

不同盐度下潮汕地区芥菜酸菜的品质及微生物种群比较

马一轩¹, 李汴生^{1,2*}, 阮征^{1,2}, 李丹丹¹, 谢财喜³, 郑钺颖³

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640) (2. 广东省天然产物绿色加工与产品安全重点实验室, 广东广州 510640) (3. 广东蓬盛味业有限公司, 广东汕头 515023)

摘要: 为探究盐汤浓度对潮汕地区自然发酵芥菜酸菜中部分理化性质和微生物种群性质的影响, 通过改变预腌后酸菜正式发酵过程中盐汤的盐度 (盐汤梯度为 3 wt.%、4 wt.%、5 wt.%), 测定发酵过程中盐度、总酸度、外观及风味、还原糖、氨基酸态氮、乳酸菌总数和菌落总数的变化, 并取发酵终点的酸菜进行细菌群落高通量测序。研究结果表明了盐度对芥菜酸菜发酵过程理化性质及微生物种群的影响, 发酵 10 d, 3 wt.% 盐度酸菜与 5 wt.% 盐度酸菜的总酸含量相差了 1.83 g·kg⁻¹, 与 4 wt.% 盐度酸菜相差 1.06 g·kg⁻¹, 3 wt.% 盐度酸菜和 5 wt.% 盐度酸菜还原糖含量达到峰值的时间相差 3 d。3 wt.% 盐度盐汤会使得酸菜中的杂菌致病菌比例较高, 而 5 wt.% 盐度盐汤则部分抑制了非耐盐乳酸菌的生长, 反而具有较低的乳杆菌比例 (21%)。更低的盐度似乎会使得发酵过程明显加快, 从菌种组成和氨基酸态氮含量来看, 预腌后选用 4 wt.% 盐度的盐汤来进行潮汕地区酸菜的腌制最为合适。研究为潮汕地区自然发酵芥菜酸菜的发酵过程探究和盐度选择提供了理论基础。

关键词: 潮汕地区芥菜酸菜; 发酵过程; 理化性质; 高通量测序

文章编号: 1673-9078(2026)04-94-104

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.4.0132

Comparison of Quality and Microbial Community of Chaoshan Mustard Greens Pickles at Different Salinity Levels

MA Yixuan¹, LI Biansheng^{1,2*}, RUAN Zheng^{1,2}, LI Dandan¹, XIE Caixi³, ZHENG Yueying³

(1. School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Guangdong Key Laboratory of Green Processing and Product Safety, Guangzhou 510640, China)

(3. Guangdong Pengsheng Taste Industry Co. Ltd., Shantou 515023, China)

Abstract: The aim of this study was to investigate the influence of brine concentration on certain physicochemical properties and microbial community characteristics in naturally fermented mustard greens pickles from the Chaoshan region. During the fermentation stage after pre-pickling, the salt concentration of the brine was adjusted to create gradients of 3 wt.%, 4 wt.%, and 5 wt.%. Throughout fermentation, changes in brine salinity, total acidity, appearance and flavor, reducing sugar, amino acid nitrogen, total lactic acid bacteria count, and total colony count were measured, and high-throughput sequencing of the bacterial community on the pickles was performed at the end of fermentation. The results indicated that salt concentration significantly

引文格式:

马一轩, 李汴生, 阮征, 等. 不同盐度下潮汕地区芥菜酸菜的品质及微生物种群比较[J]. 现代食品科技, 2026, 42(4): 94-104.

MA Yixuan, LI Biansheng, RUAN Zheng, et al. Comparison of quality and microbial community of chaoshan mustard greens pickles at different salinity levels [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(4): 94-104.

收稿日期: 2025-01-28; 修回日期: 2025-03-26; 接受日期: 2025-03-26

基金项目: 广东省重点领域研发计划项目 (2019B020219002)

作者简介: 马一轩 (1999-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与保藏, E-mail: 862193506@qq.com

通讯作者: 李汴生 (1962-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品加工与保藏, E-mail: febskli@scut.edu.cn

affected both physicochemical properties and microbial populations during fermentation. After 10 days of fermentation, the total acid content differed by $1.83 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ between pickles fermented at 3 wt.% and 5 wt.% salt; the time to peak reducing sugar content differed by 3 days between these two concentrations, whereas the difference between 3 wt.% and 4 wt.% was $1.06 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$. Brine at 3 wt.% resulted in a higher proportion of spoilage and pathogenic bacteria, whereas brine at 5 wt.% partially inhibited the growth of non-halotolerant lactic acid bacteria, resulting in a lower proportion of lactobacilli (21%). Moreover, a lower salt concentration appeared to accelerate the fermentation process. Based on microbial composition and amino acid nitrogen content, brine with 4 wt.% salt was determined to be the most suitable for fermenting Chaoshan mustard greens pickles after pre-pickling. This study provides a theoretical basis for understanding the fermentation process of naturally fermented mustard greens pickles from the Chaoshan region and for selecting the appropriate salt concentration for preparing such pickles.

Key words: Chaoshan mustard greens pickles; fermentation process; physicochemical properties; high-throughput sequencing

酸菜是中国具有地方特色的代表性发酵食品，以其开胃爽口的风味得到群众的喜爱。目前关于酸菜的研究有很多，这些研究的对象多为北方以白菜为原料的酸菜，而对南方的芥菜酸菜研究针对性较低，很多研究并未从产地、原料和环境细分不同酸菜的差异^[1-4]。南方酸菜地区的酸菜和北方地区的酸菜除了原料选择的不同以外，用盐方式也大有不同。东北酸菜，基本都是一步到位，直接用低浓度盐水进行浸泡发酵。南方酸菜包括广西酸笋^[5]、四川冬菜^[6]、湖南传统发酵芥菜^[7]等比较出名的地方酸菜，都有一部分共同的“粗盐/高浓度盐水预腌制”步骤，均在正式腌制之前用粗盐或高浓度盐水进行短期的预腌制，再漂脱洗盐后，装罐进行后续的发酵。以芥菜为原料制作酸菜的地区范围多集中在南方，如两广地区、云贵川渝地区^[8]。潮汕地区酸菜属于南方酸菜，且原料为小叶芥菜和大叶芥菜，发酵过程不添加香料和人工发酵剂，属于极具代表性的南方酸菜，在两广地区受众广泛。

酸菜在发酵环境中，盐的存在能够显著提高植物细胞内外的渗透压，从而引发细胞内水分外流，导致质壁分离，抑制细胞的增殖速度^[9]。此外，水分子会被钠离子和氯离子包围并固定，使其无法被微生物有效利用^[10]。这种作用机制直接影响微生物的繁殖动态，同时盐浓度的变化也会对发酵酸菜中微生物群落的构成产生显著影响。目前现有的盐度对酸菜发酵过程和微生物组成的研究多集中在东北地区以白菜卷心菜为原料的酸菜，而潮汕地区自然发酵芥菜酸菜在两广地区是存在一定代表性的。目前，关于盐度对微生物发酵理化性质和微生物种群的研究，由于不同地区环境菌群、平均温度和对保存时间追求的差异，导致用盐量的差异很大，从 0.5 wt.%~12 wt.% 不等^[3]，北方地区由于温度较低，杂菌少，因此很低的盐度（0.5 wt.%~1 wt.%）也能完成腌制^[1]，而南方地区的酸菜盐度基本都在 3 wt.% 以上。通过传统酸菜腌制方法的经验和

