

新疆特色果蔬中乳酸菌分离鉴定及其抑菌活性

孙海龙¹, 李佳益¹, 张敏¹, 曾傲琼², 倪永清^{*1}

(1. 石河子大学 食品学院, 新疆 石河子 832000; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 利用 MRS, M17 等 4 种培养基对采自新疆不同地区的 8 种水果中的乳酸菌进行分离鉴定, 根据 16S rRNA 基因序列确定菌株的系统进化关系, 并利用牛津杯法筛选具有抑菌活性的乳酸菌。共分离疑似乳酸菌 90 株, rep-PCR 指纹图谱分型选出 15 株代表菌株, 经 16S rRNA 基因序列分析, 它们分别隶属于乳杆菌属(*Lactobacillus*) 8 株、明串珠菌属(*Leuconostoc*) 6 株、乳球菌属(*Lactococcus*) 1 株, 共 3 个属, 8 个种。利用牛津杯法筛选出 8 株对枯草芽孢杆菌、单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌具有明显抑制作用的乳酸菌, 为乳酸菌作为生物防腐剂应用到食品工业中奠定基础。

关键词: 乳酸菌; 16S rRNA; 系统发育; 抑菌活性

中图分类号: TS 201.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2018)11-1201-06

Identification and Antibacterial Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Fruits and Vegetables Collected from Different Areas In XinJiang

SUN Hailong¹, LI Jiayi¹, ZHANG Min¹, ZENG Aoqiong², NI Yongqing^{*1}

(1. Food College, Shihezi University, Shihezi 832000, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The isolation and identification of lactic acid bacteria from 8 kinds of fruits collected from different regions in XinJiang were carried out by using MRS, M17 and other two different culture medium. The phylogenetic relationship was identified based on analysis of the 16s rRNA gene sequences; and the bacteriocin-producing lactic acid bacteria strains were screened by using the Oxford cup method. A total of 90 lactic acid bacteria strains were isolated from all samples, and 15 representative strains were obtained based on the rep-PCR fingerprint classification. According to the 16s rRNA gene sequence analysis, 15 representative strains mainly belong to genus of *Lactobacillus* (8 strains), *Leuconostoc* (6 strains), *Lactococcus* (1 strain) respectively. A total of 8 lactic acid bacteria strains can inhibit the growth of *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Listeria monocytogenes*, were screened out by using the Oxford cup method, and they have great potential application for their possible use as a natural biopreservatives in the food industry.

Keywords: lactic acid bacteria, 16S rRNA, phylogenetic analysis, antibacterial activity

收稿日期: 2016-02-20

基金项目: 新疆兵团现代农业科技攻关与成果转化项目(2015AC003)。

* 通信作者: 倪永清(1969—), 男, 甘肃武威人, 工学博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事食品微生物及生物技术方面的研究。

E-mail: niyqlzu@sina.com

引用本文: 孙海龙, 李佳益, 张敏, 等. 新疆特色果蔬中乳酸菌分离鉴定及其抑菌活性[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(11): 1201-1206.

长期研究发现,以乳酸菌为代表的益生菌是人体必不可少,且在人体中具有重要生理功能的有益菌,它们在人类肠道中起着很大生理作用。这些有益菌拥有抗酸和胆汁、粘附人类上皮细胞、在人类肠道中繁殖、产生有机酸、细菌素等抗菌物质的特性。

以乳酸菌为生物保鲜剂用于果蔬和肉制品的保鲜已有不少报道^[1-2]。Martinez 等^[3]将 *Lactobacillus plantarum* 菌液喷涂于荔枝、红毛丹果实表皮,发现能够降低致病菌的数量,同时还能抑制其褐变保持果皮的色泽、降低水分损失,延长果实货架期。果蔬富含矿物质、维生素、膳食纤维和抗氧化剂等有益的营养物质,且没有限制少数特定群体消费的乳品过敏原,因此使得果蔬成为传递益生菌的理想载体^[4]。Raffaello 等以卷心菜为原料^[5],将 *Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus casei*、*Lactobacillus delbrueckii* 加入灭菌的未添加其他营养物质的卷心菜汁里,乳酸菌能快速繁殖,30℃发酵 48 h 后,细胞数量高达 10^8 cfu/mL,且 *Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus delbrueckii* 比 *Lactobacillus casei* 能产生更多的可滴定酸。

