

PCR-DGGE 分析东北自然发酵酸菜中乳酸菌多样性

武俊瑞, 岳喜庆, 石璞, 乌日娜*

(沈阳农业大学 食品学院, 辽宁 沈阳 110866)

摘要: 为了探明传统的自然发酵白菜中乳酸菌的多样性及其优势乳酸菌群, 试验主要采用变性梯度凝胶电泳法(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE), 对 5 份采自我国东北地区利用传统方法制作的自然发酵酸菜样品中的乳酸菌多样性进行分析。结果表明, 5 份传统发酵酸菜样品共鉴定出了 9 个乳酸菌种, 呈现出丰富的多样性。其中, 植物乳杆菌、短乳杆菌、清酒乳杆菌和弯曲乳杆菌是酸菜样品的优势菌群, 此外, 还发现了片球菌、乳酸乳球菌、*Hammesii* 乳杆菌和 *Odoratifui* 乳杆菌, 而 *Hammesii* 乳杆菌和 *Odoratifui* 乳杆菌在此前文献报道中利用传统方法没有分离到。

关键词: PCR-DGGE; 酸菜; 乳酸菌; 多样性

中图分类号: TQ 920.1 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2014)02—0127—04

Diversity of Lactic Acid Bacteria Involved in Suan-Cai Using PCR- DGGE

WU Junrui, YUE Xiqing, SHI Pu, WU Rina*

(College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: In order to reveal the diversity and predominant microflora of lactic acid bacteria in traditional natural fermented Suan-cai in China. Five samples of naturally fermented suan-cai broth were collected in the study. Diversity of lactic acid bacteria was analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The results indicated that *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* were the predominant microflora in samples. Cocc-shaped strains of *Pediococcus sp.* and *Lactococcus lactis* were also identified in some samples. Interestingly, *Lactobacillus hammesii* and *Lactobacillus odoratifui* were only found in DGGE profiles, differently from previous literature reports using the traditional method.

Keywords: PCR-DGGE, suan-cai, lactic acid bacteria, diversity

酸菜是将新鲜白菜用盐水在密闭容器中泡制一段时间后形成的发酵蔬菜制品。自然发酵酸菜由

于其独特的风味, 至今仍深受广大北方地区居民的喜爱。自然发酵酸菜这种独特的发酵方式决定了其

收稿日期: 2013-08-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(31000805); 国家 863 计划项目(2011AA100902); 辽宁省教育厅科学技术研究项目(L2012249); 辽宁省高等学校优秀人才支持计划项目(LJQ 2011071); 沈阳农业大学“天柱山英才计划”项目(201105)。

作者简介: 武俊瑞(1977—), 男, 内蒙古呼和浩特人, 农学博士, 讲师, 主要从事食品生物技术方面的研究。E-mail: junruiwu@126.com

* 通信作者: 乌日娜(1979—), 女, 蒙古族, 内蒙古呼和浩特人, 农学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事食品生物技术方面的研究。

E-mail: wrn6956@163.com

中微生物区系的多样性,研究表明,乳酸菌在酸菜自然发酵过程中,发挥着重要的作用^[1-5]。然而,由于对传统的自然发酵酸菜中乳酸菌的多样性及其所扮演的角色,仍然没有较为客观、准确的界定,传统发酵酸菜以其独特的风味和口感,仍占据着酸菜消费的主流,严重制约了其现代化工业生产。因此,研究自然发酵酸菜中乳酸菌的多样性及其所扮演的角色,具有重要的科学意义。

而对复杂的乳酸菌等微生物区系进行研究,采用传统的分离、纯化和鉴定方法,不仅繁杂耗时,而且受培养条件和主观因素影响较大,不能反映出乳酸菌的多样性的真实情况^[6-8]。近年来,基于16S rDNA结合变性梯度凝胶电泳法(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)技术,为有效分析复杂微生物群落及其多样性提供了一种先进手段^[9-11]。

作者采用PCR-DGGE指纹技术,试图解析传统自然发酵酸菜中乳酸菌种群结构,揭示酸菜自然发酵过程中优势菌群组成,为明确自然酸菜发酵机制及其质量控制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

TE 缓冲液,5×TBE 电泳缓冲液,10% SDS, CTAB 溶液,3 mol/L NaAc,5 mol/L NaCl,酚/氯仿/异戊醇(25:24:1),氯仿/异戊醇(24:1),40%聚丙烯酰胺,聚丙烯酰胺凝胶(丙烯酰胺:甲叉=37.5:1),10%过硫酸铵,20% AgNO₃,异丙醇,蛋白酶 K,dNTP,10×PCR Buffer,Loading Buffer,r-Taq 酶,37%甲醛,NaOH,冰醋酸,乙醇,三蒸水,蒸馏水,液氮等试剂,实验中的引物及其它酶制剂全部由上海桑尼生物科技有限公司合成。