查阅现有南方地区酸菜的制作方法，最终确定盐浓度范围在 6 wt.% 以下，更高的盐度并不适宜食用，研究的梯度以 1 wt.% 为跨度，选取 3 wt.%、4 wt.% 和 5 wt.% 三个浓度作为探讨。本研究以盐度为变量，以潮汕地区传统发酵芥菜酸菜为代表，探究盐度对潮汕地区发酵芥菜酸菜的发酵过程品质控制参数理化性质及微生物种群组成分析的影响，便于工业生产酸菜更综合的评估酸菜的发酵终点，针对性的研究存在一定新颖性和价值。

1 材料及方法

1.1 材料

原料：小叶芥菜，生长周期为 40~50 d，产于湖南岳阳华容县；精制加碘食用盐，长江盐化有限公司。试剂：PCA 培养基、MRS 培养基，广东环凯微生物科技有限公司；E.Z.N.A.® Soil DNA Kit DNA 抽提试剂盒，美国 Omega 公司；FastPfu DNA Polymerase，北京全式金生物技术有限公司。

1.2 仪器

T100 Thermal Cycler PCR 仪，美国 BIO-RAD 公司；NanoDrop2000 分光光度计，美国 Thermo Scientific 公司；JY600C 电泳仪，北京君意东方电泳设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 酸菜发酵方法

以广东潮汕地区传统工艺为基础对酸菜进行腌制处理。选择成熟度高、外观饱满、无腐败和病虫害的优质小叶芥菜原料，去除黄叶和老帮后仔细清洗干净。初步处理时，将芥菜置于高度和底面直径为 80 cm 和 44 cm 的 HDPE 塑料桶中，用盐度为 10 wt.% 的盐水中浸泡 48 h，芥菜与盐水的质量比为 3:1（保证酸菜完

全被盐水浸没);然后用清水冲洗三次。处理后的芥菜整齐排列于发酵桶内,压实排气后,分别加入质量分数为3 wt.%、4 wt.%、5 wt.%的盐水至发酵桶,盐水用量同预腌步骤,完全密封。整个过程中不添加任何发酵剂或调味品。发酵容器用塑料布密封,并放置在避光、阴凉的环境中,由于环境温度与季节有关,因此需要人为控制发酵温度,自然发酵条件通过室内空调设定为温度20.5℃,湿度保持在50%~60%。在发酵的第0~15天分别取样,两颗酸菜沥干汤汁,分割后各取一半进行混合破碎,对酸菜进行理化指标的测定,以研究发酵过程中的变化规律。

1.3.2 盐度的测定

按照GB 5009.42-2016《食品安全国家标准 食品中盐度的测定》(以氯化钠浓度计),硝酸银滴定法,单位为质量百分比wt.%。

1.3.3 感官描述

采用盐度4 wt.%的酸菜样品,感官从色泽、香气、味道和状态等4方面描述;并用相机拍照,拍照在室内固定位置固定光线下拍摄,采用佳能g7x3相机,拍摄模式:A/M,光圈:为F2.8-F4,快门:1/100 s,感光度设置:ISO-400。

1.3.4 还原糖的测定

按照GB 5009.7-2016《食品安全国家标准 食品中还原糖的测定》的方法。

1.3.5 氨基酸态氮的测定

用GB 5009.235-2016《食品安全国家标准 食品氨基酸态氮的测定》中的甲醛滴定法测定氨基酸态氮含量。

1.3.6 总酸的测定

具体方法按照GB 12456-2021《食品安全国家标准 食品中总酸的测定》的酸碱滴定法。

1.3.7 乳酸菌检测

按照GB 4789.35-2023《食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验》的方法。

1.3.8 菌落总数的测定

按照GB 4789.2-2022《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》的方法。

1.3.9 数据分析方法

使用Origin 2022软件进行绘图,使用SPSS 2018软件进行统计分析,所有数据采用单因素ANOVA方差分析,再采用邓肯多重比较分析,每组数据至少重复3次, $P<0.05$ 表示具有显著性差异。

1.3.10 微生物的高通量测序分析

1.3.10.1 测序

在发酵的第15天,采集酸菜样品并开始后续分析。根据E.Z.N.A.® soil DNA kit (Omega Bio-tek, Norcross, GA, U.S.)操作指南提取微生物群落的总基因组DNA。提取的DNA质量通过1 wt.%的琼脂糖凝胶电泳检测,DNA的浓度和纯度则利用NanoDrop2000分光光度计(美国Thermo Scientific公司)测定。

1.3.10.2 PCR扩增

以提取的DNA作为模板,利用带有Barcode序列的特定引物338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'),对16S rRNA基因的V3-V4可变区进行PCR扩增。随后,根据97%的相似性标准,对质控拼接后的序列进行OTU(操作分类单元)聚类。基于Silva 16S rRNA基因数据库(v138),通过RDP classifier工具对OTU进行物种分类注释,置信度设定为70%,并进一步统计不同分类水平下各样本的群落组成特征。

1.3.11 数据分析方法

所有分析步骤均在美吉生物云平台完成,具体包括以下流程:首先,通过Mothur^[11]软件计算Alpha多样性指标,如Chao 1和Shannon指数,同时利用Wilcoxon秩和检验评估组间Alpha多样性的差异显著性。随后,基于Bray-curtis距离算法进行PCoA(主坐标分析),以检测样本间微生物群落结构的相似程度,并结合PERMANOVA非参数检验判断组间微生物群落结构的显著性差异。此外,采用LEfSe分析(线性判别分析效应量)方法,从门到属的分类水平上识别不同组间丰度显著差异的细菌类群。

2 结果与讨论

2.1 不同盐度下发酵芥菜酸菜的发酵过程分析

2.1.1 盐度变化

在发酵过程中0~15 d取样,测定酸菜盐度,结果如图1所示。

由图1可知,在经过10 wt.%浓度盐水预腌48 h并经过三次清水漂洗后,酸菜的平均盐度为3.38 wt.%。此时用3 wt.%、4 wt.%、5 wt.%盐度盐水进行正式腌制,在正式腌制过程中,盐分在酸菜原料和环境盐水中迁移,并基本在5 d内达到平衡。最终的平衡盐度分别为3.26 wt.%, 3.71 wt.%, 4.26 wt.%。这主要是由于渗透压和水分引起的迁移,酸菜内部盐度和外界盐水盐度相差越大,短期内的盐度变化也越快。

表1 发酵过程中酸菜的外观变化及感官描述

Table 1 Appearance changes and sensory evaluation of pickled mustard greens during fermentation								
发酵时间	新鲜芥菜	预腌 48 h	发酵 5 d	发酵 7 d	发酵 9 d	发酵 11 d	发酵 13 d	发酵 15 d
图片								
颜色	浅绿色叶片完整	叶片颜色吸水加深	部分叶片开始脱色	茎部表面开始脱色	外表面全部脱绿	叶片颜色加深, 表面转暗黄	表面完全转暗黄, 叶片发黑	表面完全转暗黄, 叶片发黑
香味	芥菜清香, 淡淡泥土气	芥菜清香, 泥土气消失	芥菜清香减弱	开始出现淡淡酸味	开始出现酸菜独有的醛酯味	醛味酯味变浓, 出现硫味	酸味、醛酯味和硫味浓郁	酸味、醛酯味和硫味浓郁
味道	生菜的涩味	咸味, 无鲜味	咸味, 无鲜味, 涩味减少	咸味, 发酸, 无鲜味	开始出现咸鲜味, 酸味加重	咸鲜味加重, 酸味加重	酸味稳定, 适口度极佳	酸味稳定, 适口度极佳
外观状态	叶片完整	叶片完整, 吸水后饱满	茎部开始脱水软化	茎部进一步脱水软化	茎部逐渐软烂	茎部逐渐软烂,	大小收缩, 稳定	大小收缩, 稳定

