

藏灵菇微生物种群结构的分子特性研究*

周剑忠 董明盛 江汉湖**

(南京农业大学食品科技学院 南京 210095)

摘要: 用 PCR-DGGE 指纹技术, 研究了藏灵菇中微生物多样性及藏灵菇发酵奶发酵过程微生物种群动力学。结果表明, 藏灵菇中细菌的种群结构较酵母菌的复杂, 不同来源的藏灵菇中细菌种群结构的相似性为 78% ~ 84%, 酵母菌种群结构的相似性为 80% ~ 92%。发酵过程中细菌种群结构变化图谱中的条带 B 和条带 E, 以及酵母菌种群结构变化图谱中的条带 N 贯穿于整个发酵过程, 是发酵过程的优势菌。序列分析表明, 细菌种群结构的 DGGE 图谱中的绝大多数条带与乳酸菌相对应, 其中最亮条带 (条带 E) 的序列与乳酸乳球菌的相似性为 100%。

关键词: 藏灵菇, PCR-DGGE, 微生物多样性, 16S rDNA, 26S rDNA

中图分类号: Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 04-0064-05

Study on Molecular Characterization of Microbial Communities in Tibetan kefir Grain*

ZHOU Jian-Zhong DONG Ming-Sheng JIANG Han-Hu**

(College of Food Science & Technology, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095)

Abstract: The diversity in Tibetan kefir grains and dynamics of the microbial community during the fermentation of Tibetan kefir by PCR-DGGE fingerprinting technique were studied. The results showed that bacterial community of Tibetan kefir grains was more complex than that of yeast. The bacteria communities between different Tibetan kefir grains showed 78% ~ 84% similarity, and yeast 80% ~ 92%. Bands B, E and N of DGGE profiles of the microbial community during fermentation of Tibetan kefir were present throughout the fermentation. Analysis of sequence data showed the majority of the DGGE bands of bacteria community corresponded to LAB, and the most intense band (band E) was completely homologous to *Lactococcus lactis*.

Key words: Tibetan kefir grains, PCR - DGGE, Microbial diversity, 16S rDNA, 26S rDNA

民间流行用藏灵菇泡牛奶, 待牛奶酸化后饮用, 据饮用者介绍, 长期饮用能增强人体免疫力, 消除疲劳, 特别适合胃肠道疾病的患者。藏灵菇是一种乳白色、胶质状的块状物, 外形酷似米粒, 上面栖息着多种微生物。目前对藏灵菇的研究刚刚起步, 相关的报道还很少, 中国科学院微生物研究所菌种中心对藏灵菇中的菌群进行了初步分析, 分离到乳酸菌、克鲁维酵母和假丝酵母。

目前我国对传统发酵食品中微生物的研究, 还是应用分离、纯化、鉴定的方法, 需要进行一系列繁杂的形态特征和生理生化实验, 这种方法最大的缺点是不能获得微生物多样性的真正概貌^[1, 2]。近年来, 基于 16S rDNA 的分子生物学技术促进了微生态研究的发展, 特别是被称为 DNA 指纹技术的变性梯度凝胶电泳法 (Denaturing Gradient

* 国家 863 计划资助项目 (No. 2002AA248041)

** 通讯作者 Tel: 025-84396989, E-mail: nnjhh5539@yahoo.com.cn

收稿日期: 2005-10-25, 修回日期: 2006-02-28

Gel Electrophoresis, DGGE) 能有效分析复杂微生物群落及其多样性且无须培养微生物, 而越来越受到重视。DGGE 基本原理是长度相同而碱基组成不同的 DNA 序列在不同变性条件(如尿素浓度)下变性, 在变性梯度凝胶上特定位置形成泳带。该技术可以用于传统发酵产品中微生物多样性和种群动力学的研究, Omar 和 Ampe 应用 DGGE 指纹技术研究了墨西哥发酵面团(Pozol)中及发酵过程中微生物的种群动力学, 确定了各个发酵阶段的优势菌^[3], Cinzia 等利用该技术研究了澳大利亚西西里干酪在生产过程中细菌群落的多样性和动力学^[4]。本研究采用 PCR-DGGE 指纹技术, 研究藏灵菇中微生物的多样性, 跟踪藏灵菇发酵奶的整个发酵过程, 观察菌群的变化, 确定发酵过程中的优势菌群。

1 材料与方法

1.1 藏灵菇的来源及培养

藏灵菇来自西藏、青海和无锡的普通家庭。实验室将藏灵菇放在 10% (W/V) 的灭菌奶中, 置于 18℃ 环境, 每隔 2d 更换一次牛奶。

1.2 藏灵菇发酵奶样品准备

将藏灵菇用无菌滤网滤出, 按 5% (W/V) 的量加入 10% (W/V) 的无菌脱脂牛奶中, 置于 20℃ 恒温培养箱放置 20h, 在发酵过程中每隔 4h 抽样, 按下述方法进行检测。

