

贵州少数民族酸肉、酸鱼中乳酸菌的分离鉴定

湛剑龙, 陈 韵, 黄林波, 车 璞, 胡 萍*
(贵州大学生命科学学院, 贵州省农畜产品贮藏加工重点实验室, 贵州 贵阳 550025)

摘 要: 采用传统微生物分离方法进行乳酸菌纯种分离, 利用16S rRNA序列分析方法进行乳酸菌鉴定, 从7个酸肉、酸鱼样品中共分离出14株乳酸菌, 有乳杆菌属、环丝菌属、乳球菌属3个属, 9个种。从其中鉴定出7株乳酸菌, 分别是: 植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、消化乳杆菌(*Lactobacillus alimentarius*)、清酒乳杆菌(*Lactobacillus sakei*)、泡菜乳杆菌(*Lactobacillus kimchi*)、清酒乳杆菌亚种(肉)(*Lactobacillus sakei* subsp. *carneus*)、草乳杆菌(*Lactobacillus graminis*)、弯曲乳杆菌(*Lactobacillus curvatus*)。

关键词: 酸鱼; 酸肉; 乳酸菌; 分离鉴定

Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Sour Meat and Sour Fish of Minor Nationalities in Guizhou Province

ZHAN Jian-long, CHEN Yun, HUANG Lin-bo, CHE Pu, HU Ping*
(Key Laboratory for Storage and Processing of Agricultural and Livestock products in Guizhou Province,
College of Life Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: A total of 14 strains of lactic acid bacteria were isolated from 7 samples of sour meat and sour fish popular with minor nationalities in Guizhou province by the traditional technique and identified based on 16S rRNA sequence analysis to belong to 9 species of the three genera *Lactobacillus*, *Brochothrix* and *Lactococcus*. Of these strains, 7 were *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus kimchi*, *Lactobacillus sakei* subsp. *carneus*, *Lactobacillus graminis*, *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus xylosus*, respectively.

Key words: sour fish; sour meat; lactic acid bacteria; isolation and identification

中图分类号: TS214.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-8123(2013)07-0040-04

贵州黔东南苗族、侗族自治州传统发酵酸肉/鱼制品主要是以猪肉和鱼肉为原料, 洗净后加入一定量的盐腌制2~3d, 再根据当地的饮食习惯多加甜酒、熟糯米、生姜、花椒、辣椒粉、大蒜等辅料, 装入坛、瓦缸、木桶等容器中, 上层用叶片、塑料和水来隔绝空气, 放置于避光阴凉地方自然发酵。此方法是当地居民延续祖先智慧结晶一代一代传承下来的, 具有历史悠久、风味独特、安全和绿色的特点。但由于传统手工工艺制作, 发酵时间长, 没有大规模的生产和市场上流通, 其他地域的人们无法享受这种风味独特的发酵肉制品^[1-3]。乳酸菌是发酵肉制品中的优势菌群, 对发酵产品的风味和营养品质变化起着至关重要的作用^[4-7]。目前, 对于贵州传统少数民族发酵肉制品中乳酸菌的研究还相当缺乏^[8]。因此, 本研究以贵州少数民族地区侗族发酵酸肉和苗族发酵酸鱼为材料, 采用传统微

生物分离方法进行乳酸菌纯种分离, 利用16S rRNA序列分析方法进行乳酸菌鉴定^[9-12], 旨在从原生态食品中发掘有益乳酸菌, 以利于进一步研究乳酸菌的发酵特性、改进传统工艺, 为保护、利用本土原生态的微生物资源打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 实验材料

实验原料来自于贵州省黔东南州从江县及黎平县农户家纯手工制作的酸肉、酸鱼, 共7个样品, 其中酸肉4个样品, 酸鱼3个样品, 采样时严格按照国标GB/T4789.1—2010《食品安全国家标准: 食品微生物学检验》操作。酸肉、酸鱼样品分别编号如表1所示。

收稿日期: 2013-04-03

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目(31260379)

作者简介: 湛剑龙(1989—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物与生物技术。Email: 429538609@qq.com

*通信作者: 胡萍(1970—), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品微生物与生物技术。Email: ls.phu@gzu.edu.cn

表1 酸肉酸鱼样品及编号

Fig.1 Samples of sour meat and sour fish used in this study

样品	编号	来源
酸肉1号	SR1	从江县饼妹镇奎里村
酸肉2号	SR2	从江县饼妹镇奎里村
酸肉3号	SR3	从江县饼妹镇高增村
酸肉4号	SR4	黎平县茅贡乡
酸鱼1号	SY1	从江县饼妹镇奎里村
酸鱼2号	SY2	黎平县茅贡乡
酸鱼3号	SY3	黎平县中潮镇佳所村