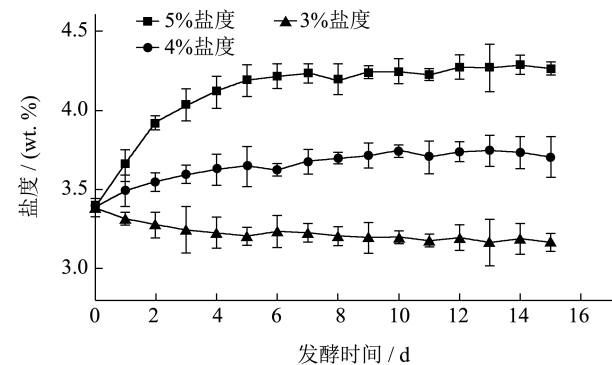


图 1 发酵过程中酸菜的盐度变化

Fig.1 Changes in salinity during the fermentation of pickled mustard greens

2.1.2 酸度变化

在发酵的 0~15 d 内每天进行取样, 检测总酸含量, 结果如图 2 所示。

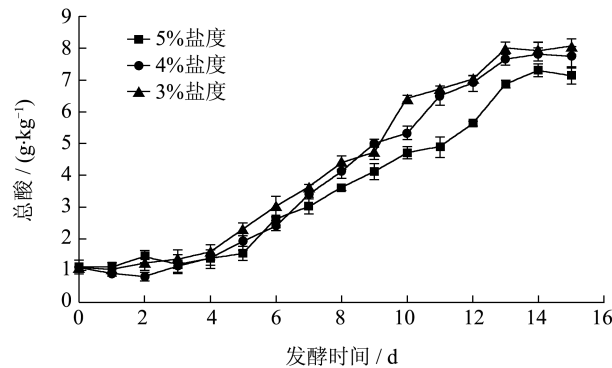


图 2 发酵过程中酸菜的总酸变化

Fig.2 Changes in total acidity during the fermentation of pickled mustard greens

由图 2 结果可得, 更高的盐度下, 总酸增加的速度会更慢, 在发酵的第 10 天, 3 wt.% 盐度酸菜和 5 wt.%

盐度酸菜的总酸含量相差了 1.83 g·kg⁻¹, 与 4 wt.% 盐度酸菜相差 1.06 g·kg⁻¹, 3 wt.% 盐度酸菜和 5 wt.% 盐度酸菜的总酸含量超过 6 g·kg⁻¹ 的时间分别为 10 d 和 13 d。因此, 如果以总酸含量达到稳定值的时间来作为评估发酵快慢的依据, 那么更高的盐度会减缓整个发酵的过程。同时, 更高盐度的酸菜在发酵后期的总酸稳定值更低。Hong 等^[12] 的研究报告的结论中, 高盐组酸菜中的总酸含量在发酵后期的稳定值也更低。高盐可能不仅影响了发酵的快慢, 同时也影响了产物的总量。

2.1.3 外观和风味变化

由于 3、4、5 wt.% 盐度下的酸菜外观及感官变化相似, 故取新鲜芥菜、预腌 48 h 芥菜和 4 wt.% 盐度酸菜在正式发酵的 5、7、9、11、13、15 d 进行取样拍照, 结果如表 1 所示。

由表 1 明显可得, 芥菜在正式发酵到第 5 天后颜色才开始明显变化, 颜色变化主要集中在发酵的中后期, 在发酵的第 13 天后几乎绿色完全褪去, 叶片变成褐色, 茎部菜口变成暗黄色。这种变化主要是由于 pH 的降低带来的叶绿素降解, 芥菜本身的叶绿素转化为脱镁叶绿素所致^[13]。此外, 乳酸菌在发酵过程中产生的 β-葡萄糖苷酶^[14]能够对芥菜中丰富的类胡萝卜素和类黄酮等天然色素进行水解反应, 从而对发酵芥菜的最终色泽产生显著影响。

2.2 不同盐度下发酵芥菜酸菜的风味特性

2.2.1 还原糖变化

乳酸菌等微生物以还原糖为主要碳源, 通过糖酵解途径产生乳酸和其他代谢产物, 可以通过还原糖含量反映酸菜发酵进程。在发酵的 0~15 d 内每天进行取

样,检测还原糖含量,结果如图3所示。

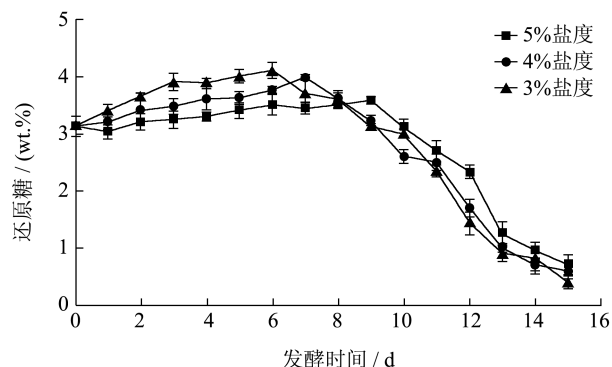


图3 发酵过程中酸菜的还原糖变化

Fig.3 Changes in reducing sugar content during the fermentation of pickled mustard greens

在蔬菜发酵的早期阶段,由于复杂碳水化合物的分解,还原糖含量可能最初会增加。以胡萝卜发酵过程为例,游离葡萄糖和果糖水平在储存过程中降低,而蔗糖水平增加^[15]。随着盐度的增加,还原糖含量由上升转为下降的峰值所对应的发酵天数逐渐增加,3 wt.%、4 wt.%、5 wt.%盐度酸菜还原糖含量达到峰值的时间分别为6、7、9 d,且峰值的还原糖含量分别为4.05 wt.%、3.76 wt.%、3.58 wt.%。这代表着盐度对发酵过程启动的影响,更高的盐度会减缓发酵过程,从而反映在还原糖下降的结果上。还原糖下降的原因是由于乳酸菌利用碳水化合物作为主要能源,进行代谢生长繁殖。Semenova等^[16]在酸菜发酵的过程中持续人为补充碳水化合物,使得乳酸菌达到了很高的丰度,这对乳酸菌利用碳水化合物作为主要能源这一判断提供了支撑。

如图3所示,在初始发酵期(0~6 d),所有浓度盐汤发酵芥菜中的还原糖含量均呈逐渐增加的趋势,最终达到峰值。这种现象可归因于延长发酵时间和盐水施加的渗透压的共同作用,这有助于还原糖和其他营养物质从芥菜基质中持续溶解。在这个阶段,微生物对还原糖的消耗可能超过了酸菜中还原糖的释放速率,从而导致观察到的前期积累。

2.2.2 氨基酸态氮变化

氨基酸态氮反映发酵酸菜中游离氨基酸的积累情况,反映了微生物对植物中可溶性蛋白的利用。在0~15 d的发酵过程中,酸菜样品中的氨基酸态氮含量变化如图4所示。

氨基酸态氮表示样品中以氨基酸形式存在的氮元素含量,通常用于间接反映游离氨基酸的总量。由图4所示,氨基酸态氮含量的范围为79.2~189 mg/100 g。氨基酸态氮在发酵的过程中呈现缓慢上升后趋于稳定

的趋势。这种趋势与Choi等^[17]对氨基酸态氮的研究结论存在相似之处。从结果来看,较高的盐水平似乎会导致氨基型氮含量的平衡值有所降低,氨基酸态氮随盐浓度的增加而显著下降,4 wt.%盐度组的酸菜在发酵终点左右氨基酸态氮含量为189 mg/100 g,超过了3 wt.%盐度组的183 mg/100 g和5 wt.%盐度组的172 mg/100 g。推测这可能是由于4 wt.%盐度组中乳杆菌属的更高丰度带来的。

