

冬瓜生腌过程细菌种群变化及其品质相关性

沈锡权^{1,2}, 赵永威^{1,2}, 吴祖芳^{*1,2}, 翁佩芳^{1,2}, 卓鸿雁^{1,2}

(1. 宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211; 2. 宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 采用 16S rDNA 基因克隆文库的方法, 对生腌冬瓜腌制体系的微生物多样性、优势种群及其相关品质变化过程进行分析。结果表明: 冬瓜生腌开始时优势细菌为肠杆菌属、乳球菌属和魏斯氏菌属; 早期阶段优势菌为戊糖片球菌; 腌制 30 d 时优势菌属变成了肠杆菌属和片球菌属; 在腌制中后期微生物组成基本稳定, 其中片球菌属、魏斯氏菌属和枝芽孢杆菌属为优势菌属。冬瓜生腌制过程中 pH 值和亚硝酸盐质量分数下降, 最低值分别为 3.7 和 0.5 mg/kg, 盐度稳定在 7.0 左右, 细菌总数和乳酸菌总数由下降至最后稳定的过程, 腌制中后期乳酸菌总数稳定在 1.0×10^7 cfu/mL 左右。冬瓜生腌过程检测到的乳球菌、片球菌和枝芽孢杆菌等菌属对维持腌冬瓜质量具有重要意义。

关键词: 冬瓜生腌; 16S rDNA 克隆文库; 优势种群; 品质

中图分类号: TQ 920.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2012)04-0411-06

Bacteria Community Changes and Its Quality Related in Raw Process of Pickled Wax Gourd

SHEN Xi-quan^{1,2}, ZHAO Yong-wei^{1,2}, WU Zu-fang^{*1,2},
WENG Pei-fang^{1,2}, ZHUO Hong-yan^{1,2}

(1. School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo 315211, China; 2. Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: The microbial community diversity, predominant species and its related characters of the product were investigated during the fermentation process of pickled wax gourd using the 16S rDNA clone library. The results showed that in the pickling system *Enterobacter*, *Lactococcus* and *Weissella* are the predominant microbial community at earlier phase. After 15 days of fermentation, the dominant population has changed to be *Pediococcus pentosaceus*, on day 30 *Enterobacter* and *Pediococcus* become to be the predominant species. In the later stage of pickling, the community system is stable, and *Pediococcus*, *Weissella* and *Virgibacillus* are the major microbial species. At the same time, the pH value and nitrite concentration of pickled wax gourd samples had been decreasing, its minimum values reached 3.7 and 0.5 mg/kg, respectively. The salinity value was finally stable in 7.0%. The total population of bacteria and lactic acid bacteria (LAB) changed from the high level to stable, the population of LAB was

收稿日期: 2012-01-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(31171735, 31071582), 宁波市农业择优委托项目(2010C10017)

作者简介: 沈锡权(1980-), 男, 浙江奉化人, 水产养殖和食品生物技术博士研究生。E-mail: shenxiqun@nbu.edu.cn

通信作者: 吴祖芳(1963-), 男, 浙江奉化人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品生物技术方面的研究。

E-mail: wuzufang06@yahoo.com.cn

1.0×10^7 cfu/mL at the later phase of pickled. Some species including *Lactococcus*, *Pediococcus* and *Virgibacillus* detected in the pickled wax gourd are very significant microorganisms in keeping the quality of the product. These experimental results can also provide the critical basis for the microbial ecosystem study and quality control of pickled wax gourd processing.

