

传统泡菜腐败过程中膜醭和盐卤的 微生物区系分析

蒋云露¹, 杨建涛¹, 何鹏晖¹, 王 猛¹, 李成龙¹, 陈 功², 饶 瑜^{1*}

(1. 西华大学食品与生物工程学院, 成都 610039; 2. 四川省食品发酵工业研究设计院, 温江 611130)

摘 要: **目的** 研究以 *Lactobacillus plantarum* 为菌剂发酵的传统泡菜在腐败过程中微生物的区系变化。**方法** 通过提取腐败前、中、后期 3 个阶段腐败膜醭及盐卤中微生物总基因组并构建 16S rRNA 基因文库, 分析其细菌群落构成和动态变化, 并通过丰富度指数 S_{Chao1} 和 S_{ACE} 、覆盖率及多样性指数 H 等揭示其群落多样性。**结果** 从不同阶段膜醭和盐卤样品中共检测到 *Lactobacillus* 等 15 个属, 盐卤及膜醭不同腐败阶段的微生物区系差异较大。其中 *L. plantarum* 为腐败前期膜醭及盐卤样品中的优势菌。腐败中期膜醭中的优势菌群为 *L. plantarum*、*Propionibacterium acidipropionici*, 腐败中期盐卤中的优势菌为 *L. plantarum*、*Enterococcus malodoratus*、*P. acidipropionici*。而腐败后期样品中, 膜醭的优势菌为 *E. malodoratus*、*Providencia rettgeri* 和 *Shewanella algae*, 盐卤的优势菌为 *Morganella morganii*、*S. algae*、*E. malodoratus* 和 *Proteus mirabilis*。**结论** 盐卤及膜醭中的微生物区系在腐败前、中、后期都以细菌为主并细菌种类有差异较大。腐败前期以革兰氏阳性为主, 腐败后期以革兰氏阴性为主。

关键词: 发酵蔬菜; 腐败微生物; 膜醭; 盐卤; 基因文库

Microbial communities in biofilm and brine samples during the spoilage process of traditional pickle

JIANG Yun-Lu¹, YANG Jian-Tao¹, HE Peng-Hui¹, WANG Meng¹, LI Cheng-Long¹,
CHEN Gong², RAO Yu^{1*}

(1. College of Food and Biological Engineering, Xihua University, Chengdu 610039, China;
2. Sichuan Academy of Food Fermentation Industries, Wenjiang 611130, China)

ABSTRACT: Objective To study the dynamic change of microbial flora in the traditional pickle brine during the deteriorating process which was fermented by starter culture *Lactobacillus plantarum*. **Methods** The total genomes of microbes in the biofilm and brine samples were extracted during the early, middle and later spoilage stage. 16S rRNA gene libraries were constructed to analyze the microbial floras. The microbial varieties were revealed by S_{Chao1} , S_{ACE} , the index of richness, coverage and H (the index of diversity). **Results** *Lactobacillus* and other 14 genera were identified. The microbial floras of different biofilm and brine samples from different spoilage periods were diverse. *L. plantarum* was the dominant organism in both biofilm and brine samples in early spoilage stage. *L. plantarum* and *Propionibacterium acidipropionici* were the major agents in biofilm

基金项目: 四川省科技厅应用基础项目(2015JY0142)、西华大学研究生创新基金项目(ycyj2015021)

Fund: Supported by the Applied Basic Program of Science and Technology Department of Sichuan (2015JY0142) and the Postgraduate Innovation Foundation of Xihua University (ycyj2015021)

*通讯作者: 饶瑜, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品微生物。E-mail: ryfish@163.com

*Corresponding author: RAO Yu, Ph. D, Associate Professor, College of Food and Biological Engineering, Xihua University, Chengdu 610039, China. E-mail: ryfish@163.com

sample in middle spoilage stage, while *L. plantarum*, *Enterococcus malodoratus*, and *P. acidipropionici* dominated in the brine. *E. malodoratus*, *Providencia rettgeri* and *Shewanella algae* were the dominant ones in biofilm samples of late spoilage stage. *Morganella morganii*, *S. algae*, *E. malodoratus* and *Proteus mirabilis* were the dominant ones in brine samples of late spoilage stage. **Conclusion** Bacteria were the dominant microorganism in all biofilm and brine samples. But the bacterial floras were diverse among different spoilage stages. In the early deteriorated stage, the major agents were gram-positive strains, while in the later-deteriorated stage, gram-negative strains were the dominant ones.

KEY WORDS: fermented vegetable; spoilage microbes; biofilm; brine; gene library

1 引言

泡菜是一类以新鲜蔬菜作为原材料,在一定浓度的盐溶液中,经乳酸菌发酵制成的一种传统发酵蔬菜^[1]。乳酸菌作为优势菌群在发酵过程中产生风味物质,赋予泡菜色、香、味及健康因子^[2,3]。

在泡菜的制作过程中,由于泡菜原料未经灭菌处理,因此容易受到腐败菌及病原菌的污染,在泡菜的储存过程中会继续生长,造成泡菜的腐败。在食品企业中,膜醭的形成往往是食品腐败的指标^[4]。泡菜盐卤表面膜的形成常被称作“生花”,表现为在泡菜表面形成一层白膜,泡菜水浑浊,严重者有馊臭味,甚至软烂变质不能食用。泡菜“生花”不仅在家庭制作泡菜的过程中发生,也常在泡菜工厂化生产时引起泡菜腐败变质^[5]。家庭自制泡菜通过加入新的蔬菜或添加白酒等方法,在一定程度上避免泡菜的“生花”问题。而工业化生产泡菜的过程中应该如何控制腐败微生物的生长,保证产品的品质及安全,以推动传统泡菜的产业化发展是一个亟待解决的问题^[6]。