由于易受到快速腐败微生物及一些病原体污染,新鲜的水果和蔬菜保质期较短,很容易腐烂变质。巴氏灭菌以及添加化学防腐剂是保证果蔬安全的主要技术操作,但同时也会带来如物理特性、化学成分变化等不理想的改变^[6]。为避免这些缺陷,利用产细菌素等抗菌物质的乳酸菌,开发果蔬汁益生菌功能饮料以及作为天然抗菌防腐剂应用于果蔬贮藏保鲜等新技术备受关注^[5,7-9]。具有产细菌素能力的乳酸菌对不同食物腐败或病原菌都表现出一定的抑制能力,且具有安全、无残留、抗菌谱广等优势,这类产细菌素的乳酸菌在乳品加工、果蔬加工、水产品、肉制品等领域的应用已经取得显著成果^[10-12]。许多研究已经证明^[3,5-6,13-14],添加产细菌素的乳酸菌到食品中比直接添加细菌素更可取。作为一类天然的、安全的食品抗菌防腐剂,乳酸菌可以较好地抑制致病菌及腐败菌的生长,从而保证食品的质量,提高食品的安全性;这使得乳酸菌作为抗菌防腐剂在食品保鲜技术中的优势日渐凸显,在未来天然食品生物防腐剂研究与开发中有极大的应用潜力。

新疆盛产瓜果、蔬菜,且营养高、口感好。由于新疆特殊的地理环境及气候多变性,较好地保存了

当地自然环境中的有益微生物,是乳酸菌的天然储存库。对新疆不同地区水果中乳酸菌进行分离、鉴定及生物学特性研究,筛选出具有抑菌活性的乳酸菌,为进一步开发果蔬汁益生菌功能饮料及加速天然食品防腐剂在食品保鲜中的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集

从新疆不同地区(伊犁、塔城、喀什、石河子等地)用提前灭菌的工具采集野生沙棘、沙枣、苹果、海棠果、山楂、石榴、葡萄、库尔勒香梨等样品(每种取样 2~3 份),装入提前灭菌的保鲜盒内,贴上标签后放置于车载冰箱-4℃冷藏,当天运回实验室。样品立即在无菌条件下处理,将其表皮用灭菌刀具削下放入装有 30 mL MRS 液体培养基的锥形瓶中,30℃摇床振荡培养 12 h,4℃保藏备用。

1.2 主要试剂和仪器

用于 PCR 扩增的全套试剂均购自 TaKaRa 公司。所用培养基及相关药品均购自海博生物技术有限公司。生理生化试验所用试剂购自天津市巴斯夫化学试剂厂。PCR 仪为德国 Biometra 公司的 Tprofessional;凝胶成像仪为美国 BioRad 公司 Gel DOC XR;水平电泳仪为美国 BioRad 公司的 PowerPac Universal。

1.3 菌株分离纯化

采用梯度稀释平板涂布法分离样品中的乳酸菌。取 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 3 个梯度稀释样品 150 μ L 分别涂布于 MRS、Elliker、M17、乳酸杆菌选择性琼脂 4 种固体培养基上,一式两份,37℃厌氧培养 2 d。待菌落长出后挑取单菌落,划线培养 3 次后,将所得纯培养物转接到 MRS 液体培养基^[15]。菌株的细胞形态、菌落形态、生理生化实验参照文献进行^[16],通过革兰氏染色和接触酶实验进行初筛,初步确定疑似乳酸菌。

