

腐乳发酵过程中细菌种群变化的鉴定与分析

邹家兴¹, 李国基¹, 耿予欢¹, 柯昌文², 杨连生¹

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640) (2. 广东省应急病源学重点实验室, 广东 广州 510300)

摘要: 采用分子生物学方法对腐乳发酵过程中各阶段的发酵样品微生物的群落结构进行研究和探讨, 提取样品中细菌的总 DNA, 通过 PCR 的方法获得其 16S rDNA 扩增片段, 对所得片段进行克隆、转化, 得到 40 个转化子。通过 16S rDNA-PCR 方法对转化子进行验证, 结果显示其中 16 个为假阳性, 对其余 24 个转化子进行双向测序, 分析序列同源性, 将具有显著同源性的序列归为一类。同时对所得序列进行检索分析, 它们中部分与 GenBank 中已知基因序列具有显著同源性, 另一部分序列检索分析显示为目前仍不能通过人工培养得到的未知微生物。通过对复杂微生物群落的分子生物学研究, 进一步认识了腐乳发酵过程中菌种以外的杂菌分布情况, 找出细菌群落变化规律, 以及微生物群落结构变化与发酵过程之间的关系。

关键词: 腐乳发酵; 16S rDNA-PCR; 序列同源性

中图分类号: TS201.3; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)05-0424-05

Analysis and Identification of Bacteria Population in Sufu Fermentation

ZOU Jia-xing¹, LI Guo-ji¹, GENG Yu-huan¹, KE Chang-wen², YAND Lian-sheng¹

(1. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Center for Disease Control and Prevention of Guangdong Province, Guangzhou 510300, China)

Abstract: The variation of bacteria population in sufu fermentation was studied by molecular biology methods. The Genome DNA was extracted from the bacteria in sufu sample, and its 16S rDNA fragment was amplified by PCR for further cloning and translating. The achieved 40 converters were examined by 16S rDNA PCR, 10 of which were false positive. Then the rest were sequenced bidirectionally for classifying them into different groups according to their homology. Meanwhile, comparison of these sequences with those on GeneBank by using Blast software showed that some genes had significant homology with foregone sequences in the GeneBank. This study enriched the knowledge of bacteria population distribution in sufu fermentation and revealed the relationship between microbe variation and Sufu fermentation.

Key word: sufu fermentation; 16S rDNA-PCR; sequence homology

对腐乳发酵过程中大量有重要生态功能, 但尚难以纯培养分离的微生物的研究和利用, 是大豆发酵食品领域中一个具有重要理论价值和前景的方向, 因此, 许多可直接对环境样品中微生物组成进行分析的分子生物学方法, 如 16S rDNA、18S rDNA-PCR 的 DGGE、TGGE 分析、RAPD-PCR 指纹图谱分析等被越来越多地应用于微生物种群结构特征、系统多样性、动力学变化和与环境互作等方面的研究^[1-3]。这些不依赖于分离培养的方法为比较全面、客观认识微生物区系结构特征。为了解一些主要功能菌群在环境中的生态作用等提供了可行的途径, 也为实现基因组序列引导下的重要功能微生物的分离鉴定提供了手段^[4]。

我们采用 16S rDNA-PCR 序列分析技术, 对腐乳发酵过程中的复杂环境微生物群落结构组成进行了研

收稿日期: 2007-12-20

通讯作者: 李国基 (1954-), 男, 高级工程师, 主要从事发酵食品领域的研究工作

究探讨, 用该技术对腐乳发酵过程中 3 个阶段的微生物种群结构进行了连续动态跟踪研究。

在本研究中对三个阶段腐乳样品的 16S rDNA-PCR 扩增中得到的 1.5 kb 左右的 DNA 片段进行了纯化、克隆和序列分析, 通过 BlastN 在 GeneBank 数据库中检索, 结果显示了腐乳发酵各阶段中的主要细菌种群结构, 以及各阶段细菌种群结构的差异, 探讨了由这些基因组 DNA 片段代表的细菌种群结构与环境变化的关系。为用分子生物学方法分离腐乳发酵过程中的主要功能菌提供了一条可行之途径。

