

浆水发酵中的优势乳酸菌分离鉴定

胡莹莹，赵丽，史力学，李全合

(天水市食品检验检测中心，甘肃 天水 741000)

摘要：利用VITEK 2compact全自动微生物鉴定系统对浆水发酵过程中乳酸菌种类及数量进行鉴定，结果表明，发酵过程中优势乳酸菌有4株乳酸菌菌株和2株酵母菌菌株。4株乳酸菌菌株分别为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、发酵乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、短乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)和乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*)，其中优势菌群为发酵乳杆菌和短乳杆菌；2株酵母菌菌株分别为平常假丝酵母(*Candida inconspicua*)、皱褶假丝酵母(*Candida rugosa*)。浆水发酵中的优势乳酸菌为发酵乳杆菌和短乳杆菌。浆水发酵至第3~4天时，植物乳杆菌为 $1.2 \times 10^7 \sim 1.6 \times 10^7$ CFU/mL，发酵乳杆菌为 $1.2 \times 10^7 \sim 1.6 \times 10^7$ CFU/mL，短乳杆菌为 $3.2 \times 10^6 \sim 6.5 \times 10^7$ CFU/mL，乳酸片球菌为 $4.6 \times 10^5 \sim 2.5 \times 10^6$ CFU/mL，此时浆水风味最佳。

关键词：浆水；发酵优势菌群；乳酸菌；酵母菌；分离鉴定

中图分类号：TS255.3 **文献标志码：**A **文章编号：**1001-1463(2021)04-0043-06

[doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2021.04.011]

Isolation and Identification of Dominant Lactic Acid Bacteria in Fermented Pickle Juice

HU Yingying, ZHAO Li, SHI Lixue, LI Quanhe

(Tianshui Food Inspection and Testing Center, Tianshui Gansu 741000, China)

Abstract: VITEK 2Compact automatic microbial identification system was used to identify the species and quantity of lactic acid bacteria in the pickle juice fermentation process. The results showed that there were 4 strains of lactic acid bacteria and 2 strains of yeast in the fermentation process. The four *Lactobacillus* strains were *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici*, respectively, and the dominant bacteria were *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis*. Two strains of yeast strains respectively *Candida inconspicua* and *Candida rugosa*. The dominant lactic acid bacteria in the fermentation of pickle juice were *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus brevis*. At the 3rd to 4th day of fermentation, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici* were $1.2 \times 10^7 \sim 1.6 \times 10^7$ CFU/mL, $1.2 \times 10^7 \sim 1.6 \times 10^7$ CFU/mL, $3.2 \times 10^6 \sim 6.5 \times 10^7$ CFU/mL and $4.6 \times 10^5 \sim 2.5 \times 10^6$ CFU/mL, respectively, indicating the best flavor of the pickle juice.

Key words: Pickle juice; Dominant population; Lactic acid bacteria; Yeast; Isolation and identification

发酵蔬菜是以各种蔬菜为原料，利用有益微生物的活动并且控制其一定的生长条件，对蔬菜进行发酵加工后制成的食品。发酵蔬菜主要有泡菜、酸菜、酱菜和腌菜等^[1-2]。浆水是甘肃、陕西等我国西北地区民间广泛流传的一种传统发酵食品，一般以

芹菜为原料，加入面汤和老浆水(俗称“引子”)发酵而成。口味酸醇、清香，且其浆水营养丰富，具有调中引气、开胃止渴、解烦去睡、调理脏腑、利小便和降血压等功效^[3]。传统浆水发酵微生物菌系复杂，主要包括枯草芽孢杆菌、醋酸菌、乳酸菌、

收稿日期：2021-01-25；修订日期：2021-03-01

基金项目：天水市科技支撑计划项目(2020-SHFZJKJ-4676)。

作者简介：胡莹莹(1986—)，女，甘肃天水人，工程师，硕士，主要从事食品微生物检测工作。Email: 289579020@qq.com。

酵母菌、霉菌等，其中优势菌群为乳酸菌和酵母菌，且乳酸菌多为厌氧或兼性厌氧菌株^[3-6]。我们按照已有传统工艺制作芹菜浆水，研究了浆水发酵中乳酸菌种类及其优势菌群、变化规律，以期对浆水工业化生产提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试新鲜浆水、芹菜、面粉均为市售。