1.4 菌株 rep-PCR 指纹图谱分析

采用 CTAB 法提取菌株单菌落 DNA。用引物 GTG5 (5'-GTGGTGCTGGTGCTG-3') 对分离菌株 DNA 进行 PCR 扩增^[17-18]。反应在 25 μ L 体系中进行,包括 2 $\times$ PCR Master Mix 12.5 μ L,0.5 μ mol/L $MgCl_2$ 2.0 μ L,引物 1 μ L,2 μ L 的模板以及 7.5 μ L 的 ddH₂O。扩增条件:95℃预变性 5 min;95℃变性 30 s;40℃退火 30 s;65℃延伸 8 min;32 个循环;

72 ℃终延伸 16 min。PCR 结束后,扩增产物经质量浓度为 14 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测 2 h。在紫外凝胶成像仪中观察电泳结果,DNA 带型完全一致的菌株被认为属于同一物种,从中选取表菌株作进一步 16S rRNA 基因测序分析。

1.5 16S rRNA 基因测序及系统发育分析

用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') 对菌株进行 16S rRNA 基因扩增^[17,19]。扩增条件:94 ℃预变性 4 min,94 ℃变性 1 min,55 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 1 min,共 30 个循环;72 ℃终延伸 10 min。PCR 扩增产物经纯化后送至上海生工生物技术有限公司测序,将所得序列提交到 GenBank 数据库中,利用 BLAST 进行序列同源性分析,比较供试菌株与已知乳酸菌相应序列的相似性。在 MEGA 6.0 软件中用 p-distances 和 Kimura-2parameter 双参数法构建系统发育树,并进行 1 000 次 Bootstraps 检验^[20]。

1.6 牛津杯法筛选具有抑菌活性的乳酸菌

分别吸取 100 μL 指示菌(金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、单增李斯特菌 *Listeria monocytogenes*) 稀释液(活菌数达到 2.0×10^8 cfu/mL)涂布于已凝固的 LB 固体培养基,用灭菌棉签均匀涂抹,在每个平板中等距放置 4 个牛津杯,再分别加入 200 μL 的乳酸菌上清液,用未加菌液的培养基为空白对照^[21]。放置于 4 ℃冰箱中扩散 5 h 后,在 37 ℃培养箱中培养 16 h。若在牛津杯周围出现抑菌圈,则表示该菌株可以产细菌素,具有抑菌活性;用游标卡尺测量抑菌圈直径,每株菌做 3 个平行,求平均值。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌生理生化鉴定

从沙棘、沙枣、苹果、海棠果、山楂、葡萄、红枣等样品中共分离得到纯培养物 137 株。通过革兰氏、接触酶实验初步确定疑似乳酸菌共 90 株。如图 1 所示,菌株菌落形态大多为白色或乳白色,边缘整齐,直径在 0.5~2 mm 之间,表面较湿润,易于挑起。90 株植物菌株中有 32 株菌落颜色呈白色,36 株菌落颜色呈乳白色,17 株菌落颜色呈淡黄色;透明或半透明状 4 株,淡灰色 1 株。镜检发现,大多数分离菌株细胞形态呈杆状或球状。

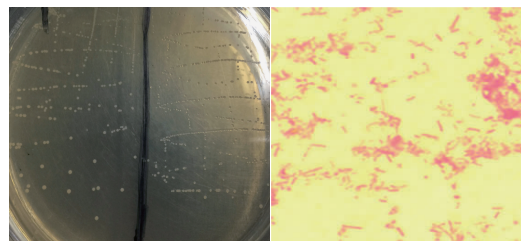


图 1 乳酸菌菌落形态及其细胞形态

Fig. 1 Colonies and cell morphology of lactic acid bacteria

2.2 乳酸菌 16S rRNA 基因序列鉴定及其系统发育

DNA 带型完全一致的菌株通常被认为属于同一物种。对 90 株疑似乳酸菌通过 rep-PCR 指纹图谱表征分析,显示出 15 种不同的 DNA 带型。结合表性特征及指纹图谱结果,选取 15 株代表菌株进行 16S rRNA 基因扩增及测序分析。

