

传统发酵香肠中菌种的分子生物学鉴定

Identification of microorganisms in traditional sausage using molecular methods

李丙超 胡卫东 唐文才 李兴玲

LI Bing-chao HU Wei-dong TANG Wen-cai LI Xing-ling

钟 强 李再新 张 智

ZHONG Qiang LI Zai-xin ZHANG Zhi

(四川理工学院化学与制药工程学院, 四川 自贡 643000)

(School of Chemical and Pharmaceutical Engineering, Sichuan University of Science and Engineering,
Zigong, Sichuan 643000, China)

摘要:为探究发酵香肠的微生物菌群的作用机理,利用传统的微生物学平板稀释分离法,分离出发酵香肠中酵母、大肠杆菌和乳酸菌等微生物,并提取其 DNA,PCR 扩增 16S rDNA、ITS 后测序,将测序结果与 NCBI 基因库中序列进行比对,MegAlign 软件进行序列分析并构建系统发育树,结果表明,发酵香肠中富含德氏酵母、YSY1-6 腐生葡萄球菌、德式乳酸乳杆菌亚种。

关键词:发酵香肠;16S rDNA;ITS;同源性比较

Abstract:To explore the mechanism of the microbial flora in fermented sausage, traditional methods of microbiological plate dilution and biochemical detection were performed to isolate and culture yeast, *E. coli*, lactic acid bacteria and other microorganisms. DNA of these suspected strains were extracted, and 16S rDNA and ITS were amplified using PCR technique, and then the amplification products were sequenced. After the obtained gene sequences were compared with those in GenBank by sequence homology comparison, three high abundance suspected strains were identified as: *Debaryomyces*, *Staphylococcus saprophyticus* strain YSY1-6 and *Lactobacillus delbrueckii subsp* respectively.

Keywords:fermented sausages; 16SrDNA; ITS; homology analysis

发酵香肠亦称生香肠,是利用自然界有益微生物发酵生产和保存的一种肉食制品。发酵香肠的制作是将切成小块猪、牛和羊等瘦肉和部分肥肉与盐、糖和香辛料等混合,灌入肠衣,经微生物发酵、风干而制成具有特殊发酵香味的肉制品^[1,2],或者采用人工添加微生物发酵剂进行制品发酵,调节

微生物发酵群落变化,形成特殊风味。人工添加微生物制剂可以缩短发酵时间,改善香肠的色泽和风味,抑制有害杂菌生长^[3],并延长香肠的保存期^[4]。

中国发酵香肠历史悠久,类型众多,主要分为川味香肠和广味香肠。其主要区别为广味甜,川味辣。在发酵过程中,适合在香肠中生长的微生物种类较多,但有益于香肠发酵形成特殊风味口感的微生物并不是很多^[5]。为筛选和鉴定香肠发酵的有益微生物,克服传统微生物物种鉴定的不足,本研究拟通过从传统优良发酵香肠中分离、筛选菌株,其后通过真菌 ITS 以及细菌 16S rDNA 分子鉴定,构建系统发育树^[6],确定其属种,以期将获得的优良肉制品菌种发酵剂应用于发酵肉和发酵香肠的生产中,进一步提高发酵肉制品品质。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 菌株

菌株:从四川简阳某肉制品市场的传统羊肉香肠中采集。

1.1.2 试剂

蛋白胨、牛肉膏、酵母浸膏、琼脂:分析纯,北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;

蛋白酶 K:30 U/mg,德国 Merck 公司;

SDS:分析纯,德国 Sigma 公司;

PCR 所用试剂:Taq 酶 2.5 U/ μ L、dNTPs 2.5 mmol/L、10 $\times$ PCR buffer 等,大连宝生物工程有限公司。

1.1.3 主要仪器与设备

电子分析天平:SA5103N 型,梅特勒—托利多仪器(上

基金项目:四川省教育厅重点项目(编号:12ZA088);四川理工学院人才工程项目(编号:2011RC16)

