PCR-DGGE 分析东北自然发酵酸菜中的微生物多样性

乌日娜，于美玲，孟令帅，徐鑫，岳喜庆，武俊瑞
（沈阳农业大学食品学院，辽宁沈阳 110866）

摘要：为了探明传统的自然发酵酸菜中微生物的多样性和优势菌群，通过聚合酶链式反应–变性梯度凝胶电泳（polymerase chain reaction- denaturing gradient gel electrophoresis，PCR-DGGE）技术分析酸菜发酵过程中微生物群落动态变化。结果表明：东北自然发酵酸菜中的细菌种类比较丰富，真菌在酸菜中存在相对较少。东北自然发酵酸菜在发酵早期的活跃菌为明串珠菌（*Leuconostoc sp.*），而后是发酵产酸的嗜酸乳杆菌（*L. acidophilus*）、发酵乳杆菌（*L. fermentum*）和植物乳杆菌（*L. plantarum*），最后是由植物乳杆菌完成发酵过程。其中明串菌株为酸菜发酵前期优势细菌，植物乳杆菌为发酵中后期优势细菌，东北自然发酵酸菜发酵过程中主要真菌为汉逊德巴利酵母（*Debaryomyces hansenii*）、热带假丝酵母（*Candida tropicalis*）、扩展青霉（*Penicillium expansum*），真菌数量随发酵时间的增加而减少，且种类也随时间的变化而不断变化。

关键词：变性梯度凝胶电泳；酸菜；发酵；真菌；多样性

文章篇号：1673-9078(2014)10-8-12 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.10.002

PCR-DGGE Analysis of the Microbial Diversity in Naturally Fermented Suan-cai from Northeast China

WU Ri-na, YU Mei-ling, MENG Ling-shuai, XU Xin, YUE Xi-qing, WU Jun-rui
(College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: In order to reveal the microbial diversity and predominant microflora in traditional naturally fermented suan-cai from Northeast China, kinetic changes in microbial communities during the fermentation of suan-cai were analyzed by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE). The results indicated that the naturally fermented suan-cai contained many types of bacteria, but relatively few fungi. The most active bacterium was *Leuconostoc* sp., observed in the early stage of the fermentation process, followed by the fermenting and acid-producing bacteria *L. acidophilus*, *L. fermentum*, and *L. plantarum*, before the fermentation was completed by *L. plantarum*. *Leuconostoc* sp. was the predominant microorganism in the early fermentation stages, whereas *L. plantarum* was predominant in the middle and later stages. *Debaryomyces hansenii*, *Candida tropicalis*, and *Penicillium expansum* were the dominant fungi during the fermentation process. The number of fungi decreased with increasing fermentation time, and the types of fungi also varied with the different stages of fermentation.

Key words: denaturing gradient gel electrophoresis; suan-cai; fermentation; fungus; diversity

发酵酸菜是东北地区冬季保藏蔬菜的传统方法，酸菜是将新鲜白菜用盐水在密闭容器中泡制一段时间后形成的发酵蔬菜制品。酸菜以酸鲜纯正、脆嫩芳香、清爽可口、回味悠久、解腻开胃、增进食欲等功效为世人所津津乐道，自然发酵的酸菜赋予了其独特的风味，这种独特的发酵方式决定了其中微生物区系的多样性，在酸菜发酵过程中会产生多种细菌和真菌，这些微生物分别在酸菜发酵的不同时期控制酸菜的发酵，使酸菜产生独特的风味[1]。随着酸菜知名度的提高，人们对其需求量越来越大，质量要求也越来越高，传统自然发酵的方法已经满足不了人们的需求。人工接种发酵工艺具有发酵时间短、受季节影响小、品质易于控制的特点，但是其风味上不及自然发酵的酸菜自然、醇厚。基于此，人们对东北酸菜发酵过程中微生物多样性进行研究，为筛选构建适宜现代东北酸菜产业发展不同需求的微生物接种剂提供技术资料，推进东北酸菜产业的规模化发展[2]。

人们对酸菜内复杂的细菌种群的研究，多采用传统的分离、纯化和鉴定方法，不仅繁杂耗时，而且受培养条件和主观因素影响较大，不能反映出酸菜内细菌的多样性的真实情况[3]，结果准确性及可靠性差。

