

四川老坛泡菜中乳酸菌的分离与鉴定

潘 晴, 曾小群*, 彭刘杨, 曾志丹, 潘道东, 吴 振

(宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 老坛泡菜比一般泡菜具有更好的菌种多样性和菌群稳定性. 为筛选乳酸菌菌株, 从四川省眉山市仁寿县新安村农家坛龄达 30 年以上的老坛泡菜中, 分离得到 12 株疑似乳酸菌, 进行形态学观察、生理生化实验鉴定, 进一步利用 16S rRNA 基因序列比对、构建系统发育树, 确定疑似乳酸菌菌种. 分离鉴定出 5 株植物乳杆菌、3 株短乳杆菌、2 株肠膜明串珠菌、1 株干酪乳杆菌和 1 株屎肠球菌, 其中以植物乳杆菌数量最多.

关键词: 老坛; 泡菜; 乳酸菌; 分离; 鉴定

中图分类号: Q939.11+7

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2017) 02-0022-07

四川老坛泡菜选用新鲜的蔬菜, 在制作时仅添加食盐、调味料和水, 采用陶土制成、未上过釉、坛口处有一圈凹型槽的坛为腌制器具, 在环形凹槽里注入凉白开水后盖上盖子隔绝空气, 利用老坛中的微生物及蔬菜自身携带的微生物进行厌氧发酵^[1-2]. 老坛从立坛开始, 几年甚至几十年不清坛, 其中的微生物经长期自然筛选, 其菌种多样性更丰富, 菌群更稳定, 菌株的发酵性能更好. 坛龄越老, 老坛的发酵性能越好, 从而造就了老坛泡菜酸鲜纯正、清脆爽嫩的口感^[3]. 老坛泡菜越来越受到人们的欢迎, 已成为目前的开发热点, 其市场前景广阔.

四川省眉山市的泡菜制作有近 4000 年历史, 为四川泡菜的重要发源地, 有“中国泡菜之乡”的美誉. 那里土壤肥沃, 蔬菜种植业发达^[4]. 当地农家有腌制泡菜的传统, 有些家庭的老坛坛龄达几十年之久, 这些老坛中存在具有优良发酵特性的乳酸菌菌株, 适合泡菜及其他食品发酵. 有文献[5-6]对四川泡菜中的优势乳酸菌进行了分离和鉴定工作, 扩展了人们对四川泡菜中乳酸菌多样性的认识. 但目前报道的菌种多来源于一般的四川泡菜, 尚未见关于从几十年坛龄的四川老坛泡菜中分离乳酸菌及其菌群结构的报道.

本文从四川眉山市仁寿县几户农家坛龄超过 30 年的传统老坛泡菜中, 分离得到疑似乳酸菌, 对其进行了分离和鉴定, 旨在为研究老坛泡菜的菌种多样性和优势菌提供资料, 进而为将从老坛泡菜中分离出的优势乳酸菌应用于制备优良泡菜发酵剂, 促进泡菜工业化生产的发展提供优质的菌种来源^[7].

1 材料与方法

1.1 实验材料

泡菜汁取自四川省眉山市仁寿县兴盛镇新安村 3 家坛龄分别为 35、33、32 年农家老坛(坛体由陶土制成、未上过釉、坛口处有一圈凹型槽)所制作的萝卜泡菜汁.

主要培养基与试剂: MRS 琼脂培养基、MRS 肉汤、明胶液化培养基、硝酸盐还原试验培养基、吲哚试验培养基、接触酶试验培养基、H₂S 产生试验培养基(均购于国药集团化学试剂有限公司); 糖发酵培养基(上海晶纯试剂有限公司); 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(Invitrogen 公司); DL15000 DNA Marker、DL2000 DNA Marker(日本 Takara 公司).

1.2 仪器与设备

梯度 PCR 仪(美国 Bio-Rad 伯乐); 核酸电泳仪

收稿日期: 2016-05-17.

