

泡菜发酵过程中菌相变化的研究

闫颖娟^{1,2}, 夏秀东³, 李爱茹², 董明盛^{2*} (1. 忻州师范学院生物系, 山西忻州 034000; 2. 南京农业大学食品科技学院, 江苏南京 210095; 3. 江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏南京 210014)

摘要 [目的]研究泡菜发酵过程中的菌相变化过程。[方法]以自制泡菜为研究对象,利用变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术对泡菜发酵过程中和泡菜成品的菌相进行了分析。[结果]发酵过程中的泡菜电泳图上的条带从发酵第1天的13条逐渐减少到第4天的11条再到第7天的9条,而泡菜成品中的条带则只有明显的2个条带。[结论]随着发酵过程的进行,泡菜最初的杂菌逐渐被优势菌抑制并最终取代。

关键词 发酵; 泡菜; 聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳

中图分类号 TS201.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)31-0037-03

Study on Microflora Changes during Fermentation of Pickles

YAN Ying-juan^{1,2}, XIA Xiu-dong³, LI Ai-ru², DONG ming-sheng^{2*} (1. Department of Biology, Xinzhou Teachers University, Xinzhou, Shanxi 034000; 2. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095; 3. Institute of Agro-product Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing, Jiangsu 210014)

Abstract [Objective] In order to analyze the changes of microflora during the fermentation of pickles. [Method] With homemade pickles as research object, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) was applied. [Result] The results showed that the strips were gradually reduced from 13 strips at day 1 to 11 strips at day 4 and to 9 strips at day 7. There were only 2 strips in the end product. [Conclusion] The original mixed bacteria were gradually replaced by dominant bacteria.

Key words Fermentation; Pickles; PCR-DGGE

泡菜是一种独特的乳酸发酵蔬菜制品,人们经常食用,可摄入大量的乳酸菌及乳酸等代谢产物,它们能调节肠道微生态平衡,达到预防疾病和保健的目的^[1]。通过对国内外若干种含有乳酸菌的药物及口服液等商品进行活菌数检测表明,泡菜汁中活乳酸菌数远远高于此类商品,而且价廉物美、食用方便。家庭制作泡菜,不仅可作为传统佐食,而且可成为具有我国传统特色的、廉价的、高效的天然微生态调节剂,这对提高我国人民身体健康水平有着积极的意义。但是,由于植物本身就带有大量的微生物,所以在腌制过程中除乳酸菌生长繁殖以外,还会有多种微生物同时生长,对泡菜的风味和质量有较大的影响。因此,对泡菜发酵过程中菌相的变化进行深入研究有着重要的意义。

变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)是目前研究微生物遗传多样性和种群动态性最有力的分子生物学技术。1993年, Muyzer等^[2]首次将该技术应用于微生物生态的研究,在近10年的时间里已被广泛应用于各种环境微生物生态的研究。DGGE的原理是在碱基序列上存在差异的不同DNA双链解链时需要不同的变性剂浓度,DNA双链一旦解链,其在聚丙烯酰胺凝胶中的电泳速度将会急剧下降。因此,将聚合酶链式反应(PCR)扩增得到的等长DNA片段加入到含有变性剂梯度的凝胶中进行电泳,序列不同的DNA片段就会在各自相应的变性剂浓度下变性,发生空间构型的变化,导致电泳速度急剧下降,停留在与其相应的不同变性剂梯度位置,染色后可以在凝胶上呈现分开的条带^[3],可以直接用来分析细菌染色体基因^[4]。采用聚