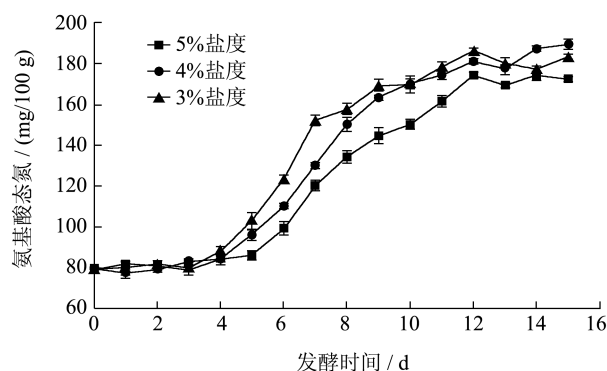


图4 发酵过程中酸菜的氨基酸态氮变化

Fig.4 Changes in amino acid nitrogen content during the fermentation of pickled mustard greens

结合图3、图4和表1可得,发酵到中期7 d,也就是氨基酸态氮含量超过120 mg/100 g后,各个盐度的酸菜都开始有了明显的醛味和酯味,鲜味也开始出现。氨基酸态氮的含量体现了乳酸菌发酵对还原糖和可溶性蛋白的利用,氨基酸态氮的含量越高,乳酸菌的活性及对原料的利用率也越高,风味上的醛酯味也变得更加浓郁。还原糖(如葡萄糖、果糖)是乳酸菌代谢的主要底物,在发酵过程中被分解为乳酸和其他有机酸,还原糖的下降代表了发酵进程,糖被转变为酸,还原糖开始快速下降的时间与滋味评价中酸味和鲜味出现的时间基本一致。从对风味的影响来看,还原糖的变化反映了醛酯味和酸味的积累,氨基酸态氮的变化反映了鲜味的积累。

2.3 不同盐度下发酵芥菜酸菜的微生物数量分析

2.3.1 乳酸菌数量

乳酸菌是发酵蔬菜中的主要微生物,通过代谢糖类产乳酸,提升丰度,乳酸菌的数量变化可以反映发酵的进程。所有理化性质的变化本质上都是由于微生物的代谢而改变的。取发酵0、1、2、3、5、7、9、11、13、15 d的酸菜样品进行乳酸菌数量的检测,结果如图5。

尽管大多数乳酸菌都具有耐盐性,但图5的结果表明,较高的盐度仍会减缓乳酸菌生长繁殖的速度。

发酵后期乳酸菌总数下降,此种结果与韩宏娇等^[4]的研究类似。推测原因是潮汕酸菜所属的南方酸菜发酵过程较短,已出现乳酸菌将原料总糖完全代谢后竞争代谢抑制的情况。

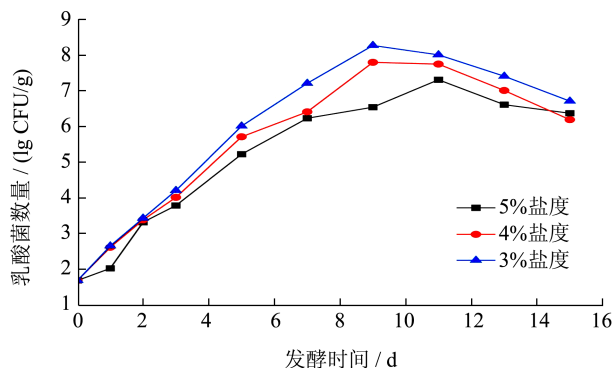


图5 发酵过程中酸菜的乳酸菌数量变化

Fig.5 Changes in lactic acid bacteria count during the fermentation of pickled mustard greens

在发酵的平稳期,3 wt.% 盐度酸菜的乳酸菌数量级明显高于5 wt.% 盐度酸菜,超过 10^8 CFU/g,推测是由于3 wt.% 盐度对非耐盐乳酸菌的影响仍较小^[18]。不同盐度酸菜中乳酸菌数量的差异从正式发酵第3天开始显现。所有盐度的酸菜乳酸菌含量似乎均仍在下降,并未进入完全平稳的阶段。

结合图2和图5不难发现,总酸含量的变化明显滞后乳酸菌指数增长的1~2 d。原因是酸菜中的酸由乳酸菌产生,而乳酸菌先分裂扩增后,再利用酸菜中的多糖原料进行生长和营养发酵,因此会存在时间上的差异。

结合图3和图5可得,随着盐度的增加,还原糖含量由上升转为下降的峰值所对应的发酵天数逐渐增加。探究还原糖含量由上升转为下降的原因,发现NADH是发酵环境中酶的主要电子供体^[19],而NADH的产生源于对还原糖的利用。在乳酸发酵中,NADH直接将电子转移到丙酮酸,产生副产品乳酸。因此,到了发酵中后期,当乳酸菌开始大量繁殖后,还原糖的析出达到饱和,且乳酸菌开始大量利用还原糖基质进行呼吸繁殖并产酸,此时微生物对还原糖的分解速率大于还原糖的析出速率。还原糖含量逐渐降低。

2.3.2 菌落总数

菌落总数反映了酸菜中的所有微生物,包括细菌、酵母和霉菌,通过和乳酸菌数量的比较能够一定程度上反映杂菌数量。菌落总数数量过高可能存在安全隐患。取发酵0、1、2、3、5、7、9、11、13、15 d的酸菜样品进行菌落总数的检测,结果如图6。

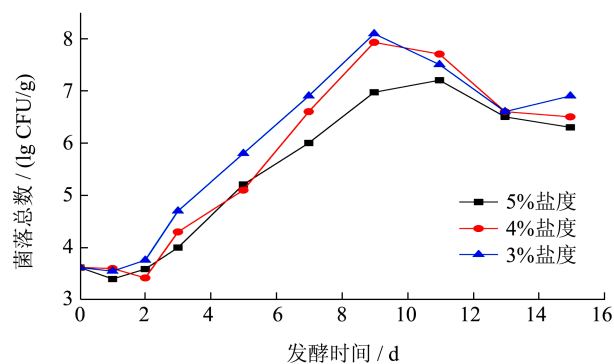


图6 发酵过程中酸菜的菌落总数变化

Fig.6 Changes in total colony count during the fermentation of pickled mustard greens

图6中菌落总数的变化趋势与乳酸菌总数的变化趋势总体是一致的。在微生物数量级达到峰值后,由于高酸和底物营养耗尽,微生物开始减少。

乳酸菌的数量级达到 10^4 CFU/g后,总酸含量才开始明显的变化,这可能是由于发酵前期乳酸菌数量级低,产酸量仍不显著。值得一提的是,由图5和图6可得,在发酵的中后期,乳酸菌的数量超过了菌落总数的数量,这可能是因为目前国标检测菌落总数的方法为需氧培养,培养基存在差异,酸菜中存在的乳杆菌属和双歧杆菌属的乳酸菌在有氧环境下的生长可能被抑制,导致菌落总数的数量低于乳酸菌的数量。

乳酸菌代表有益菌,菌落总数包括非有益菌,因此单从数量级的角度分析是不够的,还需要进行菌相种类的研究。

2.4 不同盐度下发酵芥菜酸菜的微生物多样性分析

2.4.1 不同盐度下发酵潮汕酸菜中细菌群落高通量测序质量分析

本实验要求每个样本的测序深度超过10 000条序列,9个样本共计获得567 098条序列,平均长度为420 bp,覆盖了16S rRNA的V4~V5区域。经过过滤和质量控制处理后,各酸菜样本的有效序列深度均超过10 000条。低质量序列被剔除后,在97 wt.%的相似性水平上,利用USEARCH11-uparse算法对序列进行OTU聚类分析,共识别出159个OTUs。结果如表2。