将测序得到的序列提交到 NCBI,在 GenBank 数据库中利用 BLAST 在线工具与已知的 16S rRNA 基因序列进行同源性比对,选取相似度最高的序列,分析其亲缘关系并建立系统发育树。结果如表 1 所示,16S rRNA 鉴定结果表明分离菌株主要隶属于乳杆菌属(*Lactobacillus*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)和乳球菌属(*Lactococcus*)3 个属。其中 *Lactobacillus* 6 株,包括 *Lactobacillus alimentarius*、*Lactobacillus kimchii*、*Lactobacillus paralimentarius*、*Lactobacillus paraplantarum*、*Lactobacillus plantarum* 5 个种;*Leuconostoc* 8 株,包括 *Leuconostoc mesenteroides*、*Leuconostoc pseudomesenteroides*、*Leuconostoc mesenteroides subsp.dextranicum* 3 个种;而 *Lactococcus* 只分离到一株 B-11-5,属于 *Lactococcus lactis*。

由系统发育树可知(图 2),被测菌株 16S rRNA 基因序列与 GenBank 数据库中同源性相似性在 98%~100%之间。M-PC-4、M-PC-12、M-PC-15、M-PC-17、M-PC-18、M-PC-19 聚为一群,均属于乳杆菌属(*Lactobacillus*);其中 M-PC-4 与 *Lactobacillus plantarum*,M-PC-12、M-PC-19 与 *Lactobacillus alimentarius*,M-PC-17 与 *Lactobacillus paralimentarius*,M-PC-18 与 *Lactobacillus kimchii* 的相似度均达到了 100%;M-PC-15 与 *Lactobacillus paraplantarum* 的相似度达到了 99%,因此它们均隶属于乳杆菌属(*Lactobacillus*)。M-5-1、E-5-7、M-6-3、B-5-12、M-11-13、M-11-13 与 *Leuconostoc mesenteroides* 的相似度为 99%~100%之间,M-5-6、E-5-8 与 *Leuconostoc pseudomesenteroides* 的相似

表 1 乳酸菌鉴定及表型特征

Table 1 Identification and phenotypic characteristics of Lactic acid bacteria

菌株	最相近的种	登录号	相似度/%	革兰氏染色	过氧化氢酶	细胞形态	菌落形态
M-PC-19	<i>Lactobacillus alimentarius</i> strain 6237241	KC755103	100	+	-	bacilliform	white,small
M-PC-12	<i>Lactobacillus alimentarius</i> strain NBRC 106464	AB626058	100	+	-	bacilliform	white,medium
M-PC-18	<i>Lactobacillus kimchii</i> strain MT-1077	NR025045	100	+	-	bacilliform	white,small
B-11-5	<i>Lactococcus lactis</i> isolate 214	LN623606	100	+	-	spherical	cream , small
M-5-1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain IMAU32604	KF149275	98	+	-	spherical	white,medium
E-5-7	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain L10262	KT952371	100	+	-	spherical	cream , small
M-6-3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain L12132	KT952374	100	+	-	spherical	white,medium
B-5-12	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain LOCK 0994	KP773474	99	+	-	spherical	cream , small
M-11-13	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain MFL18	KF697653	98	+	-	spherical	cream , small
B-11-1	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp.dextranicum</i> B322	KT952377	99	+	-	spherical	buff, medium
M-PC-17	<i>Lactobacillus paralimentarius</i> strain M-M4	FJ157240	100	+	-	bacilliform	white,medium
M-PC-15	<i>Lactobacillus paraplantarum</i> strain KNUC25	EF200067	99	+	-	bacilliform	white,small
M-PC-4	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain 6225118	KC755100	100	+	-	bacilliform	buff, small
M-5-6	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> strain CZNRSJ-2	KJ530641	100	+	-	bacilliform	cream ,small
E-5-8	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> strain IMAU11182	KT887242	100	+	-	spherical	cream ,small