1.2 仪器与设备

PL303/01 电子天平,METTLER TOLEDO FE20 型 pH 计,HIRAYAMA HA-300M 全自动高压蒸汽灭菌器,ADVANTEC SP-650 全自动高压干热灭菌器,ZHJH-C1112C 无菌操作台,OLYMPUS BX50 光学显微镜及 OLYMPUS PM-2 摄像系统,菲恰尔 TDL-SA 离心机,LRH-250 生化培养箱,Eppendorf TGL-168 高速台式离心机,UVP GDS-8000 凝胶成像仪,北京六一 DYY-12 电泳仪,Eppendorf 5810 高速冷冻离心机,TATIEC 电热恒温水浴锅,ND-1000 型微量紫外分光光度计、Bio-Rad 变性梯度凝胶电

泳仪(DCode Universal Mutation Detection System)、Applied biosystems 公司的 PCR 仪、MJ RESEARCH PTC-200 梯度 PCR 扩增仪。

1.3 试验方法

1.3.1 样品的采集及预处理 供试样品为5份采集自东北地区农家利用传统方法制作的自然发酵酸菜发酵液。在样品中加入5 mL PBS 缓冲液,涡旋振荡30 s,然后350 g 离心5 min,收集上清液,12 000 g 离心5 min后,弃上清液,在沉淀总加入800 μL TE 缓冲液回溶,用于总DNA的提取。

1.3.2 样品总DNA的快速提取 采用FastPrep 结合CTAB法进行总DNA的快速提取。具体步骤如下:取预处理的样品于2 mL 离心管中,加入0.5 g 玻璃珠,置于FastPrep 核酸快速提取仪中,6.0 m/s 振荡30 s;加入SDS裂解液50 μL,冰浴10 min后14 000 g 离心10 min,取上清液,加入80 μL NaCl/dL CTAB 溶液,65 °C水浴20 min,加入等体积酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)混匀,静置2 min,12 000 g 离心10 min,取上清液,等体积加入氯仿/异戊醇混匀,静置2 min,再次12 000 g 离心10 min,取上清液,加入500 μL 异戊醇和50 μL 3 mol/L NaA,-20 °C 放置30 min,12 000 g 离心10 min,沉淀用70%乙醇洗涤两次后,加入50 μL TE 缓冲液回溶,-20 °C 保存备用^[12]。

1.3.3 PCR 扩增 以提取的总DNA为模板,采用16S rDNA 基因V3区具有特异性的引物对:V3F+GC:(5'-CGCCC GCCGCGCGCG GCGGG CGGGG CGGGG GCACG GGGGGACTCC TACGG GAGGC AGCAG-3')和V3R:(5'-ATTACC GCG GCT GCT GG-3'),进行16S rDNA的PCR扩增,扩增产物片段长约180 bp。扩增反应体系(50 μL)包括:50 ng 基因组DNA模板;2 μL dNTP (2.5 mmol/L, TaKaRa);两条引物终浓度均为0.4 mol/L;0.5 μL DNA Taq 聚合酶(1.5 U, TaKaRa);5 μL 10×PCR Buffer。反应参数:94 °C预变性5 min,35个循环,包括94 °C变性30 s,55 °C退火45 s,72 °C延伸40 s,最后72 °C延伸10 min。PCR反应的产物用10 g/dL 琼脂糖凝胶电泳检测^[13-14]。

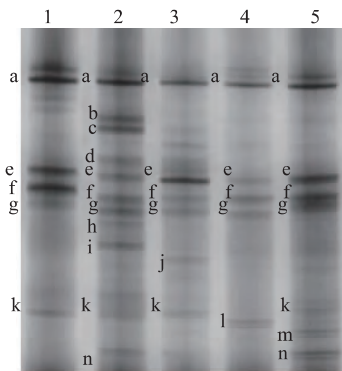
1.3.4 DGGE 及图谱分析 采用Bio-Rad 公司DcodTM 的基因突变检测系统(DCode Universal Detection System Instrument)对PCR反应产物进行分离。变性剂质量浓度为27~52 g/dL,在150 V 电压

下,60 °C电泳6.5 h。电泳完毕后,利用银染法对凝胶进行染色。将银染好的凝胶用扫描仪成像,得到 PCR-DGGE 图谱,对上述扫描后的图片进行分析,标记特异性条带,并回收条带^[15],由上海桑尼生物技术有限公司测序,测序结果进行 Blast 比对鉴定。