稀释曲线(Rarefaction Curve)^[20]和香农指数曲线(Shannon Index)通过随机抽取样本中的一些数量个体,统计其所代表的物种数量,以个体数量为横坐标,物种数量为纵坐标绘制而成。稀释曲线用于间接评估样本的物种丰富程度。当曲线趋于平缓时,说明测序深度已经覆盖了样本中的大部分物种信息,测序结果接近饱和状态。结果分别如图7和图8所示。

表 2 高通量测序结果

Table 2 High-throughput sequencing results					
盐度/ (wt.%)	样品	OTUs/ (97%)	原始 reads	优化 reads	平均长度/bp
5	SA 1	58	66 527	64 513	416.89
	SA 2	59	62 295	60 363	417.45
	SA 3	59	61 778	59 738	415.29
4	SB 1	81	61 958	59 587	424.40
	SB 2	68	60 166	58 021	423.23
	SB 3	73	64 611	62 078	423.60
3	SC 1	100	61 738	59 812	422.58
	SC 2	101	65 399	62 564	423.01
	SC 3	101	62 626	60 657	422.75

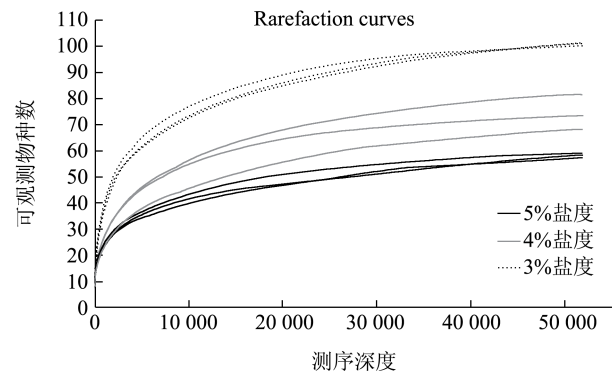


图 7 可观测物种数

Fig.7 Observable species count

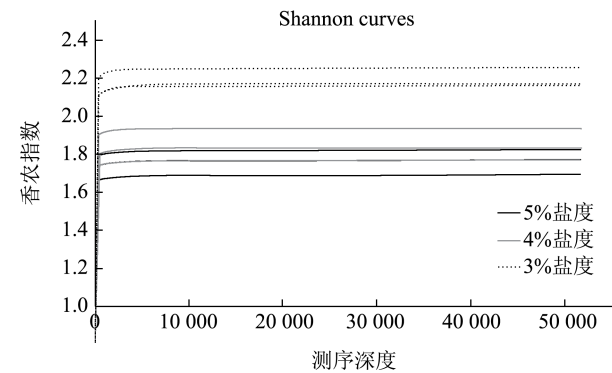


图 8 香农指数

Fig.8 Shannon index

由表 2 可见，不同酸菜样本中 OTUs 的划分情况存在差异，基于这些数据可进一步研究盐卤发酵过程中物种的多样性。图 7 显示，随着测序深度的增加，OTU 数量的增长幅度逐渐减小，但尚未完全达到饱和和平稳；而从图 8 可以看出，随着测序量的增加，多样性指数增长逐渐减缓并趋于饱和。这表明当前的测序深度足以代表样品中微生物群落的多样性，发酵酸菜中的细菌种群已基本被检测到^[21]。

2.4.2 不同盐度下发酵潮汕酸菜中细菌群落α多样性分析

对不同蔬菜种类潮汕酸菜中细菌物种数目进行 α 多样性分析，结果如表 3 所示。其中，Sobs 指数（Sspecies Observed）为代表观测到的 OTU 物种数目，Chao 指数和 Ace 指数通常用于估计微生物群落的丰富度，Shannon 指数通常用于估计微生物的多样性，Shannon 指数越大，表明样品中物种多样性越高^[22]。Simpson 指数（Simpson's Diversity Index）是一种用于量化生物多样性的指标，它考虑了每个物种的个体数量及其在总体中的相对贡献。Simpson 指数的值范围在 0 到 1 之间，其中 0 表示无限多样性，1 表示无多样性。指数的值越低，表示多样性越高；反之，值越高，表示多样性越低。

由表 3 可以看出，不同腌渍盐度的潮汕酸菜中微生物多样性有所不同，在 α 水平上 3 wt.% 盐度组酸菜菌群与 4 wt.% 盐度组和 5 wt.% 盐度组在各个指数下均具有显著差异，而 4 wt.% 盐度组和 5 wt.% 盐度组在 Shannon 指数和 Simpson 指数下多样性不具有显著性，可以推断出 5 wt.% 盐度组与 4 wt.% 盐度组的菌群多样性相似度程度更为接近，推测 5 wt.% 盐度只是抑制了菌群生长但并未明显改变菌相。

2.4.3 不同盐度下发酵潮汕酸菜中细菌群落β多样性分析

不同盐度下发酵潮汕酸菜中细菌群落 β 多样性分析结果如图 9~11 所示。

表 3 α多样性分析结果

Table 3 Results of α-diversity analysis					
盐度/(wt.%)	Sobs	Shannon	Simpson	Ace	Chao
5	59.33 ± 0.58 ^a	1.76 ± 0.07 ^a	0.25 ± 0.02 ^a	66.16 ± 4.47 ^a	62.98 ± 2.33 ^a
4	74 ± 6.56 ^b	1.84 ± 0.09 ^a	0.23 ± 0.02 ^a	78.05 ± 5.35 ^b	76.9 ± 4.56 ^b
3	100.67 ± 0.58 ^c	2.19 ± 0.05 ^b	0.18 ± 0.01 ^b	106.63 ± 5.57 ^c	103.45 ± 3.37 ^c

注：表中带有不同上标字母的数值在同列间差异显著（ $P<0.05$ ），相同字母表示差异不显著。

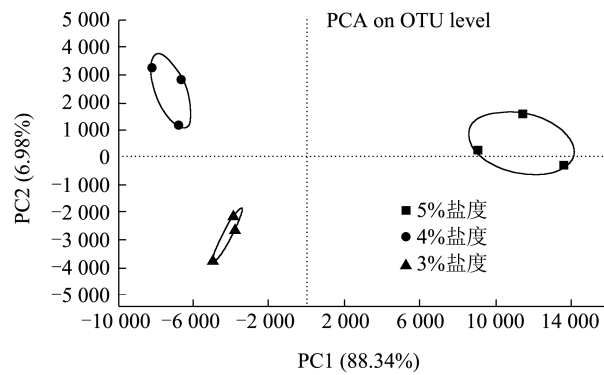


图9 PCA 主成分分析图

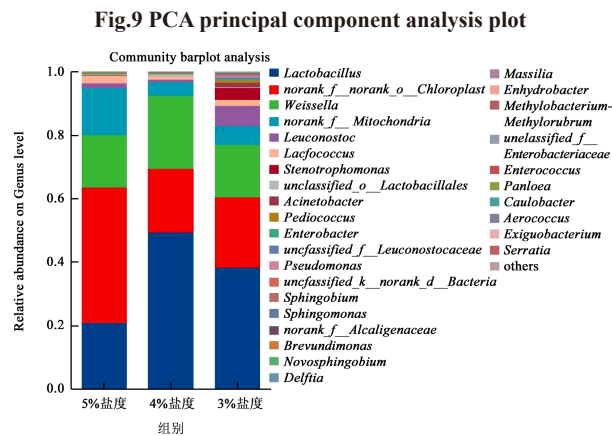


图10 细菌群落 Bar 图分析

Fig.10 Bar chart analysis of bacterial communities

通过 β 分析可以分析不同盐度潮汕地区自然发酵芥菜酸菜微生物群落组成的差异性。通过主成分分析 (Principal Components Analysis, PCA) 图9可以观察微生物群落间的差异, 其中两个点之间的距离越小, 说明两个处理组的物种组成差异性较小。三种样品的三组平行距离均比较接近, 数据重复度高, 可以判定本次检测的有效性。