宁波大学学报(理工版) 网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 国家自然科学基金(41641052, 41406165); 国家星火计划项目(2014GA701048).

第一作者: 潘晴(1992-), 女, 浙江龙游人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 食品微生物. E-mail: panqing1026@163.com

*通信作者: 曾小群(1982-), 女, 四川仁寿人, 博士/副教授, 主要研究方向: 发酵食品加工. E-mail: zxqun3447@126.com

(北京六一生物科技有限公司); 生物显微镜(上海一恒科技有限公司); DK-8D 型水浴加热锅(上海一恒科技有限公司); HWS 智能型电热恒温培养箱(宁波江南仪器厂); LDZX-50KBS 高压立式灭菌锅(上海申安医疗器械厂); 5415D 台式冷冻离心机(德国 Eppendorf).

1.3 实验方法

1.3.1 乳酸菌的分离

在超净工作台中用无菌生理盐水逐级稀释泡菜汁样品, 连续做 8 个梯度稀释. 分别吸取 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} 和 1×10^{-8} 三个浓度样品 0.5 mL, 加入至灭菌并冷却至 37°C 左右含有 CaCO_3 的 MRS 琼脂培养基中, 每个梯度做 3 个平行, 于 35°C 条件下培养 24 h. 观察菌落形态: 分别挑取有透明圈的单个菌落, 接种至 MRS 琼脂斜面培养基上, 35°C 条件下培养 24 h. 挑取 2~3 环接种于 50 mL MRS 液体培养基中, 取 5 mL 离心收集菌体, 弃上清发酵液, 加入终浓度为 20% 的甘油, 重悬后置于 -20°C 保存菌种, 其余菌液用于后续实验.

1.3.2 乳酸菌的菌体形态观察

观察含 CaCO_3 的 MRS 平板上带有透明圈的菌落色泽、形态、大小等, 对 MRS 琼脂斜面上的疑似乳酸菌菌落分别挑取, 进行革兰氏染色、镜检, 然后观察菌体颜色、大小、形态和排列方式等.

1.3.3 乳酸菌的基本生理生化鉴定

将筛选出的疑似乳酸菌分别进行接触酶试验、

明胶液化试验、 H_2S 产生试验^[8]、吲哚试验^[9]、各类糖发酵试验^[10]、葡萄糖产气试验^[11]以及乳酸菌生长温度试验.

1.3.4 乳酸菌的 16S rRNA 基因序列分析

(1) 乳酸菌 DNA 提取. 利用所购的细菌基因组提取试剂盒, 分别提取各疑似乳酸菌基因组 DNA, 提取效果利用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测.

(2) 乳酸菌 16S rRNA 基因序列测定. PCR 反应体系: $10 \times \text{PCR buffer}$ 5 μL , MgCl_2 4 μL , dNTP 4 μL , rTaq 酶 0.5 μL , 乳酸菌基因组 DNA 1 μL , 通用引物^[12]为正向 (5'-AACTGAAGAGTTTGATCCTGGCTC-3') 1 μL , 反向 (5'-TACGGTTACCTGTTCACGACTT-3') 1 μL , 加 DEPC H_2O 33.5 μL , 体系总体积为 50 μL . PCR 反应条件参考文献^[10]. PCR 扩增效果通过 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 并将 PCR 扩增得到产物送上海桑尼生物技术有限公司测序.

(3) 同源性分析. 在 NCBI 网站上对所测序列通过 Blast 同源序列比对分析, 从 GenBank 中得到所参比的标准菌株的 16S rRNA 基因序列, 进行相关的同源性分析, 最后利用 MEGA 5.1 软件构建系统发育树.