2 结果与分析

采用 CTAB-SDS-液氮冻融法提取酸菜样品细菌总 DNA,并特异扩增了细菌 16S rDNA V3 区,其 PCR-DGGE 图谱见图 1。

由图 1 可知,酸菜样品细菌 DNA 的 PCR-DGGE 图谱上共找到 14 条特异性条带,对其编号、切割、回收、测序,并登录 NCBI 数据库进行 Blast 同源性对比分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>),对比结果见表 1。



注:1,2,3,4,5 表示 5 份酸菜样品;a,b,c,d,e,f,g,h,i,j,k,l,m,n 表示选取的待测条带。

图 1 酸菜样品细菌总 DNA 的 PCR-DGGE 图谱

Fig. 1 DGGE profiles of PCR-amplified DNA from the bacterial population in each suan-cai sample

由表 1 可知,条带 a 的比对结果为植物乳杆菌,5 份样品均检测出该条带;条带 b 的比对结果为 *Hammesii* 乳杆菌,只有样品 2 检测出该条带;条带 c 的比对结果为乳杆菌属种,样品 2 检测出了该条带,样品 3 也有较模糊的对应条带;条带 e 的比对结果为短乳杆菌,5 份样品均检测出了该条带,但样品 2、4 条带较弱;条带 f 的比对结果为清酒乳杆菌,5 份样品均检测出了该条带,但样品 2、3、4 的条带较弱;条带 g、h 的比对结果为弯曲乳杆菌,其中,5 份样品均检测出了 g 条带,但只有样品 2 检测出了 h 条带;条带 k 的比对结果是乳酸乳球菌,样品 1、2、3、5 中均检测出了该条带,而样品 4 中没有检测

出该条带;条带 l 的比对结果为 *Odoratitofui* 乳杆菌,只有样品 4 检测出了该条带;条带 n 的比对结果为非培养片球菌属种,样品 2 和 5 检测出了该条带;而条带 d,i,j,m 在 GenBank 现有数据库中无比对出结果,可能是不可培养微生物种类,还要做进一步的研究才能对鉴定其属种,样品 2 检测出了 d 条带,样品 2 检测出了 i 条带,样品 3 检测出了 j 条带,样品 5 检测出了 m 条带。

表 1 酸菜样品中细菌 16S rDNA V3 区 PCR-DGGE 特异性条带比对结果

Table 1 Identification of the bands obtained by PCR-DGGE of suan-cai bacterial communities 16S rDNA based on BLAST comparison in GenBank

条带编号	鉴定结果	同源性/%	序列号
a	植物乳杆菌	100	JQ686202
b	<i>Hammesii</i> 乳杆菌	99	JQ686206
c	乳杆菌属种	96	JQ686207
e	短乳杆菌	100	JQ686203
f	清酒乳杆菌	100	JQ686204
g	弯曲乳杆菌	100	JQ686205
h	弯曲乳杆菌	100	JQ686205
k	乳酸乳球菌	95	JQ686210
l	<i>Odoratitofui</i> 乳杆菌	99	JQ686208
n	非培养片球菌属种	100	JQ686209
d, i, j, m	未鉴定出		

由上述结果可知,通过 PCR-DGGE 图谱分析、条带测序和 Blast 同源性比对,5 份传统发酵酸菜样品共鉴定出了 9 个乳酸菌种,呈现出了较为丰富的乳酸菌多样性。5 份传统发酵酸菜样品中的乳酸菌分布既有共性,又存在着一定的差异。在本试验的 PCR-DGGE 图谱中,所有样品均检测出来了 a、e、f 和 g 四条条带,为 5 份酸菜样品中的共有条带,其对应的比对结果为植物乳杆菌、短乳杆菌、清酒乳杆菌和弯曲乳杆菌,由此可以推断,植物乳杆菌、短乳杆菌、清酒乳杆菌和弯曲乳杆菌四种菌为传统发酵酸菜中的优势菌群。同时,5 份酸菜样品在本试验中呈现较大差异性,得到的条带数量和清晰程度均有所不同,其中,样品 2 中检测出了 11 条清晰的条带,呈现出较为丰富的乳酸菌多样性。此外,*Hammesii* 乳杆菌和 *Odoratitofui* 乳杆菌在此前文献中利用传统方法并未分离到。

3 结语

东北传统发酵酸菜中蕴藏着丰富的乳酸菌资源,并且呈现出丰富的多样性。应用 PCR-DGGE 技术方法对东北自然发酵酸菜中乳酸菌多样性进行

研究,可较为客观地反应传统发酵酸菜中的乳酸菌等微生物区系,对于揭示酸菜自然发酵过程中优势菌群组成,具有较高的参考价值。今后可用于其他具有复杂微生物体系的发酵食品研究中。

