

腌制苋菜梗的微生物菌群结构及其品质

沈锡权^{1,2}, 赵永威^{1,2}, 吴祖芳^{*1,2}, 翁佩芳^{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: 腌制苋菜梗是浙东传统的特色腌制食品, 了解其细菌种群结构并探讨对亚硝酸盐等理化品质的影响, 以确保腌制食品的安全性。采用 16S rDNA 基因克隆文库的方法, 对腌制成熟的苋菜梗中细菌组成结构多样性进行了分析, 共检测出了乳杆菌、类香菌、弓形杆菌等 6 个菌属, 其中乳杆菌属占优势为总数的 83.9%。与此同时, 测定了腌制苋菜梗体系亚硝酸盐等一些理化指标, 腌制成熟时 pH 值为 4.35, 盐度为 5.5, 亚硝酸盐质量分数为 3.99 mg/kg (未超标), 细菌和乳酸菌浓度分别为 8.8×10^6 CFU/mL 和 1.6×10^6 CFU/mL。

关键词: 腌制苋菜梗; 16S rDNA 克隆文库; 菌群结构; 品质

中图分类号: TS 205 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2012)05-0486-06

A Preliminary Study of Microbial Community Structure and Its Quality of Pickled Amaranth Stem

SHEN Xi-quan^{1,2}, ZHAO Yong-wei^{1,2}, WU Zu-fang^{*1,2}, WENG Pei-fang^{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: Fermented amaranth stem is a special traditional characteristics pickled food in east Zhejiang province, and it is necessary to understand the microbial community structure and influence on physical and chemical properties such as nitrite concentration of fermented amaranth stem to ensure food safety. The bacterial community diversity of fermented amaranth stem was investigated based on the method of 16S rDNA clone library. The results indicated that 6 bacterial communities in sample were detected including *Myroides*, *Arcobacter* and *Lactobacillus*, etc. The predominant community was identified as *Lactobacillus*, which account for 83.9% in total 16S rDNA sequences. In the mean time, the pH value, salinity and nitrite concentration of pickled product of amaranth stem were also detected, they are 4.35, 5.5% and 3.99 mg/kg, respectively. The population of bacteria and lactic acid bacteria were 8.8×10^6 CFU/mL and 1.6×10^6 CFU/mL, respectively. These data are within national standard. The research results can provide microbial and theory identification for process parameters of fermented amaranth stem.

Key words: fermented amaranth stem, 16S rDNA clone library, microbial community structure, characters

收稿日期: 2012-01-05

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, 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, 主要从事食品生物工程技术方面的研究。

E-mail: wuzufang06@yahoo.com.cn

浙东传统的特色腌制食品以宁波地区的臭苋菜梗、臭冬瓜和臭芋茼蒿(俗称“三臭”)最为著名,其历史渊源深远,清代范寅在《越谚》中对苋菜的描写有“其梗如蔗,段之腌之,气臭味佳,最下饭”;宁海西乡民间有“无臭不下饭”的说法,可见这类食品独特的风味与具有增进食欲的魅力。俗语又说:“六月苋,当鸡蛋,七月苋,金不换”,由此可见其营养价值之高。据现代营养分析,苋菜富含钙、磷、铁、胡萝卜素和多种维生素^[1-2]。由于这些食品风味独特、营养丰富,是浙江沿海一带著名的传统特色腌制食品,深受民众喜爱。但是苋菜易富集硝酸盐,如腌制条件控制不好会使亚硝酸盐含量超标以及有害菌群的生长从而危害人体健康^[3-4];而长期以来人们对这类传统腌制菜的食用安全性缺乏深入认识,对臭苋菜梗的细菌菌群结构更是缺乏了解。目前对食品的菌相分析常采用传统的细菌分离培养,然后进行鉴定的方法,受培养基成分、培养方法等条件的限制,难以客观准确地表现出样品中原有的菌落体系^[5-6]。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,在分子微生态研究中已体现出重要的应用价值。燕平梅等^[7]基于16S rDNA克隆文库法研究了发酵甘蓝卤水中微生物,得出4种独特的菌落,即 *Lactobacillus acidifarinae*、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、融合乳杆菌(*Weissella confusa*)和足球菌属的种(*Pediococcus sp.*),用这种分子方法发现了常规分离培养技术未鉴定的乳酸菌 *Lactobacillus acidifarinae*。Tamara等^[8]用DGGE法和16S rDNA克隆文库法研究了加纳和巴西咖啡豆发酵过程中的微生物菌群多样性,发现体系中含有许多传统方法所未培养出的细菌。作者采用16S rDNA克隆文库法,解析腌制苋菜梗微生物菌群结构,并结合国家标准对亚硝酸盐等一些理化指标、细菌总数和乳酸菌总数进行了测定,为腌制苋菜梗的品质控制和食用安全性提供指导。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料 腌制用苋菜梗:购于宁波农贸市场;Fast DNA SPIN Kit 试剂盒,扩增用PCR体系(10× Buffer、MgCl₂、dNTPs、*Ex-Taq* polymer-