1.2 仪器与设备

EX30 生物显微镜(宁波舜宇仪器有限公司)，Bio II Advance 二级生物安全柜(西班牙泰事达公司)，XW-80A 旋涡混合器(上海精科实业股份有限公司)，MJ-350B 霉菌培养箱、SPX-350B 生化培养箱(上海琅玕实验设备有限公司)，MLS-3781L-PC 高压蒸汽灭菌器(松下健康医疗器械株式会社)，MGC 厌氧培养盒(日本三菱化学株式会社中国有限公司)，VITEK 2compact 全自动微生物鉴定系统(法国生物梅里埃股份有限公司)。

1.3 培养基

分离培养基为 MRS 培养基、MC 培养基、孟加拉红培养基，鉴定培养基为蛋白胨水培养基、葡萄糖蛋白胨水培养基、明胶基础培养基、V-P 实验培养基、柠檬酸铁铵半固体培养基、含 5% 羊血的胰酶大豆琼脂培养基、含 5% 羊血的哥伦比亚血琼脂培养基、沙氏葡萄糖琼脂培养基。均购自北京陆桥生物技术有限责任公司。

1.4 试验方法

1.4.1 浆水制作工艺 采用传统工艺。将芹菜洗净切成寸段，沸水热烫 3 min 捞出，沥

水备用。用面粉、水按质量比 1 : 200 煮制面汤，芹菜、面汤按质量比 1 : 4 入缸，温度降至 30 ℃ 时按 4% 含量加入上述原浆水为引子，搅匀后进行发酵^[7]。

1.4.2 芹菜浆水发酵过程中优势菌群的变化

浆水中优势菌有乳酸菌、酵母菌。采用平板计数法，在发酵当天起每天同时采样，乳酸菌按 GB4789.35—2016 方法^[8]、酵母菌按 GB4789.15—2016 方法测定其菌数^[9]，记录培养皿中各类菌落数目、优势菌等。具体培养条件详见表 1。

1.4.3 发酵过程中乳酸菌群的分离鉴定

① 分离纯化。 在 MRS 培养基、MC 培养基、孟加拉红培养基上，用接种环挑取生长形态不同，具有钙圈的优势菌落于无菌生理盐水中，浓度稀释到 $\times 10^{-5}$ 、 $\times 10^{-7}$ 。涂布接种于分离培养基平板上，37 ℃ 培养 72 h 后挑取菌落丰厚，且占生长优势的单菌落反复纯化，从不同发酵时期的浆水中分离出不同形态菌落，进行纯化培养。将所获菌株编号并保存备用。**② 菌株初步鉴定。** 镜检菌落形态和菌体形态。**③ 生理生化鉴定。** 将上述菌株连续活化 2 次，通过革兰染色镜检，KOH 试验、过氧化氢酶试验、H₂S 试验、V-P 试验、硝酸盐、明胶液化、吲哚试验、产葡聚糖试验、碳水化合物发酵等试验进行菌种鉴定^[6,8]。**④ 仪器生化鉴定。** 用接种环挑取适量培养 18~24 h 的菌苔至 3 mL 0.45% NaCl 溶液中，配成 0.5~0.65 Mac 单位的菌悬液，选用适合的 VITEK 鉴定卡，将卡上弯管插入配制好的菌悬液中，置于 VITEK 2compact 全自动微生物鉴定系统进行仪器自动读卡鉴定。

表 1 微生物的分离与培养

分离对象	稀释度	培养基名称	培养温度 /℃	培养时间 /d	培养方式
乳酸菌	$\times 10^{-4}$ 、 $\times 10^{-5}$ 、 $\times 10^{-6}$ 、 $\times 10^{-7}$	MRS	36±1	3	厌氧
乳酸菌	10 ⁻³ 、10 ⁻⁴ 、10 ⁻⁵ 、10 ⁻⁶	MC			有氧
酵母菌	10 ⁻² 、10 ⁻³ 、10 ⁻⁴ 、10 ⁻⁵	孟加拉红	28±1	5	有氧

2 结果与分析

2.1 菌株分离和纯化

经几代纯化获得6株菌株，其中由MRS上分得3株，分别记为L1、L2、L3；由MC上分得1株记为L4，由孟加拉红上分得2株，分别记为Y1、Y2。

2.2 菌株初步鉴定

分别对L1、L2、L3、L4、Y1、Y2等菌株在MRS培养基、MC培养基和孟加拉红培养基上的菌落和菌体形态特征进行观察的结果见表2、图1。由表2和图1看出，菌株Y1、Y2菌体为革兰染色蓝色，菌体较