合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)测定方法可以取代传统的纯培养方法,克服了采用选择培养基进行菌种分离时的种种困难。所以笔者选用PCR-DGGE的方法对泡菜发酵过程中菌相的变化进行分子生物学方面的鉴定,为进一步深入了解泡菜这一自然发酵过程,寻找如何减少杂菌生长的方法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 原料:白菜,购自苏果超市;泡菜成品发酵液,南京农业大学微生物实验室提供。主要仪器:LRH-150型生化培养箱,上海益恒实验仪器有限公司;YJ-875型医用净化工作台,吴江市生化净化设备厂;DJ300型电子天平,中国轻工业机械总公司常熟衡器工业公司;手提式高压蒸汽消毒器,上海医用核子仪器厂;DUG-9140型电热恒温鼓风干燥箱,上海益恒实验仪器有限公司;HH-6型数显恒温水浴锅,常州国华电器有限公司;WD900型微波炉,顺德市格兰仕电器实业有限公司;DYY-2C型电泳仪,北京市六一仪器厂;FR-980型电泳图像分析系统,上海复日科技有限公司;PCR仪、DGGE变性梯度凝胶电泳系统,Bio-Rad;D-37520型离心机,Osterode德国。主要试剂:PCR试剂盒和DNA Marker均购自北京清华天为生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 泡菜的制作。将大白菜切分装入三角瓶中压实,倒入含3%白砂糖、2%食盐的水溶液,封瓶放入28℃培养箱发酵7d。

1.2.2 菌种的分子生物学鉴定。

1.2.2.1 基因组DNA提取^[5]。取样:每天从三角瓶中提5mL的发酵液加入离心管中,离心12500r/min转5min,去上清后,用5mL无菌水重悬沉淀,再离心12500r/min转5min,去上清,做2~3个重复;加入500μL TES缓冲液(含有20mg/mL溶菌酶),37℃水浴锅保温0.5h后,加入

基金项目 国家自然科学基金青年基金项目(31501460)。

作者简介 闫颖娟(1987-),女,山西忻州人,讲师,硕士,从事发酵工程研究。*通讯作者,教授,博士生导师,从事食品微生物与发酵工程研究。

收稿日期 2016-09-14

125 μL 20% 的 SDS 提取液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中保温 15 min; 加入等体积的酚-氯仿, 混匀, 离心 7 000 r/min 转 5 min, 待分层后, 取上层(重复 3 次氯仿抽提); 加入等体积的异丙醇, 沉淀 DNA, 放入 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱 0.5 h; 离心 12 500 r/min 转 30 min, 取沉淀, 去上清, 加入 1 mL 70% 乙醇, 重悬沉淀, 离心 12 500 r/min 转 5 min, 去上清, 离心管倒置至无水珠挂壁, 加入 50 μL TES 缓冲液, 放入 -18 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

1.2.2.2 琼脂糖凝胶电泳。称取 1.0 g 琼脂糖, 加 100 mL 电泳缓冲液($1\times\text{TAE}$)加热熔化, 直至完全溶解呈透明, 胶液冷至 60 $^{\circ}\text{C}$ 时, 加入 EB 贮存液 5 μL , 混匀, 缓慢浇注于制胶模板上, 在胶一端插上梳子, 待胶体凝固后, 拔出梳子, 将模具置于电泳槽中, 加入 $1\times\text{TAE}$ 缓冲液, 液面高于胶面 2 ~ 3 mm, DNA 样品中以 1:5 加入加样缓冲液, 上样, 接通电源 100 mV, 电泳 1 h, 切断电源, 取出凝胶, FR-980 电泳图像分析系统观察拍照。

1.2.2.3 PCR 引物及反应体系。细菌通用引物为 EUB-338GC for: 5' > CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGC GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG < 3'; EUB-518 rev: 5' > ATT ACC GCG GCT GCT GG < 3'。

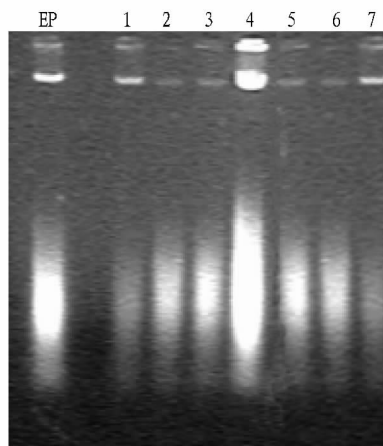
PCR 反应体系: 2 μL DNA, 2 μL EUB-338GC, 2 μL EUB-518, 5 μL PCR Buffer, 4 μL dNTP, 0.5 μL *Taq* DNA 聚合酶, 34.5 μL ddH₂O, 总体积为 50 μL 。PCR 反应参数: 模板热变性在 94 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 5 min, 模板热变性在 94 $^{\circ}\text{C}$ 下 10 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 下退火 20 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 下延伸 40 s, 共进行 35 次循环, 最后 68 $^{\circ}\text{C}$ 下延伸 7 min。产物检测: 同琼脂糖凝胶电泳。