度为 100%，可以确定属于明串珠菌属 (*Leuconostoc*)。而 B-11-5 与 *Lactococcus lactis* 的相似度为 100%，在系统发育树上形成一个单独分支。

2.3 具有抑菌活性乳酸菌的筛选

乳酸菌通常能够抑制与其种属相近的菌株,利用 15 株已鉴定的乳酸菌作为目标菌,分别以金黄葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、李斯特氏菌作为指示菌筛选具有抑菌活性的菌株。结果显示分别来自 *Leuconostoc mesenteroides*、*Lactobacillus. alimenta-rius*、*Lactobacillus. paraplantarum*、*Lactobacillus plantarum*、*Lactococcus lactis* 5 个种的乳酸菌具有抑制指示菌生长的能力。不同乳酸菌所产生的抑菌圈直径在 8~20 mm 范围内 (牛津杯直径为 7 mm);抑菌效果由表 2 可知,不同种乳酸菌对不同指示菌的抑菌程度不同,如图 3 所示。

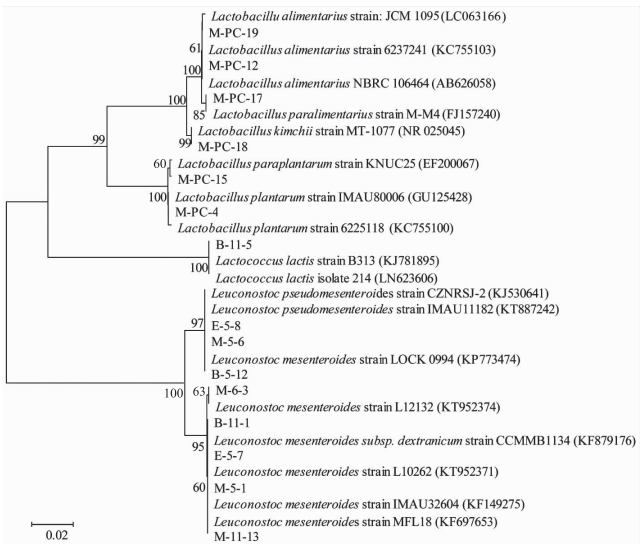


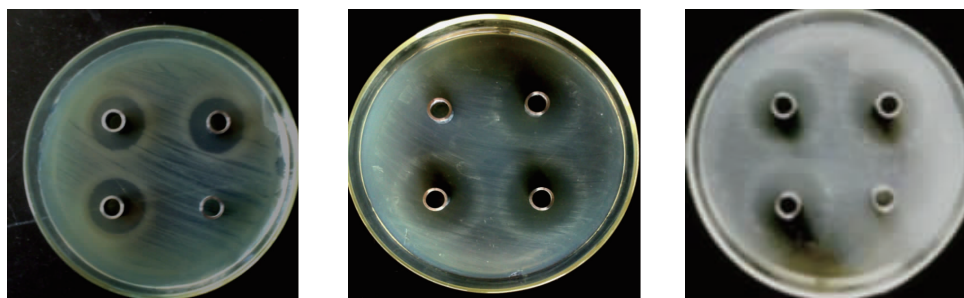
图 2 基于 16S rRNA 序列的菌株系统发育树
Fig. 2 Phylogenetic tree based on sequences of the 16S rRNA gene

表 2 对指示菌抑菌活性

Table 2 Antibacterial spectrum for indicator bacteria

指示菌	具有抑菌活性菌株							
	B-5-12	E-5-7	M-6-3	B-11-1	B-11-5	M-PC-4	M-PC-15	M-PC-12
枯草芽孢杆菌	+	+	-	+	-	++	+	-
李斯特氏菌	++	++	++	++	++	++	++	+
金黄葡萄球菌	++	+	+	++	+	++	-	++

