

盐渍青菜的细菌菌群结构 DGGE 分析及产酸细菌分离鉴定*

尹礼国^{1,2,3}, 马双艳¹, 李华兰⁶, 杨婧², 梁会朋²,
张其圣^{2,4,5}, 陈功^{4,5}, 吴正云², 张文学²

1(宜宾学院 生命科学与食品工程学院, 四川 宜宾, 644007)

2(四川大学 轻纺与食品学院, 四川 成都, 610065)

3(宜宾学院 固态发酵资源利用四川省重点实验室, 四川 宜宾, 644007)

4(四川省食品发酵工业研究设计院, 四川 成都, 611130)

5(四川东坡中国泡菜产业技术研究院, 四川 眉山, 620000)

6(宜宾学院实验与教学资源管理中心, 四川 宜宾, 644007)

摘要 采用变性梯度凝胶电泳技术(denatured gradient gel electrophoresis, DGGE)对不同盐渍青菜样品的细菌菌群结构进行了分析。对优势条带测序分析表明,盐渍青菜中主要的优势细菌是乳杆菌属(*Lactobacillus*)、魏斯氏菌属(*Weissella*)、糖多孢菌属(*Saccharopolyspora*)、短芽孢杆菌属(*Brevibacillus*)细菌。在腌渍初期,海源菌属(*Idiomarina*)与海洋杆菌属(*Marinobacter*)细菌较丰富,在腌渍后期明显减少。乳杆菌属细菌在腌渍14、26个月的青菜中含量丰富,在腌渍2个月的青菜中含量较少。通过分离培养技术从盐渍青菜中分离获得23株产酸细菌,通过16S rDNA序列分析初步确定戊糖乳杆菌(*Pediococcus pentosaceus*)8株,枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)与植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)各5株,解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)2株,溶血性葡萄球菌(*Staphylococcus hominis*)、解淀粉芽孢杆菌植物亚种(*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*)、短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)各1株。DGGE操作简便,能够较好地反映盐渍青菜的细菌菌群变化,在盐渍青菜的细菌菌群结构分析中具有独特的优势。分离获得的产酸细菌可为盐渍工艺改进提供菌种资源。

关键词 变性梯度凝胶电泳(DGGE);盐渍青菜;产酸细菌;细菌群落结构

四川地区的盐渍青菜,又称四川酸菜,是以当地称为青菜的叶用芥菜(*Brassica juncea*)盐渍发酵而成,滋味酸爽、香气浓郁,是制作酸菜鱼底料、方便面调味包及其他调味料的重要原料,在四川地区具有产业规模逾亿元,在当地农业经济发展中具有十分重要的地位。腌渍过程中,微生物发酵产生适量的有机酸及风味物质,形成特有的发酵蔬菜风味,具有开胃、促食欲等功能。发酵蔬菜的风味与品质受蔬菜的营养成分、发酵条件、发酵过程中的微生物菌群结构影响。

对规模化加工过程的菌群结构进行分析,为质量控制与品质提升提供理论基础与技术支撑,是实现产业可持续发展的重要战略手段。传统分离培养技术

能够分离到的微生物仅占自然界微生物的1%~10%,操作步骤繁琐,无法反映样品的真实菌群结构^[1-2]。聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳技术(polymerase chain reaction-denatured gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE)通过将目的基因片段体外扩增,在变性剂梯度凝胶中能将长度相同、序列不同的DNA片段分离开来,在微生态研究中具有指纹图谱功能,对优势条带克隆测序,可获得样品的菌群结构信息,具有操作简便、快速、高效等优点。1993年, Muyzer等^[3]首次将DGGE技术应用于微生物生态学研究。此后,该技术在土壤、海洋、胃肠道、菌肥、废水、污泥、食品等样品菌群结构的研究中被广泛应用。1999年,Ampe等^[4]最先将PCR-DGGE技术应用于食品微生物研究。目前,该技术在食品菌群结构研究中得到了广泛应用, Lee、Chang等^[5-6]对韩国泡菜的微生物菌群结构进行了分析, Tu等^[7]对传统的台湾自然发酵火腿成熟过程中的微生物动态变化进行了分析, Leite等^[8]对巴西开菲尔粒的微生物多样性进行了研究, González-Arenzana、Andorrà等^[9-10]对葡萄酒