2 结果与分析

2.1 菌株的分离及形态学观察结果

表 1 为分离的各疑似乳酸菌的菌落形态以及菌体特征. 在含有 CaCO_3 的 MRS 琼脂培养基上各

表 1 12 株菌株的菌落形态和菌体特征

菌株编号	菌落形态	菌体特征
PC1	圆形或豆形, 表面光滑, 乳白色	球形或豆形, 成对或短链排列
PC2	圆形, 表面湿润光滑, 乳白色	短杆状, 单生、成对或成链状排列
PC3	圆形, 表面光滑, 白色	杆状, 单生、成对或成链状排列
PC4	圆形或豆形, 表面光滑, 乳白色	球形或豆形, 成对或短链排列
PC5	圆形, 表面光滑, 白色	杆状, 单生、成对或成链状排列
PC6	圆形, 表面光滑湿润, 白色	杆状, 单生、栅状或链状排列
PC7	圆形, 表面光滑, 白色	杆状, 单生、成对或成链状排列
PC8	圆形, 表面光滑, 白色	杆状, 单生、成对或成链状排列
PC9	圆形或椭圆形, 表面光滑, 乳白色	球杆状, 链状排列
PC10	圆形, 表面湿润光滑, 乳白色	短杆状, 单生、成对或成链状排列
PC11	圆形, 表面湿润光滑, 乳白色	短杆状, 单生、成对或成链状排列
PC12	圆形, 表面光滑, 白色	杆状, 单生、成对或成链状排列

疑似菌落呈白色, 带有透明的溶钙圈. 随机挑取 PC1~PC12 共 12 株疑似乳酸菌, 进行革兰氏染色, 结果为阳性, 镜检结果显示 PC2、PC3、PC5、PC6、PC7、PC8、PC10、PC11、PC12 共 9 株菌体呈杆状, PC1、PC4、PC9 共 3 株菌体呈球状. 各菌株的接触酶试验结果均呈阴性^[11]. 表明这 12 株菌初步满足乳酸菌特征^[13], 为疑似乳酸菌.

2.2 乳酸菌的生理生化鉴定结果

12 株疑似乳酸菌菌株的生理生化及糖发酵实验结果见表 2. 通过参照文献[14-15], 确定其种属. PC1、PC4 能发酵葡萄糖产气, 具有明串珠菌属特征, 且能发酵麦芽糖、果糖、蔗糖、半乳糖等多种糖类, 初步鉴定这 2 株菌为肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*). PC2、PC10、PC11 除了具有乳杆菌

表 2 12 株菌株的生理生化特性

实验项目	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10	PC11	PC12
葡萄糖	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
果糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
麦芽糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
蜜二糖	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+
蔗糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
阿拉伯糖	+	+	+	+	+	—	+	+	—	+	+	+
木糖	+	+	+	+	+	—	+	+	—	+	+	+
棉籽糖	+	+	+	+	+	—	+	+	—	+	+	+
海藻糖	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+
乳糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
半乳糖	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+
水杨苷	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
纤维二糖	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+
甘露醇	+	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—	+
山梨醇	+	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—	+
鼠李糖	+	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—
松三糖	+	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—	+
苦杏仁苷	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
七叶苷	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
葡萄糖产气试验	+	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—
明胶液化试验	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
吲哚试验	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
H ₂ S 产生试验	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
硝酸盐还原试验	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
15 °C 生长	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45 °C 生长	—	—	—	—	—	+	—	—	+	—	—	—

注: “+”表示实验结果为阳性; “—”表示实验结果为阴性.

属的相应特征外, 还可发酵麦芽糖、蔗糖、半乳糖、果糖、苦杏仁苷等多种糖类, 但不能发酵利用纤维二糖、鼠李糖、甘露醇、山梨醇, 因此初步鉴定这3株菌为短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)。PC3、PC5、PC7、PC8、PC12的糖发酵特性与植物乳杆菌一致, 可以发酵葡萄糖、麦芽糖、乳糖、半乳糖、海藻糖等大部分糖类, 但是不能发酵利用鼠李糖, 能在15℃下生长, 45℃下不生长, 因此初步鉴定这5株菌为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)。PC6具有乳杆菌属的特征, 且与干酪乳杆菌具有相似的发酵特性, 可以发酵葡萄糖、乳糖、半乳糖等, 不能利用棉籽糖、阿拉伯糖, 因此初步鉴定为干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)。PC9能在15、45℃环境下生长, 具有肠球菌属的特征, 且能利用乳糖、海藻糖等糖类, 不能利用阿拉伯糖、甘露醇、棉籽糖, 初步鉴定为屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)。