注:+,直径 8~10 mm; ++,直径 11~15 mm



(a)乳酸菌对金黄色葡萄球菌的抑菌效果 (b)乳酸菌对李斯特氏菌的抑菌效果 (c)乳酸菌对枯草芽孢杆菌的抑菌效果

图3 产细菌素乳酸菌的筛选

Fig. 3 Screening for bacteriocin-producing strains

3 结 语

本研究利用4种培养基对8种新疆不同地区水果表皮可培养乳酸菌分离进行了分离纯化。16S rDNA序列分析确定15株代表菌株分别隶属于乳杆菌属、明串珠菌属和乳球菌属3个属,共8个种。抑菌研究结果表明,*Leuconostoc mesenteroides*、*Lactobacillus alimentarius*、*Lactobacillus paraplantarum*、*Lactobacillus plantarum*、*Lactococcus lactis* 5个种的8株乳酸菌对不同指示菌在一定程度上都有抑制作用,不同种乳酸菌对不同指示菌的抑菌程度不同。

本研究从不同水果中分离所得乳酸菌主要是*Leuconostoc*和*Lactobacillus*,尤其*Leuconostoc mesenteroides*、*Lactobacillus plantarum*是水果表皮的优势菌群,并且以其作为生物保鲜剂用于果蔬贮藏保鲜已有不少报道^[1-3,5,7-8,14]。明串珠菌和乳杆菌属菌株多数都能抑制金黄色葡萄球菌和李斯特菌的生长,但对枯草芽孢杆菌的抑菌效果并不明显。目前,*Leuconostoc mesenteroides*、*Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus delbrueckii*、*Lactococcus lactis*是果蔬乳酸发酵中最常见的菌种^[1,5,22]。有研究指出^[6,22],乳酸发酵过程中,当果蔬汁作为唯一的发酵底物时,

由于葡聚糖蔗糖酶的合成,明串珠菌可选择性地促进一些乳杆菌和双歧杆菌的生长,从而平衡肠道微生物组成。Raffaella等通过*Lactobacillus acidophilus*、*Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus casei*、*Lactobacillus delbrueckii*等研究了番茄汁是否适合生产益生菌产品,结果表明,4种乳酸菌都能在没有调节番茄汁PH和补充营养物质的情况下,快速繁殖并产酸。且在4℃冷藏4周后,*L. plantarum*、*L. delbrueckii*依然能在低pH、高酸度条件下生存^[5-6]。*L. plantarum*具有较广的抑菌谱,能抑制多种致病菌的生长。Martinez等^[3]用*L. plantarum*菌液喷涂荔枝,并在10℃条件下贮藏,延缓了果皮褐变。李转羽等^[6,23]研究发现,除金黄色葡萄球菌、李斯特菌等革兰氏阳性菌外,*L. plantarum*对沙门氏菌、志贺氏菌、阪崎肠杆菌、铜绿假单胞菌等革兰氏阴性菌也有明显抑制作用。

本研究前期对新疆不同地区水果中的乳酸菌进行了分离鉴定,并对具有抑菌活性的乳酸菌进行了初步筛选。后续研究中,会对分离菌株的生长特性及抑菌能力进行拓展实验,以期更加准确地了解其抑菌活性及相关抑菌物质的功能性质。为进一步开发果蔬汁益生菌功能饮料及加速天然食品防腐剂在食品保鲜中的应用奠定基础。

参考文献:

- [1] MARTINEZ C G, SHIRAI K, PELAYO Z C, et al. Effect of *Lactobacillus plantarum* and chitosan in the reduction of browning of pericarp Rambutan(*Nephelium lappaceum*) [J]. **Food Microbiology**, 2009, 26(4): 444-449.
- [2] ANANOU S, MAQUEDA M, MARTINEZ B M, et al. Control of *Staphylococcus aureus* in sausages by enterocin AS-48 [J]. **Meat Science**, 2014, 24(71): 549-56.
- [3] MARTINEZ C G, PELAYO Z C, PEREZ F L J, et al. Postharvest litchi (*Litchi Chinensis* Sonn.) quality preservation by *Lactobacillus plantarum* [J]. **Postharvest Biology & Technology**, 2011, 59(2): 172-178.