在第一主成分 (PC1) 上 5 wt.% 盐度组酸菜与 3 wt.% 盐度组和 4 wt.% 盐度组酸菜相距较远, 在第二主成分 (PC2) 上则呈梯度分布, 三种盐度组菌群均无交集。由上述分析可知, 酸菜发酵的含盐量对其微生物菌群结构影响较大。

由图10基于属水平的微生物丰度柱状图可以看出, 所有样品的优势菌均为乳杆菌属 (*Lactobacillus* sp.), 相对丰度占比从高到低依次为乳杆菌属 (*Lactobacillus* sp.)、魏斯氏菌属 (*Weissella* sp.)、明串珠菌属 (*Leuconostoc* sp.)、乳球菌属 (*Lactococcus* sp.)、嗜麦芽窄食单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*)。这与先前的研究报道^[23,24]结果类似, 酸菜微生物组主要由三个属组成: 明串珠菌属、乳杆菌属和魏斯氏菌属。在图中可以明显看出, 4 wt.% 盐度组的乳杆菌和魏斯氏菌属占比菌较高, 超过 50 wt.%, 3 wt.% 对照组的

种属丰富度明显极高, 存在较多杂菌。推测原因是 3 wt.% 盐度过低, 对杂菌微生物抑制性较差。5 wt.% 盐度组中较低的乳杆菌比例 (21%) 更可能导致发酵不充分, 菌种活性降低。乳杆菌属的生长可能受到高盐的抑制, 这与 Liang 等^[25]的研究结果相似。

值得一提的是, 在梯度盐度组下的微生物优势菌属结果与 Liang 等^[26]对不同盐浓度发酵酸菜中细菌群落中的分析结果有所不同, Liang 等^[26]的研究结果表明, 在低盐酸菜 (质量分数 < 1%) 中, 乳杆菌属为主要优势菌, 而高盐酸菜 (质量分数 > 1%) 中, 片球菌属、醋杆菌属和弧菌占据主导地位。然而, 在潮汕酸菜中, 主要的优势菌属为乳杆菌属 (*Lactobacillus* sp.)、魏斯氏菌属 (*Weissella* sp.) 和乳球菌属 (*Lactococcus* sp.), 而未检测到片球菌属 (*Pediococcus* sp.) 的存在。而重庆地区生产的酸菜中优势菌则确为片球菌属^[27], 因此推测这种差异是由于生产环境导致的, 不同地区环境空气中的原始菌落组成有较大差异, 进而导致酸菜产品中优势菌群的差别。

酸菜虽然属于较为常见的发酵蔬菜, 但在国内, 不同地区的环境优势菌种, 不同的酸菜原料, 以及不同的气候、温度和湿度都会导致终产物理化性质、微生物组成^[28]、风味物质的巨大差异。因此, 需要对每个地区的酸菜产品做细分研究。从微生物的主成分分析中可以看出, 潮汕地区酸菜的优势乳酸菌属为乳杆菌属 (*Lactobacillus* sp.)、魏斯氏菌属 (*Weissella* sp.)、明串珠菌属 (*Leuconostoc* sp.), 湖南传统发酵芥菜的优势菌属丰富度有类似之处^[7], 丰富度不如东北酸菜和四川酸菜。推测其原因为, 用高浓度盐水预腌制的前处理步骤, 将酸菜的优势菌进行了一轮选择, 魏斯氏菌 (*Weissella cibaria*)、植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 和柠檬明串珠菌 (*Leuconostoc citreum*) 表现出较高程度的耐盐性, 这与 González-Quijano 等^[29]的研究反映出同样的规律, 而与同样进行了预腌处理的湖南酸菜优势菌属^[7]则存在差异。因此, 可以推测, 菌相的物种丰度差异预腌步骤和环境菌种共同作用的结果。

丛敏等^[30]的研究表明, 在发酵的初始阶段, 酸菜中占主导地位的是肠膜明串珠菌, 产生二氧化碳、乙酸和乙醇, 从而增加酸度。随着发酵的进行, 耐酸的乳酸菌 (例如植物乳杆菌) 会增殖并产生乳酸, 进一步增加酸度。大约 12 d 后, 营养耗尽导致 LAB 种群和酸度水平稳定。结合图2和图10高通量测序群落 Bar 图可得, 5 wt.% 盐度酸菜的明串珠菌属微生物含量确实更高, 乳杆菌含量更低。

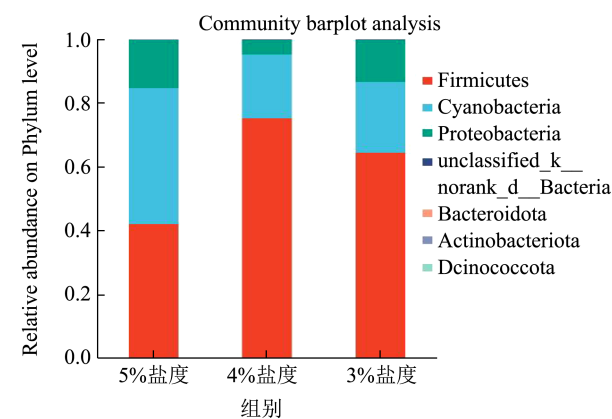


图 11 门水平相对丰度差异

Fig.11 Relative abundance differences at the phylum level

由图 11 基于门水平的微生物丰度柱状图可以看出，潮汕酸菜中优势门类分别为拟杆菌门（Firmicutes），蓝细菌门（Cyanobacteria）以及变形菌门（Proteobacteria）。其中，拟杆菌门（Firmicutes）多为对发酵和风味有益的乳杆菌，蓝细菌门（Cyanobacteria）多源于淡水，对酸菜的发酵过程影响较低，变形菌门（Proteobacteria）中存在较多杂菌和致病菌，如大肠杆菌、埃希氏菌、沙门氏菌、弧菌、螺杆菌、幽门螺杆菌等著名的属。

结果显示 4 wt.% 盐度组的变形菌门（Proteobacteria）相对丰度最低而拟杆菌门（Firmicutes）相对丰度最高，超过 70 wt.%，对发酵的有益菌含量更高。相比之下 5 wt.% 盐度组的拟杆菌门（Firmicutes）相对丰度低于蓝细菌门（Cyanobacteria），证明其乳酸菌含量不达标。推测是较高的盐度带来的高渗透压已经开始对耐盐乳酸菌也出现了活性抑制作用。

通过克鲁斯卡尔－沃利斯检验（Kruskal-Wallis H test）检验其组内高显著性微生物，结果如图 12 所示。

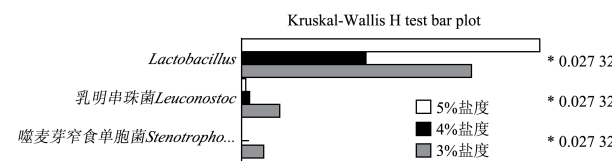


图 12 三种盐度的发酵酸菜中具有显著差异的菌种

Fig.12 Differential bacterial species in fermented vegetables with three salt coentrations

排名前三的是乳杆菌、乳明串珠菌和嗜麦芽芽孢单胞菌，可以明显看到 3 wt.% 盐度组中作为条件致病菌的嗜麦芽芽孢单胞菌含量极高而 4 wt.%、5 wt.% 盐度组含量极少。说明 3 wt.% 盐度组酸菜存在的致病杂菌比重较大。