1.3 藏灵菇及藏灵菇发酵奶中微生物总 DNA 的提取

用 FTA 卡进行提取^[5], FTA 卡(whatman InCo., USA)是一种能裂解样品中微生物细胞, 并吸附 DNA 的专用纸片。藏灵菇经高速匀浆机匀浆, 藏灵菇发酵奶混合均匀, 各取 50μL 直接滴在 FTA 卡的点样部位, 室温干燥。用 1.2mm 打孔器, 在加样处取 2 片纸片, 放入 0.2mL 离心管(PCR 管)中, 加入 200μL FTA 卡纯化试剂(whatman InCo., USA), 室温放置 5min, 洗 3 次, 再用 200μL TE 缓冲液洗 2 次, 室温干燥, 备用。

1.4 PCR-DGGE 分析

1.4.1 PCR 扩增:细菌 PCR 扩增对象为细菌 16S rDNA 的 V3 可变区^[6]: 上游引物为 338fGC (5' -CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG-3'), 下游引物为 518R (5' -ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'); 酵母 PCR 扩增对象为酵母 26S rDNA 的 D1 区^[7]: 上游引物为 NL1GC (5' -GCG GGC CGC GCG ACC GCC GGG ACG CGC GAG CCG GCG GCG GGC CAT ATC AAT AAG CGG AGG AAA AG-3'), 下游引物为 LS2 (5' -ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC-3')。上述引物均由上海生工生物工程公司合成提供。PCR 扩增在梯度 PCR 仪(Mycycler Bid-rad, USA)上进行。PCR 反应体系(50μL): 取 2 片(φ1.2mm)吸附 DNA 的 FTA 卡为模板, 1×PCR 缓冲液, 0.2mmol/L dNTP, 0.5μmol/L 引物, TaqDNA 聚合酶 1.25U, 补充 ddH₂O 至终体积 50μL。PCR 试剂盒购自 Takala 公司。总 DNA 扩增采用降落 PCR, 反应程序为 94℃ 预变性 4min, 先 20 个循环(94℃ 变性 30s, 退火温度从 65℃ 到 55℃, 每个循环降低 0.5℃, 退火 30s, 72℃ 延伸 30s), 再于恒定退火温度下进行 10 个循环(94℃ 变性 30s, 55℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 30s), 最终 72℃ 延伸 10min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后, -20℃ 冰箱保存备用。

1.4.2 变性梯度凝胶电泳 (DGGE): PCR 产物的 DGGE 分析在 Bio-Rad Dcode System 上进行, 聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8% (丙烯酰胺: 甲叉双丙烯酰胺 37.5:1)。变性梯度从 30% ~ 50% (100% 变性剂含有 7mol/L 尿素和 40% 甲酰胺), 在 $1 \times$ TAE 缓冲液中, 先 200V 预电泳 5 ~ 10min, 然后在 85V 恒压下电泳 12 ~ 14h。银染后用凝胶成像系统进行照相。图像分析用 Quantity one (Bio-rad) 分析软件进行分析。

1.4.3 DNA 的回收测序: 切下 DGGE 胶上不同位置的条带, 用 DNA 回收试剂盒进行 DNA 回收, 纯化。以回收 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 细菌引物为 338f (5' -ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'), 518r (5' -ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'); 酵母引物为 NL1 (5' -GCC ATA TCA ATA AGC GGA GGA AAA G-3'), LS2 (5' -ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC-3'), 扩增程序: 94℃ 预变性 4min, 30 个循环 (94℃ 变性 30s, 55℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 30s), 最终 72℃ 延伸 10min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检验后, 送上海生工公司测序。登陆 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/), 将所得序列与数据库中已知序列进行比对。

2 结果与分析

2.1 藏灵菇中细菌及酵母菌种群结构分析

图 1 是藏灵菇中细菌种群结构的 DGGE 图, 从图上可以看出, 藏灵菇中细菌种群结构较为复杂, 样品 1 和样品 2 都出现 8 条条带, 有 5 条共同条带; 图谱聚类分析表明, 这 3 个样品间细菌种群结构的相似性为 78% ~ 84%。从酵母菌种群结构的 DGGE 图 (图 2) 上可以看出, 酵母菌的种群结构较细菌的简单, 样品 1 和样品 2 都出现 3 条条带, 样品 3 出现 4 条条带, 有 2 条条带出现在所有样品中, 图谱聚类分析表明, 这 3 个样品间酵母菌种群结构的相似性为 80% ~ 92%。

