MPN · (100g) ⁻¹]	
	2.0% NaCl	8.0% NaCl
0	110 000	< 30
24	> 24 000 000	< 30
48	150 000	290
72	15 000	> 24 000
96	900	4 600
120	40	2 300
144		1 100
168		230
192		90

2.5 乳酸菌分离与生理生化鉴定结果

从 8% NaCl 泡菜卤水中分离得到 5 株乳酸菌,分别为 M0、M1、M3、M4 和 M6,所有菌株革兰氏染色均为阳性,无芽孢,其中 M0 为球菌,其余 4 株均为杆菌,参照常见细菌系统鉴定手册^[11]中乳酸菌的特征进行生理生化试验,结果如表 2 所示,M0 各项特征与屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*) 相符,M1、M3、M4 和 M6 符合植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 的特征

描述。

表 2 乳酸菌分离株的生理生化鉴定结果

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of lactic acid bacteria isolates

实验项目	分离株				
	M0	M1	M3	M4	M6
运动性	-	-	-	-	-
10℃ 生长	-	-	-	-	-
45℃ 生长	+	-	-	-	-
pH4.5 生长	-	+	+	+	+
pH9.6 生长	+	+	+	+	+
10% NaCl 生长	-/+	-	-	-	-
接触酶	-	-	-	-	-
葡萄糖产气	-	-	-	-	-
淀粉水解实验	-	+	+	+	+
乳糖产酸	+	+	+	+	+
水杨苷产酸	+	+	+	+	+
甘露醇产酸	+	+	+	+	+
纤维二糖产酸	+	+	+	+	+
蔗糖产酸	+	+	+	+	+
山梨醇产酸	-	+	+	+	+
木糖产酸	+	+	+	+	+

2.6 乳酸菌的 16S rDNA 测序鉴定结果

以 5 株乳酸菌分离株的基因组 DNA 为模板,应用引物 8F 和 15R 进行 PCR 扩增,结果扩增产物大小均在 1500 bp 左右。将 16S rDNA 扩增产物测序结果在 GenBank 上进行 Blastn 对比分析,结果如表 3 所示,M0 为屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*),M1、M3、M4 和 M6 均鉴定为植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*),序列同源性均大于 99%,结果与生理生化鉴定结果一致。已有的研究结果显示泡菜中存在着丰富的乳酸菌种群,主要包括乳杆菌属、肠球菌属、葡萄球菌属、片球菌属以及明串珠菌属等,其中植物乳杆菌为优势菌^[15]。本研究从 8% NaCl 泡菜发酵卤水中分离到屎肠球菌和植物乳杆菌,表明这两个种群的一些菌株具有较高的耐盐性。

表 3 分离株 16S rDNA 序列同源性分析结果

Table 3 Results of 16S rDNA sequence homology analysis for isolates

分离株	序列长度 (bp)	基因登录号	最高同源性菌株	最大同源性/%
M0	1485	NC017960.1	<i>Enterococcus faecium</i> DO	99
M1	1484	JX183220.1	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain G8	99
M3	1444	KF472174.1	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain AP1	99
M4	1481	JX183220.1	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain G8	99
M6	1474	JX183220.1	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain G8	99

2.7 乳酸菌分离株在不同盐浓度蔬菜汁模型中的生长动力学参数测定结果

将乳酸菌分离株 *E. faecium* M0 和 *L. plantarum* M1、M3、M4 和 M6 按 1.0% 接种量接种不同 NaCl 含量的黄瓜汁,应用 Bioscreen 自动生长曲线分析仪测定 60 h 生长曲线(结果未列出),通过 Gompertz 方程拟合曲线计算最大生长速率(μ_{\max})和最大群体密度(N_{\max})结果如表 4 所示。结果表明 NaCl 对乳酸菌的生长能力具有明显的抑制作用,4% NaCl 对大多数菌株显示出明显的抑制,使 μ_{\max} 和 N_{\max} 显著下降,随着 NaCl 浓度升高,生长抑制作用逐步增强。不同菌株具有不同的耐盐特征,其中 *E. faecium* M0 生长快、耐盐性最好,在 2.0% NaCl 的黄瓜汁中生长最快($\mu_{\max} = 0.064 \text{ h}^{-1}$, $N_{\max} = 0.588$),随着 NaCl 浓度的上升, μ_{\max} 和 N_{\max} 逐渐下降,但最终能在 10% NaCl 黄瓜汁中显示了微弱的生长 ($\mu_{\max} = 0.006 \text{ h}^{-1}$, $N_{\max} = 0.185$); *L. plantarum* 生长速度相对较慢,耐盐性较