2.4.4 不同盐度发酵潮汕酸菜中细菌群落热图分析

利用丰度聚类热图可以直观分析不同盐度条件下

发酵酸菜的主要优势菌群。在属分类水平上，根据菌属的丰度数据，选取丰度排名前 50 的菌属，并对各样品间的丰度相似性进行聚类分析。细菌群落的热图如图 13 所示。

对高丰度和低丰度的物种实现分级聚类。热图中的颜色梯度直观反映了不同样品在各分类水平上的群落组成差异。颜色越接近红色，表示该物种在样品中的丰度较高；而颜色越接近蓝色，则说明该物种的丰度较低。

可以看到乳杆菌属和魏斯氏菌属为代表的几种乳酸菌在三种盐度组酸菜中均为优势菌。不同的是，3 wt.% 盐度组中的不动杆菌属，假单胞菌属，寡养单胞菌属，鞘氨醇单胞菌均远高于 4 wt.%、5 wt.% 盐度组。4 wt.% 盐度组的菌落构成较为纯净，杂菌种类较少。

2.4.5 不同盐度发酵潮汕酸菜特有细菌物种韦恩图

基于样品总细菌 OTU 数量作 Venn 图，进行相似性分析，结果如图 14 所示。

3 wt.% 盐度组与 5 wt.% 盐度组共有的 OTU 数量 8 个，3 wt.% 盐度组与 4 wt.% 盐度组共有的 OTU 数量 18 个，4 wt.% 盐度组与 5 wt.% 盐度组共有的 OTU 数量 3 个，三组样本共有的 OTU 数量 60 个。这些 OTU 中，3 wt.% 盐度组特有 OTU 数量 48 个，4 wt.% 盐度组特有 OTU 数量 14 个，5 wt.% 盐度组特有 OTU 数量 8 个。由此可以看出，3 wt.% 盐度组处理对酸菜细菌群落结构影响较大，4 wt.% 和 5 wt.% 盐度组均一化程度较高，菌落构成较为纯净，杂菌种类较少。

观察图 4，发现 4 wt.% 盐度组的酸菜在发酵终点左右的氨基酸态氮含量更高。结合图 10，推测这可能是由于 4 wt.% 盐度组中乳杆菌属的更高丰度带来的。综合乳酸菌数量图 5 和菌落总数图 6 来看，更高的盐度减缓了发酵的过程，同时降低了微生物的数量级。

从盐度对酸菜菌群微生物多样性的影响来看，5 wt.% 盐度组与 4 wt.% 盐度组的菌群多样性相似程度更为接近，5 wt.% 盐度只是抑制了菌群生长但并未明显改变菌相，而 3 wt.% 盐度组中的不动杆菌属，假单胞菌属，寡养单胞菌属，鞘氨醇单胞菌均远高于 4 wt.%、5 wt.% 盐度组，3 wt.% 盐度组的微生物与 4 wt.% 和 5 wt.% 盐度的微生物多样性相比具有显著差异，且 3 wt.% 盐度组酸菜存在的致病杂菌比重较大。将潮汕酸菜的微生物种群与其他地区酸菜的微生物种群进行比较，发现潮汕地区芥菜酸菜的丰富度不如东北酸菜和四川酸菜，我们认为这种丰度差异是高盐预腌步骤和环境菌种共同作用的结果。同时我们发现 4 wt.% 盐度组的变形菌门（Proteobacteria）相对丰度最低而拟杆菌门（Firmicutes）相对丰度最高，对发酵的有益菌含量更高。

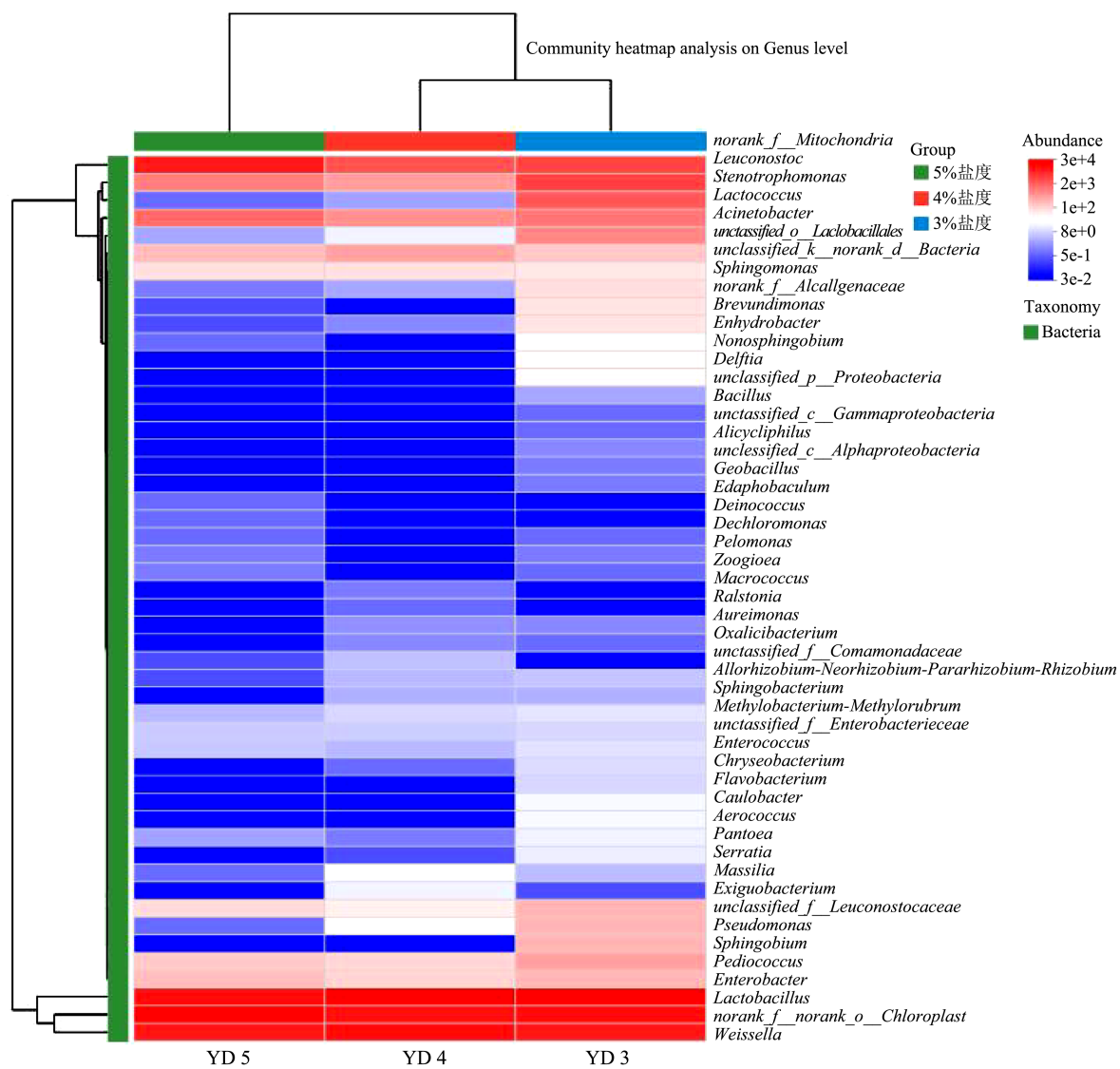


图 13 细菌种类热图

Fig.13 Heatmap of bacterial species

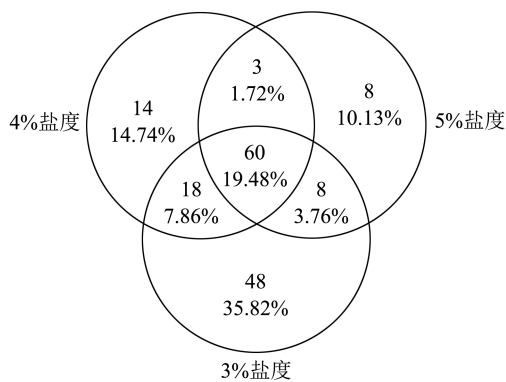


图 14 共有和特有细菌菌种 Venn 图

Fig.14 Venn diagram of shared and unique bacterial species

3 结论

本研究揭示了盐度梯度对酸菜发酵过程的综合影

响。当环境盐度与酸菜初始盐度差异增大时，盐分迁移速率显著提升。微生物群落分析表明，5 wt.% 盐度组的明串珠菌属占比更高，而乳杆菌属丰度在 4 wt.% 盐度组达到峰值。发酵过程中，所有样品在第 7 天开始脱绿并产生酸味及醛酯类风味，至第 13 天完全黄化。还原糖含量变化的转折点随盐度增加而延后：2 wt.% 组在第 5 天达峰，4 wt.% 组延至第 7 天，5 wt.% 组则到第 9 天。值得注意的是，4 wt.% 盐度组在发酵终点表现出最高的氨基酸态氮含量。