第一作者:博士研究生,副教授(张文学教授为通讯作者, E-mail: 244780836@qq.com)。

*“十二五”国家科技支撑项目(2012BAD31B04);“十二五”四川省科技支撑项目(2012NZ0002);四川省教育厅重点项目(编号:09ZC050);发酵资源与应用四川省高校重点实验室开放基金项目(编号:2009KFJ003);宜宾学院科研项目(编号:2013YY001)
收稿日期:2014-09-08, 改回日期:2014-10-27

发酵过程中的微生物群落结构变化进行了分析, Delgado 等^[11]对牛奶中嗜热细菌的多样性进行了分析。我国学者在应用 PCR-DGGE 技术解析食品菌群结构方面也开展了大量研究, 高秀芝等^[12]对豆酱发酵过程的微生物多样性进行了分析, 蓝蔚青等^[13]对冷藏带鱼贮藏期间的微生物变化进行了分析, 张中华等^[14]对绍兴黄酒麦曲中的细菌群落结构进行了分析, 张先琴等^[15]对四川地区家庭制作泡菜的微生物多样性进行了分析。本文采用 PCR-DGGE 技术对采自眉山市泡菜加工企业的不同盐渍期的青菜样品的菌群结构进行了对比分析, 并开展了产酸细菌分离与分子生物学鉴定。

1 材料与方法

1.1 样品采集与保存

用无菌取样瓶取盐渍青菜及盐渍水(2014年6月11日取自眉山吉香居食品厂), 样品取回后保存于-20℃冰箱中, 及时提取总DNA。

1.2 实验药品

Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒、UNIQ-10 核酸纯化套件, 2 × Taq PCR MasterMix, 去离子甲酰胺、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、TEMED、过硫酸铵、十二烷基磺酸钠、尿素、SYBR GREEN I(购自生工生物工程(上海)股份有限公司)。

1.3 主要实验仪器

高速冷冻离心机, 超净工作台, TECHNE TC-412 PCR 仪(TECHNE 公司), DYY-5 电泳仪(北京六一), 凝胶成像仪(Bio-Rad, USA), Bio-rad T1000 梯度 PCR 仪, 变性梯度凝胶电泳装置(Bio-Rad, USA)。

1.4 实验方法

1.4.1 盐渍青菜总 DNA 的提取

取盐渍青菜样品于冰袋表面解冻, 用无菌研钵捣碎得盐渍汁液。取汁液 1 mL 于 1.5 mL 离心管, 10 000 g 离心 5 min, 去上清液, 加入 500 μL 裂解液(100 mmol/L Tris-Cl, 5 mmol/L EDTA, 500 mmol/L NaCl, 1% SDS, pH7.5)悬浮样品, 在-20℃反复冻融 3 次, 加入 20 μL 蛋白酶溶液(20 mg/mL)于 56℃水浴 60 min。向离心管中加入 200 μL 无水乙醇, 混匀, 用 UNIQ-10 核酸纯化柱套件纯化得总 DNA, 置于-20℃保存备用。

1.4.2 细菌 16S rDNA V7-V8 区扩增

参照参考文献 16 选择反向引物 WBAC1(5'-GTCGTCAGCTCGTGTCTGAGA-3')、正向引物 WB-

CA2-GC(5'-CGCCCGCCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGACGCGGGGGCCCGGAACGTATTACCG-CG-3')作为 PCR 扩增引物, 由上海生工合成, 扩增目的片段大小约为 320 bp。PCR 扩增体系为 50 μL, 样品总 DNA 4 μL, 上游引物 WBAC2-GC(10 μmol/L)和下游引物 WBAC1(10 μmol/L)各 2 μL, 2 × Taq PCR MasterMix 25 μL, 无菌超纯水 17 μL。采用降落 PCR 程序扩增, 94℃预变性 5 min, 94℃变性 45 s, 64~54℃退火 1 min(每个循环降低 1.5℃), 72℃延伸 1 min, 10 个循环; 94℃预变性 45 s, 54℃退火 45 s, 72℃延伸 1 min, 20 个循环; 最后 72℃延伸 3 min。所得产物在 2% 的琼脂糖凝胶上电泳。