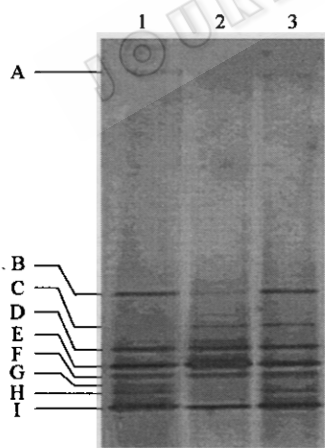


图 1 细菌群落 PCR-DGGE 指纹图谱

1 样品 1, 2 样品 2, 3 样品 3

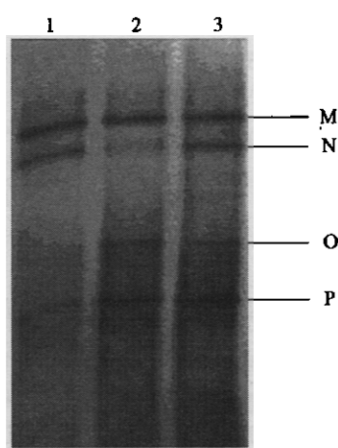


图 2 酵母群落 PCR-DGGE 指纹图谱

1 样品 1, 2 样品 2, 3 样品 3

2.2 藏灵菇微生物种群结构的 PCR-DGGE 指纹图谱中主要条带对应的 DNA 序列分析

对藏灵菇的 DGGE 胶上的主要条带割胶回收 DNA, 经 PCR 扩增后, 直接进行测序, 并将测序结果与 GenBank 上的已知序列进行比对, 结果表明, 细菌菌落结构指纹图谱上的条带序列与乳酸菌的 16S rDNA 有着很高的同源性。最亮的条带 E 与乳酸乳球菌有很近的亲缘关系, 相似性为 100%; 其它条带的分析结果为, 条带 D 与开菲尔囊乳

杆菌, 条带 B 与肠膜明串珠菌, 条带 C 与嗜酸乳杆菌, 条带 I 与干酪乳杆菌的亲缘关系十分接近, 相似性在 97.4% ~ 100% 之间, 条带 A 所对应的是一个不可培养微生物, 它们之间的相似性为 100%, 条带 G、H 在割胶回收后没有得到纯的 DNA, 所以没有得到这些条带的序列。酵母菌种群结构指纹图谱中条带 M 与单孢酵母, 条带 N 与马克斯克鲁维酵母, 条带 O 与啤酒酵母的亲缘关系十分接近, 它们之间的相似性为 100%。条带 P 与假丝酵母相似性达为 99.5%, 实验所测得的条带序列已被 GenBank 数据库收录, 登录号见表 1。

表 1 细菌和酵母 DGGE 指纹图谱条带的鉴定及序列号

Band ^a	Closest relative	Identity (%)	Accession No.
A	Uncultured bacterium	100	DQ103582
B	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	100	DQ103579
C	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	97.4	DQ103577
D	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	100	DQ10358
E	<i>Lactococcus lactis</i>	100	DQ103580
F	<i>Lactobacillus</i> sp.	94.1	DQ103578
I	<i>Lactobacillus casei</i>	99.4	DQ103576
M	<i>Saccharomyces unisporus</i>	100	DQ103586
N	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	100	DQ103587
O	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100	DQ103584
P	<i>Candida humilis</i>	99.5	DQ103588

^aBand 是指图 1 和图 2 上的条带

2.3 藏灵菇发酵奶发酵过程微生物种群结构的变化

用于藏灵菇酸奶发酵的发酵剂与普通发酵奶所用的发酵剂不一样, 它是一种天然的块状发酵剂, 加入牛奶后, 首先由藏灵菇表面与粒结合不紧密的微生物先脱落进入牛奶, 形成发酵起始阶段的优势菌群。图 3 反映了藏灵菇发酵奶发酵过程中细菌种群结构 (A) 和酵母菌种群结构 (B) 的变化。从 A 图可以看出, 在整个发酵过程中细菌群落的指纹图谱上共获得 11 条可见条带, 随着发酵时间的增加, 条带数也随之增加, 在发酵 4 ~ 12h 之间, 条带的变化最大, 表明在这段时间内, 牛奶中细菌的种类和数量