近年来，基于 16S rDNA 结合变性梯度凝胶电泳

收稿日期：2014-04-30
基金项目：国家自然科学基金项目(31000805；31370502)；辽宁省高等学校优秀人才支持计划(LJQ 2011071)；辽宁省教育厅科学技术研究项目(L2012249)
作者简介：乌日娜(1979-)，女，博士，副教授，研究方向为食品微生物
通讯作者：武俊瑞(1977-)，男，博士，副教授，研究方向为食品生物技术

法（denaturing gradient gel electrophoresis，DGGE）技术，为有效分析复杂微生物群落及其多样性提供了一种先进手段。武俊瑞等[4]利用PCR-DGGE技术对5份东北自然发酵酸菜中的乳酸菌进行研究，结果表明5份传统发酵酸菜样品共鉴定出了9个乳酸菌种，其中植物乳杆菌、短乳杆菌、清酒乳杆菌和弯曲乳杆菌是酸菜样品的优势菌群。Yang等从东北酸菜中分离到产粘液多糖的*L. rhamnosu*[5]。我国与韩国、日本等国际上已实现规模化发酵蔬菜生产的国家相比，缺乏对自然发酵蔬菜微生物区系动态深入系统的解析，从而限制了发酵蔬菜生产规模的扩大化。深入研究酸菜自然发酵微生物区系动态，加深对酸菜自然发酵微生物区系演替的认识，将更为客观、准确地掌握酸菜发酵过程中的微生物消长规律，为有效控制酸菜的发酵进程、实现酸菜标准化生产提供全面的技术资料。

1 材料与方法

1.1 试剂与药品

TE缓冲液，5×TBE电泳缓冲液，10% SDS，CTAB溶液，3 mol/L NaAc，5 mol/L NaCl，酚/氯仿/异戊醇（25:24:1），氯仿/异戊醇（24:1），40%聚丙烯酰胺，聚丙烯酰胺凝胶（丙烯酰胺:甲叉=37.5:1），10%过硫酸铵，20%硝酸银，异丙醇，蛋白酶K，High PuredNTP，10×PCR Buffer，Loading Buffer，r-Taq酶，37%甲醛，NaOH，冰醋酸，乙醇，三蒸水，蒸馏水，液氮等试剂，实验中的引物及其它酶制剂全部由上海桑尼生物科技有限公司合成。

1.2 仪器与设备

PL303/01电子天平，PNUI2V9质构仪，METTLER TOLEDO FE20型pH计，HIRAYAMA HA-300M全自动高压蒸汽灭菌器，ADVANTEC SP-650全自动高压干热灭菌器，ZHJH-C1112C无菌操作台，OLYMPUS BX50光学显微镜及OLYMPUS PM-2摄像系统，菲恰尔TDL-SA离心机，LRH-250生化培养箱，Eppendorf TGL-168高速台式离心机，UVP GDS-8000凝胶成像仪，北京六一DYY-12电泳仪，Eppendorf 5810高速冷冻离心机，TATIEC电热恒温水浴锅，ND-1000型微量紫外分光光度计、Bio-Rad变性梯度凝胶电泳仪（DCode Universal Mutation Detection System）、Applied biosytems公司的PCR仪、MJ RESEARCH PTC-200梯度PCR扩增仪。

1.3 试验方法

1.3.1 样品的采集及预处理

根据东北自然发酵酸菜的制做工艺，分别选择发酵酸菜汁0 d、2d 、6 d、12d 、16 d和22 d、30 d、34 d、36 d、40 d（成品酸菜）作为研究材料。样品采集后，用灭菌滤纸过滤以除去酸菜汁中的杂质，并保存于-20 ℃。

1.3.2 样品总DNA的快速提取

在样品中加入5 mL PBS缓冲液，涡旋震荡30 s，然后350 r/min离心5 min，收集上清，12000 r/min离心5 min后，弃上清，在沉淀总加入800 μL TE缓冲液回溶，用于总DNA的提取。