在目前腐败泡菜的研究中,分离得到的腐败微生物大多为酵母,包括克鲁维毕赤酵母、热带念珠酵母等^[7,8]。有报道认为,引起泡菜腐败的微生物主要是酵母和霉菌^[9],酵母的生长会利用掉乳酸等,使环境pH升高,从而为一些腐败细菌的生长提供良好条件^[10,11]。近几年,有研究发现,布氏乳杆菌(*Lactobacillus buchneri*)可以代谢乳酸^[12]、植物乳杆菌可在发酵糖利用完的条件下代谢乳酸、丙酸菌属(*Propionibacterium*)及梭菌属(*Clostridium*)的一些菌种可以将乳酸转化为丙酸及丁酸^[13],引起盐卤pH的升高,从而造成泡菜的腐败。

本实验研究,在菌剂发酵青菜未腐败、腐败前期及腐败后期3个阶段,膜醭的形成及盐卤和膜醭中的微生物区系,为发酵蔬菜的商业化生产所面临的腐

败等问题的解决提供理论基础。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

青菜:于成都某菜市场,挑选购买新鲜、无明显破损、大小一致的笋壳青菜。

MRS 液体培养基(北京奥博兴生物科技有限公司),用于分离乳酸菌;TSA 固体培养基(胰蛋白胨:15 g/1000 mL,大豆蛋白胨:5 g/1000 mL,氯化钠:5 g/1000 mL,琼脂:15 g/1000 mL),用于计数总细菌数;虎红培养基(购于北京奥博兴生物科技有限公司),用于分离真菌。

DNA Marker、Taq DNA 连接酶、dNTP(天根生化科技(北京)有限公司);土壤DNA提取试剂盒(成都福际生物公司);PMD19-T 载体试剂盒(宝生物工程(大连)有限公司)。

2.2 仪器与设备

MULTIFUGE X1R 台式冷冻离心机(美国 Beckman 公司);Eppendorf AG22331 PCR 仪(德国 Eppendorf 公司);T2A 凝胶成像系统(美国 BIO-RAD 公司);DYY-8C 电泳仪(北京六一仪器厂);SYQ-DSX-280B 立式灭菌锅(上海申安医疗器械厂);XW-80A 漩涡混合器(上海沪西分析仪器厂)。

2.3 实验方法

2.3.1 泡菜制备

根据成都某食品有限公司的泡菜制备方法进行青菜泡制,方法如下:将新鲜青菜洗净晾干后,取800 g放入加有1500 mL盐质量浓度为6 g/100 mL盐卤(盐卤即是泡菜水)的泡菜坛中,并加入植物乳杆菌E11^[14](终浓度约6 log CFU/mL)作为发酵菌剂,在坛沿加水密封并静置发酵,共发酵30坛。当盐卤pH值低于4时,认为发酵完成。发酵完成后仍将泡菜坛于

室温静置贮藏, 直至有泡菜坛发生腐败现象, 即盐卤表面有膜醭生成。分别对腐败泡菜坛腐败前期(盐卤 pH 3.6)、腐败中期(盐卤 pH 4.5)和腐败后期(盐卤 pH 6.3)的膜醭及盐卤进行取样, 共 6 个样: M1 表示腐败早期的膜醭样品; S1 表示未腐败的盐卤样品; M2 表示腐败前期的膜醭样品; S2 表示腐败前期的盐卤样品; M3 表示腐败后期的膜醭样品; S3 表示腐败后期的盐卤样品。

2.3.2 取 样

30 坛泡菜中有 3 坛静置保存 22 d 后发生腐败现象, 表现为盐卤表面有膜醭形成, 伴随着盐卤 pH 值升高。用无菌玻璃棒挑取 10 cm² 腐败各时期的膜醭样品, 混于 1 mL 无菌生理盐水中, 用漩涡混合器将膜醭混合液混匀。8000 r/min 离心 2 min, 去除上清液, 沉淀重悬于 1 mL 无菌生理盐水中, 重复 3 次, 得到纯净的菌悬液。用无菌移液管移取对应腐败时期的盐卤样品 200 mL, 8000 r/min 离心 2 min, 去除上清液, 沉淀重悬于 1 mL 无菌生理盐水中, 重复 3 次, 得到纯净的菌悬液。另移取 2 mL 盐卤用于 pH 测定。

2.3.3 盐 卤 pH 测定及膜醭菌种的分离

用 pH 计测定各腐败时期的盐卤样品, 并记录 pH 值。接着, 将上述菌悬液进行梯度十倍稀释。根据菌悬液浓度选取 2~3 个适宜稀释度的样品均匀液, 取 100 μL 上述均匀液(可包括原液)涂布于 MRS、TSA 固体培养基上(每个梯度每种平板各涂 2 个, 作平行对照), 置于相应温度下(TSA 于 37 °C, MRS 于 30 °C, 虎红于 30 °C)倒置培养 24~48 h。