Key words: raw pickled wax gourd, 16S rDNA colone library, dominant species, character

腌制冬瓜是浙东地区最具传统特色的腌制蔬菜之一,具有悠久的历史,是著名的宁波“三臭”食品(臭冬瓜、臭苋菜梗和臭芋茢蕪)之一。臭冬瓜具有臭味,但入口易化、口味独特,长期以来是宁波、绍兴一带居民喜爱的传统佐餐佳品。自20世纪90年代中期“三臭”制作进入产业化阶段以来,对产品质量的控制还是通过生产经验来判断和控制,生产工艺以自然发酵腌制为主,特别是对生腌冬瓜的加工更易引起产品质量不稳定,对产品风味、营养产生本质等缺乏认识。由于受传统纯培养技术研究方法局限性和片面性的制约,对发酵过程中微生物种群结构变化情况以及功能微生物了解不清楚,这在很大程度上造成了改进生产工艺的盲目性,因此重新认识和改造传统腌制发酵食品成为了传统腌制食品产业的迫切需求。前期研究表明,蔬菜腌制加工中产品的风味和营养等品质与微生物存在密切关系。Chen等^[1]对台湾芥菜发酵乳酸菌群的变化进行了分析,揭示了乳酸菌在腌制发酵过程中的作用;而刘亚等^[2]通过测定泡菜制作过程中亚硝酸盐和微生物的变化,阐述了重要微生物对腌制品食用安全的影响。分子生物学技术的日益发展使得微生物多样性分析的精度和广度不断提高,其在微生态研究中已体现出重要的应用价值。乌日娜等^[3]采用16SrDNA测序和同源性分析方法,对酸马奶分析测定得到了2菌株,经鉴定分别为*L. casei*和*L. gallinatum*,其同源性高于98%;Lee等^[4]运用DGGE技术对朝鲜泡菜发酵过程跟踪取样,发现存在的微生物群落组成主要有*Weissella confusa*、*Leuconostoc citreous*、*Lactobacillus sakei*和*Lactobacillus curvatus*等,并发现发酵初期和末期其微生物群落结构发生了很大的改变,如一些真菌条带会随着发酵的进行逐渐减弱并最终消失;而许爱清等^[5]运用PCR-DGGE技术检测发酵食品和饲料中真菌种群。袁晓阳等^[6]运用微生物分离培养法对自然发酵臭冬瓜进行菌种分离鉴定,得到了短小芽孢杆菌、极小棒杆菌、酵母菌和植物乳杆菌

等6株典型菌株;Lan等^[7]在冬瓜腌制过程中分离出优势菌,并鉴定为魏斯氏菌。但传统的分离培养只能培养出有限的微生物,具有一定的片面性。目前针对地方特色传统腌制食品中具有重要作用微生物的生态组成及功能定位,特定微生物消长规律及与此相关的理化品质变化机制等研究报道极少,对臭冬瓜腌制微生物机理不甚明确。本文采用16S rDNA克隆文库法,研究在冬瓜生腌过程中微生物的多样性及其动态变化,并进一步分析相关的理化及品质指标。通过分子生态检测方法准确表达传统腌制蔬菜的微生物多样性信息及其与腌制蔬菜质量品质的相互关系,研究结果可为研究生腌冬瓜品质与风味的形成机理提供微生物学基础,并进一步为冬瓜生腌工艺优化提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料 冬瓜:购于宁波市区农贸市场;Fast DNA SPIN Kit试剂盒,扩增用PCR体系($10 \times$ Buffer、 $MgCl_2$ 、dNTPs、Ex-Taq polymerase)、载体pMD18-T、*E. coli* DH5 α 感受态细胞和DNA Marker:购于大连宝生物工程有限公司;DNA回收试剂盒、引物:由生工生物工程(上海)有限公司提供。

1.1.2 仪器 pH计、可见分光光度计、梯度PCR仪、Alphalmger 2200凝胶成像系统等。

1.1.3 培养基 MRS固体培养基,PCA固体培养基,LB培养基,选择性LB培养基(Amp⁺)按文献^[8]配制。

1.2 实验方法

1.2.1 冬瓜的腌制 冬瓜的腌制按传统生腌工艺进行。将新鲜的冬瓜清洗干净后,称重、去子瓢。然后切成边长8 cm左右的方块,按照每12.5 kg冬瓜加0.2 kg食盐的比例加入食盐,预脱水1 d。加盐的时候要将冬瓜块除皮以外的5个面都抹上食盐,以面对面、背对背的方式整齐的放入塑料桶中。将