弱,但具有菌株差异性,在 8 % NaCl 的黄瓜汁中 M4 不能生长,M1 显示了微弱生长($\mu_{\max} = 0.007$, $N_{\max} = 0.122$),而 M3 和 M6 能较好的生长, μ_{\max} 值分别为 0.016 和 0.015 h^{-1} 。

乳酸菌对 NaCl 的耐受能力具有种属特异性,研究表明植物乳杆菌能耐受 9.1 % NaCl^[16],但是细菌对盐的耐受性取决于菌株及其生理状态^[17]。本研究中发现 *L. plantarum* M3 和 M6 能在 8.0 % NaCl 的黄瓜汁中较好的生长,但 M1 生长微弱, M4 不能生长,在不同盐浓度下最大生长速率和群体密度也显著不同,表明植物乳杆菌菌株之间对 NaCl 的耐受能力存在差异。肠膜明串珠菌是泡菜发酵中的优势菌,但研究显示 6.4% NaCl 就能抑制肠膜明串珠菌生长^[16],屎肠球菌属于同型发酵乳酸菌,产酸快,被广泛用于改善食品、饲料的质量^[18-19]。本研究发现 M0 生长快、耐盐性最好,能在 10% NaCl 黄瓜汁中生长,在高盐泡菜发酵早期屎肠球菌可能发挥了重要作用。

表 4 起始 NaCl 浓度对不同乳酸菌分离株的生长动力学参数的影响

Table 4 The influence of initial NaCl concentration on the growth kinetic parameters of different lactic acid bacteria isolates

NaCl 浓度/%	$\mu_{\max}/(\text{h}^{-1})$					$N_{\max}/(\text{OD}_{580\text{nm}})$				
	M0	M1	M3	M4	M6	M0	M1	M3	M4	M6
0.00	0.055	0.027	0.041	0.028	0.031	0.623	0.489	0.467	0.627	0.533
2.00	0.064	0.022	0.039	0.022	0.029	0.588	0.493	0.455	0.558	0.351
4.00	0.040	0.013	0.032	0.019	0.025	0.522	0.253	0.410	0.231	0.269
6.00	0.035	0.009	0.020	0.008	0.015	0.428	0.129	0.347	0.136	0.185
8.00	0.023	0.007	0.016	—	0.015	0.313	0.122	0.185	—	0.154
10.00	0.006	—	—	—	—	0.185	—	—	—	—

2.8 分离株及其组合接种发酵对泡菜 pH 变化的影响

以 8% NaCl 蔬菜汁作为模型,以自然发酵作为对照,研究了接种 10^6 CFU/mL 和 10^8 CFU/mL 单菌种增效发酵后的酸化趋势,结果乳酸菌接种量为 10^6 CFU/mL 组与未接乳酸菌的自然发酵的 pH 值下降趋势没有显著区别(结果未列出)。当乳酸菌接种量为 10^8 CFU/mL 时,pH 值下降显著快于对照组。接入球菌 M0 蔬菜汁在起始 48 h 内,pH 值下降显著快于 3 株植物乳杆菌,但在 48 h 之后,M0 产酸减弱,但其余 3 株植物乳杆菌产酸增强,其中 M3 和 M6 接种组尤为明显,在 72 h 后 pH 后显著低于 M0 接种组。选择球菌 M0 和杆菌 M3 和 M6 进行不同的配比,接种后 pH 变化趋势结果如图 4 所示。