表2 6株菌株菌落形态及菌体形态观察

编号	培养基	倾注法菌落特征	涂布法菌落特征	观察结果
L1	MRS	乳白色，圆形，扁平，雾状菌落，在培养基底层生长，大小3.0~5.0 mm	乳白色，圆形，凸起，边缘整齐，表面光滑细密，湿润有光泽，大小2.0~3.0 mm	G+, 杆状，单个、成对或短链状，无芽孢
L2	MRS	乳白色，圆形，在培养基中层呈不同方向生长，大小2.0~3.0 mm	微白色，圆形，凸起，边缘整齐，表面光滑湿润有光泽，大小2.0~3.0 mm	G+, 短杆状，单个或成对，无芽孢
L3	MRS	乳白色，圆形，在培养基中层生长，大小0.5~1.0 mm	灰白色，圆形，凸起，光滑湿润，有光泽，大小1.0~2.0 mm	G+, 杆状，单个、成对或短链状，无芽孢
L4	MC	紫红色菌落，圆形，边缘整齐，有水解圈，大小1.0~2.0 mm	紫红色，圆形，凸起，光滑湿润，有光泽，有水解圈，大小1.0~2.0 mm	G+, 球状，单个或成对，无芽孢
Y1	孟加拉红	红色，圆形，大小2.0~3.0 mm	红色，圆形，扁平，边缘不整齐，表面干燥，有皱褶，有明显酒香味，大小2.0~3.0 mm	革兰染色蓝色，菌体较大，棒状或椭圆状，多边芽殖
Y2	孟加拉红	红色，圆形，大小2.0~3.0 mm	红色，圆形，中心隆起呈突脐状，表面无光泽，较干燥，菌落大小2.0~3.0 mm	革兰染色蓝色，菌体较大，棒状或椭圆状，单端芽殖