1.4.3 扩增产物的 DGGE 分析与测序

参照仪器说明, 配制质量浓度为 80 mg/mL 的聚丙烯酰胺的变性梯度凝胶, 其中变性剂(尿素与甲酰胺)的线性梯度为 30%~60%, 聚丙烯酰胺中丙烯酰胺与双丙烯酰胺的质量比为 37.5:1。安装好仪器后, 移取扩增产物 40 μL 于点样孔中。在温度为 60℃条件下, 先 20 V 电泳 30 min, 再 60 V 电泳 14 h, 取出凝胶, 用 SYBR GREEN I 溶液染色 20 min, 置于凝胶成像系统中拍照。在紫外防护下, 将优势条带切割下来, 送上海生工克隆测序, 在 NCBI 网站利用 BLAST 比对鉴定。

1.4.4 产酸细菌分离与形态观察

在无菌条件下取盐渍青菜研磨, 取 5 mL 汁液于 50 mL 的 MRS 液体培养基中富集培养 72 h。用无菌生理盐水将富集培养后的培养液稀释, 得 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 的不同梯度稀释液。分别取 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 梯度稀释液各 0.2 mL 涂布添加 0.1% 溴甲酚绿指示剂的 MRS 固体培养基上。将涂布后的平皿放置于干燥器中, 通过燃烧法消耗其中的氧气, 在 37℃恒温培养 72 h 后, 挑选使培养基蓝色消退的菌落, 划线接种到新的产酸细菌鉴别培养基上, 重复 2~3 次, 获得产酸能力强的纯菌落。

1.4.5 产酸细菌的分子生物学鉴定

1.4.5.1 产酸细菌总 DNA 的提取

将产酸细菌活化培养后, 挑单菌落接种于液体培养基中, 培养 12~16 h, 吸取 1.5 mL 菌液于 1.5 mL 离心管中, 采用 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取总 DNA, 置于-20℃保存。

1.4.5.2 16S rDNA 的扩增与测序

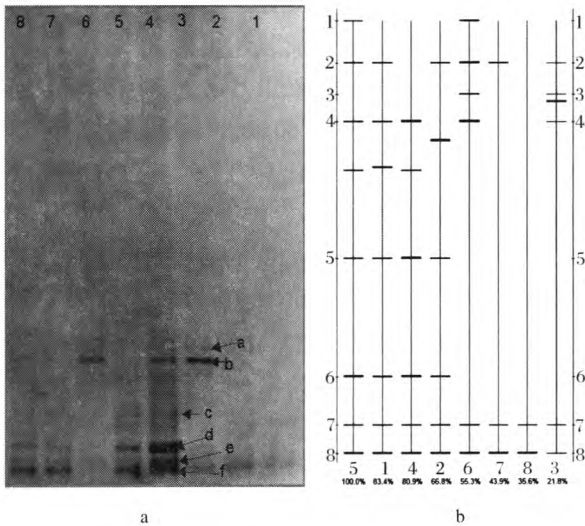
16S rDNA 的扩增反应体系为 25 μL, 模板 DNA 2 μL, 上游引物 27f(20 μmol/L)和下游引物 1492r(20

μmol/L)各 0.5 μL,2 × TaqPCRMasterMix12.5 μL,无
菌超纯水 9.5 μL。PCR 扩增程序为 94 ℃ 预变性 5
min,94 ℃ 变性 1 min,55 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 2
min,共循环 30 次;最后 72 ℃ 延伸 10 min,4℃ 保存。
通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,将扩增成
功的样品送上海生工测序。