采用Fast Prep结合CTAB法进行总DNA的快速提取。具体步骤如下：取预处理的样品于2 mL离心管中，加入0.5 g玻璃珠，置于Fast Prep核酸快速提取仪中，6.0 m/s振荡30 s；加入SDS裂解液50 μL，冰浴10 min后14000 r/min离心10 min，取上清液，加入80 μL NaCl /100 μL CTAB溶液，65 ℃水浴20 min，加入等体积酚/氯仿/异戊醇（25:24:1）混匀，静置2 min，12000 r/min离心10 min，取上清液，等体积加入氯仿/异戊醇混匀，静置2 min，再次12000 r/min离心10 min，取上清液，加入500 μL异戊醇和50 μL 3 mol/L NaAc，-20 ℃放置30 min，12000 r/min离心10 min，沉淀用70%乙醇洗涤两次后，加入50 μL TE缓冲液回溶，-20 ℃保存备用[6]。

1.3.3 PCR扩增

1.3.3.1 细菌的PCR扩增

以提取的总DNA为模板，采用16S rDNA基因V3区具有特异性的引物对：V3F+GC:（5’-CGCCCGCC GCGCGCGGCGGG CGGGG CGGGG GCACG GGGG GACTCCTACGGGAGGC AGCAG-3’）和V3R:（5’-ATT ACCGCG GCTGCTGG-3’），进行16S rDNA的PCR扩增，扩增产物片段长约250 bp。扩增反应体系(50 μL)包括：50 ng基因组DNA模板；2 μL dNTP（2.5 mmol/L each, TaKaRa）；两条引物终浓度均为0.4 mol/L；0.5 μL DNA Taq聚合酶；5 μL 10×PCR Buffer。反应参数：95 ℃预变性4 min，30个循环包括95 ℃变性1 min，55 ℃退火45 s，72 ℃延伸1 min，最后72 ℃延伸7 min。PCR反应的产物用8%琼脂糖凝胶电泳检测[7]。

1.3.3.2 真菌的PCR扩增

以提取的总DNA为模板，采用26S rDNA D1/D2区具有特异性的引物，正向引物：CTTGGTCATTTA GAGGAAGTAA，反向引物：TCCTCCGCTTATTGATA TGC进行26S rDNA的PCR扩增，扩增产物片段长约250 bp。扩增反应体系（50 μL）包括:50 ng基因组DNA模板；2 μL dNTP（2.5 mmol/L each, TaKaRa）；两条引物

终浓度均为0.4 mol/L；0.5 μL DNA Taq聚合酶；5 μL 10×PCR Buffer。反应参数：95 ℃预变性4 min，30个循环包括95 ℃变性1 min，55 ℃退火45 s，72 ℃延伸1 min，最后72 ℃延伸7 min。PCR反应的产物用8%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.4 DGGE及图谱分析

采用Bio-Rad公司DcodTM的基因突变检测系统（DCode Univeral Detection System Instrument）对PCR反应产物进行分离。细菌的变性剂浓度为范围35%~55%，在150 V电压下，60 ℃电泳7 h，真菌的变性剂浓度范围30%~55%，在120 V电压下，60 ℃电泳5 h 15 min。电泳完毕后，利用银染法对凝胶进行染色。将银染好的凝胶用扫描仪成像，得到PCR-DGGE图谱，对上述扫描后的图片进行分析，标记特异性条带，并回收条带[8]，由上海桑尼生物技术有限公司测序，测序结果进行Blast比对鉴定。

2 结果与分析

采用 Fast Prep 结合 CTAB 法提取酸菜样品总DNA，并特异扩增了细菌16S rDNA V3区，真菌26S rDNA D1/D2区，其PCR-DGGE图谱如图1、图2所示。

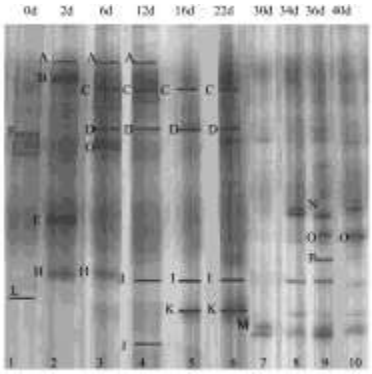


图1 酸菜样品细菌总DNA的PCR-DGGE图谱

Fig.1 PCR-DGGE profiles of total DNA from the bacterial population in each suan-cai sample