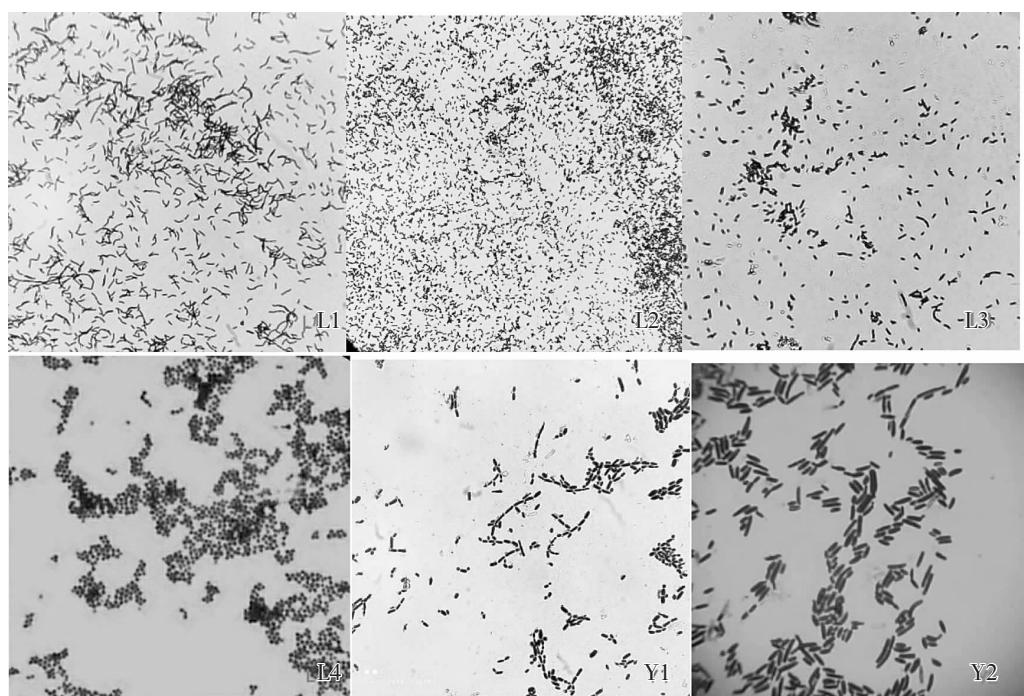


图1 6个分离菌株的显微照片

大，棒状或椭圆状，有芽殖等，初步判定为酵母菌，菌株 L1、L2、L3、L4 需进一步鉴定。

2.3 生理生化鉴定

生理生化鉴定的结果(表3、表4)表明，菌株 L1、L2、L3、L4 的 KOH、H₂O₂、V-P、吲哚试验均表现为阴性，但对碳水化合物的利用不同，根据《伯杰细菌鉴定手册》(第八版)、《常见细菌系统鉴定手册》及乳酸细菌分类鉴定及试验方法^[10-11]，将菌株 L1、L2、L3、L4 初步鉴定为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、发酵乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、短乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)和乳酸片球菌 (*Pediococcus acidilactici*)；依据《酵母菌特性及鉴定手册》和《真菌鉴定手册》^[12-13]，将分离菌株 Y1、Y2 初步鉴定为假丝酵母(*Candida inconspicua*、*Candida inconspicua*)。VITEK 2compact 微生物分析系统自动化程度高，较传统生化鉴定试剂盒操作简单，且耗时更短，快速高效，鉴定结果准确可靠。从表5可以看出，经 VITEK 2compact 鉴定，菌株 L1 为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)，菌株 L2 为发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)，菌株 L3 为短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)，菌株 L4 为乳酸片球菌 (*Pediococcus acidilactici*)，菌株 Y1 为平常假丝酵母(*Candida inconspicua*)，菌株 Y2 为皱褶假丝酵母(*Candida rugosa*)，可见 VITEK 2compact 鉴定结果与生化鉴定结果基本吻合。

表3 6个分离菌株的生化试验结果^①

项目	L1	L2	L3	L4	Y1	Y2
KOH试验	-	-	-	-	-	-
H ₂ O ₂	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	+	-	-	-
V-P	-	-	-	-	-	-
硝酸盐	-	-	-	-	-	-
明胶液化	-	-	-	-	-	-
吲哚	-	-	-	-	+	-
产葡聚糖	-	-	-	-	-	-

①“+”表示阳性反应，“-”表示阴性反应，“ND”表示未检测，下表同。

表4 6个分离菌株的碳水化合物发酵试验结果

项目	L1	L2	L3	L4	Y1	Y2
七叶苷	+	-	-	-	-	-
纤维二糖	+	-	+	+	-	-
麦芽糖	+	+	+	-	-	-
甘露醇	+	+	-	-	+	+
水杨苷	+	-	+	-	ND	ND
山梨醇	+	-	-	-	-	+
蔗糖	+	+	+	-	-	-
棉子糖	+	+	+	-	-	-
乳糖	+	+	-	-	-	-

2.4 浆水发酵过程中优势乳酸菌群的变化

浆水发酵过程中优势乳酸菌群生长变化情况见表6及图2，酵母菌生长变化见图3。由表6及图2可见，浆水发酵过程中的优势乳酸菌群菌株植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)以第4天数量最多，为 1.6×10^7 CFU/mL；第3天次之，为 1.2×10^7 CFU/mL，其余时间为 $8.5 \times 10^5 \sim 9.0 \times 10^6$ CFU/mL。发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)以第2天

表5 6个分离菌株的 VITEK 2compact 微生物鉴定结果

编号	卡片	微生物	置信度 /%	分析时间 /h
L1	ANC	植物乳杆菌(<i>Lactobacillus plantarum</i>)	95	6.00
L2	ANC	发酵乳杆菌(<i>Lactobacillus fermentum</i>)	89	6.00
L3	ANC	短乳杆菌(<i>Lactobacillus brevis</i>)	96	6.25
L4	GP	乳酸片球菌(<i>Pediococcus acidilactici</i>)	89	7.00
Y1	YST	平常假丝酵母(<i>Candida inconspicua</i>)	95	18.25
Y2	YST	皱褶假丝酵母(<i>Candida rugosa</i>)	97	18.25