2.3 乳酸菌 16S rRNA 基因序列比对鉴定结果

2.3.1 乳酸菌的基因组 DNA 提取结果

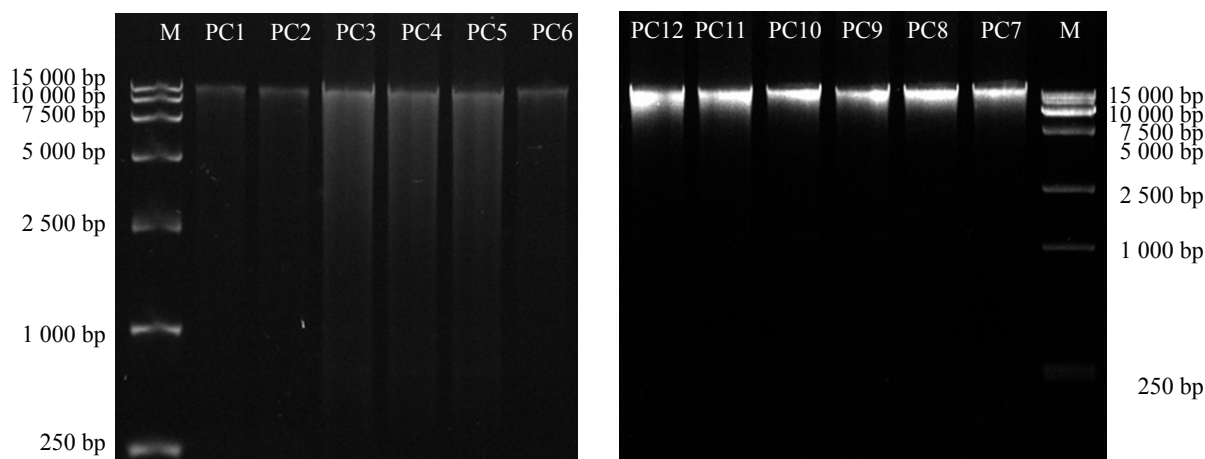
提取各乳酸菌总 DNA, 经1%琼脂糖凝胶电泳检测, 观察到清晰单一的目的条带(图1), 用于下一步的16S rRNA 基因序列 PCR 扩增。