作者简介:李丙超(1987—),男,四川理工学院在读硕士研究生。

E-mail: 946989352@qq.com

通讯作者:张智

收稿日期:2015-01-15

海)有限公司;
生化培养箱:SHP-100 型,金坛市晶玻实验仪器厂;
凝胶成像仪:TS2-310 型,美国 UVP LLC 公司;
Eppendorf PCR 仪:Mastrcycler nexus gradient 型,美国 Eppendorf 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种的分离 无菌条件下取 25 g 香肠于 225 mL 无菌生理盐水中,充分振荡,即为 10⁻¹ 样品稀释液,用生理盐水按 10 倍稀释比稀释至 10⁻⁶。分别取 10⁻⁴,10⁻⁵,10⁻⁶ 样品稀释液涂布于 MRS(蛋白胨 10 g,牛肉膏 10 g,酵母浸膏 5 g,K₂HPO₄ 2 g,柠檬酸二铵 2 g,乙酸钠 5 g,葡萄糖 20 g,吐温 80 mL,MgSO₄·7H₂O 0.5 g,MnSO₄ 0.25 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 值 6.2~6.4,121 ℃灭菌 20 min)固体平板,33 ℃培养 48 h。根据培养皿上菌落的颜色、表面光滑度、干湿度以及边缘形态将菌落进行初筛。采用反复划线分离单菌落的方法,将初筛的菌株进一步分离,选择没有蔓延且单独的菌落,并镜检分析。

1.2.2 生化试验检测 将分离培养的疑似酵母菌接种于 YPD、TTC 显色平板,30 ℃培养 24 h,观察显色结果。将分离的疑似葡萄球菌和疑似乳酸菌分别接种到灭菌脱脂牛奶(含石蕊 25 g/L),37 ℃培养 24~36 h,另将此两种菌进行过氧化氢触酶试验即将对数生长期的细菌挑取到洁净玻片上,并立即滴加新鲜的 3%过氧化氢,立即观察有无气泡。

1.2.3 菌株基因组 DNA 提取 取 2.0 mL 发酵液于离心管中,12 000×g 离心 1 min,弃上清,收集菌体。采用 SDS—酶法^[7-10],其步骤如下:2 mL 过夜发酵液于 12 000×g 离心 1 min,收集菌体,再加入 500 μL Tris 缓冲液(pH 8.0)和 300 μL 10% SDS 充分混匀后 65 ℃水浴 1 h,立即置于-80 ℃放置 15 min 再 65 ℃水浴 15 min,如此反复冻融 3 次,再 4 ℃6 000×g 离心 10 min,取上清加入等体积的酚—氯仿—异戊醇(25:24:1,V:V:V),漩涡震荡 5 min,室温静置 10 min 后 1 3000×g 离心 20 min,取上清加入 0.6 倍体积异戊醇,室温沉淀 1.5 h,13 000×g 离心 20 min,去上清,用 1 mL 70%乙醇洗沉淀一次,室温挥发 10 min,加入 50 μL 灭菌水并于 65 ℃水浴 1 h 后-20 ℃保存,作为 PCR 模板。

1.2.4 菌株 16S rDNA 和 ITS 序列分析 以 30 ng 提取的基因组 DNA 为模板,采用 Taq 酶和引物(细菌 16S rDNA 引物:1492R: 5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTG G-3',8F: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3';真菌 ITS 引物序列:ITS1: 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3',ITS4: 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')对细菌 16S rDNA 和真菌 ITS 进行 PCR 扩增。细菌的 PCR 扩增反应体系为:灭菌水 33 μL;10×PCR buffer 5 μL;dNTPs(2.5 mmol/L) 4 μL;MgCl₂(25 mmol/L)3 μL;1492R(20 mmol/L) 1 μL;8F(20 mmol/L) 1 μL;Taq 酶(2.5 U/μL) 1.5 μL;模板(10 ng/μL) 3 μL;真菌的 PCR 扩增反应体系为:灭菌水 30.5 μL;10×PCR buffer 5 μL;dNTPs(2.5 mmol/L) 4 μL;

MgCl₂(25 mmol/L) 3 μL;ITS1(20 mmol/L) 2 μL;ITS4(20 mmol/L) 2 μL;Taq 酶(2.5 U/μL) 1.5 μL;模板(10 ng/μL) 3 μL。PCR 扩增反应条件:94 ℃预变性 50 s,94 ℃变性 30 s,55 ℃退火 25 s,72 ℃延伸 1 min,共 25 个循环,72 ℃延伸 10 min,4 ℃保存。PCR 扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测。回收阳性 PCR 产物,送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。将测序结果输入 GenBank 数据库,与数据库中收录的 16S rDNA 和 ITS 序列比对,得到与分离菌序列相似的菌种 16S rDNA 和 ITS 基因序列,用 MegAlign 软件得到系统发育树。