1.2.2.4 DGGE 变性梯度凝胶电泳。将大、小 2 块玻璃板, 2 个间隔条, 1 个样品梳洗净干燥待用, 用夹子夹住; 底部涂上一层薄的凡士林, 移至固定架的橡皮条上固定; 用不同体积的 2 种丙烯酰胺贮存液配制要求浓度的变性分离胶、浓缩胶; 清洗梯度合成器并干燥, 并关掉两槽之间的活栓, 将出口针头置于大小玻璃之间并固定; 将高低 2 种浓度的变性剂溶液加入 10% 过硫酸胺 (APS) 50 μL 后加到梯度合成器的左右槽中; 打开恒流泵开关以及两槽的开关, 分离胶灌完后, 将针头移至废液瓶, 冲洗梯度合成器的两槽, 开泵排出水分, 关闭活栓并擦干; 在浓缩胶中加入 10% APS 50 μL , 并将浓缩胶加入左槽; 打开梯度合成器的泵, 先用 19 mL/min 速度直至浓缩胶运行至距离针头约 1 cm 处, 再用 1.1 mL/min 速度, 以后逐渐增大到 3.0 mL/min 将浓缩胶灌入 2 层玻璃之间; 浓缩胶充满后, 在其的顶部插入样品梳, 凝固 1 h 以上。在电泳槽中加入新配制的电泳缓冲液 ($0.5\times\text{TAE}$), 打开电泳仪预热以使得电泳缓冲液温度达到 60 $^{\circ}\text{C}$; 去掉梳子, 用电泳缓冲液冲洗加样槽和胶底部的凡士林, 并将其固定在电泳槽内; 点样 (PCR 产物与加样液缓冲液 5:1 混合); 盖上电泳仪的盖子, 电泳, 先 200 V, 10 min, 随后 85 V, 16 h; 将胶体从电泳槽中取出后放在塑料容器中, 加入 200 mL Cairns' 固定液, 摇 3 min; 将 Cairns' 固定液倒在容器中(备用); 添加 200 mL 银染溶液在摇床上摇 10 min; 弃去银染溶液, 用蒸馏水清洗胶及容器; 添加新鲜蒸馏水, 添加显影液, 直至条带清晰为止; 弃

去显影液, 加入 Cairns' 固定液, 摇 5 min; 弃去固定液, 加入蒸馏水, 摇 2 min, 弃去蒸馏水, 加入 Cairns' 保存液, 摇 7 min; 取出胶体置于洁净玻璃板上, 干燥, 扫描。

2 结果与分析

2.1 发酵液基因组 DNA 的提取 从泡菜发酵过程中的发酵液中提取 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳。图 1 结果表明, 从发酵泡菜和成品泡菜中提取的 DNA 条带清晰, 说明该试验所用 DNA 提取方法适用于发酵泡菜中细菌 DNA 的提取。DNA 条带下方亮条带是 RAN 条带, 不会影响后续试验。



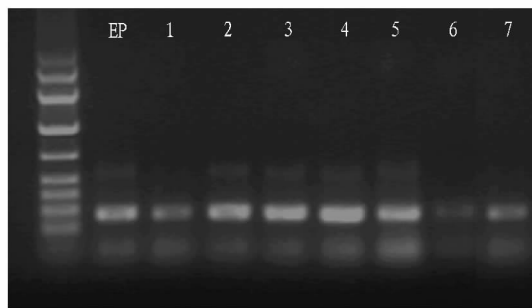
注: EP. 成品; 1 ~ 7. 从第 1 ~ 7 天的发酵液中提取的 DNA。

Note: EP. end product; 1 ~ 7. DNA extracted from pickles juice from day 1 to day 7.