培养后肉眼观察, 根据《中华人民共和国国家标准 GB 47892—2010 食品安全国家标准食品微生物学检验菌落总数测定》^[15]记录稀释倍数和相应的菌落数量, 菌落计数以菌落形成单位(colony-forming units, CFU)表示。选取菌落数在 30~300 CFU 之间, 无蔓延菌落生长的平板计数菌落数, 并以 2 个平行平板的菌落平均数作为最终菌落计数结果。

2.3.4 腐 败 膜 醭 及 盐 卤 DNA 的 提 取 及 16S rDNA PCR

采用土壤 DNA 提取试剂盒分别对膜醭及盐卤菌悬液进行总基因组的提取。利用 1.0%的琼脂凝胶对结果进行电泳检验。以各基因组为模板, Eu27F 和 1490R 为引物进行 16S rDNA 片段的体外扩增。扩增条件: 95 °C 5 min, 95 °C 1 min, 50 °C 1min, 72 °C 2 min, 35 个循环; 72 °C, 10 min。进行 16S rDNA 片段的扩增, 引物序列见表 1。

表 1 16S rDNA PCR 扩增引物序列表

Table 1 Primers used for PCR amplification of 16S rDNA

引物	序列	目标 DNA
Eu27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	细菌 16S rDNA
1490R	5'-GGTTACCTGTGTACGACTT-3'	细菌 16S rDNA

2.3.5 膜醭细菌基因文库建立

根据 pMD19-T 载体试剂盒说明书将 16S rDNA PCR 产物与 PMD19-T 载体进行连接, 并转化至 DH5α 大肠杆菌细胞中, 于含氨卞青霉素(Amp)100(μg/mL)的 LB 液体培养基中摇床培养 1 h 后, 将其涂布至含 Amp(100 μg/mL)、IPTG (24 μg/mL) 及 X-gal (40 μg/m) 的 LB 固体培养基上, 37 °C 静置培养 24 h。筛选出阳性克隆, 进行 PCR、凝胶电泳检测后, 将含有 16S rDNA 片段的菌株送至上海华津生物科技有限公司进行测序。

将测序结果与 GenBank 中的序列进行比对, 序列相似度在 98%以上的两个菌株被认为属于同一个菌种。使用 MEGA 5.0 建立系统发育树。

2.3.6 数 据 处 理

获得序列利用 BioEdit 软件进行两两比对, 同源性大于 97%的归为同一个操作分类单元(OTU)。根据所得 OTU 个数以及每个样品的 OTU 丰富度, 采用 Rarefaction 1.3 软件进行分析并绘制稀释度曲线^[16]。Shannon diversity (H)、S_{obs}、S_{Chao1}、S_{ACE} 等多多样性指数以及 Simpson 优势度指数通过 Estimates Win 8.20 进行计算, 以分析比较细菌物种的多样性^[17], 利用下式计算文库覆盖度指数。

$$\text{覆盖率} = S_{obs} / \left(\frac{S_{Chao1} + S_{ACE}}{2} \right) \times 100\%$$

3 结果与分析

3.1 腐 败 过 程 中 微 生 物 数 量 变 化

图 1 所示为泡菜腐败前期(pH 3.6)、腐败中期(pH 4.5)和腐败后期(pH 6.3)膜醭和盐卤中的微生物变化。如图所示, 在泡菜盐卤从 pH 3.6 变化至 pH 4.5 的腐败过程中, 膜醭和盐卤中的微生物总量出现微弱下降, 从 5.78 log CFU/cm²(M1)、7.18 log CFU/mL(S1) 变化为 5.49 log CFU/cm²(M2)、6.48 log cfu/mL(S2)。但泡菜盐卤从 pH 4.5 变化到 pH 6.3 的腐败过程中, 微生物总数增加了 1~2 个数量级。在 pH 6.3 的腐败条件下, 膜醭和盐卤中的微生物总数分别为 6.93 log

CFU/cm²(M3)和 8.14 log CFU/mL(S3)。乳酸菌在腐败前期和腐败中期是盐卤和膜醭中的主要微生物,但在腐败后期的膜醭和盐卤中,乳酸菌数量都急剧下降了 4~5 个数量级。乳酸菌数量在腐败中期较腐败早期有所减少,但腐败中期膜醭中乳酸菌占总菌的比例较腐败前期膜醭中有所提高,从 43.3%增加到 61.3%。另外,膜醭及盐卤样品中真菌只有在腐败前期样品中检测到有约 4.30 log CFU/cm²(M1)和 5.30 log CFU/mL(S1),随着腐败的进行,真菌下降 2~3 个数量级。