结果显示,组合接种组 M0 + M3 (1:1 接种)产酸速度高于 M0 和 M3 单独接种组,在 48 h 达到

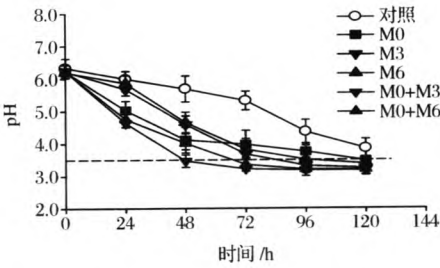


图 4 不同分离株及其组合接种发酵对泡菜 pH 变化的影响

Fig. 4 The effects of isolates and their combinations on the pH change during fermentation

pH3.5, M0 + M6 (1:1 接种) 在 72 h 达到 pH3.5, 两个组合均显著低于对照组和单独接种组 ($P < 0.05$),但是与其他接种比例的组合(结果未列出)的 pH 变化趋势没有显著差异 ($P > 0.05$)。结果表明 M0 + M3 组合接种组产酸最快,适合作为高 NaCl 浓度泡菜发

酵剂的进一步研究。

3 结论

论文对起始盐浓度为 2.0% (低盐) 和 8.0% (高盐) 泡菜发酵过程中 pH、总酸、细菌菌落总数、乳酸菌总数以及大肠菌群的变化规律进行了测定与分析, 并从盐浓度为 8.0% 的泡菜发酵卤水中分离得到 5 株乳酸菌, 并对菌株在不同盐含量的蔬菜汁中的生长动力学参数及其产酸特性进行了分析, 结果表明:

(1) 高盐泡菜发酵产酸速度显著低于低盐泡菜, 但在发酵后期两者均能达到 pH3.5~3.8。高盐泡菜起始菌落总数、乳酸菌总数以及大肠菌群数均显著低于低盐泡菜。发酵过程中, 菌群变化呈先上升后下降趋势, 其中 8.0% 盐浓度泡菜菌落总数及大肠菌群数缓慢上升, 144 h 后开始缓慢下降, 而在低盐泡菜中 24 h 后迅速下降, 结果表明蔬菜携带的自然菌群中包含耐盐性和盐敏感性群体, 高浓度盐对盐敏感性乳酸菌的抑制是发酵周期延长的主要原因, 通过提高起始耐盐性乳酸菌数量可以加快高盐泡菜成熟。

(2) 从高盐泡菜发酵卤水中分离获得 1 株球菌 (M0) 和 4 株杆菌 (M1、M3、M4 和 M6), 经生理生化 and 分子鉴定, 球菌 M0 属于屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*), 4 株杆菌均鉴定为植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)。5 株乳酸菌分离株在含 0~10% NaCl 的黄瓜汁中的最大生长速率、最大群体密度、以及耐盐特性呈现菌株差异性。菌株 M0 能够在 10% NaCl 的黄瓜汁中生长, 显示了良好的耐盐性, 而在 8% NaCl 的黄瓜汁中, 菌株 M3 和 M6 能较好生长, 而 M4 不能生长。结果表明菌株 M0、M3 和 M6 具有良好的耐 NaCl 胁迫的能力, 可能是高盐泡菜中的优势乳酸菌。

(3) 5 株乳酸菌在含 8% NaCl 的蔬菜汁中呈现不同的产酸特性, 球菌 M0 前期产酸速度快, 而杆菌在发酵后期产酸速度快, 球菌 M0 和杆菌 M3 和 M6 按不同的配比接种 8% NaCl 的蔬菜汁, 其中 M0 + M3 (1:1) 接种组产酸最快, 在 48 h 达到 pH3.5, 显著低于对照组和单独接种组 ($P < 0.05$), 适合用于高盐泡菜发酵剂制备。

参 考 文 献

- [1] 郑炯, 黄明发. 泡菜发酵生产的研究进展[J]. 中国调味品, 2007(5): 22-25.
- [2] 李书华, 陈封政. 泡菜的研究进展及生产中存在的问题[J]. 食品科技, 2007(3): 8-11.