1.1.2 培养基及主要试剂

培养基: MRS肉汤培养基、PY培养基、PYG液体培养基(在PY培养基中添加10g/L葡萄糖)。

主要试剂: 革兰氏染色试剂、细菌微量生化鉴定管(麦芽糖、乳糖、葡萄糖)、试剂A(α -萘酚5g和95%体积分数乙醇100mL)、试剂B(KOH 80g、肌酸(Creatine)0.6g、蒸馏水200mL)、溶菌酶、CTAB(十六烷基三甲基溴化胺)裂解液、Tris-饱和酚、氯仿、异戊醇、聚乙二醇均为分析纯。

1.2 仪器与设备

CX21SF1奥林巴斯生物显微镜 奥林巴斯(中国)有限公司; S1000TM Thermal Cycler PCR仪、DcodeTM Universal Mutation Detection System DGGE电泳仪、Gel DocXR凝胶成像仪 美国Bio-Rad公司; Gilson P型移液器 法国吉尔森公司; Micro 17R微量高速冷冻离心机 美国Thermo Electron公司。

1.3 方法

1.3.1 菌株分离纯化

取3g样品, 剪碎放入MRS液体培养基中, 36℃恒温厌氧培养48h, 然后稀释5个梯度($10^{-1} \sim 10^{-5}$)后, 直接涂布于MRS固体培养基上, 36℃恒温厌氧培养48h。再采用平板划线法对涂布平板中不同的单个菌落进行接种、培养, 并进行革兰氏染色和镜检, 重复分离纯化直至镜检结果一致。

1.3.2 菌株分类鉴定方法

1.3.2.1 菌落特征

对纯化菌株在MRS固体培养基上的菌落特征进行观察、记录和编号, 主要包括菌落大小、形状、颜色、湿润度、光泽度、透明度、隆起形状、边缘特征等。将初步认定为乳酸菌菌株进行革兰氏染色镜检。

1.3.2.2 菌种分类生理生化试验

主要生理生化试验包括: 接触酶试验、甲基红试验、乙酰甲基甲醇(voges-proskauer, VP)试验、石蕊牛奶试验、淀粉水解试验、葡萄糖产酸试验和糖发酵试验^[13-15]。

1.3.3 菌株DNA的提取

参照谭映月等^[16]提取DNA方法, 有所改动。取备

用菌株菌液2mL于2mL离心管中, 8000×g离心8min, 收集沉淀; 加200μL溶菌酶(质量浓度为0.05g/mL), 置于35℃水浴2h; 加2%十六烷基三甲基溴化胺(Hexadecyl trimethyl ammonium bromide, CTAB)裂解液0.5mL, 上下颠倒混匀10min; 加0.5mL Tris-饱和酚:氯仿:异戊醇=25:24:1, 上下颠倒混匀2min后, 于10000×g离心5min; 收集上清液转入新的离心管, 加入等体积的氯仿:异戊醇=24:1, 上下颠倒混匀2min后于10000×g离心5min; 收集上清液转入新的离心管, 加入2倍体积30%聚乙二醇于4℃条件下沉淀4h; 取出离心管于14000×g离心8min, 倒掉上清液, 用70%体积分数乙醇洗涤DNA 3次, 经真空干燥后转入0.2mL PCR管, 加50mL TE(10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, pH8.0)缓冲液于-20℃保存。

1.3.4 PCR扩增细菌16S rRNA全长^[17]

采用细菌通用引物: 27F: 5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3'; 1492R: 5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'。

25μL反应体系: 1μL模板DNA, 引物(1μmol/L)各2.5μL, Go Taq Green Master Mix(2×)12.5μL, 去离子水6.5μL。反应程序: 95℃预变性2min; 25个循环包括: 94℃变性1min, 58℃退火1min, 72℃延伸2min; 最终72℃延伸2min。用1.0%琼脂糖凝胶进行电泳检测。

1.3.5 数据分析方法

取PCR扩增产物送上海生工公司进行测序分析, 在ABI DNA自动测序仪上进行测序反应。登陆NCBI网站, 与已知基因序列进行比对。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离

