

智微园大学生科技服务团“协同育人”系列丛书

恩施市

传统发酵食品微生物多样性研究

ENSHI SHI
CHUANTONG FAJIAO SHIPIN
WEISHENGWU DUOYANGXING YANJIU

湖北文理学院智微园大学生科技服务团 © 编著



西南交通大学出版社

智微园大学生科技服务团“协同育人”系列丛书

恩施市传统发酵食品微生物 多样性研究

湖北文理学院智微园大学生科技服务团 © 编 著

西南交通大学出版社

· 成 都 ·

图书在版编目 (C I P) 数据

恩施市传统发酵食品微生物多样性研究 / 湖北文理学院智微园大学生科技服务团编著. —成都: 西南交通大学出版社, 2019.5

(智微园大学生科技服务团“协同育人”系列丛书)
ISBN 978-7-5643-6876-0

I. ①恩… II. ①湖… III. ①发酵食品—食品微生物—生物多样性—研究—恩施 IV. ①TS201.3

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2019) 第 093786 号

智微园大学生科技服务团“协同育人”系列丛书

恩施市传统发酵食品微生物多样性研究

湖北文理学院智微园大学生科技服务团 编著

责任编辑	牛 君
助理编辑	赵永铭
封面设计	曹天擎
出版发行	西南交通大学出版社 (四川省成都市金牛区二环路北一段 111 号 西南交通大学创新大厦 21 楼)
发行部电话	028-87600564 028-87600533
邮政编码	610031
网 址	http://www.xnjdcbs.com
印 刷	成都勤德印务有限公司
成品尺寸	170 mm × 230 mm
印 张	12.5
字 数	197 千
版 次	2019 年 5 月第 1 版
印 次	2019 年 5 月第 1 次
书 号	ISBN 978-7-5643-6876-0
定 价	68.00 元

图书如有印装质量问题 本社负责退换
版权所有 盗版必究 举报电话: 028-87600562

《恩施市传统发酵食品微生物多样性研究》

指导教师团队名单

湖北文理学院	郭壮	张振东	赵慧君
	侯强川	雷敏	王玉荣
	折米娜	王海燕	汪娇
恩施市公共检验检测中心	叶辉	陈红	任维仲
恩施市农业局	廖华		
恩施市硒资源保护与开发中心	黄恒兴	严大银	
恩施土家族苗族自治州公共检验检测中心	薛华	谢义梅	熊坤

资助项目：

湖北文理学院“协同育人”专项

湖北文理学院学科建设项目

湖北省第七批博士服务团专题调研项目

《恩施市传统发酵食品微生物多样性研究》

智微园大学生科技服务团参与人员名单

食品科学与工程 14 级	蔡宏宇	杨成聪			
食品科学与工程 15 级	沈馨	王丹丹	邹金	张毅	
食品质量与安全 15 级	杨小丽				
食品科学与工程 16 级	尚雪娇	董蕴	倪慧	周书楠	
	杨江	颜娜	望诗琪	吕虎晋	
	邓风	杨发容	许小玲	代程洋	
食品质量与安全 16 级	舒娜				
食品科学与工程 17 级	葛东颖	向凡舒	崔梦君	李娜	
	雷炎	马佳佳	张逸舒		
食品科学与工程 18 级	刘雪婷	马彬杰	魏冰倩	周亚澳	

前 言

恩施土家族苗族自治州恩施市地处湖北省西南部，紧邻湘、渝，被大巴山、巫山、齐岳山和武陵山等山脉环绕，境内地势复杂，河谷深切，河流较多。生活着汉族、土家族和苗族等 27 个民族，少数民族文化多姿多彩，传统发酵食品制作技艺更是不胜枚举。传统发酵食品中微生物的构成不仅影响了产品的风味品质，同时其含有的一些条件致病菌亦可能存在一定安全隐患，因而对传统发酵食品的微生物多样性进行解析则显得尤为重要。