2 结果与分析

2.1 盐渍青菜细菌菌群的 PCR-DGGE 分析

依据实验方法 1.4.1 提取各盐渍青菜样品总
DNA,对细菌 16S rDNA V7-V8 区扩增,采用 DGGE 分
析,结果如图 1 所示。



1、2 号样品为青菜的杆、叶,购自农贸市场;3、4、5 号样品
为盐渍 2 个月、14 个月、26 个月的青菜杆部,6、7、8 号样品为盐
渍 2 个月、14 个月、26 个月的青菜的叶部。

a - 电泳图; b - 条带识别图

图 1 盐渍青菜样品优势细菌 16S rDNA V7-V8
区的 DGGE 分析

Fig. 1 DGGE analysis of 16S rDNA V7-V8 fragments
of bacteria community from pickled *Brassica juncea*

由图 1 可知,新鲜蔬菜(1、2 列)中的微生物较
少,盐渍发酵后细菌生物量明显增加,盐渍 2 个月的
青菜(3、6 列)中的条带 b 代表的细菌增长明显。腌
渍 14 个月,盐渍青菜(4、7 列)的种类与含量增加,
杆的亮度增加更为明显,条带 a、b 的亮度降低,条带
c、d、e、f 亮度增加。腌渍 26 个月的盐渍青菜叶的菌
群结构与腌渍 14 个月的相似,青菜杆的条带 a、b 亮
度明显降低,c、d、e、f 的亮度也相对降低。综合比较
各列推断,条带 a、b 代表的细菌在盐渍初期大量繁
殖,在盐渍后期逐步衰亡,条带 c、d、e、f 所代表的细

菌在盐渍过程中逐渐增殖,在 26 个月的样品较 14 个
月的样品有一定降低。

2.2 PCR-DGGE 优势条带序列分析

对 PCR-DGGE 优势条带克隆测序、序列比对结
果如表 1 所示。

表 1 DGGE 条带测序结果
Table 1 Identification results of DGGE bands

条带	相似菌株	相似性/%	相似株接受号
a	<i>Idiomarina ramblicola</i> strain R22	98	NR025806.1
b	<i>Marinobacter maritimus</i> strain D15-8P	98	FJ799007.2
c	<i>Weissella thailandensis</i> strain N8MR4	100	KF193910.1
d	<i>Saccharopolyspora rosea</i> strain IMMIB L-1070	99	NR042711.1
e	<i>Brevibacillus laterosporus</i> strain HS-A465	100	KM091710.1
f	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain LY4	99	KJ769142.1

结合表 1 与图 2 可知,各优势条带的基因序列与
相似菌株有较高的相似性,条带 a 所代表的菌与海源
菌属的 *Idiomarina ramblicola* 有 98% 的相似性,在腌
渍 2 个月与 14 个月的杆中有一定的生物量。条带 b
所代表的菌与海洋杆菌属的 *Marinobacter maritimus*
相似性较高,在腌渍 2 个月与 14 个月的样品中较为
丰富,以腌渍 2 个月的样品最为突出。条带 c 所代表
的菌与魏斯氏菌属的 *Weissella thailandensis* strain
N8MR4 基因序列相似度为 100%,条带 d 与糖多孢菌
属的 *Saccharopolyspora rosea* strain IMMIB L-1070 基
因序列相似度为 99%,二者在腌渍 14 个月与 26 个月
的样品中的生物量较高,d 的含量尤为丰富。条带 e
与侧孢短芽孢杆菌 (*Brevibacillus laterosporus* strain
HS-A465) 基因序列相似度为 100%,条带 f 与植物乳
杆菌 (*Lactobacillus plantarum* strain LY4) 基因序列相
似度为 99%,在新鲜蔬菜与盐渍青菜中均存在。

条带 c、d、e、f 在发酵成熟的青菜(青菜在盐渍 6
个月后即成熟)中具有绝对优势,而条带 a、b 则呈现
先增加后减少的趋势,这是由于盐渍青菜成熟后酸度
降低至 pH 4.0 以下,抑制其生长所致。依据序列鉴
定结果进一步推断条带 a、b 为耐盐微生物,但不耐
酸,而 c、d、e、f 则能够耐受低 pH 的酸性环境,在腌
渍发酵过程中强化这些条带所代表的细菌可促进酸菜
的成熟,缩短成熟期,抑制有害微生物的生长。

