

培养和非培养方法分析发酵白菜卤乳酸菌的多样性

燕平梅^{1,2}, 柴政³, 薛文通^{2*}, 畅晓晖⁴, 孔冬梅⁵, 张惠²

(¹ 太原师范学院生物系, 山西 030031)

(² 中国农业大学食品科学和营养工程学院, 北京 100083)

(³ 山西大学附属中学, 太原 030031)

(⁴ 北京进出口检验检疫局, 北京 100875)

(⁵ 山西大学生物科学与技术学院, 太原 030031)

摘要 【目的】为了探明发酵白菜体系中乳酸菌的多样性和优势乳酸菌。【方法】采用培养和非培养的 16S rRNA 基因同源性分析发酵白菜卤中乳酸菌的多样性。【结果】从培养平板分离得到的 90 株乳酸菌鉴定为 *Lactobacillus* 属和 *Leuconostoc* 属。通过对 115 个 16S rRNA 基因序列对比发现非培养样品的乳酸菌为 *Lactobacillus* 属, *Pediococcus* 属, *Leuconostoc* 属, *Weissella* 属。【结论】非培养样品的乳酸菌多样性较培养方法丰富。两种方法分析的结果显示 *Lactobacillus plantarum* 为发酵白菜体系中优势乳酸菌之一。

关键词: 酸白菜; 乳酸菌; 多样性; 培养; 非培养

中图分类号: Q939 **文献标识码**: A **文章编号**: 0001-6209(2009)03-0383-06

发酵蔬菜是将新鲜蔬菜用盐水和其它辅料在密闭容器中泡制一段时间后形成的蔬菜制品。目前蔬菜发酵以自然发酵为主要加工方法^[1-3], 蔬菜自然发酵过程中不可避免地受到许多制约因素的影响, 如原料供应的限制、加工温度和容器的限制及操作卫生的限制等, 如有不慎, 均有导致发酵异常和发酵失败的危险。自然发酵所需发酵时间较长, 且发酵质量不稳定, 不利于工厂化、规模化及标准化生产。采用人工接种发酵能避免自然发酵的不足, 并且是实现发酵蔬菜工业化的较佳加工方法。目前人工接种发酵蔬菜方法处于实验室研究阶段^[3]。这种方法不能广泛应用的缺点是不明确发酵蔬菜中微生物的多样性及其所扮演的角色。

蔬菜发酵体系是独特的微生态环境。发酵蔬菜中微生物多样性的研究大多使用培养技术。由于环境微生物在营养培养基中可培养性太低^[4]、不能被

分离纯化的缺陷严重地制约了对微生物多样性的深入研究, 因此人们试图通过非培养方法研究微生物的多样性。据资料报道前人用分析细胞脂肪酸和碳源利用^[5-6]的方法对韩国泡菜中乳酸菌作系统分类法的研究。然而, 这些方法较为繁琐。

近来, 利用分子的方法认识复杂体系中微生物的多样性、微生物群落的研究显著增加, 如象深层土壤^[7]、泥潭沼泽^[8]、淤泥^[9]微生物多样性的研究。这些研究是从样品中提取 DNA, 分析其 16S rRNA 基因序列同源性而揭示其物种的多样性系^[10-12]。发酵食品的环境含有多种微生物, 利用不受培养限制的基于 16S rRNA 基因的 PCR 的方法, 可以分析食品中微生物的多样性和动态变化, 如像发酵玉米团^[13]、麦芽威士酒^[14]、意大利香肠^[15]、韩国泡菜^[16]。关于中国泡菜微生物多样性, 用传统分离培养方法研究的报道很多, 但未见到用分子生物学方法研究

* 通信作者。Tel/Fax: +86-10-62736734; E-mail: xwt315@cau.edu.cn

作者简介: 燕平梅(1968-)女, 山西应县人, 副教授, 博士研究生, 主要从事食品微生物学的研究。E-mail: yanpingmei@sohu.com

收稿日期: 2008-06-25; 修回日期: 2008-11-24

泡菜中微生物的多样性。

本研究利用培养和基于 PCR 扩增的 16S rRNA 基因序列分析方法,调查并比较了自然发酵白菜样品中乳酸菌的多样性。为人工接种发酵蔬菜加工方法提供可靠的资料。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料:实验样品为袋装酸白菜(沈阳妙味食品有限公司生产)购自北京家乐福超市。其中的酸白菜卤的 pH 为 3.96,氯化钠浓度 4.27%。