- [4] RIVERA E Y, GALLARDO N Y. Non-dairy probiotic products[J]. **Food Microbiology**, 2010, 27(1): 1-11.
- [5] RAFFAELLA D C, ROSSANA C, MARIA D A, et al. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation.[J]. **Food Microbiology**, 2013, 33(1): 1-10.
- [6] PRADO F C, PARADA J L, PANDEY A, et al. Trends in non-dairy probiotic beverages [J]. **Food Research International**, 2008, 41(2): 111-123.
- [7] TAMANG B, TAMANG J P, MU, HERJEE P K, et al. Traditional knowledge of biopreservation of perishable vegetable and bamboo shoots in Northeast India as food resources[J]. **Indian Journal of Traditional Knowledge**, 2014, 8(1): 89-95.
- [8] BUONOCORE G G, NOBILE M A D, PANIZZA A, et al. A general approach to describe the antimicrobial agent release from highly swellable films intended for food packaging applications.[J]. **Journal of Controlled Release**, 2003, 90(1): 97-107.
- [9] LI Jing, LIU Lina, WANG Anjian, et al. Research progress of microbial preservation technology on fruits and vegetables[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2014, 33(4): 337-343. (in Chinese)
- [10] SHEN Lianqing, SU Guangyao, WANG Xiangyang. Progress on plantaricin by *L. plantarum* [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2006, 25(5): 121-126. (in Chinese)
- [11] RAO Yu, CHANG Wei, TANG Jie, et al. Application of bacteriocinogenic lactic acid bacteria in fermented vegetable food biopreservation[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2013, 34(16): 392-395. (in Chinese)
- [12] LV Xinran, BAI Fengling, LI Jianrong. Research and application of lactic acid bacteria as seafood bio-preservation agent[J]. **Food and Fermentation Industry**, 2014, 40(4): 118-124. (in Chinese)
- [13] CASTELLANO P, VIGNOLO G. Inhibition of *Listeria innocua* and *Brochothrix thermosphacta* in vacuum-packaged meat by addition of bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* CRL705 and its bacteriocins. [J]. **Letters in Applied Microbiology**, 2006, 43(2): 194-199.
- [14] CALO M P, ARLINDO S, BOEHME K, et al. Current applications and future trends of lactic acid bacteria and their bacteriocins for the biopreservation of aquatic food products[J]. **Food & Bioprocess Technology**, 2007, 1(1): 43-63.
- [15] BONOMO M G, RICCIARDI A. Molecular and technological characterization of lactic acid bacteria from traditional fermented sausages of *Basilicata region* (Southern Italy)[J]. **Meat Science**, 2008, 80: 1238-1248.
- [16] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 289-294.
- [17] GEVERS D, HUYS G, SWINGS J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species [J]. **Fems Microbiology Letters**, 2001, 205(205): 31-36.
- [18] ISABEL S, SUSANA S, POVEDA J M, et al. Genetic diversity, dynamics, and activity of *Lactobacillus* community involved in traditional processing of artisanal *Manchego cheese*[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2006, 107(3): 265-273.
- [19] DROSINOS E H, SPIROS P, GEORGE K, et al. Phenotypic and technological diversity of lactic acid bacteria and staphylococci isolated from traditionally fermented sausages in southern Greece[J]. **Food Microbiology**, 2007, 24(3): 260-270.
- [20] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. **Mol Biol Evol**, 1987, 4(6): 406-425.
- [21] DONG Caiwen, MAO Duobin. Screening and identification of lactic acid bacterium producing bacteriocin with broad spectrum [J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2009, 30(5): 21-24. (in Chinese)
- [22] GAWKOWSKI D, CHIKINDAS M L. Non-dairy probiotic beverages: the next step into human health [J]. **Beneficial Microbes**, 2013, 4(2): 127-42.
- [23] LI Zhuanyu, HAO Yanfang, ZHANG Hongxing, et al. Identification and function studying of a *Lactobacillus plantarum* producing lactobacillin[J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, 2015, 15(2): 207-213. (in Chinese)