综合 DGGE 图谱分析与优势条带鉴定结果表

明,植物乳杆菌、短芽孢杆菌、魏斯氏菌属的细菌是促进酸菜发酵成熟的主要细菌,高盐的酸性环境有效地抑制了其他微生物的生长繁殖,是腌渍蔬菜形成风味并得以保存的基本要素之一。

2.3 产酸细菌分离鉴定

依据实验方法 1.4.4 从盐渍青菜中分离得到 23 株产酸性能优良、革兰氏染色阳性的乳产酸细菌,采用实验方法 1.4.5 对菌株进行鉴定,结果如表 2 所示。

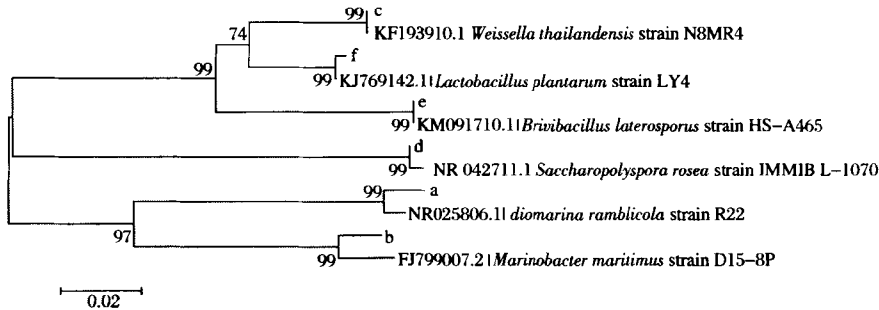


图 2 盐渍青菜细菌群落 DGGE 优势条带序列与相似序列系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of chief bacteria communities DGGE bands of pickled *Brassica juncea* and similar sequences

表 2 产酸细菌 16S rDNA 序列比对结果

Table 2 Identification results of acid-producing bacteria by 16S rDNA sequence analysis

菌株编号	相似菌种名	登录号	相似度/%
LAB-QC-1-1	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	EU878171.1	99
LAB-QC-1-2	<i>Bacillus subtilis</i>	KF818630.1	99
LAB-QC-1-3	<i>Bacillus subtilis</i>	JN205340.1	99
LAB-QC-1-4	<i>Bacillus subtilis</i>	KJ139434.1	100
LAB-QC-1-5	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	KF048926.1	99
LAB-QC-2-1	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	KF048923.1	99
LAB-QC-2-2	<i>Bacillus subtilis</i>	KF818630.1	99
LAB-QC-2-3	<i>Staphylococcus hominis</i>	JQ795892.1	99
LAB-QC-2-4	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	KF048922.1	99
LAB-QC-2-5	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	EU878171.1	99
LAB-QC-2-6	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	KF048922.1	99
LAB-QC-3-1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	JX964996.1	99
LAB-QC-3-2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	JX964996.1	99
LAB-QC-4-1	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	KF048922.1	99
LAB-QC-8-1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	AB761309	99
LAB-QC-8-2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	EU419598.1	99
LAB-QC-8-3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	AB761309	99
LAB-QC-9-1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i>	JN700074.1	99
LAB-QC-9-2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	GU125613.1	99
LAB-QC-9-3	<i>Bacillus subtilis</i>	KF535118.1	99
LAB-QC-9-4	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	HM130536.1	99
LAB-QC-CZL-3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	HQ286594.1	99
LAB-QC-CZL-4	<i>Lactobacillus brevis</i>	HM162416.1	99

由表 2 可知,8 株菌与戊糖片球菌 (*Pediococcus pentosaceus*) 序列相似度达 99%,5 株菌与枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的相似度达 99% 以上,5 株菌与植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 序列相似度达 99%,2 株菌与解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amylolique-*

faciens) 序列相似度达 99%,1 株菌与溶血性葡萄球菌 (*Staphylococcus hominis*) 序列相似度达 99%,1 株菌与解淀粉芽孢杆菌植物亚种 (*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*) 序列相似度达 99%,1 株菌与短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*) 序列相似度达 99%。Bosshard 等^[17]认为相似率 >99% 的定义为种,95%~99% 的可定义为属;Fournier 等^[18]则认为种属相似率应分别大于 99.8%、98.1%。仅仅依靠 16S rDNA 序列相似度这一个指标进行种水平的鉴定应当十分慎重^[19]。为了进一步研究应用这些产酸细菌,在后续实验中需要开展其生理生化代谢特性、发酵特性的研究。