1.1.2 主要仪器和试剂:PCR 仪型号:HYBAID LIMITED。内切酶 *MspI* 购自宝生物有限公司。氨苄青霉素、感受态细胞、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) TOP10、细菌基因组 DNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒和 T-Vector 载体均购自北京天根生化科技有限公司。PCR 引物由上海博亚生物技术公司合成。

1.2 酸白菜卤中细菌总 DNA 的提取

取酸白菜卤水 5 mL,用灭菌的滤纸过滤,用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取。

1.3 PCR 扩增酸白菜卤细菌的 16S rRNA 基因

用提取的总 DNA 为模板,以原核生物通用引物 8F 和 1542R 为上下游引物扩增 16S rRNA 基因,引物 fD1(5'-AGAGTTTGACCTCTCCTGGCTCAG-3')和 rD1(5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3')分别靶向大肠杆菌 16S rRNA 的 8-27 位和 1542-1525 位核苷酸以及与革兰氏阳性菌相关的序列^[13]。PCR 反应在 PCR 仪中进行。PCR 反应的循环条件为 95℃ 5 min,95℃ 2 min,45℃ 30 s,72℃ 2 min,30 次循环;72℃ 7 min。PCR 扩增产物为 1.5 kb。

1.4 16S rRNA 基因克隆文库的构建

PCR 扩增产物用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收,与 T-Vector 载体连接形成重组质粒,用重组质粒转化感受态细胞(*E. coli* TOP10),挑取阳性克隆转化菌培养在含氨苄青霉素 50 μg/mL 的 LB 培养基中过夜,加 30% 的甘油保藏在 -70℃ 条件。

用下述两种方法确认阳性克隆转化菌是否含有 1.5 kb - 16S rRNA 基因。(1)用 *EcoRI* 内切酶消化从阳性克隆菌提取质粒,用含 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离消化后的质粒片段,如有 1.5 kb 大小的片段,则为 16S rRNA 基因阳性转化菌。(2)用 PCR 扩增法检测重组克隆菌中是否有 16S rRNA 基因,以质粒为模板,PCR 反应按 1.3 条件进行,分析 PCR 反

应产物用含 1.5% 琼脂糖凝胶电泳法来检测。

1.5 16S rRNA 基因序列的分析和测定

将阳性克隆的 16S rRNA 基因片段用内切酶 *MspI* 切割,用 2% 的琼脂糖凝胶电泳方法检测切割后的结果,对克隆菌作初步分析,此方法称为扩增性核糖体 DNA 片断的限制性酶切分析(Amplified ribosomal DNA restriction analysis,ARDRA)。并根据此结果将克隆鉴定,从每种类型中选一代表克隆菌测序,以此阳性菌的质粒为模板,通用 T7/SP6 序列为引物测定所有的序列反应。测序由上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.6 16S rRNA 基因序列的鉴别和系统发育分析

测定代表阳性转化克隆 16S rRNA 基因序列的 500bp 核苷酸,识别独特的序列类型。用 CHECK CHEMERA 程序检测人工嵌合序列并剔除。将序列相同的 16S rDNA 克隆子定义为同一个操作分类单位(Operational taxonomic unit,OTU)。不同的 OTU 序列用 BLAST 程序在 GenBank 中搜索相似序列,将相关序列用 DNAMAN (Version4.0)进行比对,进行系统发育分析。鉴别的序列提交于 GenBank 库中,存取号为 DQ649012—DQ649015,EF423911—EF423914 和 EF423908。