根据《湖北文理学院“协同育人 337 工程”实施方案》和《湖北文理学院“双百行动计划”实施细则》，智微园大学生科技服务团与恩施市农业局、恩施市公共检验检测中心、恩施市硒资源保护与开发中心和恩施土家族苗族自治州公共检验检测中心合作，以“恩施市传统发酵食品微生物多样性研究”为切入点，积极引导食品科学与工程、食品质量与安全专业本科生参与科研创新活动，在发酵肉制品、发酵蔬菜制品、腌制蔬菜制品、发酵酒制品和发酵豆制品微生物多样性解析及传统发酵食品微生物分离、鉴定、收集和保藏等方面取得了初步的研究成果。

本书将团队成员前期发表的学术论文集结成册，以便于食品科学与工程类专业师生、第三方检测平台和发酵食品生产企业技术人员翻阅斧正。全书共分 6 章，第 1 章为恩施市发酵肉制品微生物多样性解析，第 2 章为恩施市发酵蔬菜制品微生物多样性解析，第 3 章为恩施市腌制蔬菜制品微生物多样性解析，第 4 章为恩施市发酵

酒制品微生物多样性解析,第5章为恩施市发酵豆制品微生物多样性解析,第6章为恩施市传统发酵食品和长寿老人肠道中乳酸菌和双歧杆菌分离株目录。

本书的出版得到了湖北文理学院“协同育人”专项、湖北文理学院学科建设项目和湖北省第七批博士服务团专题调研项目经费资助,在此我们表示感谢。

编 者

2018年11月

目 录

第 1 章 恩施市发酵肉制品微生物多样性解析	1
1.1 恩施市腊肠细菌多样性解析	1
1.1.1 材料与方法	2
1.1.2 结果与讨论	4
1.1.3 结 论	9
1.2 恩施市腊肉细菌多样性解析	11
1.2.1 材料与方法	12
1.2.2 结果与分析	14
1.2.3 结 论	19
1.3 恩施市腊鱼细菌多样性解析	23
1.3.1 材料与方法	24
1.3.2 结果与讨论	26
1.3.3 结 论	32
第 2 章 恩施市发酵蔬菜制品微生物多样性解析	35
2.1 恩施市泡辣椒细菌多样性解析	35
2.1.1 材料与方法	36
2.1.2 结果与分析	39
2.1.3 结 论	44
2.2 恩施市酸萝卜细菌多样性解析	47
2.2.1 材料与方法	48
2.2.2 结果与讨论	51
2.2.3 结 论	57
2.3 恩施市酸菜水细菌多样性解析	59
2.3.1 材料与方法	60

2.3.2	结果与分析	63
2.3.3	结 论	68
2.4	恩施鲜广椒中乳酸菌的分离鉴定及其 对鲜广椒挥发性物质影响	71
2.4.1	材料与amp;方法	72
2.4.2	结果与分析	75
2.4.3	结 论	80
2.5	泡萝卜中乳酸菌的分离鉴定及其对品质的影响	81
2.5.1	材料与amp;方法	82
2.5.2	结果与分析	85
2.5.3	结 论	90
2.6	酸豇豆中乳酸菌多样性解析及其分离株发酵特性评价	92
2.6.1	材料与amp;方法	93
2.6.2	结果与分析	95
2.6.3	结 论	101
第3章	恩施市腌制蔬菜制品微生物多样性解析	104
3.1	恩施市腌芥菜细菌多样性解析	104
3.1.1	材料与amp;方法	105
3.1.2	结果与分析	108
3.1.3	结 论	113
3.2	恩施市梅干菜细菌多样性解析	116
3.2.1	材料与amp;方法	117
3.2.2	结果与分析	119
3.2.3	结 论	123
第4章	恩施市发酵酒制品微生物多样性解析	126
4.1	恩施市米酒细菌多样性解析	126
4.1.1	材料与amp;方法	126
4.1.2	结果与分析	129
4.1.3	结 论	136
4.2	恩施市米酒真菌多样性解析	139
4.2.1	材料与amp;方法	140