最多, 为 5.0×10^8 CFU/mL; 第3天次之, 为 1.3×10^8 CFU/mL; 其余时间为 5.4×10^6 ~ 1.4×10^7 CFU/mL。短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*) 以第3天最多, 为 6.5×10^7 CFU/mL; 第2天次之, 为 4.6×10^7 CFU/mL; 其余时间为 2.5×10^5 ~ 1.9×10^7 CFU/mL。乳酸片球菌 (*Pediococcus acidilactici*) 以第4天最多, 为 2.5×10^6 CFU/mL; 第3天次之, 为 4.6×10^5 CFU/mL; 其余时间为 1.5×10^2 ~ 4.6×10^5 CFU/mL。菌株Y1为平常假丝酵母 (*Candida inconspicua*), 菌株Y2为皱褶假丝酵母 (*Candida rugosa*), 二者均为假丝酵母, 因此平常假丝酵母+皱褶假丝酵母以第6天、第7天最多, 均为 3.5×10^5 CFU/mL; 第5天次之, 为 3.0×10^5 CFU/mL; 其余时间为 9.2×10^3 ~ 2.2×10^5 CFU/mL。可见, 在浆水发酵初期(1~2 d)乳酸菌数量较少, 产品没有酸味, 此时主要是需氧微生物枯草芽孢杆菌、醋酸菌、明串珠菌占优势^[6]。2 d后乳酸菌数量开始增加, 随着酸度的降低成为优势菌群, 活跃是在发酵中期(3~5 d), 这与前人的研究基本一致^[6]。此时发酵乳杆菌、希氏乳杆菌生长占优势, 在发酵第3天达到峰值; 随着发酵的进行, 属于同型乳酸发酵的植物乳杆菌开始占优势并在第4天达到峰

值。从计数上看, 在乳酸菌活跃的整个发酵期, 发酵乳杆菌和希氏乳杆菌在数量上占绝对优势, 乳酸片球菌在整个发酵过程中数量较少, 不是优势菌群; 发酵后期(第6~10天)乳酸菌数量减少, 活力下降。由图3可知, 浆水发酵过程中酵母菌数量呈先增加后降低的趋势, 发酵前中期酵母菌生长受抑制, 随着乳酸菌活力的下降, 从4 d后开始迅速生长; 在发酵中后期(第5~7天)占优势, 同时在第6~7天时酵母菌数量达到峰值。试验过程中还发现, 在发酵6 d后浆水开始有霉菌滋生, 霉菌、酵母菌的数量逐渐增加, 质量下降, 风味不再酸香爽口。可见浆水在发酵第3~4天时达到最佳状态, 食用风味最佳。

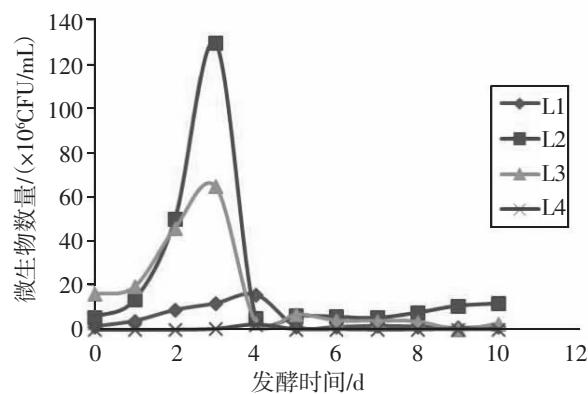


图2 浆水发酵中乳酸菌生长变化

表6 浆水发酵过程中优势菌群变化情况

发酵时间 /d	微生物数量/(CFU/mL)				
	L1	L2	L3	L4	Y1+Y2
0	1.5×10^6	5.7×10^6	1.6×10^7	1.5×10^2	1.9×10^4
1	4.0×10^6	1.4×10^7	1.9×10^7	3.4×10^2	9.2×10^3
2	9.0×10^6	5.0×10^8	4.6×10^7	3.8×10^3	3.8×10^4
3	1.2×10^7	1.3×10^8	6.5×10^7	4.6×10^5	4.1×10^4
4	1.6×10^7	5.4×10^6	3.2×10^6	2.5×10^6	5.5×10^4
5	1.5×10^6	6.5×10^6	7.1×10^6	2.8×10^5	3.0×10^5
6	1.3×10^6	6.0×10^6	4.3×10^6	3.1×10^5	3.5×10^5
7	1.8×10^6	5.5×10^6	4.2×10^6	0.8×10^5	3.5×10^5
8	1.4×10^6	7.9×10^6	3.8×10^6	2.1×10^5	2.2×10^5
9	8.5×10^5	1.1×10^7	2.5×10^5	3.5×10^5	9.2×10^4
10	1.3×10^6	1.2×10^7	2.9×10^6	2.9×10^5	6.0×10^4