预脱水以后的冬瓜捞出,然后按照 12.5 kg(洗净后新鲜冬瓜的重量)冬瓜加 0.6 kg 食盐的比例加入食盐。加盐的方式与预脱水的时候一致,然后以面对面对背的方式放入坛中。最后又塑料纸封口,放于阴凉处发酵 90 d 即可。

1.2.2 样品总 DNA 提取纯化 采用 Fast DNA SPIN Kit 试剂盒,按试剂盒给定步骤,取 0、15、30、60、90 d 的腌制冬瓜卤水样品 50 mL 进行总 DNA 的提取。

1.2.3 PCR 扩增 PCR 扩增所用的反应体系为:10×Buffer 5 μ L、25 mmol/L 的 $MgCl_2$ 5 μ L、2.5 mmol/L 的 dNTP 8 μ L、10 μ mol/L 的上下游引物各 1.0 μ L,具体为 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R(5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3')、模板 DNA 1.0 μ L、5 U/ μ L 的 Ex-TaqDNA 聚合酶 0.4 μ L,用无菌 ddH₂O 补足 50 μ L 体系。PCR 反应的循环条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,30 个循环(94 $^{\circ}$ C 变性 50 s,52 $^{\circ}$ C 退火 50 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 30 s),72 $^{\circ}$ C 最后延伸 10 min;PCR 产物采用纯化试剂盒切胶纯化。

1.2.4 16S rDNA 克隆文库的构建 将 PCR 产物纯化后与 pMD18-T 载体在 4 $^{\circ}$ C 过夜连接,转化感受态细胞 *E. coli* DH5 α 。用引物 M13F 和 M13R 随机检测出 40 个阳性克隆进行测序。

1.2.5 基因序列的鉴别 测序结果采用 DAMBE、DNASTAR、MEGA4.1 等软件进行编辑分析,并把编辑好的序列在 GenBank 数据库中进行 BLAST 同源性比对,分析出克隆所属物种的系统位置和与之最近似的种类。

1.2.6 分析方法 盐度、pH 值和亚硝酸盐含量的测定:取冬瓜腌制过程中的腌制卤水,按文献[9—10]进行测定。细菌总数以及乳酸菌总数变化情况的测定:取冬瓜腌制过程中的腌制卤水,利用稀释倒平板法测定卤水中细菌总数^[11]以及乳酸菌总数^[12]的变化情况。

2 结果与分析

2.1 冬瓜生腌体系腌制过程中细菌 16S rDNA 克隆文库的构建

将来自冬瓜腌制过程中 5 个时期的阳性克隆子的测序结果在 GenBank 数据库中进行 Blast 比对,检测出腌制腌制过程中共涉及到 20 个不同的菌属,其中以肠杆菌属、乳球菌属、片球菌属和枝芽孢杆菌属的变化最为明显。5 个时期的克隆子与 GenBank 数据库中已知细菌的 16S rDNA 序列相似性均在 90% 以上;冬瓜腌制体系中不同腌制时期样品的细菌群落测定结果见表 1。

表 1 16S rDNA 克隆文库法对腌制冬瓜样品的细菌群落组成分析结果

Tab. 1 Analytical results of bacterial community composition for fermented wax gourd based on 16S rDNA clone library

菌属名/菌名	不同时期克隆子数量				
	0 d	15 d	30 d	60 d	90 d
肠杆菌属	7	1	7		
乳球菌属(乳酸乳球菌)	16(16)				
片球菌属(戊糖片球菌)		31(31)	24(24)	3(3)	6(6)
枝芽孢杆菌属				25	24
魏斯氏菌属	7	1	2	5	6
泛菌属	3				
葡萄球菌属	1	2	2	3	
乳杆菌属		1	1		
克雷伯菌属	1	1			
克吕沃尔氏菌属	2				
果胶杆菌属	1				