4.2.2	结果与讨论	142
4.2.3	结 论	148
第 5 章	恩施市发酵豆制品微生物多样性解析	151
5.1	恩施市发酵腐乳细菌多样性解析	151
5.1.1	材料与amp;方法	152
5.1.2	结果与分析	154
5.1.3	结 论	160
第 6 章	恩施市传统发酵食品和长寿老人肠道中乳酸菌和 双歧杆菌分离株目录	163
6.1	双歧杆菌属	163
6.2	肠球菌属	164
6.3	乳杆菌属	166
6.4	片球菌属	185
6.5	链球菌属	185
6.6	魏斯氏菌属	186
附 录	187
附录 A	乳酸菌常用培养基及配方	187
附录 B	可用于食品的菌种名单	187

第1章 恩施市发酵肉制品微生物多样性解析

1.1 恩施市腊肠细菌多样性解析

中式腊肠创于南北朝前期，是一种外形美观、味道鲜醇、营养丰富的传统风味肉制品^[1]。传统中式腊肠多采用自然发酵的方式制作，而被称为“世界硒都”的恩施土家族苗族自治州境内以山地为主体，少数民族文化多样，较好地保留了这种传统腊肠制作工艺^[2]。该地生产的腊肠以散养鄂西土猪猪肉为原料，添加食盐、白酒、香辛料、八角和花椒等辅料用松柏木熏制或自然晾晒而成。传统的制作方法、开放的贮藏条件不仅赋予了恩施腊肠鲜香劲道的品质同时也使得原料、香辛料以及环境中复杂的微生物更容易进入腊肠成品中。

近年来研究人员围绕腊肠中微生物多样性开展多项卓有成效的研究。刘长建从腊肠中分离出 35 株具有降胆固醇能力的乳酸菌，通过对比发现 *Lactobacillus casei*（干酪乳杆菌）清除胆固醇的效率最高^[3]；谢科采用传统分离培养方法从广式腊肠中分离出 4 株 *Staphylococcus*（葡萄球菌）和 2 株 *lactic acid bacteria*（乳酸菌），使用 PCR-DGGE 技术分析发现 *staphylococcus saprophyticus*（腐生葡萄球菌）、*Lactobacillus*（乳杆菌属）和 *staphylococcus xylosum*（木糖葡萄球菌）为其中主要的优势细菌^[4]；Xinhui Wang 采用高通量测序技术对中式干腊肠、中式熏腊肠和香肠中细菌群落结构差异进行了分析，发现中式干腊肠、中式熏腊肠中细菌分布比香肠更为丰富^[5]。除此之外，研究人员还对红曲菌^[6]、戊糖乳杆菌^[7]、葡萄球菌和乳酸菌^[8-9]对腊肠品质的影响以及腊肠中风味物质^[10-11]进行了分析，然而上述研究多围绕广式腊肠展开，而有关恩施地区腊肠微生物多样性的研究尚少。

本研究采用聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳 (Polymerase Chain Reaction-Denatured Gradient Gel Electrophoresi, PCR-DGGE) 与 Illumina Miseq 高通量测序 (High-throughput sequencing) 技术相结合的方法对采集自恩施土家族苗族自治州的腊肠中细菌群落结构多样性进行了研究, 以期为该地区腊肠微生物多样性的解析提供一定的数据支撑。

1.1.1 材料与方法

1. 材料与试剂

腊肠: 采集自湖北省恩施市土桥坝和舞阳坝体育场菜市场; 聚丙烯酰胺、冰醋酸、酚、尿素、过硫酸铵、四甲基乙二胺、硝酸银、甲醛、乙二胺四乙酸二钠、N,N-亚甲基二丙烯酰胺和氯仿: 国药集团化学试剂有限公司; QIAGEN DNeasy mericon Food Kit 提取试剂盒: 德国 QIAGEN 公司; Axygen 清洁试剂盒: 北京科博汇智生物科技发展有限公司; SolutionI、6× Loading buffer、DNA 聚合酶、dNTP mix、pMD18-T vector 和 10× PCR Buffer: 宝生物工程 (大连) 有限公司; 引物由武汉天一辉远生物科技有限公司合成。