注：1~10为酸菜细菌DGGE泳道，A~P为选取的电泳条带。

由图1可知，酸菜样品细菌DNA的PCR-DGGE图谱上共找到14条特异性条带，对其编号、切割、回收、测序，并登录NCBI数据库进行Blast同源性对比分析（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/），比对结果如表1所示。

由图1可知，在酸菜发酵前期条带数量明显，发酵中后期细菌条带数量增加，但条带明显较发酵前期淡，在细菌数量方面比前期少，发酵0 d样品主要条带为F、L，其中条带F为微小乳杆菌（*L. minor*），条带L为台湾乳杆菌（*L. taiwanensis*）；发酵2 d样品主要条带为A、B、E、H，其中条带A为嗜酸乳杆菌（*L. acidophilus*），条带B为约氏乳杆菌（*L. johnsonii*），条带E为明串株菌属（*Leuconostoc sp.*），条带H为卷曲乳杆菌（*L. curvatus*）；发酵6d样品主要条带为A、C、D、G、H，其中条带C为发酵乳杆菌（*L. fermentum*），条带D为乳酸杆菌属（*L. sp.*），条带G为格氏乳杆菌（*L. gasseri*）；发酵12 d天样品主要条带为A、C、D、I、J，其中I为植物乳杆菌（*L. plantarum*），J为詹氏乳杆菌（*L. jensenii*）；发酵16 d、22 d样品主要条带为C、D、I、K，其中条带K为赖氨酸芽孢杆菌（*Lysinibacillus sp.*）；发酵30 d样品主要条带为M；发酵36 d主要条带为N、O、P，其中条带O为假单胞菌属（*Pseudomonas sp.*），条带P为棒状乳杆菌（*L. coryniformis*），而条带M、N在GenBank现有数据库中没有比对出结果，可能是不可培养微生物种类，还要做进一步的研究才能对其属种进行鉴定，发酵40d样品主要条带为O。

表1 酸菜样品中细菌16S rDNA V3区PCR-DGGE特异性条带比对结果

Table 1 Comparison of characteristic bands obtained by PCR-DGGE of the 16S rDNA V3 region from bacteria in suan-cai samples

条带编号	鉴定结果	同源性/%	序列号
A	*L. acidophilus*	98	KF056894.1
B	*L. johnsonii*	97	AB809568.1
C	*L. fermentum*	97	AF382391.1
D	*L.sp.*	97	DQ268819.1
E	*Leuconostoc sp.*	95	DQ061074.1
F	*L. minor*	92	M23039.1
G	*L. gasseri*	98	KC785085.1
H	*L.curvatus*	100	JQ686205
I	*L.plantarum*	100	JQ686202
J	*L. jensenii*	96	JX520630.1
K	*Lysinibacillus sp.*	97	JN975194.1
L	*L. taiwanensis*	94	GU417817.1
O	*Pseudomonas sp.*	96	JF513141.1
P	*L. coryniformis*	94	KF149106.1
M、N	Unidentified		

由上述结果可知，从东北自然发酵酸菜发酵中鉴定出了乳酸杆菌属，明串株菌属，假单胞菌属、芽孢杆菌属，其中主要为乳酸杆菌属，发酵酸菜样液中的乳酸菌分布既有共性，又存在着一定的差异。在本试验中的PCR-DGGE图谱中，发酵2 d、6 d、12 d的样品中都检测出了*L. acidophilus*，发酵6 d、12 d、16 d、22 d酸菜发酵液中都检测出了*L. fermentum*，发酵12