对来自贵州黔东南苗族、侗族自治州的发酵酸肉、酸鱼7个样品中的优势乳酸菌群进行分离及纯化, 共得到14株纯菌株。从SR1中分离出2株, SR2中分离出1株, SR3中分离出3株, SR4中分离出2株; 从SY1中分离出1株, SY2中分离出2株, SY3中分离出3株。从SR2只分离出1株乳酸菌, 由于酸肉发酵时间超过1年, 其中的优势乳酸菌群已经十分稳定, 其他菌群在发酵过程中处于竞争劣势, 随着时间的延长逐步消亡; SR3中分离出3株, 是酸肉样品中发酵时间最短的, 仅3个月, 也是分离出优势乳酸菌最多的。

2.2 菌株分类鉴定

2.2.1 形态学观察

将14株菌接种于MRS固体培养基上, 置于37℃培养24h后镜检观察, 菌落形态特征如表2所示。

表2 细菌菌落形态及菌体形态

Table 2 Colony morphology and cell morphology of the 14 isolates		
编号	菌落形态	镜检菌体形态
SR1-1,SR1-2	乳白色,凸起,光滑圆整,直径(1.5±0.20)mm	G ⁺ ,有成对,链状
SR2	微白色,凸起,光滑圆整,直径0.7~1.0mm	G ⁺ ,单个或有成对,短杆状
SR3-1,SR3-2	乳白色,凸起,光滑圆整,直径(3±0.3)mm	G ⁺ ,成对,杆状
SR3-3,SY1	乳白色,凸起,光滑圆整,直径0.7~1.0mm	G ⁺ ,单个或有成对,杆状
SR4-1	透明,凸起,光滑圆整,直径(3±0.3)mm	G ⁺ ,单个或有成对,四连链状,杆状
SR4-2	乳白色,凸起,光滑圆整,直径(3±0.3)mm	G ⁺ ,中间略有弯曲,杆状
SY2-1,SY2-2	乳白色,凸起,光滑圆整,直径3mm	G ⁺ ,无芽孢,单个或有成对
SY3-1,SY3-2	微白色,凸起,光滑圆整,直径(4±0.3)mm	G ⁺ ,单个或有成对,四连链状
SY3-3	略透明,凸起,光滑圆整,直径(3±0.3)mm	G ⁺ ,中间略有弯曲,较粗,短杆状

注: G⁺表示革兰氏染色试验阳性。

2.2.2 生理生化试验

14株菌进行的生理生化试验结果如表3所示。试验结果表明: 14株菌株均能使石蕊牛奶变为粉红色, 表明14株菌均能在石蕊牛奶中产酸; 14株菌均能使粉红色的石蕊牛奶凝固, 表明14株菌产酸能力很强; 只有SR2、SR3-1、SR3-2、SR4-1这4株菌能使牛奶清澈, 表明只有它们能产蛋白酶。所有14株菌过氧化氢酶全部为阴性, 乙酰甲基甲醇试验、甲基红试验全部为阳性, 淀粉水解试验中, 除SR1-1、SR1-2为阴性外, 其余菌全部能水解淀粉。糖发酵试验表明: 14株菌培养24h后均能发酵葡萄糖产酸使细菌微量生化鉴定管中葡萄糖培养液变为黄色, 呈阳性。除SR2和SR3-1未能完全发酵麦芽糖, 导致管内为半黄半紫; 其余12株菌均能使均能发酵麦芽糖使培养液变为黄色, 呈阳性; 在乳糖发酵中, SR1-1、SR1-2和SR2未能发酵乳糖, 颜色仍为蓝紫色, 呈阴性, SR3-1、SR3-2、SY2-1、SY2-2和SY3-3不完全发酵乳糖, 使管中乳糖培养液为半黄半紫; SR3-3、SR4-1、SR4-2、SY1、SY3-1和SY3-2均能发酵乳糖, 使管内乳糖培养液完全变为黄色, 呈阳性。

表3 细菌生理生化试验结果

Table 3 Physiological and biochemical identification of the 14 isolates										
菌株编号	试验项目							糖发酵试验		
	石蕊牛奶试验			过氧化氢试验	乙酰甲基醇试验	甲基红试验	淀粉水解试验	葡萄糖	麦芽糖	乳糖
	变红	凝固	清澈							
SR1-1	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-
SR1-2	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-
SR2	+	+	+	-	+	+	+	+	d	-
SR3-1	+	+	+	-	+	+	+	+	d	d
SR3-2	+	+	+	-	+	+	+	+	+	d
SR3-3	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
SR4-1	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
SR4-2	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
SY1	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
SY2-1	+	+	-	-	+	+	+	+	+	d
SY2-2	+	+	-	-	+	+	+	+	+	d
SY3-1	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
SY3-2	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
SR3-3	+	+	-	-	+	+	+	+	+	d