1 材料与方法

1.1 腐乳样品

取自广州某腐乳厂生产线。共设 3 个采样点, 分别是 1 前发酵 (毛胚)、2 盐胚、3 盐水胚。样品采集均用无菌三角瓶。

1.2 样品预处理

无菌环境下取腐乳样品于 50 mL coming 管中, 加入 5 倍体积 PB buffer 和 1 倍体积无菌玻璃珠, 充分漩涡振荡; 梯度离心, 100×g、200×g、300×g 各 5 min, 400×g、500×g、600×g 各 3 min; 上层乳浊液移入新的 50 mL coming 管中, 梯度离心, 700×g、800×g 分别 2 min; 上层清液再移入新的 coming 管中, 分装 1 mL/管于 1.5 mL EP 管中; 12000 r/min 离心 20 min, 弃上清液; 30%生理盐水甘油重悬沉淀, -20 °C 冻存。

1.3 细菌总 DNA 基因组的提取

取分装有 1 mL 菌液的 1.5 mL EP 管, 12000 r/min 离心 15 min, 弃上清液; 沉淀中加入 567 μL TE 缓冲液, 吹打重选菌体, 加入 30 μL SDS 和 3 μL 20 mg/mL Proteinase k, 混匀, 于 56 °C 温育 1 h; 加入 100 μL 5 mol/L NaCl, 充分混匀, 再加 80 μL CTAB/NaCl 溶液混匀, 于 65 °C 温育 10 min; 加入等体积氯仿/异戊醇颠倒混匀, 12000 r/min 离心 15 min, 上清液移入新的 EP 管中; 加入等体积 Tris 酚、氯仿、异戊醇, 颠倒混匀, 12000 r/min 离心 15 min, 上层水相移入新的 EP 管中; 加入 0.6 倍体积的异丙醇, 轻轻混合直到 DNA 沉淀下来, 12000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 用 70% 乙醇洗涤; 洗涤后 12000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 真空干燥, 重悬于 50 μL TE buffer 中, -20 °C 冻存。

1.4 16S rDNA 引物序列

16S rDNA-PCR 引物设计参照文献^[5], 引物由大连宝生物公司合成, 序列如下:

5'-gAgTTTgATccTggcTcAg-3';

5'-TAcggcTAccTTgTTAcgAcTT-3'

1.5 16S rDNA-PCR 扩增

扩增反应采用 25 μL 体系, 反应程序 94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 2 min, 72 °C 7 min, 4 °C ∞; 35 个循环。PCR 试剂购自 TaKaRa 公司, PCR 反应在 Biometra TGRADIENT PCR 扩增仪上进行。用 1.5% (m/V) 琼脂糖凝胶 (含有 GeneView 1.5 μg/mL) 检测 PCR 产物, 点样量 5 μL, Bio-Red 凝胶成像系统拍摄、分析结果。

1.6 16S rDNA 片段的转化、克隆、DNA 片断测序
克隆结果得到 40 个阳性转化子, 对其进行编号,

前发酵阶段蓝白斑筛选平板中转化子编号依次为 1-1~1-10, 盐胚阶段转化子编号依次为 2-1~2-22, 盐水浸泡阶段依次为 3-1~3-8。

从含有 X-Gal 和 IPTG 的平板上挑取克隆, 使用 E.Z.N.A.TM Plasmid Mini Kit 提取质粒; 对质粒进行 PCR 检测, 弃去假阳性克隆。测序反应试剂使用 ABI 公司 BigDye, 在 Biometra TGRADIENT PCR 扩增仪上进行, 测序仪使用 AB 公司 ABI3100 Genetic Analyzer。序列结果在 GenBank 数据库中进行 Blast 同源性检索。采用 clustal1.83、phylip 及 Treeview 软件对所得序列信息进行同源性分析。

2 结果与分析

2.1 三个发酵阶段腐乳样品 16S rDNA-PCR 扩增结果

对三个采样点的腐乳发酵物分别进行总 DNA 基因组提取、16S rDNA-PCR 扩增, 凝胶成像结果 (如图 1) 显示三个样品均扩增出约 1.5 kbp 的单一明亮条带, 表明从三个采样点腐乳样品总基因组 DNA 中都扩增获得了 16S rDNA 保守序列^[6]。