2.3.2 16S rRNA 扩增产物检测结果

检测各乳酸菌的16S rRNA 基因序列扩增结果, 大小均约为1 500 bp(图2)。说明PCR扩增成功, 可用于序列测定。

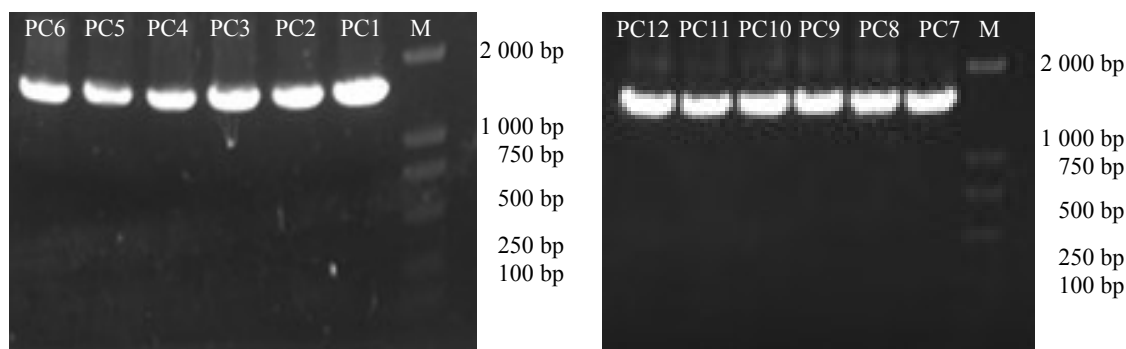
2.4 16S rRNA 序列比对结果

将各乳酸菌的16S rRNA 基因序列测序结果在NCBI网站进行Blast同源序列的比对分析, 以进一步鉴定各乳酸菌菌株。在16S rRNA 基因序列比对分析中, 对属和种的界定为: 属于同一个属的最低同源性为95%^[16]; 当同源性大于97%时, 属于同一个种^[17]。PC1、PC4与 *Leuconostoc mesenteroides*



M 为 Takara DL15000 DNA Marker

图1 12株乳酸菌基因组 DNA 电泳检测图



M 为 Takara DL2000 DNA Marker

图2 12株菌株 16S rRNA PCR 扩增产物电泳图

SD1S2L1 (Genbank 登陆号: KJ095664.1)、*Leuconostoc mesenteroides* TW53-2 (KJ026675.1)等的同源性高达 99%, 将这 2 株菌鉴定为肠膜明串珠菌; PC2、PC10、PC11 与 *Lactobacillus brevis* BSO 464 (JX398133.1)、*Lactobacillus brevis* ATCC14687 (EF120367.1)等的同源性高达 99%, 这 3 株菌鉴定为短乳杆菌; PC3、PC5、PC7、PC8、PC12 与 *Lactobacillus plantarum* F03 (KO170095.1)、*Lactobacillus plantarum* KF9 (KR816164.1)等的同源性高达 99%, 这 5 株菌鉴定为植物乳杆菌; PC6 与 *Lactobacillus casei* MG1365-2 (HM218007.1)、*Lactobacillus casei* 14CK1 (KR055477)等的同源性高达 100%, 鉴定为干酪乳杆菌; PC9 与 *Enterococcus faecium* UW8175 (CP011828.1)、*Enterococcus faecium* DO (CP003583.1)等的同源性高达 99%, 鉴定为屎肠球菌。

2.5 系统发育树的构建

从 GenBank 数据库中提取 *Lactobacillus brevis* L63、*Leuconostoc mesenteroides* KIBGE-IB19、*Leuconostoc mesenteroides* KIBGE-IB22M、*Lactobacillus plantarum* JCM 1149、*Enterococcus faecium* H2、*Lactobacillus casei* 的 16S rRNA 基因序列, 以及各乳酸菌 16S rRNA 基因序列, 利用 MEGA 5.1 软件构建系统发育树(图 3), 最终得到所

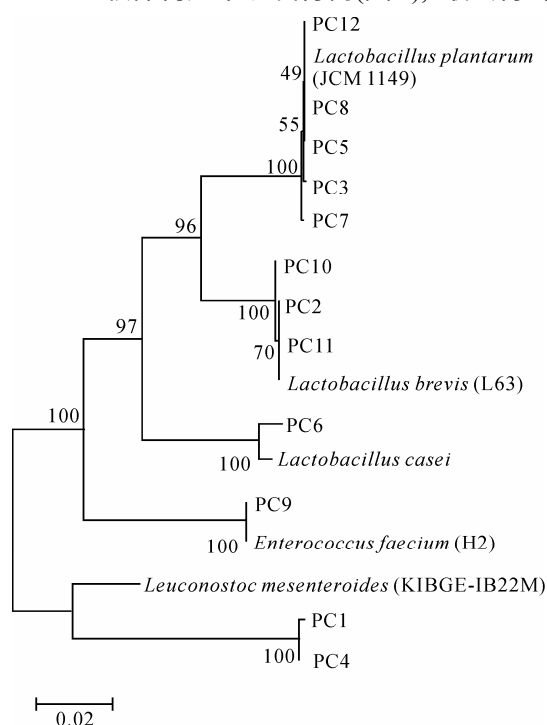


图 3 12 株菌株的系统发育树

分离的乳酸菌的分类地位及其系统发育地位^[18-19]。上述 16S rRNA 基因序列鉴定结果与生理生化试验结果一致, 进一步确认了分离出的乳酸菌菌种^[20]。