图 1 泡菜发酵液 DNA 电泳图谱

Fig. 1 Electrophoregrams of DNA in pickle juices

2.2 16S rDNA 可变区 DNA 扩增 针对不同菌种的 16S rDNA 可变区含有不同的碱基对, 以此为靶基因用 PCR-DGGE 进行区别。先将提取的 DNA 进行 PCR 扩增, 获得 PCR 产物。如图 2 所示, 试验所提取的泡菜发酵液 DNA 经 PCR 扩增, 其产物的大小为 200 ~ 300 bp, 小于 500 bp, 可进行 DGGE 电泳。



注: EP. 成品; 1 ~ 7. 从第 1 ~ 7 天的发酵液中提取的 DNA。

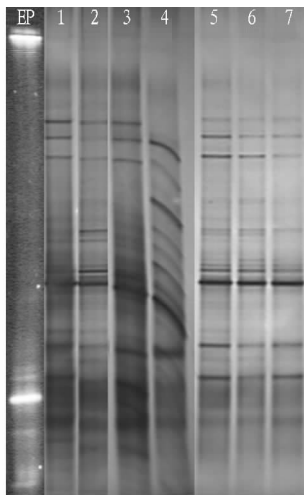
Note: EP. end product; 1 ~ 7. DNA extracted from pickles juice from day 1 to day 7.

图 2 16S rDNA 可变区 DNA 扩增凝胶电泳

Fig. 2 Electrophoregrams of 16S rDNA

2.3 PCR-DGGE 分析 图 3 是泡菜成品以及发酵第 1 ~ 7 天产物的 DGGE 图谱, 图谱上的泳带反映了发酵过程中的优势菌群, 泳带数量和位置的复杂性说明了菌群的多样性。该

试验通过对发酵过程中的不同时期发酵产物 DGGE 分析,来监测发酵液中细菌群体变化过程。图 3 显示,发酵过程中的发酵产物在同一 DGGE 凝胶上进行图谱分析表明,发酵产物第 1 天的一些优势泳带在发酵第 5 天时消失。另一方面,没有新的泳带在第 5 天后出现。从总体看,随时间延长,条带的数量逐渐减少。可以看出,在发酵前 4 d 内,DGGE 图谱有变化,而在发酵第 5 天样本 DGGE 间的相似值最高,看不出有显著的变化,这与赵书欣等^[6]的研究结果一致,发酵时间应为 5 d,第 5 天后其细菌群体变化速度较稳定。这些结果说明,泡菜发酵过程中细菌群体在发酵前 4 d 内有变化,而后缓慢,这可能是大多数杂菌的生长受到了抑制,逐渐被优势菌落所取代的结果。然而,泡菜成品仅有 2 条清晰的条带,可知此产品中已经没有杂菌,只剩下了 2 个菌群。这可能是由于发酵泡菜在储藏过程中优势菌继续生长,杂菌被进一步抑制而造成的。



注:EP. 成品;1~7. 从第 1~7 天的发酵液中提取的 DNA。

Note:EP. end product; 1~7. DNA extracted from pickles juice from day 1 to day 7.

图 3 PCR-DGGE 电泳

Fig.3 Electrophoregrams of PCR-DGGE

3 结论与讨论

国外有的学者在应用 DGGE 进行研究时,对得到的 DGGE 单个条带测序从而进行系统发育分析,其结果与直接形态观察或纯培养结果均呈现出一致性,证明了 DGGE 是一种快速、可靠的方法^[7-8]。该试验利用 DGGE 检验了泡菜在发酵过程中的菌相变化,但未进行 DNA 的测序,不能确定具体的菌种,也无法详细分析泡菜发酵过程中优势菌落,以及

杂菌的类别。但赵书欣等^[6]的研究结果证明,这些菌落为乳酸菌、芽孢杆菌、假单胞菌、肠杆菌属欧文氏菌等。在后续试验中应进行 DNA 的测序、鉴别菌种,并寻找适合优势菌群快速生长的发酵条件,确定发酵过程中的动态参数,对发酵过程进行监控。