注: +. 90% 以上的菌株阳性, - . 90% 以上的菌株阴性; d. 11% ~ 89% 的菌株为阳性。

2.2.3 菌株拟鉴定结果

参考《常见细菌鉴定手册》^[18]及《乳酸菌分类鉴定及实验方法》^[19]对14株菌进行形态学特征和生理生化试验分类鉴定, 由菌落形态、革兰氏染色、接触酶试验、甲基红试验、乙酰甲基甲醇试验、石蕊牛奶试验、淀粉水解试验、葡萄糖产酸试验、麦芽糖和乳糖发酵试验等结果表明, 14株细菌均为乳酸菌, 并确定有乳杆菌属、环丝菌属、乳球菌属3个属。

2.3 DNA测序结果及分析

2.3.1 DNA提取结果检测

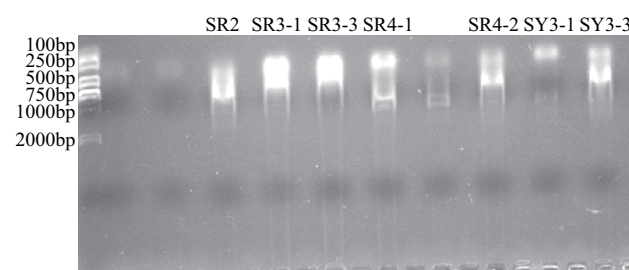


图1 DNA提取结果

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of DNA from the 7 identified isolates

选取7株乳酸菌提取的DNA经琼脂糖电泳后的凝胶于凝胶成像如图1所示。采用溶菌酶消化裂解法提取的DNA条带清晰, 主带明显, 不过此法所提DNA出现拖尾, 分析原因可能是提取过程中DNA条带被打断或者是RNA干扰所致。

2.3.2 PCR扩增结果

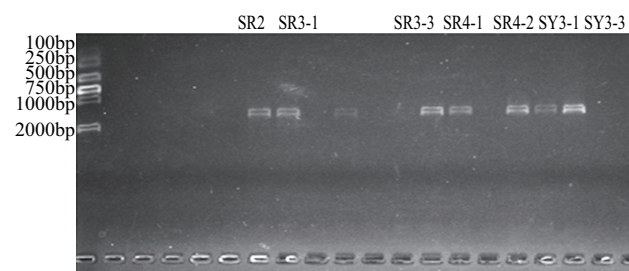


图2 细菌通用引物PCR扩增

Fig.2 PCR amplification of DNA from the 7 identified isolates with universal primers

7株菌DNA经正反2种引物扩增各样品的16S rRNA如图2所示, 全长效果均良好, 条带清晰。

2.3.3 测序结果

7株菌16S rRNA序列与美国国家生物技术信息中心(National Center of Biotechnology Information, NCBI)数据库与已知细菌基因序列进行比对, 结果见表4。

从表4鉴定结果可知, 所鉴定7株细菌全部为乳酸菌, 与NCBI数据库已知菌株序列的相似性达99%。SR2号菌鉴定为泡菜乳杆菌(*Lactobacillus kimchi*), SR3-1



号菌为消化乳杆菌(*Lactobacillus alimentarius*), SR3-3号菌为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*), SR4-1号菌为草乳杆菌(*Lactobacillus graminis*), SR4-2号菌为弯曲乳杆菌(*Lactobacillus curvatus*), SY3-1号菌为清酒乳杆菌(*Lactobacillus sakei*), SY3-3号菌为清酒亚种(*Lactobacillus sakei* subsp. *carnosus*)。其中植物乳杆菌、弯曲乳杆菌、清酒乳杆菌和清酒乳杆菌亚种4株菌的分离鉴定、益生特性及在发酵肉质品中的作用均有研究,而消化乳杆菌、草乳杆菌、泡菜乳杆菌^[20]的相关研究报道很少。

表4 细菌16SrRNA序列鉴定结果

Table 4 16S rRNA sequence similarity of the 7 identified isolates to the corresponding relative strains

编号	亲缘性最近的菌株	序列号	相似性/%
SR2	<i>Lactobacillus kimchi</i>	NR_025045	99%
SR3-1	<i>Lactobacillus alimentarius</i>	NR_044701	99%
SR3-3	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	NR_075041	99%
SR4-1	<i>Lactobacillus graminis</i>	NR_042438	99%
SR4-2	<i>Lactobacillus curvatus</i>	NR_042437	99%
SY3-1	<i>Lactobacillus sakei</i>	NR_042443	99%
SY3-3	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carnosus</i>	NR_025719	99%