3 讨论

乳酸菌的鉴定方法包括形态学观察、生理生化实验和分子生物学等, 前两种方法只是鉴定了菌株的表型, 存在一定的局限性^[21]。利用 16S rRNA 基因序列分析方法鉴定乳酸菌种类, 具有高度保守性和特异性, 可以鉴定到属以及属以上的进化地位^[22]。16S rRNA 基因序列分析法结合生理生化实验鉴定菌种, 结果准确可靠, 说服力强, 在目前乳酸菌鉴定方法中广泛应用。

陈功等^[23]以内江泡菜为研究对象, 分离出短乳杆菌、植物乳杆菌、耐乙醇片球菌、干酪乳杆菌、戊糖乳杆菌、肠膜明串珠菌等; 高娃^[24]以成都周边地区泡菜汁为研究对象, 分离出植物乳杆菌、短乳杆菌、米酒乳杆菌、消化乳杆菌、干酪乳杆菌; 杨吉霞等^[19]以眉山泡菜为研究对象, 分离出植物乳杆菌、短乳杆菌、肠膜明串珠菌、干酪乳杆菌、戊糖片球菌等。本实验分离出的优势乳酸菌与以上文献报道中存在的菌种均有植物乳杆菌、短乳杆菌和干酪乳杆菌。原因可能是在泡菜发酵中后期, 耐酸且不产气的一类乳酸菌, 尤其是植物乳杆菌和短乳杆菌会逐渐成为优势菌群^[25-26], 还可能与四川地区的环境、气候以及四川泡菜的制作方法、发酵温度及发酵时间有关。本实验分离出的肠膜明串珠菌也是四川地区泡菜中的一种常见菌。肠膜明串珠菌能够对糖类进行发酵, 使其产生某些酸和醇, 并且具有抗氧化性、高产酸等能力^[27], 可应用于制作优良的风味剂、抑菌剂和保健剂。除以上菌种外, 还从四川老坛泡菜中分离出屎肠球菌, 这在一般泡菜分离的菌种中报道不多, 这可能与四川老坛泡菜的坛龄有关。屎肠球菌是一种乳酸菌类益生菌, 生长代谢快, 具有较好的黏附力^[28], 能够抑制人体肠道内致病菌的繁殖, 国际上的一些益生菌制品, 如 Bioflorin、Ventrux 等都含屎肠球菌^[29], 其可调节动物的肠道菌群, 提高免疫力以及增强生长性能^[30-31], 在动物微生态制剂和食品添加剂方面应用广泛。

乳酸菌的组成与泡菜品质密切相关。泡菜发

酵早期, 肠膜明串珠菌启动泡菜发酵, 此时泡菜的风味品质较差^[32]; 泡菜发酵中期, 短乳杆菌、植物乳杆菌等成为优势菌, 此期间乳酸菌的数量最多, 泡菜的风味、品质达到最佳状态; 泡菜发酵晚期, pH 下降, 且乳酸菌开始逐渐死亡, 酵母菌等杂菌开始逐渐繁殖, 泡菜的风味、品质下降^[33]。本试验分离出的短乳杆菌、植物乳杆菌等乳酸菌, 可应用于发酵泡菜, 能改善泡菜的品质和风味, 防止腐败, 延长保质期, 增加泡菜的益生和保健功效^[34-36]。