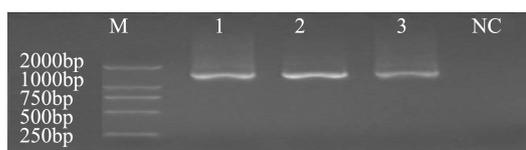


图 1 三个发酵阶段发酵物 16S rDNA-PCR 扩增图谱

Fig.1 Amplified patterns of 16S rDNA-PCR of three fermented stage

注: M: DNA Marker DL2000; 1: 前发酵阶段; 2: 盐胚阶段; 3: 盐水浸泡阶段; NC: 阴性对照。

2.2 重组质粒的提取及 PCR 分析

将三个发酵阶段样品的 16S rDNA-PCR 产物进行纯化回收, 与 PMD18-T simple vector 连接, 转化到 E.coli JM109, 在含有 X-Gal、IPTG 和 ampicillin 的 LB 平板上涂板培养, 挑取 40 个转化子, 质粒提取和 PCR 产物电泳检测 (如图 2) 表明 24 个克隆为含有目的片段的重组子。

2.3 重组质粒测序结果和同源性分析

2.3.1 Blast N 结果



图 2 转化子质粒的 PCR 检测

Fig.2 PCR detection of transformant plasmid

注: M: DNA Marker DL2000; 1-1~1-10: 前发酵阶段中微生物16S rDNA转化片段; 2-1~2-22: 盐胚阶段中微生物16S rDNA转化片段; 3-1~3-8: 盐水浸泡阶段中微生物16S rDNA转化片段; NC: 阴性对照。

对 24 个重组质粒进行双向测序, 测序结果显示碱基识别信号强, 无杂峰, 测序结果良好, 采用 SeqMan 软件对 DNA 序列重新组装得到重叠群, 将通过组装得到的 24 个重组质粒重叠序列在 NCBI 上进行 Blast N 检索, 从而获得序列的微生物种属信息, 其中通过比对鉴定出的细菌种属包括融合乳杆菌、链锁状球菌、牛链球菌、马肠链球菌、鲍氏不动杆菌、肺炎克雷伯(氏)杆菌、霍氏肠杆菌、志贺(氏)痢疾杆菌、屎肠球菌。

重组质粒序列与 GeneBank 中的序列比对结果显示, 菌株 1-1、1-2、1-3、1-5 与链球菌属(*Streptococcus*) 一些种的 16S rDNA 序列具有高度的同源性, 其中菌株 1-1、1-5 与马肠链球菌(*Streptococcus equinus*) 的同源性为 96%, 菌株 1-2、1-3 与牛链球菌(*Streptococcus bovis*) 的同源性为 96%。菌株 1-4、3-1 与融合乳杆菌(*Weissella confusa*) 具有高度同源性, 其中 1-4 的同源性为 99%, 3-1 为 98%。菌株 2-1、2-3、2-4、2-7、2-14、2-16、2-18、2-19、2-20、2-22、3-2、3-5、3-6 与不动杆菌属一些种的 16S rDNA 序列具有高度的同源性, 其中 2-1 与无硝不动杆菌(*Acinetobacter anitratus*) 的同源性为 98%, 2-3、2-4、2-22 与 Uncultured bacterium clone 具有 99% 的同源性, 2-7、2-14、2-16、2-18、2-20、3-2、3-5 与鲍氏不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*) 的同源性为 98%, 2-19、3-6 与醋酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*) 同源性为 99%。菌株 2-8 与大肠杆菌(*Escherichia coli*) 同源性为 99%。

菌株 2-9 与肺炎克雷伯(氏)杆菌(*Klebsiella pneumoniae*) 同源性为 95%。菌株 2-21 与肠杆菌属(*Enterobacter*) 具有高度同源性, 与霍氏肠杆菌(*Enterobacter hormaechei*) 同源性为 98%。菌株 3-3 与志贺(氏)痢疾菌(*Shigella dysenteriae*) 同源性为 98%。菌株 3-4 与屎肠球菌(*Enterococcus faecium*) 的同源性为 98%。