1.7 酸白菜卤中乳酸菌的分离和鉴定

乳酸菌的分离培养基为 MRS(de Man, Rogosa and Sharpe)培养基每升中加 12 g 琼脂、25g NaCl 和 2 g 纳他霉素。将酸白菜卤稀释不同的浓度涂布于 MRS 平板,在 30℃ 培养箱中培养 72 h。从不同稀释度平板中随机挑取菌落转移到装有无菌 MRS 肉汤培养基的 10 mL 试管中,进行种属鉴定之前将分离的菌落在适宜的琼脂培养基上用连续划线方法纯化。

从酸白菜卤中获得菌株 102 株,对其进行革兰氏染色、过氧化氢酶反应和乳酸含量的测试,根据测试结果选取乳酸菌。102 株菌株中,8 株过氧化氢酶反应为阳性,4 株革兰氏反应呈阴性。对余下的产乳酸量多的 90 株乳酸菌菌株作进一步鉴定。应用 API50CH 试剂条和 API50CHL 培养基按照厂商的指示说明,对分离的 90 株菌株进行糖发酵反应,试验结果由 APILABPLUS (Version3.3.3, Bio-Merieux, France)程序和标准分类法得出鉴定结果^[17]。

2 结果

2.1 用非培养方法分析酸白菜卤中乳酸菌多样性
采用 ARDRA 分析 1600 个转化菌 16S rRNA 基

因的序列, 有 146 个不同类型的酶切图谱(图 1 为其中一部分的酶切图谱), 选取一代表克隆阳性菌, 通过测定基因序列反应得到 115 个 16S rRNA 基因序列, 序列相似性对比后有 8 个 OTU, 根据 8 个 OUT 的 16S rRNA 基因序列来判断酸白菜混合体系中乳酸菌的多样性。利用 BLAST 程序在 GenBank 库中搜索相似序列, 基因序列相似性大于 97% 的为相同的种^[19]。利用 16S rRNA 基因克隆菌来分析酸白菜卤体系的乳酸菌多样性, 8 个 OUT 分析结果总结于表 1, 16S rRNA 基因克隆子中 74.78% 为 *Lactobacillus* 属、8.70% 为 *Pediococcus* 属、8.70% 为 *Leuconostoc* 属、7.82% 为 *Weissella* 属。*Lactobacillus* 属中有植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)、*Lactobacillus acidifarinae*、戊糖乳杆菌 (*Lactobacillus pentosus*)、*Lactobacillus curvatus*、*Lactobacillus hammesii*。其中 *Lactobacillus plantarum* 在总克隆中的含量最多, 为 31.3%。其次为 *Lactobacillus acidifarinae* (24.4%), 再次为 *Lactobacillus pentosus* (9.6%)、*Pediococcus*

(8.7%)、*Leuconostoc mesenteroides* (8.7%)、*Weissella confusa* (7.8%)、*Lactobacillus curvatus* (5.2%)、*Lactobacillus hammesii* (4.3%) 在总的克隆菌数中所占的比例少。用非培养方法研究发酵白菜体系中乳酸菌有 4 个属, 而乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*) 是主要种群, *Lactobacillus plantarum* 是数量上占优势的成员。

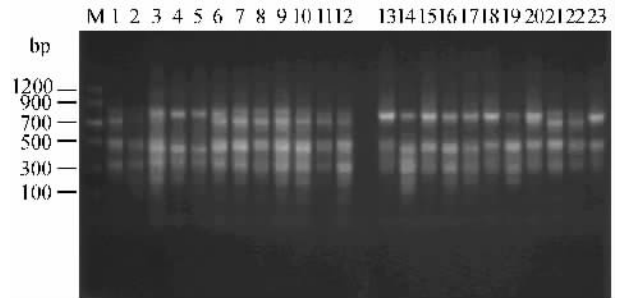


图 1 克隆菌 16S rDNA 基因 ARDRA 分析的电泳图谱
Fig.1 ARDRA of clones of the 16S rDNA. 1~23: of Clones of the 16S rDNA. M: DNA Marker.