Vallaes 等^[9]发现,DGGE 法并不能对样品中所有的 DNA 片段进行分离。Muyzer 等^[2]指出,DGGE 法只能对微生物群落中数量上大于 1% 的优势种群进行分析。因此以上分析具有一定的局限性,同时由于不同的菌落所需的溶菌酶的不同,以及 PCR 引物的不同,都会对图谱产生影响。理论上,只要选择的电泳条件如变性剂梯度、电泳时间、电压等足够精细,DGGE 技术对于 DNA 片段的分辨率可以达到一个碱基差异水平,所以 PCR-DGGE 技术在菌落分析中仍大量使用。该研究结果表明,在泡菜的发酵过程中细菌群体在发酵前 4 d 内有变化,而后缓慢,电泳图上的条带从第 1 天的 13 条到第 4 天的 11 条再到第 7 天的 9 条,说明发酵开始时的大多数菌群在发酵过程中逐渐被优势菌所取代。

泡菜在发酵初期含有大量的杂菌,在发酵过程中优势菌会抑制杂菌的生长,并最终取代杂菌;在该泡菜制作条件下发酵 4 d 便可使发酵泡菜体系中的菌相达到稳定状态,但是泡菜经储藏后优势菌会进一步抑制其他细菌并最终占绝对优势。

参考文献

- [1] 赵文红,黄小丹,范敏华,等. 自然发酵泡菜中乳酸菌的分离及特性研究(二)[J]. 现代食品科技,2003,19(2):36-37.
- [2] MUYZER G,DE WAAL E C,UITERLINDEN A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. Appl Environ Microbiol,1993,59(3):695-700.
- [3] MUYZER G,SMALLA K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis(TGGE) in microbial ecology[J]. Antoni Van Leeuwenhoek,1998,73(1):127-141.
- [4] 张彤,方汉平. 微生物分子生态技术:16S RNA/DNA 方法[J]. 微生物学通报,2003,30(2):97-101.
- [5] MARMUR J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms[J]. Journal of molecular biology,1961,3(2):208-218.
- [6] 赵书欣,张春艳. 不同方法腌制渍菜过程中的菌相分析[J]. 吉林农业大学学报,1999,21(1):83-86.
- [7] CASAMAYOR E O,SCHÄFER H,BAXERAS L,et al. Identification of and spatiotemporal difference between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lake: Comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis[J]. Appl Environ Microbiol,2000,66(2):499-508.
- [8] SMIT E,LEEFANG P,GOMMANS S,et al. Diversity and seasonal fluctuation of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods[J]. Appl Environ Microbiol,2001,67(5):2284-2291.
- [9] VALLAES 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(3):279-285.
- [10] KIM D H,CHOI J O,KIM J,et al. Application of a polymeric solid phase extraction for the analysis of sulfonamides in milk by LC/MS[J]. Journal of liquid chromatography & related technologies, 2003, 26(7): 1149-1159.
- [5] 赵飞,高广慧. 超高效液相色谱-串联三重四级杆质谱测定蜂蜜中氯霉素的含量[J]. 山东化工,2016,145(13):82-84.
- [6] PANG G F,CAO Y Z,FAN C L,et al. Liquid chromatography-fluorescence detection for simultaneous analysis of sulfonamide residues in honey[J]. Analytical and bioanalytical chemistry,2003,376(4):534-541.
- [7] 房超,王捍东,王宗元,等. 磺胺类药物残留及酶免疫法检测的研究[J]. 上海畜牧兽医通讯,2004(2):16-17.
- [8] CLIQUET P,COX E,HAASNOOT W,et al. Extraction procedure for sulfachloropyridazine in porcine tissues and detection in a sulfonamide-specific enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)[J]. Analytica chimica acta, 2003,494(1/2):21-28.
- [9] 杨勇,罗奕,吴琳琳,等. 薄层色谱法测定牛奶、蜂蜜中 6 种氟喹诺酮类药物残留[J]. 江苏农业科学,2015,43(10):380-383.

(上接第 36 页)