续表 1

菌属名/菌名	不同时期克隆子数量				
	0 d	15 d	30 d	60 d	90 d
假单胞菌属	1				
勒克氏菌属		1	1		
不动杆菌属(醋酸钙不动杆菌)		1(1)			
芽孢杆菌属		1	2	3	4
预研菌属			1		
<i>Sediminibacillus</i>				1	
变形菌属	1				

由表 1 可知,在冬瓜生腌的第 0 天(即腌制开始时),腌制体系中的优势细菌为 3 个不同的菌属,即肠杆菌属、乳球菌属和魏斯氏菌属,其中乳球菌属占克隆子总数 40%,肠杆菌属占 17.5%,魏斯氏菌属 17.5%,其他菌属细菌占 25%;在第 15 天,优势菌变为戊糖片球菌,占 77.5%,其他菌属的细菌占 22.5%;到第 30 天时,片球菌属和肠杆菌属成为优势菌属,比例为 60%和 17.5%。其中片球菌属中绝大多数为戊糖片球菌;在第 60 天和 90 天时,腌制体系基本稳定,菌群结构相似,优势菌属为片球菌属、魏斯氏菌属和枝芽孢杆菌属,在第 60 和 90 天时,枝芽孢杆菌分别占 62.5%和 60%,魏斯氏菌为 12.5%和 15%,差异不显著,片球菌则分别为 7.5%和 15%。

2.2 冬瓜生腌体系腌制过程中的盐度、pH 值和亚硝酸盐质量分数的变化

对冬瓜腌制过程中不同时期样品的盐度、pH 值和亚硝酸盐质量分数进行测定,结果见图 1、2。

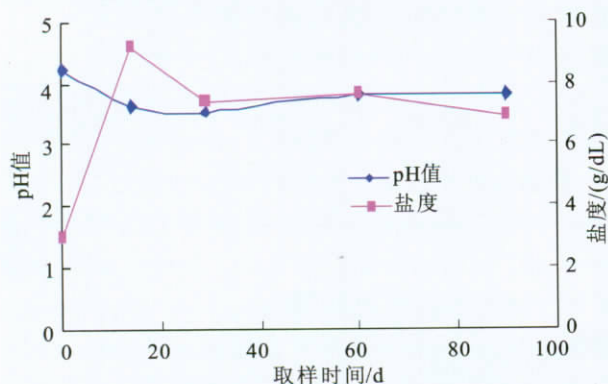


图 1 冬瓜生腌过程中 pH 值和盐度变化
Fig. 1 Changes of pH and salt concentration during the fermentation of wax gourd

由图 1 可知,在冬瓜生腌的前期,pH 值一直在下降,在第 30 天时达到 3.5 左右,后期略有上升并

最终稳定在 3.7 左右。而盐度在第 0 天的时候,为 2.99。复腌时加入了大量的盐,所以盐度迅速上升,在第 15 天时达到了 9.2 左右。然后逐渐下降,最终稳定在 7.0 左右。

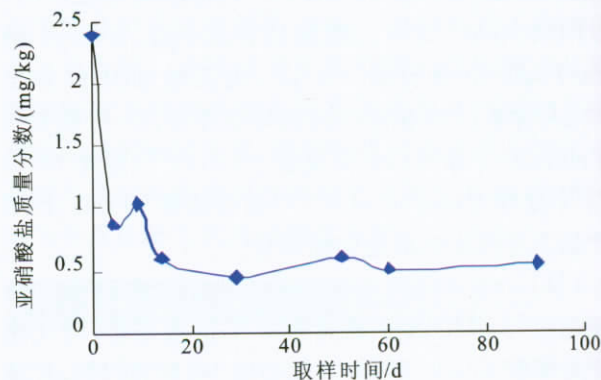


图 2 冬瓜生腌过程亚硝酸盐含量变化
Fig. 2 Changes of nitrite concentration during the fermentation of wax gourd