d、16 d、22 d 酸菜发酵液中都检测出了 *L. plantarum*，由此可以推断，乳酸杆菌属是东北自然发酵酸菜发酵液中的主要菌属，*L. acidophilus* 、*L. fermentum*、*L. plantarum* 三种菌为传统发酵酸菜中的优势菌种。同时，发酵酸菜样液中的乳酸菌分布呈现出较大差异性，从不同发酵阶段的酸菜液中得到的条带数量和清晰程度均有所不同，其中，发酵 6 d、12 d 的酸菜样液中都检测出了 5 条清晰的条带，呈现出较为丰富的乳酸菌多样性，随着发酵时期的延长，条带数增加，但条带明显较发酵前期淡，在细菌数量方面比前期少，明串珠菌在发酵前期非常活跃，是启动酸菜发酵的最重要菌株，并能产生高效的葡萄糖庶糖酶，而后是发酵产酸的嗜酸乳杆菌、发酵乳杆菌和植物乳杆菌，最后是由植物乳杆菌完成发酵过程。发酵初期明串珠菌属代谢产酸，随着发酵时间的延长，酸度逐渐的增加，使得明串珠菌属的活动受到抑制甚至死亡，而后乳酸杆菌属占优势并迅速繁殖。东北地区发酵菜中多种乳酸杆菌并存，共同影响发酵产品的品质。以往的研究多采用传统培养方法对酸菜中的乳酸菌进行分离，然后利用生理生化反应对种属进行鉴定，2010 年，张晓春等从自然发酵酸菜汁中利用分离纯化、生理生化特性鉴定出了 *L. plantarum*、*L. casei*、*L. acetotolerans* 和 *L. brevis*[9]，2012 年，栗永乐等从内蒙古东部地区农家酸菜中利用形态学、生理生化特性鉴定出了 *L. plantarum*、*L. rhamnosus*、*L. brevis* 和 *L. acetotolerans*[10]。

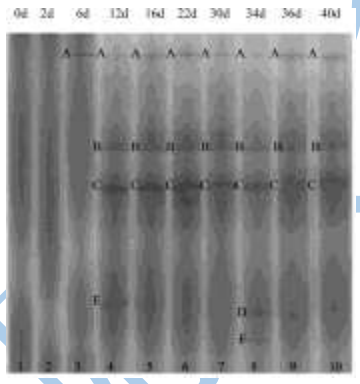


图 2 酸菜样品真菌总 DNA 的 PCR-DGGE 图谱

Fig.2 PCR-DGGE profiles of total DNA from the total fungal population in suan-cai samples

注：1~10为酸菜真菌DGGE泳道，A~F为选取的电泳条带。

近年来，应用分子生态学方法研究传统发酵酸菜中的微生物组成逐渐增多，2009 年，燕平梅等采用 16S rDNA 测序的方法对分离乳酸菌进行鉴定，结果表明所分离的乳酸菌分属为 *Lactobacillus* 属，*Pediococcus* 属，*Leuconostoc* 属和 *Weissell* 属，且分离到最多的为 *Lactobacillus* 属，包括 *L. acidifarinae*，*L. curvatus*，*L. hammesii*[11]，2010 年，张鲁冀等从自然发酵后期的东北酸菜中分离到乳杆菌，采用生理生化实验结合 16S rDNA 测序的方法鉴定为 *L. plantarum*，*L. brevis*，*L. reuteri* 和 *L. sakei*[12]。2012 年，李欣等从自然发酵酸菜中利用 16S rDNA 测序的方法对分离乳酸菌进行鉴定，鉴定结果为 *L. curvatus*、*L. brevis*、*L. sakei*、*Leuconostoc mesenteroides*、*L. fermentum*[13]。本研究中发现的 *L. johnsonii*、*L. gasseri*、*Lysinibacillus sp.*、*L. jensenii* 、*L. taiwanensis* 在自然发酵酸菜中利用传统方法和分子生态学方法均并未分离到。

由图 2 可知，酸菜样品真菌 DNA 的 PCR-DGGE 图谱上共找到 6 条特异性条带，对其编号、切割、回收、测序，并登录 NCBI 数据库进行 Blast 同源性对比分析（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/），比对结果如表 2 所示。

表 2 酸菜样品中真菌 26S D1/D2 rDNA 区 PCR-DGGE 特异性条带比对结果

Table 2 Comparison of characteristic bands obtained by PCR-DGGE of fungal 26S D1/D2 rDNA regions

条带编号	鉴定结果	同源性/%	序列号
A	*Candida tropicalis*	89	EU543673.1
B	*Penicillium expansum*	95	KC111777.1
C	*Debaryomyces hansenii*	100	JX068679.1
D	*Penicillium olsonii*	99	KC510082.1
E	*Penicillium solitum*	99	KC806054.1
F	*Candida albicans*	99	KC405619.1