4 结论

从坛龄达 30 年以上的四川老坛泡菜汁中分离出 5 株植物乳杆菌、3 株短乳杆菌、2 株肠膜明串珠菌、1 株干酪乳杆菌和 1 株屎肠球菌 5 种乳酸菌, 其中植物乳杆菌数量最多。并对四川老坛泡菜中的乳酸菌进行了分离鉴定, 为研究老坛泡菜的菌群结构和开发利用老坛泡菜中乳酸菌资源奠定了基础, 后续实验将进一步研究上述分离的老坛泡菜乳酸菌的发酵性能和功能特性, 选育出优良乳酸菌菌株, 用于生产泡菜及其他发酵食品, 改善其品质, 提高加工效益。

参考文献:

- [1] 巨晓英, 韩烨, 周志江. 自然发酵泡菜中乳酸菌的分离鉴定[J]. 食品与机械, 2008, 24(5):29-31.
- [2] TAMANG J P, TAMANG B, SCHILLINGER U, et al. Identification of predominant lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented vegetable products of the Eastern Himalayas[J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 105(3):347-356.
- [3] MCFEETERS R F. Fermentation microorganisms and flavor changes in fermented foods[J]. Journal of Food Science, 2004, 69(1):35-37.
- [4] 尹伟. 眉山市泡菜产业发展探析[J]. 经济研究导刊, 2014, 37(4):39-41.
- [5] 汪红, 曹瑜, 罗时宇, 等. 四川泡菜乳酸菌的分离鉴定及其特性研究[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2008, 45(6):1509-1512.
- [6] 敖晓琳, 张小平, 史令, 等. 四川泡菜中两株优良乳酸菌的鉴定及不同发酵条件对其发酵泡菜品质的影响[J]. 食品科学, 2011, 32(11):152-156.
- [7] 徐丹萍, 蒲彪, 敖晓琳, 等. 传统泡菜中乳酸菌的研究现状[J]. 食品工业科技, 2013, 34(19):369-372.
- [8] MUYANJA C M B K, NARVHUS J A, TREIMO J, et al. Isolation, characterisation and identification of lactic acid bacteria from bushera: A Ugandan traditional fermented beverage[J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 80(3):201-210.
- [9] 牛天贵. 食品微生物学实验技术[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002:110-128.
- [10] 魏艳, 曾小群, 潘道东, 等. 新疆地区不同酸奶中优势乳酸菌的分离与鉴定[J]. 中国食品学报, 2012, 12(12):161-166.
- [11] 凌代文. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999:6-16; 85.
- [12] 曾小群, 潘道东, 杨瑶, 等. 一株高效降解胆固醇乳酸菌的筛选鉴定及其益生潜能初探[J]. 食品科学, 2009, (21):241-245.
- [13] 杨洁彬, 郭兴华, 凌代文, 等. 乳酸菌——生物学基础及应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1996:2-19.
- [14] 布坎南, 吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1984:660-721.
- [15] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌鉴定系统手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001:423-447.
- [16] YARZA P, RICHTER M, PEPLIES J, et al. The all-species living tree project: A 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains[J]. Systematic & Applied Microbiology, 2008, 31(4):241-250.
- [17] STACKEBRANDT E, GOEBEL B M. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1994, 39(14):846-849.
- [18] GRECO M, MAZZETTE R, SANTIS E P L D, et al. Evolution and identification of lactic acid bacteria isolated during the ripening of Sardinian sausages[J]. Meat Science, 2005, 69(4):733-739.
- [19] 杨吉霞, 张利玲, 蒋厚阳, 等. 眉山泡菜中乳酸菌的分离鉴定[J]. 食品科学, 2015, 36(17):158-163.
- [20] WANG J G, CHEN X, LIU W J, et al. Identification of *Lactobacillus* from koumiss by conventional and molecular methods[J]. European Food Research and Technology, 2008, 227(5):1555-1561.
- [21] 徐永健, 焦念志, 钱鲁闽. 水体及沉积物中微生物的分离、检测与鉴定[J]. 微生物学通报, 2004, 31(3):151-155.
- [22] 曾静, 窦岳坦, 王磊, 等. 新疆地区盐湖的中度嗜盐菌 16S rDNA 全序列及 DNA 同源性分析[J]. 微生物学报, 2002, 42(2):133-137.
- [23] 陈功, 张其圣, 余文华, 等. 四川泡菜乳酸菌多样性及