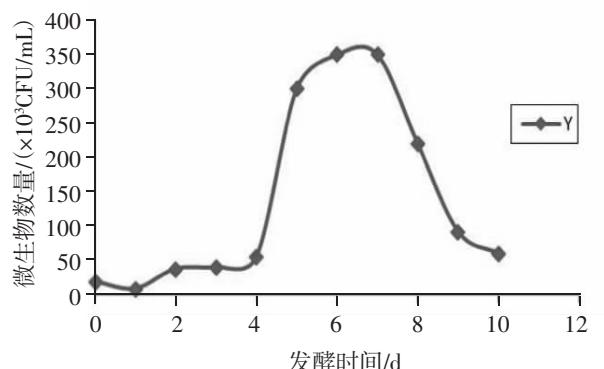


图3 浆水发酵中酵母菌生长变化

3 结论

经鉴定及测定,发现浆水中乳酸菌群有植物乳杆菌、发酵乳杆菌、短乳杆菌、乳酸片球菌等,其中优势菌群为发酵乳杆菌和短乳杆菌,酵母菌群有平常假丝酵母+皱褶假丝酵母。浆水发酵过程中优势乳酸菌群菌株植物乳杆菌以第4天最多,为 1.6×10^7 CFU/mL;第3天次之,为 1.2×10^7 CFU/mL,其余时间为 $8.5 \times 10^5 \sim 9.0 \times 10^6$ CFU/mL。发酵乳杆菌以第2天最多,为 5.0×10^8 CFU/mL;第3天次之,为 1.3×10^8 CFU/mL,其余时间为 $5.4 \times 10^6 \sim 1.4 \times 10^7$ CFU/mL。短乳杆菌以第3天最多,为 6.5×10^7 CFU/mL;第2天次之,为 4.6×10^7 CFU/mL,其余时间为 $2.5 \times 10^5 \sim 1.9 \times 10^7$ CFU/mL。乳酸片球菌以第4天最多,为 2.5×10^6 CFU/mL;第3天次之,为 4.6×10^5 CFU/mL,其余时间为 $1.5 \times 10^2 \sim 4.6 \times 10^5$ CFU/mL。菌株Y1为平常假丝酵母,菌株Y2为皱褶假丝酵母,二者均为假丝酵母,因此平常假丝酵母+皱褶假丝酵母以第6天、第7天最多,均为 3.5×10^5 CFU/mL;第5天次之,为 3.0×10^5 CFU/mL,其余时间为 $9.2 \times 10^3 \sim 2.2 \times 10^5$ CFU/mL。浆水发酵至第3~4天时,植物乳杆菌为 $1.2 \times 10^7 \sim 1.6 \times 10^7$ CFU/mL,发酵乳杆菌为 $1.2 \times 10^7 \sim 1.6 \times 10^7$ CFU/mL,短乳杆菌为 $3.2 \times 10^6 \sim 6.5 \times 10^7$ CFU/mL,乳酸片球菌为 $4.6 \times 10^5 \sim 2.5 \times 10^6$ CFU/mL,食用风味最佳,可直接食用或真空贮藏待售。

参考文献:

- [1] 施安辉,周波.蔬菜传统腌制发酵工艺过程中微生物生态学的意义[J].中国调味品,2002(5): 11-15.
- [2] 杨荣玲,肖更生.我国蔬菜发酵加工研究进展[J].保鲜与加工,2006(2): 15-18.
- [3] 孟宪刚,周鸽鸽,张丽珂.发酵蔬菜浆水中优势好氧微生物的分离及鉴定[J].食品工业科技,2010, 32(3): 222-224.
- [4] 张轶,王玉丽.传统发酵食品—浆水中微生物的分离与初步鉴定[J].食品科学,2007, 28(1): 219-222.
- [5] 张丽珂,周鸽鸽,孟宪刚.传统发酵食品浆水中厌氧微生物分离鉴定初探[J].食品科技,2010, 35(4): 39-41.
- [6] 何玲,李勤振.浆水芹菜发酵过程中优势菌群的分离、鉴定及变化[J].食品科技,2010, 35(5): 36-40.
- [7] 何玲,杨公明.浆水芹菜自然和接种发酵过程中有机酸的变化[J].北方园艺,2011(4): 179-181.
- [8] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局.食品安全国家标准:食品微生物学检验 乳酸菌检验:GB4789.35—2016[S].北京:中国标准出版社,2016.
- [9] 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:食品微生物学检验 霉菌和酵母计数:GB4789.15—2016[S].北京:中国标准出版社,2016.
- [10] RE布坎南, E吉本斯.伯杰细菌鉴定手册[M].中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组,译.8版.北京:科学出版社,1984.
- [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] 巴尼特,佩恩,亚罗.酵母菌的特征与鉴定手册[M].青岛:中国海洋大学出版社,1991: 15-35.
- [13] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社,1979: 100-120.

(本文责编:郑立龙)