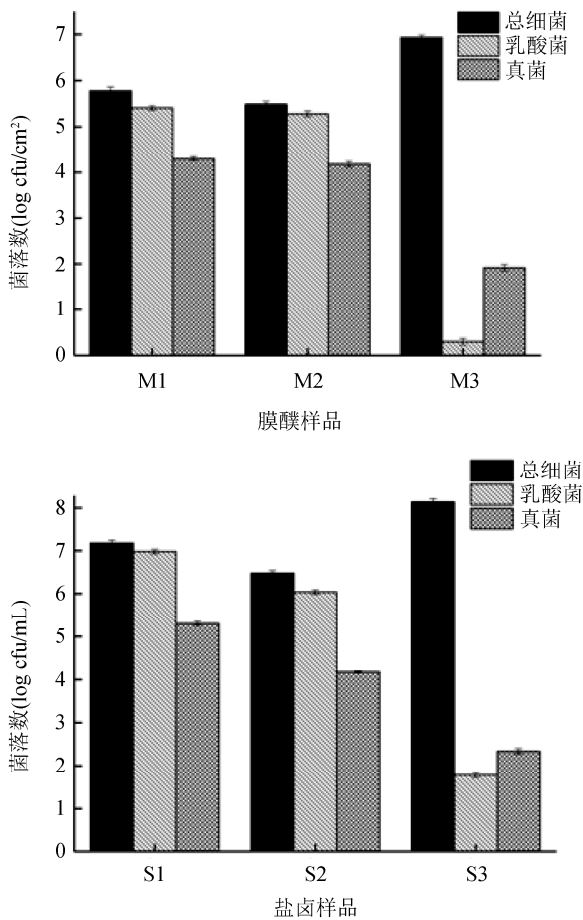


图1 发酵蔬菜腐败过程中膜醭(A)和盐卤(B)中的微生物数量变化

Fig. 1 Changes of microbial amounts in biofilm (A) and brine (B) samples during the spoilage process

3.2 膜醭及盐卤样品的总基因组及 PCR 产物的电泳检测

利用 1%的琼脂糖凝胶对试剂盒提取的各时期膜醭及盐卤样品的细菌总基因组进行电泳检测,

从图 2(A)中可以看到,得到的基因组条带清晰明亮。与 Marker 比较后发现,样品的条带处于 15000 bp 以上,因此可以判断细菌总基因组提取成功^[18]。

以成功提取得到的细菌总基因组为模板,进行 16S rDNA PCR,得到的片段通过 1%的琼脂糖凝胶电泳检测,得到的图像如图 2(B)中所示。图中条带明亮清晰,且与 Marker 比较后发现,样品条带处于 1000~2000 bp Marker 条带之间且大于 1500 bp。由于 16S rDNA 片段大小约为 1540 bp,因此可以判断 16S rDNA 体外扩增成功。

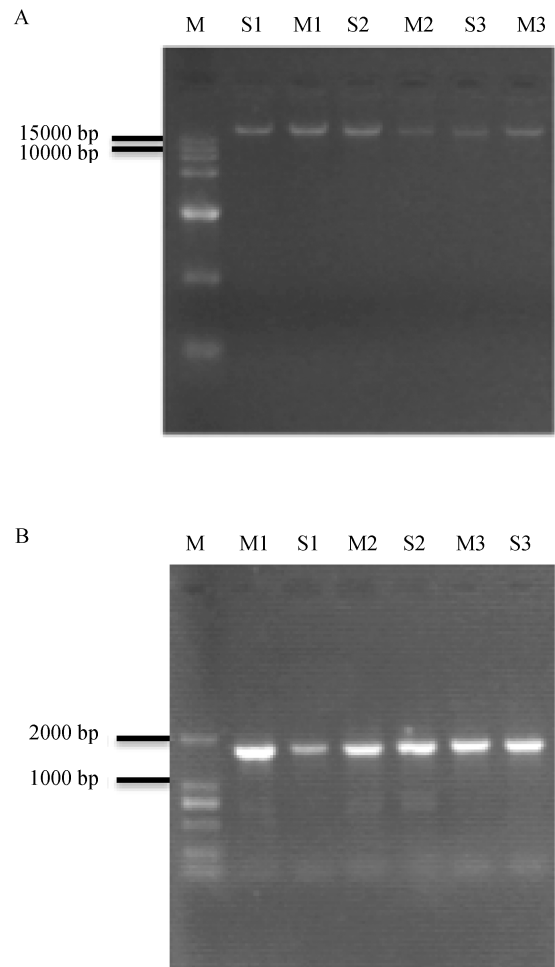


图2 总基因组及 16S rDNA PCR 凝胶电泳图

Fig. 2 Gel electrophoresis of genome DNA and PCR-amplified products of 16S rDNA

M:marker, M1-M3: 膜样品; S1-S3: 盐卤样品

M: marker, M1-M3: samples of biofilm; S1-S3: samples of brine

3.3 腐败膜醭及盐卤中的细菌多样性

稀释度曲线是有效的形态学和多样性分析方法

[19], 由图 3A、B 可知, M1、M2、M3、S1、S2、S3 6 个样品的 OTU 数量随克隆数的增加而增加, 后各自逐渐趋于稳定。从而可以知道, 这六个样品的基因文库已趋于饱和, 因此能够较全面地反应腐败前期、中期及后期膜醭及盐卤中细菌群落的多样性。OTU 的丰富度及多样性结果如表 2 所示, 从表中可以看出, 6 个样品的克隆数分别为 40(M1)、26(M2)、66(M3)、52(S1)、76(S2)、128(S3), 各样品的丰富度指数均 S_{Chao1} 和 S_{ACE} 均相等, 分别为 4(M1)、3(M2)、7(M3)、5(S1)、6(S2)、8(S3), 并且各样品的覆盖率均为 100%。各样品的多样性指数 H 分别为 1.27(M1)、0.85(M2)、1.65(M3)、1.02(S1)、1.55(S2)、1.88(S3), Simpson 指数分别为 3.49(M1)、2.18(M2)、4.78(M3)、2.24(S1)、4.27(S2)、6.31(S3)。