2. 仪器与设备

HBM-400B 拍击式无菌均质器: 天津市恒奥科技发展有限公司; DCodeTM System: 美国 Bio-Rad 公司; VeritiTM 96 孔梯度 PCR 扩增仪: 美国 AB 公司; 5810R 台式高速冷冻离心机: 德国 Eppendorf 公司; ND-2000C 微量紫外分光光度计: 美国 Nano Drop 公司; Bio-5000 plus 扫描仪: 上海中晶科技有限公司; Miseq PE300 高通量测序平台: 美国 Illumina 公司; R920 机架式服务器: 美国 DELL 公司。

3. 方 法

(1) 样品采集

本研究分别从湖北省恩施市土桥坝和舞阳坝体育场菜市场采集腊肠样品 5 个, 编号为 LC1-LC5。

(2) 样品预处理微生物宏基因组 DNA 提取

将腊肠切碎后, 取 10 g 加入 90 mL 生理盐水, 使用拍击器拍击

3 min 后, 300 r/min 离心 10 min 取上清, 上清液 10 000 r/min 离心 10 min 后取沉淀, 参照 QIAGEN DNeasy mericon Food Kit 约束方法进行微生物宏基因组 DNA 提取。

(3) 基于 DGGE 技术的腊肠细菌多样性评价

用灭菌双蒸水将各样品宏基因组 DNA 的浓度调至 30 ng/ μ L 用于后续扩增 PCR 扩增体系为 25 μ L, 正向和反向引物分别为 LacF-GC-V₃F (5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGCCCGGGGGCACC GG GGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 Lac-V₃R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'), 扩增条件和程序参照文献 12 和 13 中的方法进行。扩增结束后用 1% 的琼脂糖凝胶电泳 (2 000 bp 的 Maker 为参照, 电压为 120 V, 恒压时间为 30 min) 检测是否扩增出单一明亮的目的条带。

本研究使用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶, 变性范围为 35%~52%, 将 0.5 \times TAE 缓冲溶液温度调至 60 $^{\circ}$ C, 每个胶孔加入 10 μ L 扩增产物, 120 V 预电泳 78 min 然后 80 V 固定电压下电泳 13 h。电泳结束后的凝胶采用银染法显色, 并置于扫描仪上成像^[14]。用无菌手术刀回收优势条带, 加无菌超纯水过夜, 取回溶液 2 μ L 进行 PCR 扩增, 扩增使用不带 GC 夹子的正反引物各 0.5 μ L 以及 12.5 μ L 2 \times PCR mix, 用无菌超纯水补齐至 20 μ L, 扩增程序同 1.2.3。将重新扩增的 PCR 产物用清洁试剂盒清洁后连接至 PMD18-T 载体上, 然后导入大肠杆菌 Top10, 将筛选出的阳性克隆送至测序公司测序。

(4) 基于 Miseq 高通量测序技术的腊肠细菌多样性评价

对样品微生物宏基因组 16s rRNA 的 V₃~V₄ 进行扩增, 引物为 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGT-3'), 扩增时在引物的 5' 端加上核酸标签, 扩增体系和条件参照蔡丽云^[15]的方法。扩增产物检测合格后寄至上海美吉生物医药科技有限公司进行测序, 测序平台为 Illumian Miseq PE300。

将测序数据上传至 R920 机架式服务器端, 利用 QIIME 分析平台^[16]进行序列分析。原始数据去除低质量序列后采用两步 UCLUST 法^[17]在 97% 的相似度下划分分类操作单元 (Operational taxonomic units, OTU); 从每个 OTU 中挑选代表性序列与 RDP (Ribosomal Database Project, Release 11.5)^[18]和 Greengenes (Release 13.8)^[17]数据库进行比对后使