基于序列测序结果对 23 株产酸细菌作系统发育树,结果如图 2 所示。

由图 2 可知,依据 16S rDNA 亲缘性可将分离纯化得到的产酸细菌分为 2 个大的分支,1 个大分支由戊糖片球菌小分支、短乳杆菌小分支与植物乳杆菌组成,另一个大分支由葡萄球菌属与芽孢杆菌属组成。分析结果表明,盐渍青菜的产酸细菌呈现生物多样性。比较产酸细菌鉴定结果与 DGGE 分析结果可发现,大多数 DGGE 条带所代表的微生物未能分离培养获得,这是由于这些微生物对培养条件的严格要求所致。在分离到的产酸细菌中的植物乳杆菌在 DGGE 分析中也被鉴定到,并在发酵过程中具有明显优势。而分离培养到的一些产酸细菌不是 DGGE 优势条带,这是由于这些微生物在样品含量较少。

卢沿钢^[20]研究表明,植物乳杆菌、短乳杆菌、肠膜明串珠菌按 2:1:1 组合制作发酵剂腌渍胭脂萝卜可以较好保存泡菜营养物质,抑制有害微生物的生

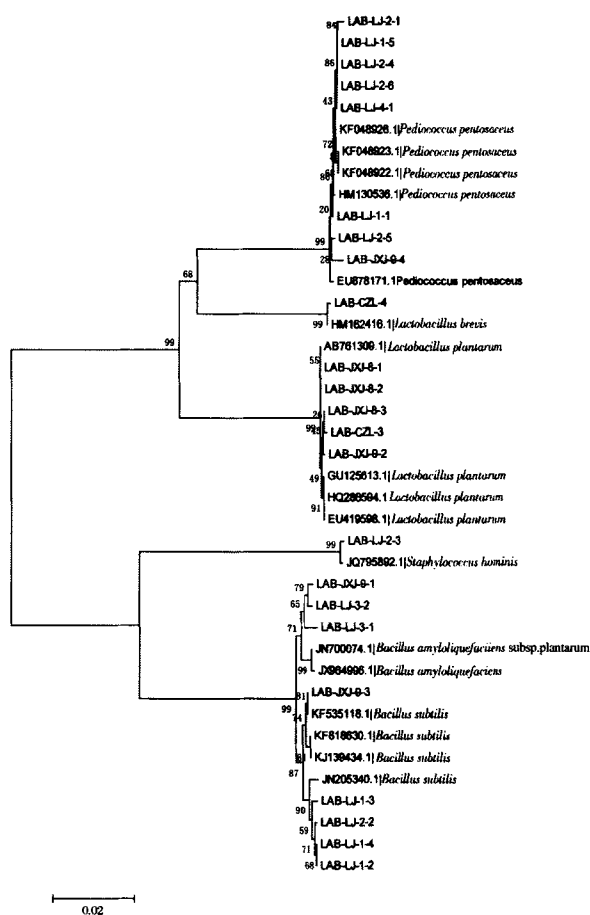


图2 23株盐渍青菜产酸细菌基于16S rDNA
基因序列的系统发育分析

Fig 2 phylogenetic analysis of 23 acid-producing bacteria
strains from pickled vegetables by 16S rDNA sequences

长,提高泡菜的安全性及保健功能。张良等研究表明^[21],四川泡菜茄果类泡菜发酵剂的菌种 *Bacillus coagulans*、*Leuconostoc mesenteroides* XF03、*Lactobacillus plantarum* XF02、*Lactobacillus brevis* XF04 和 *Pediococcus acidilactici* XF02 按 2:5:5:5:5 配比,块茎、叶菜类泡菜专用乳酸菌制剂的菌种 *Leuconostoc mesenteroides* XF03、*Lactobacillus plantarum* XF02、*Lactobacillus brevis* XF04 和 *Pediococcus acidilactici* XF02 按 1:1:1:1 混合,可再现传统泡菜的风味。本次研究从盐渍青菜中分离获得了大量的产酸细菌,为强化优势有益菌、改进盐渍工艺、缩短成熟期提供了菌种资源。