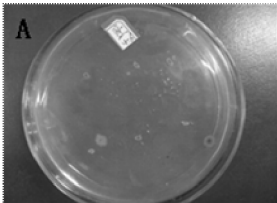
2 结果与分析

2.1 菌种的分离结果

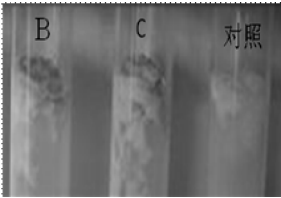
经过 MRS 培养基分离与镜检,得到 3 种优势菌,它们的主要形态特征为:A 菌菌落较大且表面干燥,突起,边缘圆滑较湿润,呈乳白色,不透明,镜检显示菌体个体形态较大,呈卵球形;B 菌菌落较小,表面扁平且较湿润,边缘光滑,呈淡乳白色,不透明,革兰氏染色镜检显示个体形态呈链状或者线状,部分呈“X”形、“Y”形的革兰氏染色阳性菌;C 菌菌落较小,表面扁平、平滑、较干燥,呈黄色,不透明,革兰氏染色镜检显示为阳性菌,且个体形态较小,呈典型的球状,无链接状。初步将此 3 种菌分为:A 疑似酵母菌、B 疑似乳酸菌、C 疑似葡萄球菌。

2.2 生化分析

将疑似酵母菌直接点样接种于 YPD 平板上培养 24 h 后,再在上层倒入 TTC 培养基,发现平板上显示红色菌落(图 1A),初步判定为酵母菌。石蕊牛奶试验结果显示疑似葡萄球菌和疑似乳酸菌都能使石蕊牛奶变红(图 1B 和 1C),过氧化氢触酶试验显示疑似乳酸菌不产生气泡为阴性,疑似葡萄球菌产生大量气泡为阳性。



(a) YPD 与 TTC 平板鉴定酵母菌



B. 疑似葡萄球菌 C. 疑似乳酸菌

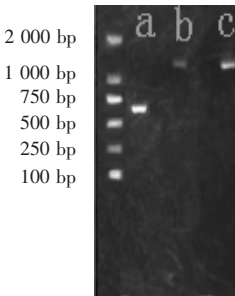
(b) 石蕊牛奶试验鉴定葡萄球菌和乳酸菌

图 1 疑似菌生化结果

Figure 1 The result of biochemical experiment

2.3 PCR 扩增 16S 和 ITS 序列结果

以分离菌基因组 DNA 为模板,利用 16S rDNA 和 ITS 引物进行 PCR 扩增,分别得到了约 630 bp(a 泳道)、1 410 bp (b 泳道)和 1 480 bp(c 泳道)的目的条带(见图 2),结果与预期相符。



a. PCR 扩增疑似酵母菌 ITS 序列结果 b. PCR 扩增疑似葡萄球菌 16s rDNA 序列的结果 c. PCR 扩增疑似乳酸菌 16s rDNA 序列的结果

图 2 细菌 16S rDNA 和真菌 ITS 序列 PCR 扩增
Figure 2 Electrophoresis of PCR products

2.4 测序及系统进化树的构建

2.4.1 酵母菌 ITS 序列分析结果 PCR 扩增酵母菌 ITS 序列,测序分析结果表明该序列大小为 636 bp,将该基因与 NCBI 数据库进行比对。BLAST 比对结果发现该序列与德巴利酵母 ATCCMYA-4749(HQ999977.1)的 ITS 序列相似度达到 99%,利用 MegAlign 软件构建的系统发育树(见图 3),结果表明二者处在同一分支上,进化距离近,最终判断该酵母菌为德氏酵母。

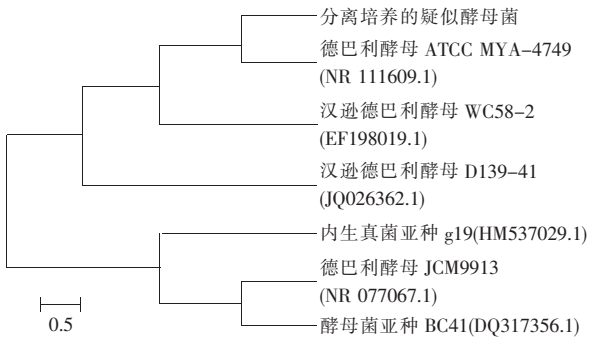


图 3 系统发育树
Figure 3 System growth trees

2.4.2 葡萄球菌 16S rDNA 结果 测序结果表明 PCR 扩增的 16S rDNA 序列大小为 1 411 bp,将该序列与 NCBI 数据库进行比对。BLAST 比对结果发现该序列与腐生葡萄球菌 YSY1-6 株(GU197535.1)的 16S rDNA 序列相似度达到 100%,利用 MegAlign 软件构建的系统发育树(见图 4)表明二者处在同一分支上,进化距离近,最终判断为 YSY1-6 腐生葡萄球菌。