由图 2 可知,在冬瓜生腌过程中,亚硝酸盐的质量分数一直都在国标^[13]规定的范围之内,而且从腌制保藏开始起迅速下降,从第 30 天左右开始稳定在 0.5 mg/kg 左右。

2.3 冬瓜腌制体系腌制过程中细菌总数以及乳酸菌总数变化情况

对冬瓜腌制过程中不同时期样品的细菌总数和乳酸菌总数进行测定,结果见表 2。

由表 2 可知,在冬瓜预脱水时(即腌制的第 0 天)细菌总数在 2.9×10^8 cfu/mL 左右,乳酸菌总数在 1.2×10^8 cfu/mL 左右。在复腌后,细菌总数和乳酸菌总数均经过了一个先迅速下降然后迅速上升再迅速下降的过程,从腌制的第 60 天开始,细菌总数和乳酸菌总数基本稳定在 1×10^7 cfu/mL 左右。

表2 冬瓜腌制过程中细菌总数以及乳酸菌总数变化
Tab.2 Change of total amounts of bacteria and lactic acid bacteria during the fermentation of wax gourd

取样时间/d	细菌总数/ (cfu/mL)	乳酸菌总数/ (cfu/mL)
0	2.87×10^8	1.22×10^8
15	8.43×10^7	4.5×10^7
30	2.84×10^8	2.64×10^8
60	1.4×10^7	1.1×10^7
90	1.52×10^7	1.26×10^7

3 讨论

对冬瓜腌制卤水通过试剂盒进行DNA提取,扩增所获得的PCR产物,是冬瓜腌制体系中各个时期各种微生物的16S rDNA的混合物,通过测序就能获知该腌制时期卤水中的微生物种群结构。由细菌克隆文库分析结果显示,在冬瓜生腌开始即第0天时,腌制体系中优势细菌为肠杆菌属、乳球菌属和魏斯氏菌属。由于这个时候样品经历预脱水,加入的盐比较少,因此在这个时期检测出的微生物种类比较多,共有10个不同属的细菌,其中乳酸乳球菌比例最高(40%),是一种革兰氏阳性兼性厌氧菌,但其不耐高盐,因此在复腌以后就未能再检测到此菌。在腌制早期阶段(第15和20天),腌制体系中戊糖片球菌占绝对优势,由于在复腌时补加了较多量的食盐,一些耐盐的微生物逐渐占据优势,戊糖片球菌是机体内一类重要的益生菌,因其益生功能和安全性,在食品行业和医疗保健领域有着广泛的应用。如张凤宽等^[14]研究戊糖片球菌对香肠发酵过程中活菌总数、乳酸菌总数有显著的增加作用,均能有效抑制香肠发酵过程中有害菌的生长,迅速降低香肠的pH和AW值,显著降低香肠中的亚硝酸盐残留量,更好的保障发酵香肠的安全性,在冬瓜发酵的前期pH值迅速下降,可能正是戊糖片球菌等乳酸菌发酵产酸的结果。在冬瓜腌制的中后期(第60天和第90天),腌制体系菌群结构基本稳定,优势菌属为片球菌属、魏斯氏菌属和枝芽孢杆菌属,其中枝芽孢杆菌相对来说占更大优势。此结果与文献[6-7]运用微生物分离培养方法对自然发酵臭冬瓜进行菌种分离鉴定得到的结果有一定的差别,其分离出魏斯氏菌、短小芽孢杆菌、极小棒杆菌和植物乳杆菌。枝芽孢杆菌是一种中度

嗜盐菌,嗜盐菌具有极为特殊的生理结构和代谢机制,并且还产生了许多具有特殊功能的天然活性物质^[15],乳酸菌为益生菌,部分乳酸菌还具有降解胆固醇的作用^[16]。