用 FastTree 软件^[19]构建系统发育进化树，并计算 α 多样性。

(5) 数据处理

使用多元统计学手段对微生物各分类地位的种类、数量、相对含量以及 α 多样性指数进行计算；序列长度分布图、OTU 出现频率和包含序列数统计图以及腊肠中优势核心 OTU 相对含量的比较分析由 Origin2017 软件绘制；腊肠中优势细菌门属相对含量的比较分析图和腊肠中优势核心 OTU 相对含量的比较分析图由 Excel 2016 绘制。

1.1.2 结果与讨论

1. 基于 DGGE 技术的腊肠细菌多样性分析

本研究首先使用 PCR-DGGE 技术对腊肠样品中细菌的多样性进行了分析，其指纹图谱如图 1-1 所示。

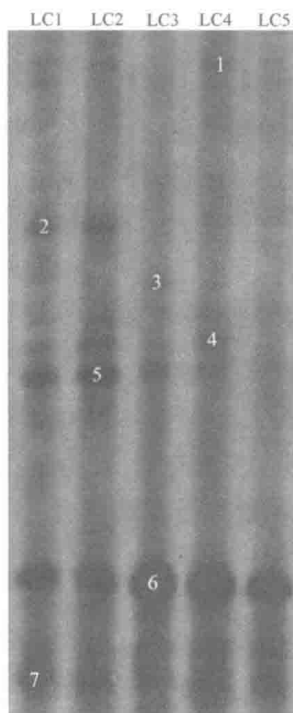


图 1-1 腊肠中细菌的 DGGE 图谱

注：编号 1~7 为优势条带编号，分别对应 LC01~LC07。

由图 1-1 可知, 条带 6 和条带 7 亮度远高于其他 5 个条带且在每个样品中均存在, 这说明条带 6 和条带 7 所代表的细菌可能为腊肠样品中的优势菌属。值得一提的是, 条带 1~5 亮度偏暗, 且其仅在某几个腊肠样品中存在, 这说明这些条带代表的菌属在腊肠中的含量偏低, 且可能仅存在于部分样品中。由图 1-1 亦可知, LC1 样品的条带数最多而 LC5 样品最少, 这说明 LC1 样品的细菌多样性最高而 LC5 最低。各条带比对分析结果如表 1-1 所示。

表 1-1 细菌 DGGE 条带测序结果

条带编号	近源种	相似度 /%	登录号	分类
LC01	<i>Anaerostipes hadrus</i> (毛螺旋菌属)	100	NR_117139.2	Firmicutes
LC02	不可培养细菌	—	—	—
LC03	<i>Acinetobacter johnsonii</i> (不动细菌属)	99	MG846022.1	Proteobacteria
LC04	<i>Vibrio litoralis</i> (弧菌属)	98	NR_043545.1	Proteobacteria
LC05	<i>Staphylococcus equorum</i> (葡萄球菌属)	100	NR_027520.1	Firmicutes
LC06	<i>Brochothrix thermosphacta</i> (环丝菌属)	100	NR_113587.1	Firmicutes
LC07	不可培养细菌	—	—	—

由表 1-1 可知, 经比对发现腊肠样品中细菌由 *Anaerostipes hadrus* (毛螺旋菌属)、*Acinetobacter johnsonii* (不动细菌属)、*Vibrio litoralis* (弧菌属)、*Staphylococcus equorum* (葡萄球菌属)、*Brochothrix thermosphacta* (环丝菌属) 和未知分类地位的不可培养细菌构成, 且 *Brochothrix* (环丝菌属) 为其优势细菌属。

2. 基于 Miseq 高通量测序技术的腊肠细菌多样性评价

较之 PCR-DGGE 技术, 以 Miseq 为代表的第二代高通量测序技术具有通量高的优点, 且实现了菌群的相对定量分析, 因而本研究进一步采用 Miseq 高通量测序技术对 5 个腊肠样品的细菌多样性进行了解析, 同时对 PCR-DGGE 的结果进行了验证。通过 Miseq 高通量测序, 本研究 5 个腊肠样品共产生 193 486 条高质量的 16s rDNA 序列, 平均每个腊肠样品产生 38 697 条, 切除引物和 barcode 后序列长度的分布情况如图 1-2 所示。