3 结论

通过采用 DGGE 技术对青菜及不同盐渍时间的青菜进行菌群结构分析表明,乳杆菌属、魏斯氏菌属、糖多孢菌属、短芽孢杆菌属的细菌是盐渍青菜的优势

菌群,在发酵过程中逐步增加,海源菌属与海洋杆菌属细菌在腌渍初期有明显的增殖,后期逐渐衰亡。依据盐渍菜的 pH 变化推断海源菌属与海洋杆菌属细菌能耐高温渗透压,但不能耐受低 pH,可通过调节 pH 值抑制其生长。通过分离培养技术从盐渍青菜中共分离获得 23 株产酸细菌,通过 16S rDNA 初步确定 8 株为戊糖乳杆菌,枯草芽孢杆菌与植物乳杆菌各 5 株,解淀粉芽孢杆菌 2 株,溶血性葡萄球菌、解淀粉芽孢杆菌植物亚种、短乳杆菌各 1 株。将 DGGE 技术与依赖培养的细菌分离纯化相结合,能够较好反应盐渍青菜的菌群结构变化,分离获得的产酸菌株需进一步开展生理生化与代谢特性研究。

致谢:本论文中的样品采集得到了四川省吉香居食品有限公司的大力支持,研究工作开展过程中得到了固态发酵资源利用四川省重点实验室、宜宾学院实验与教学资源管理中心、四川东坡中国泡菜产业技术研究院的大力支持,在此表示衷心感谢。

参 考 文 献

- [1] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K-H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. Microbiological Reviews, 1995, 59 (1): 143 - 169.
- [2] Ranjard I, Ploy F, Nazaret S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent, molecular techniques: application to soil environment [J]. Research in Microbiology, 2000, 151 (3): 167 - 177.
- [3] Muyzer G, Wall E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA [J]. Applied Environmental Microbiology, 1993, 59 (3): 695 - 700.
- [4] Ampe F, Omar N B, Moizan C, et al. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65 (12): 5 464 - 5 473.
- [5] Lee J S, Heo G Y, Lee J W. Analysis of kimchi microflora using denaturing gradient gel electrophoresis. [J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 102 (2): 143 - 150.
- [6] Chang H W, Kim K H, Nam Y D. Analysis of yeast and archaeal population dynamics in kimchi using denaturing gradient gel electrophoresis. [J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 126 (1): 159 - 166.
- [7] Tu R, Wu H, Lock Y, et al. Evaluation of microbial dynamics during the ripening of a traditional Taiwanese naturally