2.4.3 乳酸菌 16S rDNA 结果 测序结果表明 PCR 扩增的 16S rDNA 序列大小为 1 489 bp,将该序列与 NCBI 数据库进

行比对。BLAST 比对结果发现该序列与德式乳杆菌 NBRC3376 株(AB680073.1)的 16S rDNA 序列相似度达到 99%,利用 MegAlign 软件构建的系统发育树(见图 5)表明二者处在同一分支上,进化距离近,最终判断为德式乳杆菌。

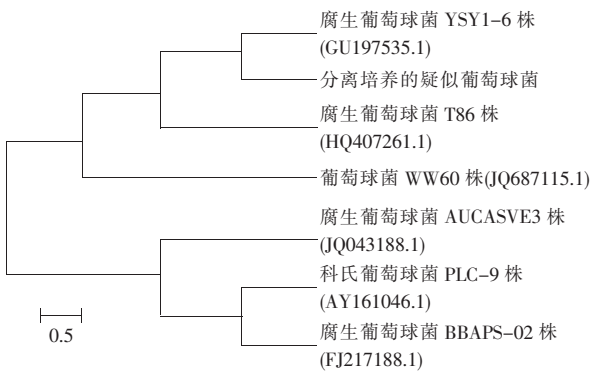


图 4 系统发育树
Figure 4 System growth trees

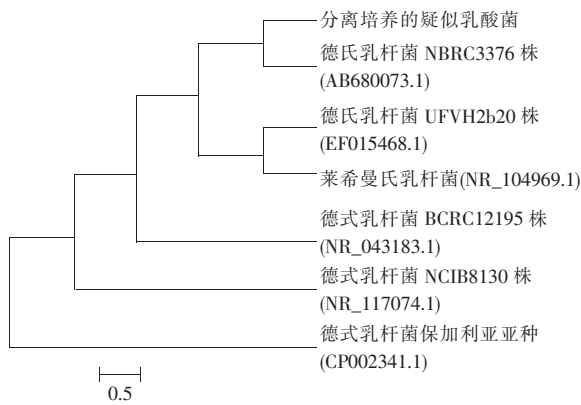


图 5 系统发育树
Figure 5 System growth trees

3 结论

发酵香肠是中国人喜爱的食品,不同工艺和调味料配方,产生不同的风味、香型。其制作过程中的微生物种类及数量变化对香肠品质十分重要^[11]。传统微生物技术鉴定香肠中细菌和霉菌的方法主要是依据它们的形态特征和生理特征,但往往只能鉴定到属水平,不能反映与其它物种之间的亲缘关系,而且耗时、工作量大,不利于工业化生产的在线检测^[12]。随着分子生物学、基因工程的发展,越来越多的技术被应用于菌种的鉴定,在大大减少工作量的同时显著提高了鉴定的准确性。本研究利用微生物 rRNA 序列的保守性,从传统羊肉香肠中分离酵母和细菌,以细菌 16S rDNA 和酵母 ITS 为指标来鉴定香肠中的微生物,结果发现香肠中德氏酵母、YSY1-6 腐生葡萄球菌、德式乳酸乳杆菌亚种较丰富。目前工业上用于发酵香肠的发酵剂主要由乳酸菌、片球菌等混合而成^[13],本研究结论也证明了发酵香肠中的微生物主要

(下转第 107 页)

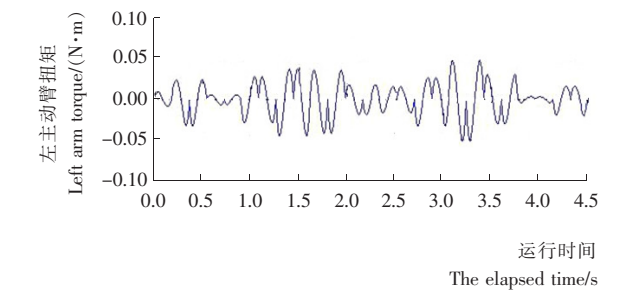


图 13 左侧主动臂扭矩曲线图

Figure 13 Curve of torque of the left active arm

5 结论

(1) 本研究针对种子分选机执行机构速度快、负载低的工作特点,设计出一种高速小型的并联机械手作为种子分选机的执行机构;

(2) 采用全域性能指标对并联机构的各个杆长进行了优化设计,结果显示,在机械手工作范围内的雅克比矩阵的条件数较小,并且波动平稳,说明机械手的运动学性能较好;并始终使主动臂与从动臂之间的传动角在 40°以上,确保了其较好的传动性能,有效地避免了奇异点的发生。