- [3] 卢晓黎, 尼海峰. 发酵蔬菜功能菌研究与应用进展[J]. 中国食品学报, 2012, 12(2): 1-4.
- [4] 杨瑞, 张伟, 陈炼红, 等. 发酵条件对泡菜发酵过程中微生物菌系的影响[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(3): 91-92.
- [5] ZHAO D, DING X. Studies on the low-salt Chinese potherb mustard (*Brassica juncea*, Coss.) pickle. I—The effect of a homofermentative L(+) -lactic acid producer *Bacillus coagulans* on starter culture in the low-salt Chinese potherb mustard pickle fermentation [J]. LWT, 2008, 41: 474-482.
- [6] 孙力军, 李正伟, 孙德坤, 等. 纯种接种和促菌物质的添加对苔菜泡菜发酵过程及其品质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(8): 103-105.
- [7] 李文婷, 车振明, 雷激, 等. 乳酸菌制剂发酵泡菜品质及安全性研究[J]. 西华大学学报(自然科学版), 2011, 30(3): 97-100; 112.
- [8] 吴丹, 陈健初, 叶兴乾, 等. 榨菜腐败微生物的分离、鉴定及生物学特性研究[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2009, 35(2): 135-140.
- [9] 徐婷, 张成杰, 张桂敏. 襄阳孔明菜卤水中耐盐污染菌的分离与鉴定[J]. 湖北大学学报(自然科学版), 2013, 35(1): 24-28.
- [10] Romero-Gil V, Bautista-Gallego J, Rodríguez-Gómez F, et al. Evaluating the individual effects of temperature and salt on table olive related microorganisms [J]. Food Microbiology, 2013, 33: 178-184.
- [11] 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.
- [12] 奥斯伯. 精编分子生物学指南(第五版)[M]. 北京: 科学出版社, 2008.
- [13] Gupta S, Cox S, Rajauria G, et al. Growth inhibition of common food spoilage and pathogenic microorganisms in the presence of brown seaweed extracts[J]. Food Bioprocess Technol, 2012, 5: 1907-1916.
- [14] 熊涛, 关倩倩, 谢明勇. 直投式与传统发酵泡菜工艺中病原菌的变化规律[J]. 食品科学, 2012, 33(13): 140-143.
- [15] 盛海圆, 郭艳萍, 常艳, 等. 传统泡菜中乳酸菌多样性的分析[J]. 中国微生物学杂志, 2010, 22(7): 580-582; 586.
- [16] 杨瑞鹏, 赵学慧. 几种乳酸菌的生理特性研究[J]. 中国调味品, 1991(11): 15-17.
- [17] Hajmeer M, Ceylan E, Marsden JL, et al. Impact of sodium chloride on *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* analysed using transmission electron microscopy [J]. Food Microbiology, 2006, 23(5): 446-452.

- [18] 王晓丽,王永山,诸玉梅,等. 5株乳酸菌的分离鉴定与生物学特性研究[J]. 江苏农业科学,2011(1):390-392.
- [19] 赵树田,张士青,顾欣,等. 十种可制作酸奶的乳酸菌体外降解草酸能力评价[J]. 上海交通大学学报(医学版),2009,29(12):1 463-1 466.

Isolation and identification of lactic acid bacteria from pickles and their NaCl stress tolerance and acidifying ability

YANG Zhen-quan, ZHANG Mi, WANG Xiao-lin, MEI Qiu-yan, ZHOU Hai-bo

(College of Food Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China)

ABSTRACT In this study, the changes of pH, total colony number, lactic acid bacteria and coliform count were determined and compared between pickles containing 2.0% (low-salt) and 8.0% (high-salt) of sodium chloride during the process of natural fermentation. The lactic acid bacteria strains isolated and identified from the high-salt pickle were analyzed for their salt tolerance and acid producing ability in the vegetable juice model. Results showed that high concentration of NaCl had inhibitory effect on the natural flora carried by vegetables. The initial total colony number, lactic acid bacteria, coliform and pH drop rate for high-salt pickle were significantly lower than those for low-salt pickle, however both low- and high-salt pickles reached pH 3.5 ~ 3.8 after 144 h of fermentation with final coliform count ≤ 90 MPN/100g. One strain of *Enterococcus faecium* (M0) and 4 strains of *Lactobacillus plantarum* (M1, M3, M4 and M6) were isolated from high-salt pickle brine. Isolates showed strain-dependant growth kinetic parameters and salt resistance in the vegetable juice model with different NaCl concentration, in which strain M0 showed the best growth characteristics and higher salt resistance. The inoculums with mixture of M0 and M3 by 1:1 proportion in the vegetable juice containing 8.0% of salt showed the best acidifying ability, with pH value reaching 3.5 after 48 h of fermentation, which was significantly lower than those of control group and the other strains inoculated group ($P < 0.05$).

Key words pickle; lactic acid bacteria; sodium chloride stress; acidifying ability