参考文献:

- [1] 刘晓辉,陈顺,高晓梅,等. 酸菜中乳酸菌的分离筛选与鉴定研究[J]. 中国酿造,2009,28(2):62-64.
LIU Xiaohui, CHEN Shun, GAO Xiaomei, et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria in pickled cabbage [J]. **China Brewing**, 2009, 28(2): 62-64. (in Chinese)
- [2] Chao S H, Wu R J, Watanabe K, et al. Diversity of lactic acid bacteria in suan-tsai and fu-tsai, traditional fermented mustard products of Taiwan[J]. **Int J Food Microbiol**, 2009, 135(3): 203-210.
- [3] 武俊瑞,李欣,李晓忱,等. 自然发酵酸菜汁中乳杆菌的分离鉴定[J]. 食品科学,2012,33(15):191-194.
WU Junrui, LI Xin, ZHANG Miao, et al. Isolation and identification of *Lactobacillus* strains from naturally fermented sauerkraut [J]. **Food Science**, 2012, 33(15): 191-194. (in Chinese)
- [4] 张天琪,张雪,孔保华,等. 东北酸菜中产胞外多糖乳杆菌的分离筛选及其在酸乳中的应用[J]. 中国乳品工业,2009,37(7):8-11.
ZHANG Tianqi, ZHANG Xue, KONG Baohua, et al. Isolation and screening of exopolysaccharide-producing *lactobacilli* from northeast sauerkraut and their applications in yoghurt[J]. **China Dairy Industry**, 2009, 37(7): 8-11. (in Chinese)
- [5] 于志会,李常营,张雪,等. 酸菜中降胆固醇功能植物乳杆菌的体外筛选[J]. 食品与生物技术学报,2011,30(3):398-402.
YU Zhihui, LI Changying, ZHANG Xue, et al. In vitro cholesterol lowering activity of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* isolated from Chinese sauerkraut[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2011, 30(3): 398-402. (in Chinese)
- [6] Iacumin L, Cecchini F, Manzano M, et al. Description of the microflora of sourdoughs by culture-dependent and culture-independent methods[J]. **Food Microbiol**, 2009, 26(2): 128-135.
- [7] 梁新乐,朱扬玲,蒋予箭,等. PCR-DGGE 法研究泡菜中微生物群落结构的多样性[J]. 中国食品学报,2008,8(3):133-137.
LIANG Xinle, ZHU Yangling, JIANG Yujian, et al. Diversity of bacterial communities of pickle by PCR-DGGE [J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, 2008, 8(3): 133-137. (in Chinese)
- [8] 曲媛媛,魏利. 微生物非培养技师原理与应用[M]. 北京:科学出版社,2010.
- [9] 束玮玮,韩衍青,徐幸莲,等. 超高压处理抑制低温烟熏火腿中的优势腐败菌[J]. 食品与生物技术学报,2011,30(6):945-949.
SHU Weiwei, HAN Yanqing, XU Xinglian, et al. Inactivation of the predominant spoilage bacteria in sliced cooked ham by high pressure[J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, 2011, 30(6): 945-949. (in Chinese)
- [10] Luca S, Sara V, Douwe van S, et al. Combination of multiplex PCR and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis for monitoring common sourdough-associated *Lactobacillus* species[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2006, 72(5): 3793-3796.
- [11] Zhang J C, Liu W J, Sun Z H, et al. Diversity of lactic acid bacteria and yeasts in traditional sourdoughs collected from western region in inner mongolia of China[J]. **Food Control**, 2011, 22(5): 767-774.
- [12] Wu J, Zhang J, Shi P, et al. Bacterial community involved in traditional fermented soybean paste dajiang made in northeast China [J]. **Ann Microbiol**, 2013, DOI: 10.1007/s13213-013-0604-2.
- [13] Renouf V, Claisse O, Miot-Sertier C, et al. Lactic acid bacteria evolution during wine making: use of rpoB gene as a target for PCR-DGGE analysis[J]. **Food Microbiol**, 2006, 23(2): 136-145.
- [14] Cocolin L, Manzano M, Cantoni C, et al. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16s rDNA geneV1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausage [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2001, 67(11): 5113-5121.
- [15] 高娃,于洁,乌兰,等. 蒙古国传统发酵乳中部分乳杆菌 16S rRNA-RFLP 的分类[J]. 中国乳品工业,2010,38(1):4-7.
GAO Wa, YU Jie, WU Lan, et al. Classify research of *lactobacillus* from traditional fermented milk in mongolia by 16S rRNA-RFLP methods[J]. **China Dairy Industry**, 2010, 38(1): 4-7. (in Chinese)