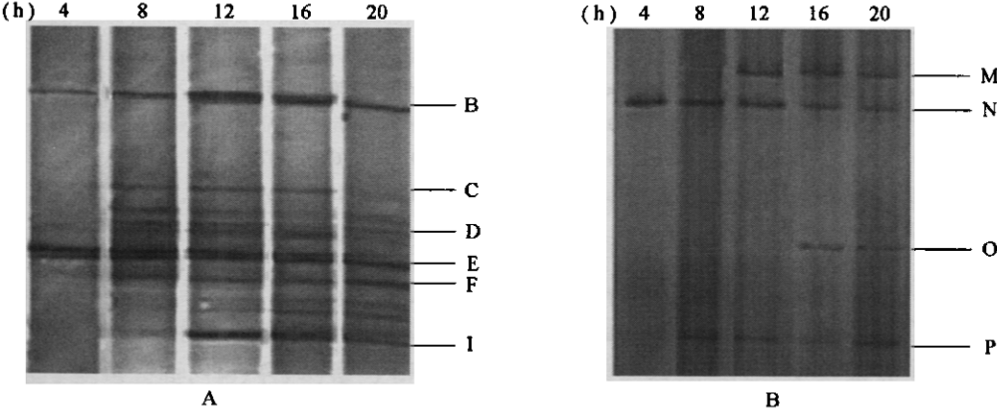


图 3 藏灵菇发酵奶发酵过程中微生物种群结构的变化
A 细菌群落, B 酵母菌群落

在大量增加, 12h 后, 细菌的种类基本保持不变。从图谱上条带的亮度分析, 最亮的条带 E (乳酸乳球菌) 贯穿于整个发酵过程, 是整个发酵过程的优势菌, 条带 B (肠膜明串珠菌) 从发酵 8h 开始, 条带 I (干酪乳杆菌) 从发酵 12h 开始成为优势菌。图 B 的结果表明, 在整个发酵过程中酵母菌群落图谱上共出现 4 条可见条带, 远小于细菌群落中出现的条带, 表明在参与牛奶发酵的微生物中细菌较酵母菌复杂。从酵母菌的种群结构图上可以看出, 条带 N (马克斯克鲁维酵母) 贯穿于整个发酵过程, 是整个发酵过程的优势菌, 条带 P (假丝酵母) 从发酵 8h 开始, 条带 M (单孢酵母) 从发酵 12h 开始, 条带 O (啤酒酵母) 从 16h 开始成为优势菌。

3 讨论

目前国内一些地区流行饮用藏灵菇浸泡奶, 实质上是利用藏灵菇作为发酵剂, 发酵牛奶。藏灵菇中微生物较普通酸奶发酵剂复杂, 除含乳酸菌外, 还含有酵母菌。现在对藏灵菇的研究, 仅仅是从藏灵菇中分离出部分菌株, 对藏灵菇中微生物的种群结构及发酵过程中的优势微生物缺乏了解, 因而对藏灵菇作为发酵剂的发酵机理及其发酵奶所具有的保健效果不能作出科学的解释, 使得藏灵菇在民间一直保持着神秘色彩。本研究将 PCR—DGGE 指纹图谱技术与 16S rDNA 序列分析相结合, 用于藏灵菇中微生物多样性的研究, 比较了不同来源藏灵菇中微生物的种群结构, 结果表明, 藏灵菇中含有多种乳酸菌和多种酵母菌, 另外还存在不可培养微生物。细菌的种群结构较酵母菌复杂, 不同来源的藏灵菇中微生物的种群结构具有一定差异, 这与许多学者对开菲尔粒的研究结果极为相似^[8,9]。

藏灵菇发酵奶发酵过程中微生物种群动力学研究揭示了藏灵菇中各种微生物在发酵过程中的消长变化, 为进行有效的发酵调控, 发酵过程中优势菌筛选及纯培养发酵剂的开发提供理论依据。

本研究结果表明, 将 DGGE 和 16S rDNA (细菌), 26S rDNA (酵母菌) 序列分析技术结合, 用于藏灵菇中微生物群落多样性分析十分有效。PCR—DGGE 能够跟踪发酵过程, 提供实时信息。将该技术引入我国传统发酵食品的研究, 可以更加深入了解发酵机理, 提升技术水平和生产效率, 提高产品档次, 是利用生物技术改造传统产业的重要突破口, 具有广阔的发展前景, 能产生巨大的社会效益和经济效益。

参考文献

- [1] Hugenholtz P, Goebbel B M, Pace N R. *Journal of Bacteriology*, 1998, **180**: 4765 ~ 4774.
- [2] Pace N R. *Science*, 1997, **276**: 734 ~ 740.
- [3] Omar B, Ampe F. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**: 3664 ~ 3673.
- [4] Cinzia L R, Sandra T, Antoon D L A, *et al.* *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **4**: 1882 ~ 1892.
- [5] Anu T T, Alatossava T. *Food Microbiology*, 2004, **21**: 365 ~ 368.
- [6] Muyzer G E, Wall C D, Uitterlinden A G. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, **59**: 695 ~ 700.
- [7] Cocolin L, Aggio D, Manzano M, *et al.* *Int Dairy J*, 2002, **12**: 407 ~ 411.
- [8] Angulo L, Lopez E, Lema C. *Journal of Dairy Research*, 1993, **60**: 263 ~ 267.
- [9] Witthuhn R C, Schoeman T, Britz T J. *International Journal of Dairy Technology*, 2004, **57**: 33 ~ 37.