由pH值、盐度和亚硝酸盐质量分数测定结果显示,在冬瓜生腌前期,pH值一直在下降,在第30天时达到最低,后期略有上升并最终稳定,可能是冬瓜经预腌后一些营养物质的逐步溶出及菌群的变化,发酵初期乳酸菌大量繁殖产酸,使得腌制体系的pH值迅速下降,但下降到一定程度后,乳酸菌生长繁殖达到平衡,最终pH值稳定。而盐度在刚开始时较低,主要是因为预脱水时加的盐比较少,复腌时加入了较多数量的盐,盐分进入冬瓜中,冬瓜逐渐失水,使腌制环境盐度逐渐增加,当冬瓜和卤水中的盐浓度达到平衡后,盐度最终稳定。在冬瓜生腌的过程中,亚硝酸盐的含量一直都在较低的水平。腌制开始时由于一些乳酸菌种属的迅速生长,使pH值下降,在复腌时又加入了较多的盐,较好地抑制了硝酸盐还原菌等的生长,如不耐盐的肠杆菌生长较少;另外,一些种类乳酸菌及低pH值环境对亚硝酸盐的降解也有重要作用^[17]。所有这些因素,使亚硝酸盐的质量分数一直在下降,最后稳定在0.5 mg/kg左右。

细菌总数和乳酸菌总数的测定结果显示,在腌制开始时细菌总数和乳酸菌总数较多,可能是此时腌制体系盐度较低,适合细菌生长的种类较多,当复腌时由于盐的添加,此时细菌和乳酸菌总数均迅速下降,随着腌制的进行,耐盐微生物迅速生长繁殖,使得细菌总数和乳酸菌总数迅速上升;但在这个过程中,戊糖片球菌发酵产酸,大多数微生物死亡或生长受到限制,细菌和乳酸菌总数又快速下降,在腌制的后期细菌和乳酸菌总数基本达到稳定的状态。

4 结语

1) 在冬瓜生腌的初期,腌制体系中的优势细菌为肠杆菌属、乳球菌属和魏斯氏菌属;腌制早期优势菌为戊糖片球菌,到中期时转变为肠杆菌属和片球菌属;到后期腌制体系基本稳定,优势菌属为枝芽孢杆菌属、魏斯氏菌属和片球菌属。

2) 在冬瓜生腌的前期,pH值一直在下降,后期

略有上升并最终稳定在 3.7 左右;而盐度的变化则由低到高然后逐渐下降,最终稳定在 7.0 左右;亚硝酸盐的质量分数从腌制的最初开始,一直处于下降水平,最后稳定在 0.5 mg/kg 左右。

3) 在冬瓜腌制过程中细菌总数和乳酸菌总数均经过了一个先迅速下降然后上升,最后再迅速下降的过程,从腌制的第 60 天开始细菌总数和乳酸菌总数基本稳定在 1.0×10^7 cfu/mL 左右。

参考文献(References):