ase)、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、AlphaImager 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 苋菜梗的腌制 苋菜梗的腌制按传统腌制工艺进行。将新鲜的苋菜梗清洗干净后称重。然后切成边长6 cm左右的小段,用水浸泡24 h左右,等水起白泡,即把苋菜梗捞起,洗净并沥干,然后按照12.5 kg苋菜梗加0.7 kg食盐的比例加入食盐。最后用塑料纸封口,放于阴凉处发酵20 d左右即可,作为菌群分析用样品。

1.2.2 样品总DNA提取纯化 采用Fast DNA SPIN Kit 试剂盒,按说明书步骤对腌制苋菜梗卤水样品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MgCl₂ 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-Taq* DNA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℃预变性3 min,30个循环(94℃变性50 s,52℃退火50 s,72℃延伸1 min 30 s),72℃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℃连接过夜,转化感受态细胞*E. coli* DH5 α 。用引物M13F和M13R随机检测出60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、MEGA 4.1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值和亚硝酸盐质量分数的测定:取苋菜梗的腌制卤水,按文献^[9]进行测

定;细菌总数以及乳酸菌总数变化情况的测定:取苋菜梗的腌制卤水,利用稀释倒平板法测定卤水中细菌总数以及乳酸菌总数的变化情况。

2 结果与分析

2.1 细菌 16S rDNA 克隆文库的构建

将来自腌制苋菜梗样品的 58 个阳性克隆子的测序结果在 GenBank 数据库中进行 Blast 比对, 克隆子与 GenBank 数据库中已知细菌的 16S rDNA 序列相似性均在 95% 以上, 检测出样品共含有 6 个

菌属,见图 1。即乳杆菌属(*Lactobacillus*)、类香菌属(*Myroides*)、弓形杆菌属(*Arcobacter*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、片球菌属(*Pediococcus*)和产碱菌属(*Alcaligenes*),其中乳杆菌属有 51 个克隆子,占总菌数的 83.9%,其余 5 个属细菌占 16.1%。为方便分析,把差异在 0.5% 之内的序列作为一个分类操作单元(operational taxonomic unit, OTU),样品可分成 15 个 OTU,腌制后臭苋菜梗样品的细菌群落组成测定结果见表 1。

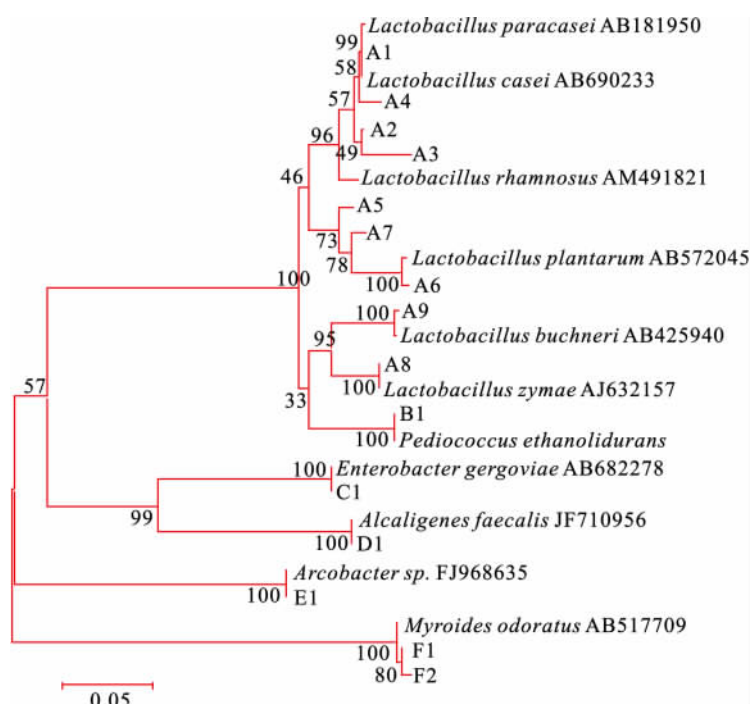


图1 NJ法构建腌制苋菜梗中细菌16S rDNA克隆文库序列的系统发育树

Fig. 1 Establishment of phylogenetic tree based on the neighbour-joining analysis of 16S rDNA sequence in fermented amaranth stem