表 1 16S rRNA 基因序列的分析结果

Table 1 Results from 16S rDNA clone sequences analyse

| Organism identified | No. (%) of organism identified | Clone of GenBank accession No. | GenBank accession No. | Similarity* /% |
|-----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------|----------------|
| <i>Lactobacillus acidifarinae</i> | 28 (24.4) | B11 | DQ649012 | 97.5 ~ 98.7 |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | 36 (31.3) | B19 | DQ 649013 | 98.1 ~ 99.0 |
| <i>Pediococcus sp.</i> | 10 (8.7) | B4 | DQ649015 | 98.0 ~ 99.1 |
| <i>Weissella confusa</i> | 9 (7.8) | B36 | DQ649014 | 97.7 ~ 99.2 |
| <i>Lactobacillus pentosus</i> | 11 (9.6) | B189 | EF423913 | 98.1 ~ 99.9 |
| <i>Lactobacillus curvatus</i> | 6 (5.2) | B225 | EF423914 | 98.6 ~ 99.0 |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | 10 (8.7) | B112 | EF423911 | 98.7 ~ 99.8 |
| <i>Lactobacillus hammesii</i> | 5 (4.3) | B34 | EF423908 | 98.1 ~ 98.9 |

* Range of 16S rRNA gene sequence similarity values between paocai clones and the type strains.

2.2 用培养方法分析发酵白菜卤乳酸菌的多样性

用 API 鉴定体系鉴定 90 株菌的结果见表 2, 发酵白菜卤中含有两个属, 97.78% 为 *Lactobacillus* 属, 2.22% 为 *Leuconostoc* 属。*Lactobacillus* 属中有 *Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus Pentosus*、短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*)、嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*)、发酵乳酸杆菌 (*Lactobacillus fermentum*)。其中 *Lactobacillus plantarum* 的含量最高, 为分离总乳酸菌的 34.44%, 其次是 *Lactobacillus pentosus* 和 *Lactobacillus brevis*, 分别为 30.00% 和 27.78%, *Lactobacillus fermentum* (2.22%)、*Leuconostoc mesenteroides* (2.22%)、*Lactobacillus acidophilus* (3.33%) 的含量少。培养方法的研究结果说明乳酸杆菌是发酵白菜体系中主要菌群, 其中 *Lactobacillus plantarum* 为优势菌株。

3 讨论

本研究利用了不受培养限制的非培养方法——即用 16S rRNA 基因克隆文库中独特阳性转化菌的序列来分析发酵白菜样品中乳酸菌的多样性, 发现发酵白菜体系中的乳酸菌有四个属, 乳酸杆菌是主要菌属, *Lactobacillus plantarum* 是优势菌种, 此方法曾被利用在韩国泡菜 (kimchi) 中细菌群落的研究^[18], 发现 kimchi 中乳酸杆菌是处于弱势地位的菌属, *Weissella koreensis* 是优势菌种。研究结果不同的原因是因两种发酵蔬菜的样品不同、加工工艺不一样, 而导致发酵白菜中微生物群落不一致。

用培养方法检测发酵白菜中乳酸菌多样性, 得到乳酸菌有 *Lactobacillus*、和 *Leuconostoc* 两个属, 乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*) 是主要菌属, *Lactobacillus*