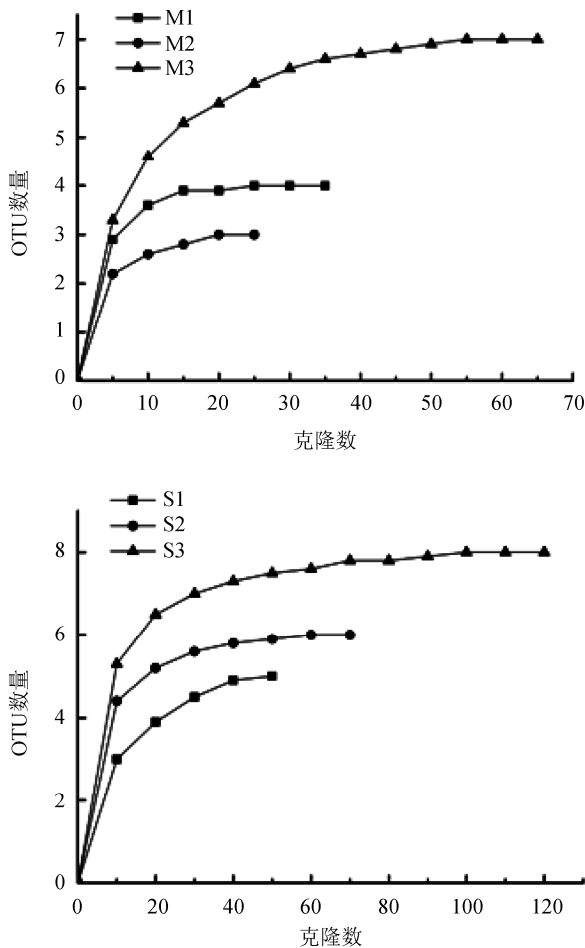


图 3 16S rRNA 基因文库的稀释度曲线

Fig. 3 The rarefaction analysis of 16S rRNA clone library
A: 膜醭样品; B: 盐卤样品
A: samples of biofilm; B: samples of brine

表 2 膜醭中 OUT 的丰富度和多样性分析
Table 2 The richness and diversity estimation of OTUs derived from biofilm

样品名称	克隆数	S_{obs}	S_{Chao1}	S_{ACE}	覆盖度%	H	Simpson
M1	40	4	4	4	100%	1.27	3.49
S1	52	5	5	5	100%	1.02	2.24
M2	26	3	3	3	100%	0.85	2.18
S2	76	6	6	6	100%	1.55	4.27
M3	66	7	7	7	100%	1.65	4.78
S3	128	8	8	8	100%	1.88	6.31

S_{obs} : 可见; S_{ACE} : ACE 分析得到的丰富度; S_{Chao1} : Chao1 分析得到的丰富度; H : Shannon's 多样性指数; Simpson: Simpson's 多样性指数。

3.4 细菌的分布及系统发育树的建立

为了进一步研究各时期腐败膜醭及盐卤中细菌的区系变化, 从每个 OUT 中选取一个代表序列到 NCBI 基因库中进行比对, 然后利用 MEGA 6.0 构建系统发育树。Devereux 等^[20]认为, 两菌株的 16S rRNA 序列同源性大于 97% 时, 可认为属于同一个属, 当同源性大于 98% 时, 被认为属于同一个种。将所有序列上传至 RDP 进行分类, 6 个样品共 392 个克隆被分为 17 个 OTU, 属于以下 15 个属: *Lactobacillus*、*Propionibacterium*、*Leuconostoc*、*Citrobacter*、*Enterobacter*、*Enterococcus*、*Kluyvera*、*Serratia*、*Pantoea*、*Klebsiella*、*Proteus*、*Providencia*、*Morganella*、*Shewanella*、*Corynebacterium*。其中前 4 个属为革兰氏阳性, 其余为革兰氏阴性。如图 4 所示, 盐卤及膜醭中的微生物区系在腐败前、中、后期有较大差异。腐败前期盐卤及膜醭中以 *L. plantarum* 和 *C. freundii* 为主要微生物。腐败中期膜醭(M2)中的优势菌群为 *L. plantarum* 和 *P. acidipropionici*, 其中 *L. plantarum* 占 61.5%, 较前期(42.5%)有所提高, 腐败中期盐卤(S2)中的优势菌为 *L. plantarum*、*E. malodoratus* 和 *P. acidipropionici*, 其中 *L. plantarum* 占 36.8% 较前期(61.5%)有所下降。在腐败后期(M3、S3)时, *L. plantarum* 已几乎检测不到。此外, 在此时期的膜醭及盐卤样品中均存在: *Ec. malodoratus*、*P. mirabilis*、*P. rettgeri*、*M. morganii* 和 *S. algae*, 其中 *Ec. Malodoratus*、*P. rettgeri* 和 *S. algae* 为膜醭(M3)中优势菌, 而 *M. morganii*、*S. algae*、*Ec. malodoratus* 和 *P. mirabilis* 为盐卤(S3)中优势菌。