2.3.2 转化子序列的同源性分析

所测得克隆序列经过 Blast 检索, 有些虽然不能够知道序列来自同一种的哪一株, 但是已经能够精确鉴定细菌的种, 而有些序列经过比对只能鉴定到属, 因此有必要借助系统进化树的绘制对它们的进化关系作进一步的分析。从蓝白斑筛选中, 分离出了大量不动杆菌属细菌, 其中有鲍氏不动杆菌、醋酸钙不动杆菌、无硝不动杆菌, 但也存在一些目前不能通过人工培养得到的未知菌株, 在本研究中将这一类菌株的 16S rDNA 序列进行了同源性分析。

分析采用 Clustal X 1.83 软件^[7,8]对所测定的核苷酸序列及其同源序列进行校排^[9-11]后, 输出 PHY 格式文件。用系统发育推断软件包 phylip^[12]进行序列分析。采用最大简约法(Maximum Parsimony)构建系统发育树。系统发育树^[13]的拓扑结构检测是通过 seqboot 程序来建立 100 次重复, 然后采用 DNAPARS 程序构建最大简约进化树(如图 3), 合意树运用 CONSENSE 程序统计获得, 其稳定性通过 Bootstrap 分析和评价。

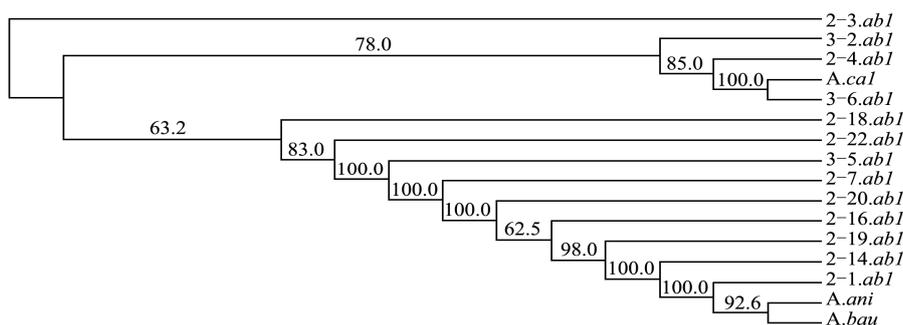


图 3 不动杆菌属菌株 16S rDNA 序列的系统进化树状图

Fig.3 Phylogenetic dendrogram of 16S rDNA sequence of Acinetobacter

注: A.ani: *Acinetobacter anitratus* (无硝不动杆菌); A.bau: *Acinetobacter baumannii* (鲍氏不动杆菌); A.cal: *Acinetobacter calcoaceticus* (醋酸钙不动杆菌)。

Blast N 结果显示, 菌株 2-1、2-3、2-4、2-7、2-14、2-16、2-18、2-19、2-20、2-22、3-2、3-5、3-6 的 16S rDNA 片段与不动杆菌属 16S rDNA 具有高度的相似性, 但有些不能确定其种。为进一步确定 2-1、2-3、

2-4、2-7、2-14、2-16、2-18、2-19、2-20、2-22、3-2、3-5、3-6 之间的同源性关系, 选取鲍氏不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*) 29108 CMCC(B)菌株、醋酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*)

BRL02-42A 菌株、无硝不动杆菌 (*Acinetobacter anitratus*) ATCC 15308 菌株的 16S rDNA 为标准菌株, 绘制树状图。

从树状图能看出, 菌株 2-4、3-2、3-6 与菌株 2-1、2-7、2-14、2-16、2-18、2-19、2-20、2-22、3-5 之间较早就出现了分支, 同源性较远, 其中菌株 2-4、3-2、3-6 与醋酸钙不动杆菌具有较高的同源性, 菌株 2-1、2-7、2-14、2-16、2-18、2-19、2-20、2-22、3-5 则与鲍氏不动杆菌同源性更高。菌株 2-1 与无硝不动杆菌具有最近的进化距离, 菌株 3-6 与醋酸钙不动杆菌具有最近的进化距离, 这一结果与 Blast 比对结果是一致的。

2.4 腐乳发酵各阶段微生物种群结构及变化

测序及 Blast 检索结果显示, 在腐乳发酵的过程中, 不同的发酵阶段细菌种群结构发生了变化, 前发酵阶段通过克隆分离出的细菌多属的链球菌属, 盐胚阶段分离出较多不动杆菌属菌株, 盐水浸泡阶段得到的转化子组成则更为复杂, 其中包括不动杆菌、球菌、志贺(氏)菌、乳杆菌。