3 结 论

传统酸肉和酸鱼中乳酸菌群在发酵过程中随着时间延长,优势乳酸菌种类逐渐减少,最终趋近稳定,一般优势乳酸菌群只有1~2种;由于地域不同,制作工艺有差异,酸肉和酸鱼中优势乳酸菌群也不相同。本研究从7份样品酸肉/鱼中,共分离出乳酸菌14株,目前鉴定出7株乳酸菌,分别是:植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、消化乳杆菌(*Lactobacillus alimentarius*)、清酒乳杆菌(*Lactobacillus sakei*)、泡菜乳杆菌(*Lactobacillus kimchi*)、清酒亚种(*Lactobacillus sakei* subsp. *carnosus*)、草乳杆菌(*Lactobacillus graminis*)、弯曲乳杆菌(*Lactobacillus curvatus*)。本实验分离鉴定出酸肉、酸鱼中的乳酸菌有利于了解其中的乳酸菌群,为揭示酸肉、酸鱼发酵机理,扩大市场,发掘其中的益生乳酸菌打下基础。

参考文献:

- [1] 张倩,郭晓芸,张海松,等. 贵州荔波传统酸肉发酵期间理化成分与发酵风味物质分析[J]. 食品科学, 2013, 34(4): 173-177.
- [2] 李宗军,江江湖,李红琼,等. 湘西侗族传统发酵肉的产品特性[J]. 湖南农业大学学报, 2002, 28(1): 61-63.
- [3] 车科,麻成金,黄群,等. 湘西传统酸肉乳酸菌分离、筛选及鉴定[J]. 中国酿造, 2008(11): 25-29.
- [4] FARNWORTH E R. Handbook of fermented functional foods[M]. 2nd ed. Boca Raton[etc.]: CRC Press, 2008: 291-320.
- [5] OCKERMAN H W, BASU L. Handbook of fermented meat and poultry[M]. Iowa[etc.]: Blackwell Pub Professional, 2007: 9-17.
- [6] RATTANACHAIKUNSOPON P, PHUMKHACHORN P. Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production[J]. Annals of Biological Research, 2010, 1(4): 218-228.
- [7] SINGH V P, PATHAK V, VERMARA K. Fermentation meat products: organoleptic quality and biogenic amines: a review[J]. American Journal Food Technology, 2012, 7(5): 278-288.
- [8] 章德法,徐为民,徐幸莲. 侗族发酵酸肉中乳酸菌的筛选及鉴定[J]. 江苏农业学报, 2008(6): 986-988.
- [9] 周宁,张建新,樊明涛,等. 分子分型技术在乳酸菌鉴定及多态性研究中的应用[J]. 食品工业, 2012, 33(5): 69-73.
- [10] 谢科,余晓峰,郑海松. 传统分离培养结合PCR-DGGE技术分析广式腊肠中优势菌[J]. 食品科学, 2013, 34(4): 157-160.
- [11] FONTANA C, VIGNOLO G, COCCONCELLI P S. PCR-DGGE analysis for the identification of microbial populations from Argentinean dry fermented sausages[J]. Journal of Microbiological Methods, 2005, 63(3): 254-63.
- [12] AYMERICH T, MARTÍN B, GARRIGA M. Safety properties and molecular strain typing of lactic acid bacteria from slightly fermented sausages[J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 100(1): 40-49.
- [13] 唐血梅,李海英,赵芳,等. 新疆酸马奶中高产胞外多糖乳酸菌筛选鉴定及培养条件优化研究[J]. 新疆农业科学, 2012, 49(8): 1540-1545.
- [14] 帅瑾,杨勇,姚伟伟,等. 四川发酵香肠中乳酸菌的分离与鉴定[J]. 食品工业科技, 2012, 33(20): 171-175.
- [15] 刘长建,刘秋,姜波,等. 产苯乳酸菌的筛选鉴定[J]. 食品工业科技, 2012, 33(21): 192-195.
- [16] 谭映月,胡萍,谢和. 应用PCR-DGGE技术分析酱香型白酒酒曲细菌多样性[J]. 酿酒科技, 2012(10): 107-111.
- [17] 胡萍,周光宏,徐幸莲. 应用PCR-DGGE指纹技术研究真空包装火腿切片贮藏过程中的微生物动态变化[J]. 南京农业大学学报, 2009, 32(2): 137-140.
- [18] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [19] 凌代文,东秀珠. 乳酸菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- [20] YOON J H, KANG S S, MHEEN T I, et al. *Lactobacillus kimchii* sp. nov., a new species from kimchi[J]. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 2000, 50(5): 1789-1795.