表2 API50CH 试剂分析结果

Table 2 Reagent from API50CH reagents

| Source of carbon | <i>Lac. plantarum</i> | <i>Lac. Pentosus</i> | <i>Lac. brevis</i> | <i>Lac. fermentum</i> | <i>Lac. acidophilus</i> | <i>Leu. mesenteroides</i> |
|------------------|-----------------------|----------------------|--------------------|-----------------------|-------------------------|---------------------------|
| 0 | - | - | - | - | - | - |
| GLY | - | + | - | - | - | - |
| ERY | - | - | - | - | - | - |
| DARA | - | - | - | - | - | - |
| LARA | + | + | + | - | - | + |
| RIB | + | + | + | + | - | + |
| DXYL | - | + | - | - | - | + |
| LXYL | - | - | - | - | - | - |
| ADO | - | - | - | - | - | - |
| MDX | - | - | - | - | - | - |
| GAL | + | + | + | + | - | + |
| GLU | + | + | + | + | + | + |
| FRU | + | + | + | + | + | + |
| MNE | + | + | + | + | + | + |
| SBE | - | + | - | - | - | - |
| RHA | - | - | - | - | - | - |
| DUL | - | - | - | - | - | - |
| INO | - | - | - | - | - | - |
| MAN | - | + | - | - | + | - |
| SOR | - | - | - | - | - | - |
| MDM | + | - | - | - | - | + |
| MDC | - | + | + | - | - | + |
| NAG | + | + | + | - | - | + |
| AMY | - | + | - | - | - | + |
| ARB | + | + | + | - | - | + |
| ESC | + | + | + | - | + | + |
| SAL | + | + | + | - | + | + |
| CEL | + | + | + | - | - | + |
| MAL | + | + | + | + | + | + |
| LAC | + | + | - | + | + | + |
| MEL | + | + | + | + | + | + |
| SAC | + | + | + | + | + | + |
| TRE | + | - | + | + | - | + |
| INU | - | - | - | - | - | - |
| MLZ | - | + | + | - | + | - |
| RAF | + | - | - | + | + | + |
| AMD | - | - | - | - | - | - |
| GLYG | - | - | - | - | - | - |
| XLT | - | - | - | - | - | - |
| GEN | + | + | + | - | - | + |
| TUR | - | - | - | - | - | + |
| LYX | - | - | - | - | - | - |
| TAG | - | - | - | - | - | - |
| DFUC | - | - | - | - | - | - |
| LFUC | - | - | - | - | - | - |
| DARL | - | - | - | - | - | - |
| LARL | - | - | - | - | - | - |
| GNT | + | + | - | + | - | - |
| 2KG | - | - | - | - | - | - |
| 5KG | - | - | - | - | - | - |

+ : Positive reaction ; - : Negative reaction.

plantarum 是优势菌种的研究结果。非培养方法发现发酵白菜体系中有 *Lactobacillus*、*Leuconostoc*、*Pediococcus sp.*、*Weissella* 四个属,用培养的方法未检测到 *Pediococcus sp.*、*Weissella* 两个属。非培养方法检测到的 *Lactobacillus acidifarinae*、*Lactobacillus curvatus*、*Lactobacillus hammesii* 用培养的方法未检测到,其中 *Lactobacillus acidifarinae* 在泡菜中是首次发现的微生物。据 Vancanneyt 2005^[19] 报道, *Lactobacillus acidifarinae* 是在比利时的酸面团中发现的新菌种,此菌的 16S rRNA 基因序列和 *Lactobacillus brevis* 的非常相近,用糖发酵反应产物的不同来区别两者。在本研究中 *Lactobacillus brevis* 用培养方法分离到,而非培养方法未检测到。培养方法检测到的 *Lactobacillus fermentum*、*Lactobacillus acidophilus*、*Lactobacillus brevis* 用非培养方法未检测到,但以此三种菌种的 DNA 为模板,使用和上述 PCR 法相同的引物能扩增出相应的产物,此事实证明了基于 PCR 技术的非培养方法是可行的。

培养方法和非培养方法检测同一种发酵白菜样品,得到了不完全一致结果的原因如下:① 样品的处理方法不同 培养方法中将发酵白菜卤稀释后涂布于 MRS 平板,非培养方法是将发酵白菜卤过滤后从中提取 DNA 作为扩增 16S rRNA 基因的模板;② 获得微生物鉴定的材料不同 培养方法是把涂布发酵白菜卤的 MRS 平板通过培养后,从中挑取形态不同的菌落经过纯化后鉴定其类型,非培养方法是通过 PCR 技术获得 16S rRNA 基因克隆文库,从克隆菌提取克隆的 16S rRNA 基因作为鉴定微生物的材料;③ 鉴定微生物的方法不同 培养方法鉴定微生物是通过菌落形态和一些生化反应的表型特征作出判断的,非培养方法是通过测定 16S rRNA 基因的碱基序列和 GenBank 库中已有的已知序列对比后而作出鉴定结果的。由于培养方法和非培养方法的以上不同,导致它们在检测微生物方面各有千秋。培养方法对微生物的研究是通过在培养基培养、微生物识别和描述,这些限制因素不可避免地会造成菌株的富集和衰退,对研究结果造成较大的偏差^[20]。可能在发酵蔬菜体系中存在的或含量很高的菌群在培养基中无法培养或生长很差^[21]。而用培养分离法从发酵蔬菜中分离出的菌株可能仅仅是由于培养基上能大量被培养出来,从而被高估了它们的实际含量和作用^[22]。非培养的方法可以真实反映特定环境中微生物多样性,并且需要时间较少,但此种方法也存在内在的弊端,核酸的选择性提取,16S rDNA 的