- fermented ham. [J]. Food Microbiology, 2010, 27(4): 460-467.
- [8] Leite A, Mayo B, Rachid C, et al. Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. [J]. Food Microbiology, 2012, 31(2): 215-221.
- [9] González-Arenzana L, López R, Santamaría P, et al. Dynamics of lactic acid bacteria populations in Rioja wines by PCR-DGGE, comparison with culture-dependent methods. [J]. Appl Microbial Biotechnol, 2013, 97(15): 6 931-6 941.
- [10] Andorrà I, Landi S, Mas A, et al. Effect of fermentation temperature on microbial population evolution using culture-independent and dependent techniques. [J]. Food Research International, 2010, 43(3): 773-779.
- [11] Delgado S, Rachid C, Fernández E, et al. Diversity of thermophilic bacteria in raw, pasteurized and selectively-cultured milk, as assessed by culturing, PCR-DGGE and pyrosequencing [J] Food Microbiology, 2013, 36(1): 103-111.
- [12] 高秀芝, 王小芬, 刘慧, 等. PCR-DGGE 分析天源酱园豆酱发酵过程中微生物多样性 [J]. 食品科学, 2011, 32(1): 112-114.
- [13] 蓝蔚青, 谢晶. PCR-DGGE 指纹技术研究复合保鲜剂对冷藏带鱼贮藏期间微生物变化的影响. [J] 食品科学, 2012, 33(14): 255-260.
- [14] 张中华, 管政兵, 梁小刚, 等. PCR-DGGE 分析绍兴黄酒麦曲中细菌群落方法的建立. [J] 食品工业科技, 2012, 33(4): 206-213.
- [15] 张先琴, 张小平, 敖晓琳, 等. PCR-DGGE 分析四川地区家庭制作泡菜中微生物多样性. [J] 食品科学, 2014, 34(12): 129-134.
- [16] Lopez I, Ruiz-Larrea F, Cocolin L, et al. Design and evaluation of PCR primers for analysis of bacterial populations in wine by denaturing gradient gel electrophoresis. [J] Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(11): 6 801-6 807.
- [17] Bosshard P, Abels S, Zbinden R, et al. Ribosomal DNA sequencing for identification of aerobic gram-positive rods in the clinical laboratory (an 18-month evaluation) [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(9): 4 134-4 140.
- [18] Fournier P E, Dumler J S, Greub G, et al. Gene sequence-based criteria for identification of new rickettsia isolates and description of *Rickettsia heilonjiangensis* sp. nov [J]. J Clin. Microbiol, 2003, 41(12): 5 456-5 465.
- [19] 刘朝军, 沈定霞. 16S rDNA 序列测定在细菌鉴定中的应用 [J]. 军医进修学院学报, 2011, 32(7): 774-777
- [20] 卢沿钢. 胭脂萝卜纯种发酵泡菜及其保藏方式的研究 [D]. 重庆: 西南农业大学, 2013.
- [21] 张良, 向文良, 曾泽生, 等. 四川泡菜乳酸发酵菌剂的研究. [J] 食品科学, 2013, 34(19): 200-206

DGGE analysis of bacteria community, isolation and identification of acid-producing bacteria in pickled *Brassica juncea*

YIN Li-guo^{1,2,3}, MA Shuang-yan¹, LI Hua-lan⁶, YANG Jing², LIANG Hui-peng², ZHANG Qi-sheng^{2,4,5}, CHEN Gong^{4,5}, WU Zheng-yun², ZHANG Wen-xue²

1(College of Life Science and Food Engineering, Yibin University, Yibin 644007, China)

2(College of Light Industry, Textile & Food, Sichuan University, Chengdu, 611130, China)

3(Soild-state Fermentation Resource Utilization Key Laboratory of Sichuan Province, Yibin University, Yibin, 644007, China;)

4(Sichuan Academy of Food and Fermentation Industries, Chengdu 611130, China)

5(Sichuan Dongpo Chinese Paocai Industrial Technology Research Institute, Meishan 620000, China)

6(Laboratory and Teaching Resources Management Center, Yibin University, Yibin, 644007, China.)

ABSTRACT The bacterial communities of different pickled *Brassica juncea* were analyzed by denatured gradient gel electrophoresis (DGGE). According to the result of sequences analysis, the dominant bacteria of pickled *Brassica juncea* were belong to *Lactobacillus*, *Weissella*, *Saccharopolyspora*, and *Brevibacillus*. The bacteria of *Idiomarina* and *Marinobacter* were abundant in the initial stage of pickling and then decreased significantly in the later stage. The bacteria of *Lactobacillus* were rich in the *Brassica juncea* pickled for 14 and 26 months, while they were few in the samples pickled for 2 months. 23 acid-producing bacteria were isolated from pickled *Brassica juncea* by the culture-dependent method, including 8 *Pediococcus pentosaceus* strains, 5 *Bacillus subtilis* strains, 5 *Lactobacillus plantarum* strains, 2 *Bacillus amyloliquefaciens* strains, 1 *Staphylococcus hominis* strain, 1 *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* strain, and 1 *Lactobacillus brevis* strain. Due to its easy operation and its potential to reveal the change of bacteria community, the advantage of DGGE was apparent in the study of bacteria community of pickled *Brassica juncea*. The acid-producing bacteria could be used as good resource to improve technology of salted vegetable.

Key words denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE); pickled *Brassica juncea*; acid-producing bacteria; bacteria community