表 1 16S rDNA 克隆文库法对腌制臭苋菜梗样品的细菌群落组成分析结果

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

属 名	OTU	数量	最相似菌	登录号	最大相似性
乳杆菌属(<i>Lactobacillus</i>)	A1	38	<i>Lactobacillus casei</i>	AB690233	99.5%~100%
	A2	1	<i>Lactobacillus casei</i>	AB690233	99.2%
	A3	1	<i>Lactobacillus casei</i>	AB690233	96.9%
	A4	1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	AB181950	98.6%
	A5	1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	AM491821	95.8%
	A6	5	<i>Lactobacillus plantarum</i>	AB572045	99.7%
	A7	2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	AB572045	96.7%

续表 1

属名	OTU	数量	最相似菌	登录号	最大相似性
	A8	1	<i>Lactobacillus zymae</i>	AJ632157	98.7%
	A9	1	<i>Lactobacillus buchneri</i>	AB425940	99.6%
	属总数	51(83.9%)			
片球菌属(<i>Pediococcus</i>)	B1	1	<i>Pediococcus ethanolidurans</i>	AB682363	99.7%
肠杆菌属(<i>Enterobacter</i>)	C1	1	<i>Enterobacter gergoviae</i>	AB682278	99.6%
产碱菌属(<i>Alcaligenes</i>)	D1	1	<i>Alcaligenes faecalis</i>	JF710960	99.9%
弓形杆菌属(<i>Arcobacter</i>)	E1	2	<i>Arcobacter</i> sp.	FJ968635	99.9%
类香菌属(<i>Myroides</i>)	F1	1	<i>Myroides odoratus</i>	AB517709	99.9%
	F2	1	<i>Myroides odoratus</i>	AB517709	99.2%

2.2 盐度、pH 和亚硝酸盐的测定

对腌制苋菜梗样品的盐度和 pH 值进行了测定,分别为 5.5% 和 4.35;亚硝酸盐质量分数为 3.99 mg/kg。

2.3 细菌总数以及乳酸菌总数的测定

对腌制苋菜梗样品的细菌总数和乳酸菌总数进行测定,分别为 8.8×10^6 CFU/mL 和 1.6×10^6 CFU/mL。

3 结 语

采用 16S rDNA 基因克隆文库方法较好地反映了腌制成熟的苋菜梗样品细菌的多样性,从组成菌属组成可以看出,菌群结构较简单,样品共含有 6 个菌属,其中乳杆菌属占总菌数高达 83.9%,其余 5 个属细菌占 16.1%。在对样品分成的 15 个分类操作单元(OTU)中,乳杆菌属可分为 9 个 OTU,其中 A1 型数量最多共 38 个克隆子(占样品总数 65.5%),在 NCBI 上进行序列比对分析,与 *Lactobacillus casei*(干酪乳杆菌)(登录号:AB690233)最相似,相似性在 99.5%~100%,干酪乳杆菌在乳酸菌种类中组成重要地位,属于益生菌,因此,食用腌制苋菜梗对于改善人体肠道微生物组成结构是有益的。

硝酸盐和亚硝酸盐是食品加工的常用的添加剂,能使产品呈现良好色泽、防腐以及增强风味的作用^[10-11];但亚硝酸盐具有危害性,可使血液中低铁血红蛋白氧化成高铁血红蛋白,使得血红蛋白的携氧能力下降,引起组织缺氧,并对周围血管有扩张作用;亚硝酸盐还可以与食物或胃中的仲胺类物质作用转化为亚硝胺,可引起食管癌、胃癌、肝癌和

大肠癌等^[14],是强致癌物质之一;因此,亚硝酸盐作为腌制菜食用安全最重要的控制指标之一。在蔬菜加工中亚硝酸盐的主要来源途径之一是硝酸盐被某些细菌还原生成。张加春等^[12]对大白鼠舌表硝酸盐还原菌进行了研究,结果显示肠杆菌科、葡萄球菌属、莫拉氏菌属和奈瑟氏球菌属为优势菌,因此,控制这些细菌种类对于含硝酸盐较高的食品物料中亚硝酸盐质量分数的减少具有重要作用。先期在对蔬菜腌制过程菌群组成及其动态变化研究结果表明,蔬菜中肠杆菌科细菌分布较多;另外,有文献报道一些乳酸菌种属能够降解亚硝酸盐,一方面通过产生酶蛋白来降解,另一方面乳酸菌发酵产酸降低环境中的 pH 也能使亚硝酸盐得到降解^[13];因此,要使腌制蔬菜产品中亚硝酸盐处于较低水平,关键在于如何让乳酸菌占优势而抑制肠杆菌科细菌生长。从腌制成熟苋菜梗细菌组成多样性分析结果可以看出,腌制成熟后乳杆菌为优势菌,比例高达 83.9%,这对腌制样品亚硝酸盐质量分数的控制起到了关键的作用。