- [1] Chen Y S, Yanagida F, Hsu J S. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from suan-tsai (fermented mustard), a traditional fermented food in Taiwan[J]. **Journal of Applied Microbiology**, 2006, 101:11-25.
- [2] 刘亚,张鉴明. 泡菜制作过程中亚硝酸盐和微生物的变化[J]. 中国调味品, 2009, (3):99-101.
LIU Ya, ZHANG Jian-ming. Change of nitrite and microorganism during the pickles processing[J]. **China Condiment**, 2009, 34(3):99-101. (in Chinese)
- [3] 乌日娜,张和平,孟和毕力格. 酸马奶中乳杆菌 *Lb. casei*. Zhang 和 ZL12-1 的 16S rDNA 基因序列及聚类分析[J]. 中国乳品工业, 2005, 33(6):4-9.
WU Ri-na, ZHANG He-ping, Menghe Bilige. 16S rDNA sequence and cluster analysis of *Lb. casei*. Zhang and ZL12-1 isolated from Koumsis[J]. **Dairy Industry**, 2005, 33(6):4-9. (in Chinese)
- [4] Lee J S, Heo G Y, Lee J W, et al. Analysis of Kimchi microflora using denaturing gradient gel electrophoresis[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2005, 102: 143-150.
- [5] 许爱清,李宗军,王远亮,等. 应用 PCR-DGGE 技术检测发酵食品和饲料中真菌菌群[J]. 食品科学, 2010, 31(7):317-322.
XU Ai-qing, LI Zong-jun, WANG Yuan-liang, et al. A review of PCR-DGGE detection of fungal community in fermented food and feedstuff[J]. **Food Science**, 2010, 31(7):317-322. (in Chinese)
- [6] 袁晓阳,陆胜民,郁志芳. 自然发酵腌制冬瓜主要发酵菌种及风味物质鉴定[J]. 中国食品学报, 2009, 9(1):219-225.
YUAN Xiao-yang, LU Sheng-min, YU Zhi-fang. Identification of main fermented strains and flavor substances in naturally fermented wax gourd with strong odour[J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, 2009, 9(1):219-225. (in Chinese)
- [7] Lan Weitse, Chen Yisheng, Yanagida Fujitoshi. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from Yan-dong-gua (fermented wax gourd), a traditional fermented food in Taiwan[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2009, 108(6):484-487.
- [8] 翁佩芳,吴祖芳,龚业,等. SSCP 方法的条件优化与榨菜低盐腌制微生物多样性分析[J]. 食品与生物技术学报, 2011, 30(2):261-266.
WENG Pei-fang, WU Zu-fang, GONG Ye, et al. Optimization of SSCP condition and diversity of microbial community in pickled mustard tuber with low salinity[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2011, 30(2):261-266. (in Chinese)
- [9] 尹利端,韩北忠,黄晶晶,等. 萝卜泡菜发酵过程中食盐对微生物变化的影响[J]. 中国酿造, 2005, 114(3):19-21.
YIN Li-duan, HAN Bei-zhong, HUANG Jing-jing, et al. Effect of salt on microbial changes in pickled radish[J]. **China Brewing**, 2005, 114(3):19-21. (in Chinese)
- [10] GB 5009.33-2010, 食品中亚硝酸盐与硝酸盐含量的测定[S].
- [11] GB/T 4789.2-2010, 食品微生物学检验菌落总数测定[S].
- [12] GB 4789.35-2010, 食品微生物学检验乳酸菌总数检验[S].
- [13] GB 2762-2005, 食品中污染物限量[S].
- [14] 张凤宽,吕彩霞,刘晓强,等. 干酪乳杆菌和戊糖片球菌在发酵香肠中的作用研究[J]. 食品科学, 2008, 29(11):387-390.
ZHANG Feng-kuan, LU Cai-xia, LIU Xiao-qiang, et al. Study on effects of *Lactobacillus casei* and *Pediococcus pentosaceus* on fermented sausage[J]. **Food Science**, 2008, 29(11):387-390. (in Chinese)
- [15] 刘晶晶,陈全震,曾江宁,等. 海洋微生物活性物质的研究进展[J]. 海洋学研究, 2007, 25(1):52-65.
LIU Jing-jing, CHEN Quan-zhen, ZENG Jiang-ning, et al. Advances in the research of bioactive substances from marine microorganisms[J]. **Journal of Marine Science**, 2007, 25(1):52-65. (in Chinese)
- [16] 刘长健,姜波,安晓雯,等. 菠菜中降胆固醇乳酸菌的筛选及鉴定[J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29(6):940-944.
LIU Chang-jian, JIANG Bo, AN Xiao-wen, et al. Isolation and identification of cholesterol-lowering lactic acid bacteria from spinach[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2010, 29(6):940-944. (in Chinese)
- [17] 张庆芳,迟乃玉,郑燕. 乳酸菌降解亚硝酸盐机理的研究, 食品与发酵工业, 2002, 28(8):27-31.
ZHANG Qing-fang, CHI Nai-yu, ZHENG Yan. The study on mechanism of nitrite degradation by lactic acid bacteria[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2002, 28(8):27-31. (in Chinese)