- 其功能特性[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(3):16-20.
- [24] 高娃. 四川部分地区泡菜中乳酸菌的分离鉴定[D]. 内蒙古: 内蒙古农业大学, 2010.
- [25] JI F D, JI B P, LI B, et al. Note microbial changes during the salting process of traditional pickled Chinese cabbage [J]. Food Science & Technology International, 2007, 13(13):11-16.
- [26] 李文斌, 宋敏丽, 唐中伟, 等. 自然发酵泡菜微生物群落变化的研究[J]. 中国食物与营养, 2008, 14(11):22-24.
- [27] 李文斌, 宋敏丽, 高荣琨. 肠膜明串珠菌的研究和应用进展[J]. 食品工程, 2006, 31(4):3-4.
- [28] SIMONOVÁ M, LAUKOVÁ A. Probiotic properties of *Enterococcus faecium* EF9296 strain isolated from silage [J]. Acta Veterinaria Brno, 2004, 73(4):513-519.
- [29] 王婷婷. 尿肠球菌的分离鉴定及其微囊化产品的制备和体外评价[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.
- [30] 文静, 孙建安, 周绪霞, 等. 尿肠球菌对仔猪生长性能、免疫和抗氧化功能的影响[J]. 浙江农业学报, 2011, 23(1):70-73.
- [31] 彭虹旒, 梁莉, 陈西广. 尿肠球菌冷冻干燥保护剂筛选及稳定性比较研究[J]. 食品科学, 2013, 34(3):239-242.
- [32] XIONG T, GUAN Q, SONG S, et al. Dynamic changes of lactic acid bacteria flora during Chinese sauerkraut fermentation[J]. Food Control, 2012, 26(1):178-181.
- [33] 徐丹萍, 蒲彪, 卓志航. 传统泡菜中乳酸菌对风味的影响[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(2):170-173.
- [34] 胡书芳, 王雁萍. 乳酸菌在泡菜生产中的应用[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(21):9275-9276.
- [35] 周光燕, 张小平, 钟凯, 等. 乳酸菌对泡菜发酵过程中亚硝酸盐含量变化及泡菜品质的影响研究[J]. 西南农业学报, 2006, 19(2):290-293.
- [36] 尹胜利, 杜鉴, 徐晨. 乳酸菌的研究现状及其应用[J]. 食品科技, 2012(9):25-29.

Isolation and identification of lactic acid bacteria from old jar pickles in Sichuan province

PAN Qing, ZENG Xiao-qun^{*}, PENG Liu-yang, ZENG Zhi-dan, PAN Dao-dong, WU Zhen
(School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: The stability and diversity of bacteria from the pickles marinated in old jars are better than those in normal jars. In the current study, the old-jar pickles were more than 30 years old and obtained from Xin-an Village, Renshou County, Meishan City, Sichuan Province. The pickles were used to screen lactic acid bacteria (LAB) with good properties. Twelve strains of LAB were isolated from the old-jar pickles and were identified by morphological observation, physiological and biochemical test, 16S rRNA gene sequence alignment and phylogenetic analysis. Five strains of *Lactobacillus plantarum*, 3 strains of *Lactobacillus brevis*, 2 strains of *Leuconostoc mesenteroides*, 1 strain of *Lactobacillus casei* and 1 strain of *Enterococcus faecium* were isolated and identified as predominant bacteria, while *Lactobacillus plantarum* was dominant among these 5 species of LAB.

Key words: old jar; pickle; lactic acid bacteria; separation; identification

(责任编辑 史小丽)