另一方面,腌制苋菜梗的亚硝酸盐含量与腌制时间、腌制方法和温度有关^[3],这种变化实际上由微生物组成种群变化有关。腌制时间初期亚硝酸盐含量增高,腌制 7~8 d 时质量分数最高,随后逐渐下降;而亚硝酸盐质量分数随腌制的温度升高而增加。先期在研究榨菜、雪菜及冬瓜低盐腌研究中发现,腌制初期肠杆菌科细菌较多,亚硝酸盐质量分数不断升高,当乳酸菌数量占优势时亚硝酸盐质量分数不断下降;而传统的高盐浓度腌制工艺,其食盐质量浓度达 12 g/dL 以上时,亚硝酸盐产生受到抑制,这些条件都在于调控肠杆菌科细菌和乳酸菌

的生长情况,因此,高盐、密封和添加发酵剂等操作方式均能有效控制亚硝酸盐的形成。为安全起见,采用传统的苋菜梗腌制方法,需经 10 d 以上方可食用^[14]。由本研究样品的 pH 值和亚硝酸盐质量分数分析结果,腌制苋菜梗样品低 pH 以及乳杆菌属细菌占绝对优势,抑制了肠杆菌科细菌的生存和生长,使得虽然低盐体系但亚硝酸盐质量分数远未超标。

4 结 论

1) 16S rDNA 基因克隆文库法测定腌制苋菜

梗样品的菌群结构,共检测出 6 个菌属,即乳杆菌属(*Lactobacillus*)、类香菌属(*Myroides*)、弓形杆菌属(*Arcobacter*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、片球菌属(*Pediococcus*)和产碱菌属(*Alcaligenes*),其中乳杆菌属有 51 个克隆子,占总菌数的 83.9%,其余 5 个属细菌占 16.1%。

2) 腌制苋菜梗样品的盐度和 pH 值为 5.5%和 4.35,亚硝酸盐质量分数为 3.99 mg/kg,未超标。

3) 腌制苋菜梗样品的细菌和乳酸菌含量分别为 8×10^6 CFU/mL 和 1.6×10^6 CFU/mL。

参考文献(References):