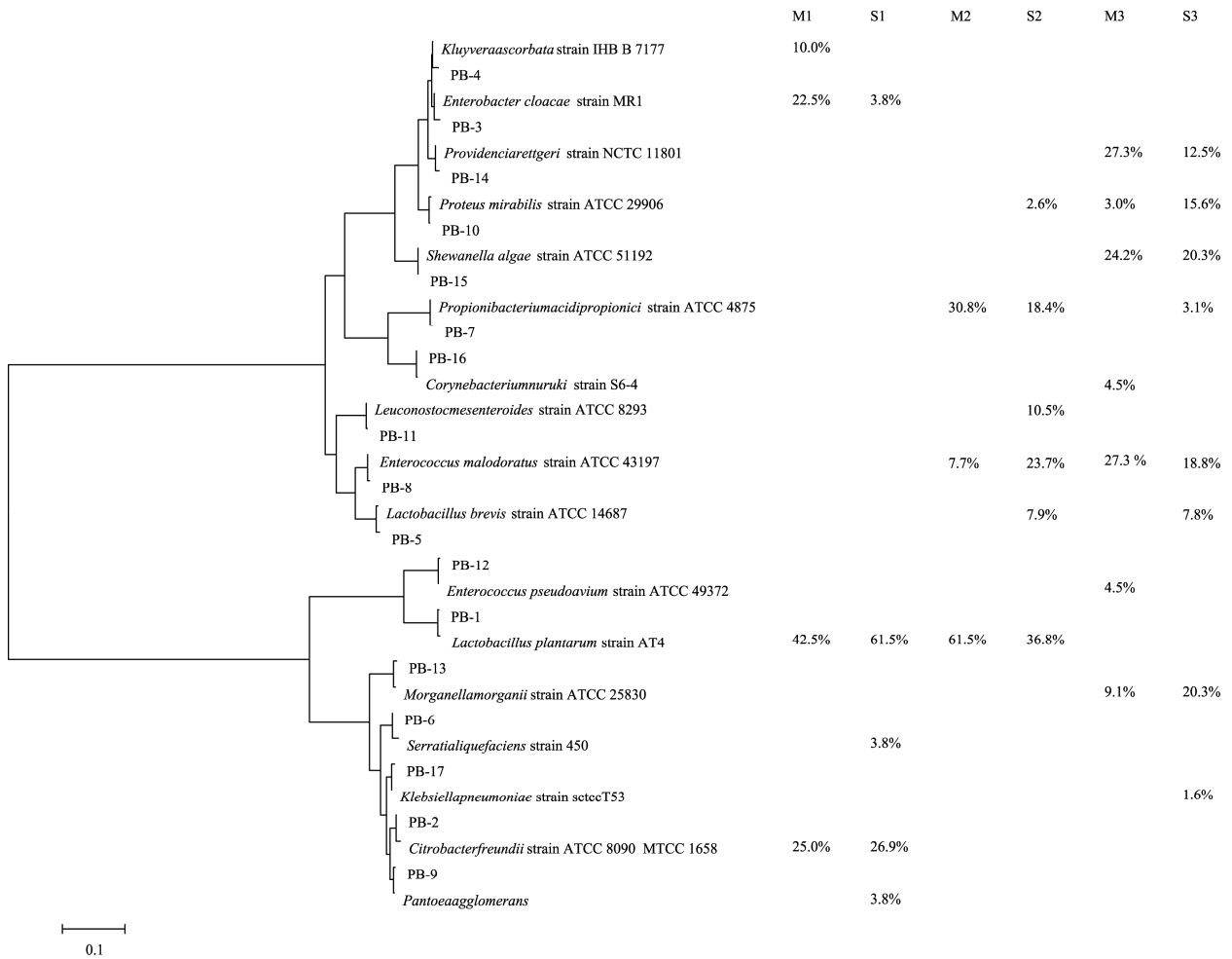


图 4 不同时期阳平中的细菌系统发育树
Fig.4 Phylogenetic trees of bacterial in samples of different stages

表 3 各样品中细菌分类特性
Table 3 Classification features of bacteria of samples

样品名称	克隆数	属名	所占比例	相似性	革兰氏染色
M1	40	<i>Lactobacillus</i>	42.5%	98%~100%	G ⁺
		<i>Citrobacter</i>	25.0%	97%~99%	G ⁻
		<i>Enterobacter</i>	22.5%	97%~99%	G ⁻
		<i>Kluyvera</i>	10.0%	97%~98%	G ⁻
		<i>Lactobacillus</i>	61.50%	98%~100%	G ⁺
S1	52	<i>Citrobacter</i>	26.90%	97%~99%	G ⁻
		<i>Enterobacter</i>	3.80%	98%~99%	G ⁻
		<i>Pantoea</i>	3.80%	98%~99%	G ⁻
		<i>Serratia</i>	3.80%	97%~98%	G ⁻
M2	26	<i>Lactobacillus</i>	61.50%	98%~100%	G ⁺
		<i>Propionibacterium</i>	30.80%	97%~99%	G ⁺
		<i>Enterococcus</i>	7.70%	98%~99%	G ⁻

续表 3

样品名称	克隆数	属名	所占比例	相似性	革兰氏染色
S2	76	<i>Lactobacillus</i>	44.70%	98%~100%	G ⁺
		<i>Propionbacterium</i>	18.40%	97%~99%	G ⁺
		<i>Proteus</i>	2.60%	98%~99%	G ⁻
		<i>Enterococcus</i>	23.70%	97%~99%	G ⁻
		<i>Leuconostoc</i>	10.50%	97%~99%	G ⁺
		<i>Enterococcus</i>	31.80%	97%~99%	G ⁻
M3	66	<i>Morganella</i>	9.10%	97%~99%	G ⁻
		<i>Providencia</i>	27.30%	97%~99%	G ⁻
		<i>Shewanella</i>	24.20%	97%~99%	G ⁻
		<i>Proteus</i>	3.00%	97%~99%	G ⁻
		<i>Corynebacterium</i>	4.50%	97%~99%	G ⁺
		<i>Lactobacillus</i>	7.80%	97%~99%	G ⁺
S3	128	<i>Propionbacterium</i>	3.10%	97%~99%	G ⁺
		<i>Proteus</i>	15.60%	97%~99%	G ⁻
		<i>Klebsiella</i>	1.60%	97%~99%	G ⁻
		<i>Morganella</i>	20.30%	97%~99%	G ⁻
		<i>Shewanella</i>	20.30%	97%~99%	G ⁻
		<i>Providencia</i>	12.50%	97%~99%	G ⁻
		<i>Enterococcus</i>	18.80%	97%~99%	G ⁻