由图 2 可知，东北自然发酵酸菜发酵过程中真菌种类明显少于细菌，且真菌组成无明显的变化，东北传统发酵酸菜样品共鉴定出了 3 个酵母菌种，3 个青霉菌种，发酵初期，腌渍液中的真菌含量很少，随着发酵和贮存期间腌渍液中各种化学和物理条件的变化，真菌的数量会增加，在酸菜发酵 0 d、2 d 时，并未检测到真菌条带，发酵 6 d 样品的主要条带为 A，条带 A 为热带假丝酵母（*Candida tropicalis*）；发酵 12 d 样品主要条带为 A、B、C、E，条带 B 为扩展青霉（*Penicillium expansum*），条带 C 为汉逊德巴利酵母（*Debaryomyces hansenii*），条带 E 为离生青霉（*Penicillium solitum*）；发酵 16 d 样品主要条带为 A、B、C；发酵 22 d、30 d 样品主要条带为 A、B、C；发酵 34 d 样品主要条带为 A、B、C、D、F，条带 D 为奥尔森氏青霉（*Penicillium olsonii*），条带 F 为白色念株菌（*Candida albicans*）；发酵 36 d 和 40 d 样品主要条带为 A、B、C。发酵 12 d、16 d、22 d、30 d、34 d、36 d、40 d 样品中均存在 *Candida tropicalis* 、*Penicillium expansum* 、*Debaryomyces hansenii*，由此可以推断，*Candida tropicalis* 、*Debaryomyces hansenii* 、*Penicillium*

expansum 为传统发酵酸菜中真菌的优势菌群。运用 PCR-DGGE 方法对酸菜中真菌的研究甚少，2012 年，张先秦利用 PCR-DGGE 技术从四川地区家庭制作的泡菜中鉴定出了 *Candida tropicalis*，*Debaryomyces hansenii*[14]，此外，本研究发现的 6 种真菌在自然发酵酸菜中利用传统方法和分子生态学方法均并未分离到。

3 结论

东北传统发酵酸菜中蕴藏着丰富的微生物资源，并且呈现出丰富的多样性。应用 PCR-DGGE 技术方法对东北自然发酵酸菜中微生物多样性进行研究，可较为客观地反应传统发酵酸菜中的细菌、真菌等微生物区系，对于揭示酸菜自然发酵过程中优势菌群组成，具有较高的参考价值。今后可用于其他具有复杂微生物体系的发酵食品研究中。东北自然发酵酸菜在发酵早期的活跃菌为明串珠菌(*Leuconostoc sp.*)，而后是发酵产酸的嗜酸乳杆菌（*L. acidophilus*）、植物乳杆菌（*L. plantarum*）和发酵乳杆菌（*L.fermentumi*），最后是由植物乳杆菌完成发酵过程。其中明串菌株为酸菜发酵前期优势细菌，植物乳杆菌为发酵中后期优势细菌；东北自然发酵酸菜发酵过程中主要真菌为汉逊德巴利酵母（*Debaryomyces hansenii*）、热带假丝酵母（*Candida tropicalis*）、扩展青霉（*Penicillium expansum*），真菌数量随发酵时间的增加而减少，且种类也随时间的变化而不断变化。本试验采用 PCR-DGGE 技术，鉴别出了东北自然发酵酸菜中存在主要菌群，此方法与传统方法相比较，鉴定结果呈现了丰富的微生物多样性，最大的优势在于鉴别了许多非培养的细菌和真菌，这是传统方法远远不可及的。试验对东北自然发酵酸菜中微生物进行属种的分离鉴定，接下来要对其特性和功能进行系统的研究，研究在同样发酵条件下，在东北酸菜发酵前接入不同菌种的微生物接种剂，包括纯菌种接种剂和多菌种混合接种剂，分析其对酸菜发酵微生物区系动态的影响，并检测发酵过程中的生化指标，两者结合有望分析不同类型的接种剂对酸菜发酵进程的作用机制，其结果可以为制备适宜现代东北酸菜产业发展不同需求的微生物接种剂提供技术支持，丰富酸菜产品种类和风味，推进东北酸菜产业标准化、规模化发展。