由理化指标和高通量测序结果综合可得，高盐浓度下微生物的多样性较低，对乳酸菌的数量也有所影响。在高盐条件下，盐的抑制作用可能导致乳酸菌的生长受到一定限制，从而影响酸度的积累。除了氨基酸态氮这一指标外，其余的理化指标均与盐度的递增呈现规律性变化，而高通量测序的结果却不与盐度变

化呈正相关。我们认为这是值得探讨的,不论在什么盐度下,乳杆菌属、魏斯氏菌属以及明串珠菌属在潮汕芥菜酸菜中的优势地位都没有改变,只是相对含量和杂菌丰度发生了变化,这种变化不足以改变盐度对发酵过程理化指标的影响规律。从高通量测序的菌相来看,4 wt.% 盐度组酸菜的菌相更纯净,有益菌更多,杂菌更少,氨基酸态氮含量更高,因此我们认为4 wt.% 盐汤的发酵条件更有优势。

参考文献

- [1] WANG Q, YANG J, WANG Y, et al. Basic research and industrial development status of suancai in Northeast China: History, microflora diversity, processing technology, nutrition and safety [J]. Food Science and Human Wellness, 2025, 14: 9250306.
- [2] 刘鑫,王家旺,隋雨萌,等.中国传统发酵蔬菜中微生物多样性及其对品质形成影响研究进展[J].食品科学,2024,45(10):290-297.
- [3] 李凤姿,张媛,吴昊,等.盐对发酵蔬菜微生物群体和发酵质量的影响[J].中国调味品,2018,43(3):150-154,200.
- [4] 韩宏娇,丛敏,李欣蔚,等.自然发酵酸菜化学成分含量和微生物数量的动态变化及其相关性分析[J].食品工业科技,2019,40(2): 148-153.
- [5] 陈正培,曹倩,蒋熠琮,等.柳州地区传统发酵酸笋细菌多样性研究[J].中国调味品,2021,46(8):33-42.
- [6] 姚英政.四川冬菜腌制过程品质动态变化及微生物宏基因组研究[D].武汉:华中农业大学,2017.
- [7] 王一淇.芥菜发酵过程中菌相变化规律及发酵剂的研究[D].长沙:湖南农业大学,2014.
- [8] 冷容,李娟,杨仕伟,等.晚熟宽柄芥(酸菜)新品种渝芥1号的选育[J].中国蔬菜,2015,9:78-80.
- [9] 欧雪,吴梦西,廖一漠,等.不同盐浓度对接种发酵萝卜泡菜品质的影响[J].四川农业大学学报,2022,40(3):438-448.
- [10] ZHANG Y, GUO X, PENG Z, et al. A review of recent progress in reducing NaCl content in meat and fish products using basic amino acids [J]. Trends in Food Science & Technology, 2022, 119: 215-226.
- [11] SCHLOSS P D, WESTCOTT S L, RYABIN T, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(23): 7537-7541.
- [12] HONG G H, LEE S Y, PARK E S, et al. Changes in microbial community by salt content in kimchi during fermentation [J]. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 2021, 50(6): 648-653.
- [13] GUNAWAN M I, BARRINGER S A. Green color degradation of blanched broccoli (*Brassica oleracea*) due to acid and microbial growth. [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2000, 24(3): 253-263.
- [14] MAPELLI-BRAHM P, BARBA F J, REMIZE F, et al. The impact of fermentation processes on the production, retention and bioavailability of carotenoids: An overview [J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 99: 389-401.
- [15] ANDERSSON R, ERIKSSON C, SALOMONSSON A, et al. Lactic acid fermentation of fresh and stored carrot : chemical, microbial and sensory evaluation of products [J]. LWT, 1990, 23: 34-40.
- [16] SEMENOVA J A, POSOKINA N E, TERESHONOK V I. Influence of carbohydrate correction of raw materials on the growth of lactic acid microorganisms in the process of directed fermentation of vegetables [J]. Vegetable Crops of Russia, 2020, 6: 99-103.
- [17] CHOI Y J, LEE H W, YANG J H, et al. Changes in quality properties of kimchi based on the nitrogen content of fermented anchovy sauce, Myeolchi Aekjeot, during fermentation [J]. Food Science and Biotechnology, 2018, 27(4): 1145-1155.
- [18] LEE D Y, PARK S E, KIM E J, et al. A comparative study of the physicochemical, microbial, and metabolic profiling of kimchi during long-term fermentation under varying salinity conditions [J]. LWT, 2024, 196: 115838.
- [19] DODDS K L, COLLINS-THOMPSON D L. Characteristics of nitrite reductase activity in *Lactobacillus lactis* TS4 [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1985, 31(6): 558-562.
- [20] 钱杨,饶瑜,蒋云露,等.基于高通量测序技术分析不同蔬菜种类四川泡菜中微生物多样性[J].食品与发酵工业,2022,48(13):277-284.
- [21] SAKAI M, MORIMURA S. Production of low salt takana pickles by using isolated lactic acid bacteria [J]. Journal of the Brewing Society of Japan, 2015, 110(4): 212-217.
- [22] 李成,孔晓雪,余炬波,等.基于高通量测序分析蟹糊微生物菌群多样性[J].食品科学,2020,41(4):134-139.
- [23] BAE J W, RHEE S K, PARK J R, et al. Development and evaluation of genome-probing microarrays for monitoring lactic acid bacteria [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(12): 8825-8835.
- [24] CHO K M, MATH R K, ISLAM S Md A, et al. Biodegradation of chlorpyrifos by lactic acid bacteria during kimchi fermentation [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(5): 1882-1889.
- [25] LIANG H, HE Z, WANG X, et al. Effects of salt concentration on microbial diversity and volatile compounds during suancai fermentation [J]. Food Microbiology, 2020, 91: 103537.
- [26] LIANG H, HE Z, WANG X, et al. Bacterial profiles and volatile flavor compounds in commercial Suancai with varying salt concentration from Northeastern China [J]. Food Research International, 2020, 137: 109384.
- [27] 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.
- [28] 李文青,卿泉,唐清苗,等.发酵芥菜工艺及品质变化研究进展[J].中国酿造,2019,38(12):1-4.
- [29] GONZALEZ-QUIJANO G K, DORANTES-ALVAREZ L, HERNANDEZ-SANCHEZ H, et al. Halotolerance and survival kinetics of lactic acid bacteria isolated from jalapeño pepper (*Capsicum annuum* L) fermentation [J]. Journal of Food Science, 2014, 79(8): 414-421.
- [30] 丛敏,李欣蔚,武俊瑞,等.PCR-DGGE分析东北传统发酵酸菜中乳酸菌多样性[J].食品科学,2016,37(7):78-82.