- [1] 杨瑞因,李曙轩. 菜用苋菜营养成分变异初探[J]. 浙江大学学报, 1991, 17(2): 205—207.
YANG Rui-ying, LE Shu-xuan. Preliminary studies on the variation of nutrients of vegetable amaranths[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Zhejiangensis*, 1991, 17(2): 205—207. (in Chinese)
- [2] 于淑玲. 药食保健野菜-苋菜的开发利用[J]. 资源开发与市场, 2010, 26(2): 141—142.
YU Shu-ling. Development and utilization of amaranth in wild food and medicine health care[J]. *Resource Development & Market*, 2010, 26(2): 141—142. (in Chinese)
- [3] 张永,张国红. 一起食用霉苋菜梗引起食物中毒的调查[J]. 浙江预防医学, 1999, S1: 47.
ZHANG Yong, ZHANG Guo-hong. Investigation of food poisoning caused by fermented amaranth stem[J]. *Zhejiang Journal of Preventive Medicine*, 1999, S1: 47. (in Chinese)
- [4] 王萍,操璟璟,刘佳佳. 安庆市售叶菜类蔬菜硝酸盐含量的调查及污染评价[J]. 安庆师范学院学报:自然科学版, 2009, 15(3): 75—77.
WANG Ping, CAO Jing-jing, LIU Jia-jia. Investigation and evaluation of nitrate pollution of leafy vegetables in anqing city[J]. *Journal of Anqing Normal College: Natural Science Edition*, 2009, 15(3): 75—77. (in Chinese)
- [5] 杨小鹏,吴清平,张菊梅,等. 多重 PCR 检测无公害畜禽肉和水产品中 4 种致病菌[J]. 微生物学通报, 2005, 32(3): 95—101.
YANG Xiao-juan, WU Qing-ping, ZHANG Ju-mei, et al. Simultaneous detection of common food-borne bacterial pathogens in innocuous poultry and seafood by multiplex PCR assay[J]. *Microbiology China*, 2005, 32(3): 95—101. (in Chinese)
- [6] 陈燕,苏秀榕,宋益银,等. 生食蛭类细菌的生理生化特性研究[J]. 水产科学, 2009, 28(1): 20—23.
CHEN Yan, SU Xiu-rong, SONG Yi-yin, et al. Physiological and biochemical characteristics in bacteria from uncooked ark shells[J]. *Fisheries Science*, 2009, 28(1): 20—23. (in Chinese)
- [7] 燕平梅,张慧,薛文通,等. 16S rRNA 基因序列方法分析传统发酵菜中乳酸菌多样性[J]. 中国食品学报, 2007, 7(2): 119—123.
YAN Ping-mei, ZHANG Hui, XUE Wen-tong, et al. Determination of lactic acid bacterial diversity in the traditional fermented vegetable by 16S rRNA sequence analysis[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2007, 7(2): 119—123. (in Chinese)
- [8] Tamara G A, Zoi P, Hugo H, et al. Diversity of the total bacterial community associated with Ghanaian and Brazilian co-coa bean fermentation samples as revealed by a 16 S rRNA gene clone library[J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2010, 87: 2281—2292.
- [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] Chow C K, Hong C B. Dietary vitamin E and selenium and toxicity of nitrite and nitrate[J]. **Toxicology**, 2002, 180: 195—207.
- [11] 何燕飞,李和生,董亚辉,等. 腌鱼中硝酸盐还原菌的筛选及系统发育分析[J]. **食品工业科技**,2011, 32(8):213—215.
HE Yan-fei, LI He-sheng, DONG Ya-hui. Screening and phylogenetic analysis of nitrate-reducing bacteria in salted fish [J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2011, 32(8):213—215. (in Chinese)
- [12] 张加春,李红,何斌,等. 大白鼠舌表硝酸盐还原菌研究[J]. **云南大学学报:自然科学版**, 1998,20(S4):516—518.
ZHANG Jia-chun, LI Hong, HE Bin, et al. Nitrate reducing bacteria on rat tongue[J]. **Journal of Yunnan University: Natural Science Edition**, 1998, 20(S4): 516—518. (in Chinese)
- [13] 张庆芳,迟乃玉,郑燕. 乳酸菌降解亚硝酸盐机理的研究[J]. **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)
- [14] 龚钢明,管世敏. 乳酸菌降解亚硝酸盐的影响因素研究[J]. **食品工业**, 2010, 5:6—8.
GONG Gang-ming, GUAN Shi-min. Study on influencing factors of degradating nitrite by lactic acid bacteria[J]. **Food Industry**, 2010, 5:6—8. (in Chinese)

科技信息

卫生部关于牛初乳产品适用标准问题的复函

日前,卫生部关于牛初乳产品适用标准问题的复函(卫办监督函〔2012〕335号)中指出:(一)牛初乳是健康奶牛产犊后七日内的乳。用牛初乳为原料生产乳制品的,应当严格遵守相关法律法规规定,其产品应当符合相应的国家标准、行业标准、地方标准和企业标准。对牛初乳粉的检验,可参照现行《牛初乳粉》规范(RHB602—2005)中理化和卫生指标执行。二、在普通食品中添加牛初乳为原料的乳制品,应当按照相关食品标准执行。三、婴幼儿配方食品中不得添加牛初乳以及用牛初乳为原料生产的乳制品。以上要求自2012年9月1日起执行,此前按照相关规定生产或进口的产品可在保质期内继续销售。

[信息来源]卫生部. 卫生部关于牛初乳产品适用标准问题的复函. 卫办监督函〔2012〕335号. (2012—04—16).

美国环境医学研究会提出转基因食品风险警示

美国环境医学研究会(AAEM)提出了转基因食品的《健康风险指引手册》,手册指出,一系列的动物研究实验表明食用“基因食品对健康构成严重威胁”,并要求暂停转基因食品。

“转基因食品和对健康的负面影响之间有各种联系”和“基因改造食物产生严重的健康风险在过敏和免疫功能,生殖健康方面的,以及代谢,生理和遗传健康等方面”。美国环境医学研究会(AAEM)医生提醒所有疾病患者尽量避免食用转基因食品。美国环境医学研究会(AAEM)关于转基因食品的立场呼吁:

- 1、关于转基因食品,立即执行长期的安全测试和转基因食品标签制度。
- 2、医生要教育他们的病人,医学界和公众都应该避免转基因食品。
- 3、医生要考虑到转基因食品对病人病情的作用。
- 4、更独立地进行长期科学研究以积累数据调查转基因食品对人体健康的作用。

[信息来源]光明网. 美国环境医学研究会提出转基因食品风险警示[EB/OL]. (2012—4—14). http://health.gmw.cn/2012-04/14/content_3966120.htm.