(3) 采用 SolidWorks 和 MATLAB 联合仿真技术对机械手进行了运动学和动力学仿真;根据仿真结果,利用 MATLAB 的图形显示功能对并联机械手执行结构的轨迹进行了主动臂角位移和扭矩的分析,并预估了伺服电机的参数;对机械手样机的建立以及控制方法有重要的指导作用;同时对同类型机械手产品的设计具有一定的借鉴作用。

(上接第 22 页)

组成。根据王永霞^[14]的介绍这些细菌降低了香肠的 pH 且还原了亚硝酸盐,对发酵香肠的质地有明显影响。传统的自然发酵香肠风味往往是乳酸菌、酵母等优势菌与其它杂菌竞争的结果,受季节、地区等外界环境的影响不易大规模生产。通过生理生化与基因鉴定方法,可以得到自然发酵香肠中的优势菌,为模拟自然发酵的风味提供了基础。

参考文献

1 葛长荣,马美湖.肉与肉制品工艺学[M].北京:中国轻工业出版社,2002:25~30.

2 南庆贤.肉类工业手册[M].北京:中国轻工业出版社,2003:42~48.

3 刘会平,成文生.发酵肉制品的生产[J].肉类工业,1999(4):16~18.

4 李凤彩,程文新,谢华,等.发酵香肠菌种筛选标准探讨[J].食品科技,2002(6):78~79.

5 曲佳乐,闵伟红,王巧玲,等.一株产木糖醇菌株的生理生化及分子生物学鉴定[J].食品科学,2011,32(12):171~175.

6 乔宏萍,沙大年,金泰虞,等.红茶菌中优势微生物的分离鉴定及

参考文献

1 颜克涛.台面式种子分选机的分选机理和小麦分选试验研究[D].武汉:华中农业大学,2005.

2 李占贤.基于 PLC 的高速并联机械手控制技术[J].智能控制技术,2006,35(21):55~57.

3 褚金钱,徐方.基于 Solidworks 与 Matlab 的码垛机器人动力学仿真[J].组合机床与自动化加工技术,2013(9):28~31.

4 周双林.平面闭链五杆机构柔性工作空间的研究[J].机械工程学报,2000,36(11):98~99.

5 赵登峰.平面五杆机构工作空间及其演化的研究[J].机械设计与研究,2007,23(5):56~58.

6 梁香宁,牛志刚.三自由度 Delta 并联机器人运动学分析及工作空间求解[J].太原理工大学学报,2008(1):93~96.

7 曲义远,黄真.空间六自由度并联机构位置的三维搜索方法[J].机器人,1989,3(5):128~130.

8 石磊,许明恒,邓维鑫,等. PowerCube 模块化机器人工作空间计算[J].中国工程机械学报,2011,9(1):88~90.

9 Angeles J. Architecture singularities of parallel manipulators [J]. International Journal of Robotics & Automation, 1992, 7 (1): 23~29.

10 米士彬,金振林.基于雅克比矩阵求解并联机器人位置正解方法[J].燕山大学学报,2011,59(2):391~395.

11 汪军.双臂机器人运动学与可操作性及其优化的研究[D].无锡:江南大学,2007.

12 李维嘉. Stewart 运动平台的雅可比矩阵条件数的研究[J].华中理工大学学报,1997,11(3):34~36.

系统发育分析[J].食品与生物技术学报,2011,30(4):609~612.

7 胡佳,邓斌,张文学,等.浓香型白酒曲药中细菌组成及系统学分析[J].酿酒科技,2007(5):17~19.

8 F 奥斯伯.精编分子生物学实验指南[M].北京:科学出版社,1998:95~100.

9 Yeates C, Gillings M R, Davison A D, et al. Veal methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification[J]. Biological Procedures Online, 1998, 1(1): 14~16.

10 Judith Meis, Chen Feng-Ling. Extract PCR-ready soil DNA in less than an hour with the new soil master DNA extraction kit [J]. Epicentre Forum, 2002, 9(2): 1~3.

11 雷华威,李榕,樊康,等.不同菌种对中式发酵香肠风味的影响[J].食品与机械,2011,27(5):19~24.

12 王令建,李开雄.发酵香肠菌种的筛选及鉴定[J].现代食品科技,2006,22(2):24~27.

13 罗欣,朱燕.发酵剂微生物及其代谢与发酵香肠的工艺控制[J].食品与发酵工业,2002,28(3):67~71.

14 王永霞,曹东林,宋慧月,等.不同发酵剂对发酵香肠色泽和质地的影响[J].食品与机械,2006,22(1):4~6.