选择性扩增和随机的 16S rDNA 连接和转化程序。因此,环境体系中非常少的序列成功地克隆插入的可能性是很低的。用培养方法分离鉴定的菌株可能用此方法得不到。另外,由于非培养方法得不到菌体,不利于微生物的形态、生理代谢等方面的研究和应用。两种技术各有利弊,只有把两种方法有效结合使用,才能更深入地揭示发酵蔬菜体系中乳酸菌的多样性。

本研究用培养和基于 PCR 扩增 16S rRNA 基因序列分析的非培养方法分析发酵白菜卤中乳酸菌的多样性,两种方法鉴定结果一样的菌是 *Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus pentosus*、*Leuconostoc mesenteroides*、*Lactobacillus plantarum* 为发酵白菜中优势乳酸菌。据 shilf^[23]和 Pederson^[24]报道韩国泡菜(kimchi)、德国泡菜(sauerkraut)中 *Lactobacillus plantarum* 是优势的菌种。在我们的实验中用培养和非培养的两种方法发现了大量的 *Lactobacillus plantarum*。 *L. plantarum* 是许多发酵蔬菜中的优势菌群^[25]。发酵后期 *L. plantarum* 成为主要菌的原因是此种菌能耐受高酸性^[25-26]。

在本研究中采用了基于 PCR 技术的非培养方法和培养方法,得到不完全一样的结果,是由于两种方法本身存在不足造成的。而两种方法得到 *Lactobacillus plantarum* 为含量最多乳酸菌的一致结果。说明 *Lactobacillus plantarum* 是发酵白菜中优势乳酸菌。可作为人工接种发酵蔬菜首选的发酵菌种。

参考文献

- [1] Oh Chang-kyung, Oh Myung-chul, Kim Soo-hyun, et al. The depletion of sodium nitrite by lactic acid bacteria Isolated from Kimchi. *Journal of Medicinal Food*, 2004, 7 (1):38-44.
- [2] Britta Viander, Maarit Mäki, Airi palva, et al. Impact of low salt concentration, salt quality on natural large-scale sauerkraut fermentation. *Food Microbiology*, 2003, 20: 391-395.
- [3] 陈仲翔,董英. 泡菜工业化生产的研究进展. *食品科技(Food Science and Technology)*, 2004, 4:33-36.
- [4] Staley JT, Konopka A. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Reviews Microbiology*, 1985, 39:321-346.
- [5] Lee JS, Chun CO, Kim HJ, et al. Analysis of cellular fatty acid methyl esters FAMES. For the identification of *Leuconostoc* strains isolated from kimchi. *Journal of Microbiology*, 1996b, 34:225-228.
- [6] Lee JS, Chun CO, Jung MC, et al. Classification of isolates originating from kimchi using carbon-source utilization patterns. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1997, 7:68-74.
- [7] Yamamoto H, Hiraishi A, Kato K, et al. Phylogenetic evidence for the existence of novel thermophilic bacteria in hot spring sulfur-turf microbial mats in Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64:1680-1687.
- [8] Rheims HC, Spraker F, Rainey A, et al. Molecular biological evidence for the occurrence of uncultured members of the actinomycete line of descent in different environments and geographical locations. *Microbiology*, 1996, 142:2863-2870.
- [9] Borneman J, Skorch PW, O'Sullivan KM, et al. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62:1943-1953.
- [10] Busse HJ, Denner EM, Lubitz W, et al. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacteria systematics. *Journal of Biotechnology*, 1996, 47:3-8.
- [11] Ludwig W, Schleifer KH. Bacterial phylogeny on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 1994, 5:155-173.
- [12] Marchesi J, Sato R, Weightman AJ, et al. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64:795-799.
- [13] Adelfo E, Carmen W, Amelia F, et al. Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 64:21-31.
- [14] Beek SV, prist FG. Environ of the lactic acid bacterial community during malt whisky fermentation: a polyphasic study. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68:297-305.
- [15] Cocolin L, Manzano M, Cantoni C, et al. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67:5113-5121.
- [16] Lee JS, Heo GY, Lee JW, et al. Analysis of kimchi microflora using denaturing gradient gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 102:143-150.
- [17] Muyanja CMBK, Narvhus JA, Treimo J, et al. Isolation characterization and identification of lactic acid bacteria from