由表 3 所示, 在腐败发生的前期和中期, 盐卤和膜醭中的微生物以革兰氏阳性为主, 如 *Lactobacillus*, 在腐败后期, 盐卤和膜醭中的微生物又以革兰氏阴性为主, 如 *Morganella*、*Shewanella* 及 *Providencia* 等, 这与 Franco 等^[21]的研究结果一致。Franco 等认为革兰氏阳性厚壁菌门(*Firmicutes*)主宰了泡菜腐败发酵早期, 革兰氏阴性在发酵后期(pH > 5)居多。

在腐败早期盐卤和中期膜醭中, *L. plantarum* 占总细菌数的皆为 61.5%, 说明在盐卤 pH 3.6 到 pH 4.5 阶段, *L. plantarum* 为主要微生物, 并且在膜醭中有所富集。已有研究报道乳酸菌与发酵蔬菜腐败有关^[22], Johanningsmeier 等^[23]认为无论是在有氧还是厌氧的条件下, *L. buchneri* 可利用乳酸代谢产生醋酸和 1,2-丙二醇, 使 pH 值从 3.8 上升至 4.3, *L. rafi* 随后将 1,2-丙二醇转化为丙酸和丙醇, pH 的升高与环境基质的还原使得梭菌、肠杆菌、酵母等随之更替生长, 从而造成腐败。本实验发现, 在泡菜腐败前期, *L. plantarum* 为最主要的微生物, 随着腐败的进行, 开

始出现了 *Enterococcus*、*Morganella*、*Shewanella* 及 *Providencia* 等腐败微生物, 并逐渐成为优势菌群。有文献报道称^[13], *L. plantarum* 可在发酵糖利用完的条件下代谢乳酸。因此, 本研究中 *L. plantarum* 是否与腐败发生和膜醭形成有关, 还有待进一步验证。

本研究中发现的其他腐败微生物也有相关文献报道, Franco 等^[24]指出 *E. cloacae* 可在黄瓜的腐败过程中利用乳酸生长。Breidt 等^[13]在腐败发酵橄榄腐败研究中指出丙酸杆菌属(*Propionbacterium*)可将乳酸转化为丙酸和丁酸, 引起发酵橄榄更严重的腐败。本研究中, 在 M2 和 S2 时开始检测到的 *P. acidipropionici*, 可进一步造成发酵泡菜的腐败。

4 结 论

盐卤 pH 升高和形成膜醭是发酵蔬菜腐败的典型特征。已有关于腐败泡菜中膜醭微生物的报道, 都是关于腐败后期或完全腐败的膜醭中的微生物。已分离鉴定的腐败膜醭微生物大多为酵母和霉菌。本文研究