参考文献

[1] Tao Xiong, Qianqian Guan, Suhua Song, et al. Dynamic changes of lactic acid bacteria flora during Chinese sauerkraut fermentation [J]. Food Control, 2012, 26(1): 178-181

[2] Zhihui Yu, Xue Zhang, Shengyu Li, et al. Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Chinese sauerkraut [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2013, 29(3): 489-498

[3] Jiachao Zhang, Wenjun Liu, Zhihong Sun, et al. Diversity of lactic acid bacteria and yeasts in traditional sourdoughs collected from western region in Inner Mongolia of China [J]. Food Control, 2011, 22(5): 767-774

[4] 武俊瑞,岳喜庆,石璞,等.PCR-DGGE分析东北自然发酵酸菜中乳酸菌多样性[J].食品与生物技术学报，2014, 33(2): 127-130
WU Jun-rui, YUE Xi-qing, SHI Pu, et al. Diversity of lactic acid bacteria involved in suan-cai using PCR-DGGE [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2014, 33(2): 127-130

[5] Yang Z, Li S, Zhang X, et a1. Capsular and slime polysaccharide production by Lactobaeillus rhamnosus JAAS8 isolated from Chinese sauerkraut:potential applicationin fermented milk products [J]. Biosci Bioeng, 2012, 110(1): 53-57

[6] Wu J, Zhang J, Shi P, et al. Bacterial community involved in traditional fermented soybean paste dajiang made in northeast China [J]. Annals of Microbiology, 2013, 63(4): 1417-1421

[7] Crispim SM, Nascimento AMA, Costa PS, et al. Molecular identification of *Lactobacillus spp*. associated with puba, a Brazilian fermented cassava food [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2013, 44(1): 15-21

[8] Renouf V, Claisse O, Miot-Sertier C, et al. Lactic acid bacteria evolution during wine making: use of rpoB gene as a target for PCR-DGGE analysis [J]. Food Microbiol, 2006, 23: (2): 136-145

[9] 张晓春,刘艳姿,高大威,等.自然发酵酸菜汁中乳酸菌的分离鉴定及抑菌活性的分析[J].黑龙江畜牧兽医，2010, 9(17): 132-134
ZHANG Xiao-chun, LIU Yan-zi, GAO Da-wei, et al. Isolation and identification of *Lactobacilli* antibacterial activity from natural fermented suancai [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2010, 9(17): 132-134

[10] 栗永乐,李秀丽,李传娟,等.内蒙古东部地区农家酸菜中乳酸菌的分离与初步鉴定[J].食品工业,2012,33(11):132-134
JIA Yong-le, LI Xiu-Li, LI Chuan-juan, et al. Isolation and identification of Lactic acid bacteria from home-made sauerkraut in inner Mongolia [J]. Food Industry, 2012, 33(11): 132-134

[11] 燕平梅,柴政,薛文通,等.培养和非培养方法分析发酵白菜卤

乳酸菌的多样性[J].微生物学报,2009,49(3):383-388.AN Ping-mei, CHAI Zheng, XUE Wen-tong, et al. Culture and non-culture methods analyze the diversity of lactic acid bacteria in fermented cabbage [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2009, 49(3): 383-388

[12] 张鲁冀,孟祥晨.自然发酵东北酸菜中乳杆菌的分离与鉴定[J].东北农业大学学报,2010,41(11):125-131.ZHANG Lu-ji, MENG Xiang-cheng. Isolation and indentification of *Lactobacilli* from natural fermented suancai [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2010, 41(11): 125-131

[13] 李欣,武俊瑞,田甜,等.大庆自然发酵酸菜中乳酸菌的分离鉴定及耐酸菌株初步筛选[J].食品科学,2014,35(1):150.LI Xin, WU Jun-rui, TIAN Tian, et al. Isolation、identification and preliminary screening of acid-tolerant lactic acid bacteria from naturally fermented pickle juices from Da Qing [J]. Food Science, 2014, 35(1): 150

[14] 张先琴,PCR-DGGE技术分析传统发酵蔬菜中微生物群落结构[D].成都,四川农业大学,2012.Zhang Xian-qin, The microbial community structure of traditional pickled vegetables studied by PCR-DGGE [D]. ChengDu, Sichuan Agricultural University, 2012

现代食品科技