3 讨论

本研究中分离得到了乳杆菌属、不动杆菌属、链球菌属、志贺氏菌属、肠杆菌属、克雷伯氏菌属、肠球菌属的菌株。乳杆菌属是发酵过程中的有益菌, 很少致病, 分解糖的能力强, 分解蛋白质类的能力低, 分解糖的主要终产物是乳酸, 乳杆菌生长而使环境偏酸, 从而能够抑制腐败性菌的生长, 在发酵过程中具有一定的防腐作用。然而, 本次研究未分离出更多种属的发酵有益菌, 同时, 对于有益菌的代谢过程目前仍属于探究阶段, 弄清这些发酵有益菌在腐乳发酵过程中的具体作用无疑对腐乳的生产具有更加明确的指导意义。分离得到的其他几个属的菌株都是在开放式生产发酵过程中引入的杂菌, 但在腐乳发酵这个复杂的环境中, 有些微生物之间能够通过代谢产物相互抑制, 同时相对较长时期的后发酵过程中所加入的汤汁、酒水对有害菌也起到了很好的抑制作用, 以保证了腐乳产品各项指标在出厂检测中符合国家标准。对于分离得到的有害菌, 如志贺氏菌、克雷伯氏肺炎杆菌等是如何被有效抑制以及其代谢产生的有害物质是如何被降解, 仍然是我们需要继续探讨的内容。

开放式是腐乳的发酵过程的特点, 因此杂菌的种类效丰富, 其中包括有益菌和有害菌, 本次研究中分离出的细菌种属数量有限, 且相当一部分存在于发酵过程的有益菌尚未被分离出来, 限制了我们对腐乳发

酵过程中细菌种群结构的多样性及其变化的分析与认识, 更未能进一步研究有益菌代谢过程, 微生物的富集数量, 是导致其不能被更有效分离的可能原因之一; 另外, 对复杂微生物群落的基因组 DNA 提取方法还有待改进, 以得到更为丰富全面的模板 DNA, 从而更加真实地反映出腐乳发酵过程中微生物群落结构; 同时, 本次研究中 16S rDNA 序列长度在 1.5 kb 左右, 片段较长, 这对载体的连接增加了难度, 微生物基因成功地克隆插入质粒载体的效率偏低, 这很大程度上影响了分离得到细菌的多样性。

在本次研究中, 由于多样性的局限, 各阶段的优势有益菌并不明显, 但从前发酵阶段及盐水浸泡阶段均分离出融合乳杆菌来看, 推测乳杆菌是伴随整个腐乳发酵过程的一种细菌, 其对腐乳发酵的影响是值得研究的。此外, 研究结果显示, 前发酵阶段分离出的细菌以链球菌为主, 可能由于这一阶段氧气充足且腐乳的 PH 值相对较高, 适合链球菌 PH 7.4~7.6 的生长环境; 盐胚阶段腐乳中分离出较多的不动杆菌, 这一阶段腐乳胚在食盐渗透压的作用下, 表面潮湿, 适合不动杆菌的生长; 盐水浸泡阶段则出现了更多的杂菌, 各发酵阶段中的人工操作是引入新杂菌的可能原因。

分离出更加具有多样性的菌株是我们今后进一步的研究工作的重点, 从而深入分析腐乳发酵各阶段的微生物种群结构变化, 同时找出腐乳发酵各阶段中的优势有益菌, 研究其代谢过程, 为腐乳发酵过程的微生物结构优化提供有力的证据。

参考文献

- [1] Watanabe K, Kodama Y, Harayama S. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting[J]. Journal of Microbiological Methods, 2001, 44: 253-262
- [2] Vallaeyts T, Topp E, Muyzer G, et al. Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs[J]. FEMS Microbiol Ecol. 1997, 24: 279-285
- [3] Felske A, Wolterink A, van Lis R, et al. Searching for predominant soil bacteria: 16S rDNA cloning versus strain cultivation[J]. FEMS. Microbiol. Ecol. 1999, 30: 137-145
- [4] Whiteley A S and Bailey M J. Bacterial Community structure and physiological state with in an industrial phenol bioremediation system[J]. Appl Environ Microbiol. 2000, 66 (6): 2400-2407

(下转第 438 页)