了泡菜腐败过程中腐败膜醭和盐卤中微生物区系及其变化,发现盐卤及膜醭中的微生物区系在腐败前、中、后期都以细菌为主,并且细菌种类有差异较大。一共检测到17种菌,分别属于15个属。腐败前期以革兰氏阳性为主,腐败后期以革兰氏阴性为主。其中*L. plantarum*在盐卤pH 3.6到pH 4.5阶段为主要微生物,并且在膜醭中有所富集。*L. Plantarum*是否与发酵蔬菜的膜醭形成和腐败相关,还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 蒋云露, 杨健涛, 王猛, 等. 四川泡菜盐卤中微生物总基因组DNA提取方法的比较[J]. 中国酿造, 2015, 34(4): 90-92.
Jiang YY, Yang JT, Wang M, *et al.* Comparison of methods for total genomic DNA extraction from Sichuan pickled vegetables broth [J]. Chin Brew, 2015, 34(4): 90-92.
- [2] 张良, 向文良, 曾泽生, 等. 四川泡菜乳酸发酵菌剂的研究[J]. 食品科学, 2013, 34(19): 200-206.
Zhang L, Xiang WL, Zeng ZS, *et al.* Formulation of *Lactobacillus* strains for preparation of Sichuan pickles [J]. Food Sci, 2013, 34(19): 200-206.
- [3] 陈功. 试论中国泡菜历史与发展[J]. 食品与发酵科技, 2010, 46(3): 1-5.
Chen G. The history and development of Chinese pickles [J]. Food Ferment Technol, 2010, 46(3): 1-5.
- [4] Madalena L, Anabela B, Joana T, *et al.* The effects of ferulic and salicylic acids on *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens* single- and dual-species biofilms [J]. Inter Biodeter Biodegr, 2014, 86: 42-51.
- [5] 刘敏, 牛贞福. 盐渍双孢菇加工工艺及常见问题分析[J]. 山东农业科学, 2009(8): 102-103.
Liu M, Niu ZF. Analysis of processing technology and common problems about salted agaricus bisporus [J]. Shandong Agric Sci, 2009(8): 102-103.
- [6] 钟少枢, 吴克刚, 柴向华, 等. 七种单离食用香料对食品腐败菌抑菌活性的研究[J]. 食品工业科技, 2009, 30(5): 68-71.
Zhong SS, Wu KG, Chai XH, *et al.* Study on bacteriostasis of seven isolate spices to food spoilage organisms [J]. Sci Technol Food Ind, 2009, 30(5): 68-71.
- [7] 王猛, 蒋云露, 杨健涛, 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, 36(13): 184-189.
Wang M, Jiang YL, Yang JT, *et al.* Analysis and comparison of microorganisms isolated from fermented and spoilage Sichuan pickles with different salt concentrations [J]. Food Sci, 2015, 36(13): 184-189.
- [8] 饶瑜, 常伟, 龚丽, 等. 四川泡菜生花酵母的分离与鉴定[J]. 食品与发酵科技, 2013, 49(3): 19-22.
- [9] Rao Y, Chang W, Gong L, *et al.* Isolation and identification of spoilage microorganisms from Sichuan pickle [J]. Food Ferment Technol, 2013, 49(3): 19-22.
- [9] 王树庆, 张咏梅, 姜薇薇, 等. 发酵蔬菜食品的腐败及预防[J]. 中国调味品, 2013, 38(1): 73-75.
Wang SQ, Zhang YM, Jiang WW, *et al.* Prevention and control of spoilage of fermented vegetable products [J]. Chin Cond, 2013, 38(1): 73-75.
- [10] Jae HK, Fred B. Development of preservation prediction chart for long term storage of fermented cucumber [J]. J Life Sci, 2007, 17(12): 1616-1621.
- [11] Wendy F, Ilenys M, Pérez-Díaz, *et al.* Characteristics of spoilage-associated secondary cucumber fermentation [J]. AEM, 2011, 78(4): 1273-1284.
- [12] Suzanne D, Johanningsmeier RF, Feeters M. Metabolism of lactic acid in fermented cucumbers by *Lactobacillus buchneri* and related species, potential spoilage organisms in reduced salt fermentations [J]. Food Microbiol, 2013, 35: 129-135.
- [13] Breidt F, Medina E, Wafa D, *et al.* Characterization of cucumber fermentation spoilage bacteria by enrichment culture and 16S rDNA cloning [J]. J Food Sci, 2013, 78(3): 470-476.
- [14] Rao Y, Chang W, Xiang WL, *et al.* Screening and performance of *Lactobacillus plantarum* E11 with bacteriocin-like substance secretion as fermentation starter of Sichuan pickle [J]. J Food Saf, 2013, 33(4): 445-452.
- [15] GB 47892—2010 食品安全国家标准食品微生物学检验菌落总数测定[S].
GB 47892—2010 The total number of school inspection colonies national food safety standard determination of food microbiology [S].
- [16] Sundarakrishnan B, Pushpanathan M, Jayashree S, *et al.* Assessment of microbial richness in pelagic sediment of Andaman Sea by bacterial tag encoded FLX titanium amplicon pyrosequencing (bTEFAP) [J]. Indian J Microbiol, 2012, 52(4): 544-550.
- [17] Li K, Lin K, Li Z, *et al.* Spoilage and pathogenic bacteria associated with spoilage process of Sichuan pickle during the spontaneous fermentation [J]. Food Sci Technol Res, 2014, 20(4): 899-904.
- [18] 蒋云露, 王猛, 常伟, 等. 传统风吹肉加工过程中的微生物演替及优势菌群分析[J]. 食品科学, 2015, 36(7): 111-116.
Jiang YL, Wang M, Chang W, *et al.* Microbial community succession and dominant microbial population during the processing stages of traditional air-dried meat [J]. Food Sci, 2015, 36(7): 111-116.
- [19] 李可, 张庆, 陈功, 等. 青菜腌制过程中腐败表层细菌的多样

- 性分析与群落演替[J]. 食品科学, 2014,35(1): 180–184.
- Li K, Zhang Q, Chen G, *et al.* Diversity and community succession of surface spoilage bacteria in leaf mustard during pickling process [J]. Food Sci, 2014, 35(1): 180–184.
- [20] Devereux R, He SH, Doyle CL, *et al.* Diversity and origin of *Desulfovibrio* species: phylogenetic definition of a family [J]. J Bacteriol, 1990, 172(7): 3609–3619.
- [21] Franco W, Pe´rez-Di´az I. Microbial interactions associated with secondary cucumber fermentation [J]. J Appl Microbiol, 2013, 114(1): 161–172.
- [22] Johanningsmeier SD, Franco W, Perez-Diaz I, *et al.* Influence of sodium chloride, pH, and lactic acid bacteria on anaerobic lactic acid utilization during fermented cucumber spoilage [J]. J Food Sci, 2012, 77(7):397–404.
- [23] Johanningsmeier SD, McFeeters RF. Metabolism of lactic acid in fermented cucumbers by *Lactobacillus buchneri* and related species, potential spoilage organisms in reduced salt fermentations [J]. Food Microbiol, 2013, 35(2): 129–135.
- [24] Franco W, Pe´rez-Di´az I. Microbial interactions associated with secondary cucumber fermentation [J]. J Appl Microbiol, 2013, 114(1): 161–172.

(责任编辑: 金延秋)

作者简介



蒋云露, 硕士, 主要研究方向为食品微生物。

E-mail: jiangyl0104@163.com



饶瑜, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品微生物。

E-mail: ryfish@163.com