- bushera: a Ugandan traditional fermented beverage. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, 80: 201–210.
- [18] Myungjin K, Jongsik C. Bacterial community structure in kimchi, a Korean fermented vegetable food, as revealed by 16S rRNA gene analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 103: 91–96.
- [19] Vancanneyt M, Neysens P, Wachter M, et al. *Lactobacillus acidifarinae* sp. nov. and *Lactobacillus zymae* sp. nov., from wheat sourdoughs. *International Journal System Environmental Microbiology*, 2005, 55: 615–620.
- [20] Burgmann H, Pesaro M, Widmer FA. Strategy for optimizing quantity and quality of DNA extracted from soil. *Journal of Microbiological Methods*, 2001, 45: 7–20.
- [21] Souza MP, Amini A, Dojka MA. Identification and characterization of bacteria in a selenium-contaminated hypersaline evaporation pond. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(9): 3785–3794.
- [22] Cullen DW, Hirsch PR. Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. *Soil Biol Biochem*, 1997, 30: 983–993.
- [23] Shin DH, Kim MS, Han JS, et al. Changes of chemical composition and microflora in commercial Kimchi. *Journal Food Science Technology*, 1996, 28: 137–145.
- [24] Pederson, CS, Albury, MN. The sauerkraut fermentation. *New York State Agricultural Experiment Station Bulletin*. 1969, 82: 26–28.
- [25] Oyewole OB, Odunfa SA. Characterization and distribution of lactic acid bacteria in cassava fermentation during fufu production. *Journal of Bacteriology*, 1990, 68: 145–152.
- [26] Hounhouigan D, Nout MR, Nago CM, et al. Characterization and frequency distribution of species of lactic acid bacteria involved in the processing of mawe, a fermented maize dough from Benin. *International Journal of Food Microbiology*, 1993, 22: 279–287.

Lactic acid bacteria diversity in fermented cabbage estimated by Culture-dependent and-independent methods

Pingmei Yan^{1,2}, Zheng Chai³, Wentong Xue^{2*}, Xiaohui Chang⁴, Dongmei Kong⁵, Hui Zhang²

(¹Department of Biology, Taiyuan Normal College, Taiyuan 030001, China)

(²College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

(³Affiliated Secondary School, Shangxi University, Taiyuan 030031, China)

(⁴Beijing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Beijing 100026, China)

(⁵School of Life Science and Technology, Shanxi University, Taiyuan 030001, China)

Abstract: [**Objective**] To study the diversity of lactic acid bacteria (LAB) and dominant LAB in fermented cabbage.

[**Methods**] Culture-dependent and -independent (16S rRNA gene clone libraries were constructed) methods were used to determine the composition of LAB in fermented cabbage. [**Results**] Ninety LAB isolated from fermented cabbage were identified as species of *Lactobacillus* and *Leuconostoc*, whereas 115 clones of the 16S rRNA gene sequence from fermented cabbage DNA were identified as *Lactobacillus*, *Weissella*, *Pediococcus* and *Leuconostoc*. [**Conclusion**] The significant difference of the LAB compositions by the two methods implies that some specialized nutrients may lead to a distinctive selection of the dominant organisms. *Lactobacillus plantarum* appeared as the dominant species in fermented cabbage by both methods.

Keywords: fermented cabbage; lactic acid bacteria; culture-dependence; culture-independence

(本文责编 :王晋芳)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-62736734; E-mail: xwt315@cau.edu.cn