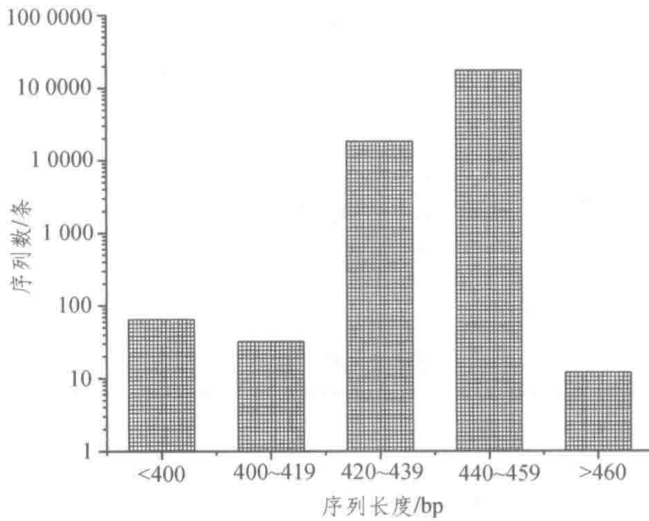


图 1-2 序列长度分布图

由图 1-2 可知，193 486 条高质量的 16s rDNA 序列中有 175 308 条集中在 440 ~ 459 bp，占到序列总数的 90.61%，18 069 条集中在 420 ~ 439bp，占到序列总数的 9.34%。使用 QIIME 平台，对高质量序列进行生物信息学分析，共有 193 356 条序列通过 Align（对齐），按照 100%相似性进行 UCLUST 后共得到 84 979 条代表性序列，按照 97%相似性进行 UCLUST 后共得到 8 057 个 OTU 且没有发现嵌合体。本研究进一步对 OTU 在 5 个样品中出现的频率和包含序列数进行了统计，结果如图 1-3 所示。

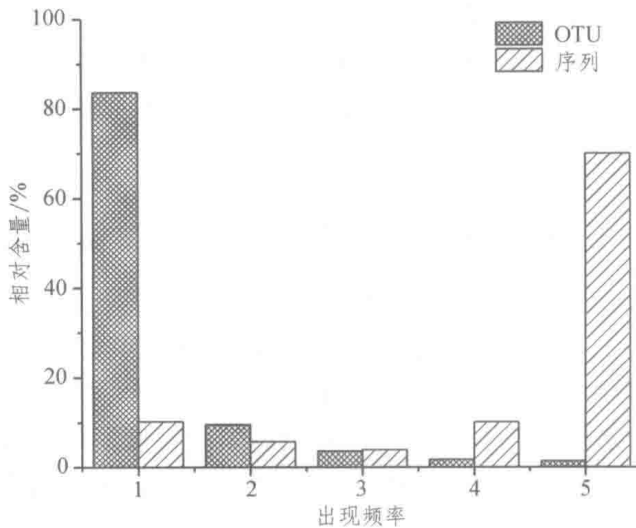


图 1-3 OTU 出现频率和包含序列数统计

由图 1-3 可知, 在 5 个样品中出现 1 次、2 次、3 次和 4 次的 OTU 分别有 6 742 个、771 个、289 个和 142 个, 分别占 OTU 总数的 83.68%、9.57%、3.59% 和 1.76%, 其包含的序列数分别为 18 341 条、11 093 条、7 039 条和 19 140 条, 分别占有所有质控后合格序列数的 10.21%、5.76%、3.88% 和 10.13%。虽然核心 OTU 仅有 113 个, 仅占 OTU 总数的 1.40%, 但其包含的序列数为 137 743 条, 占有所有质控后合格序列数的 70.02%。由此可见, 5 个腊肠样品共有大量的细菌类群。

使用 RDP 和 Greengenes 数据库比对后, 所有序列鉴定到 14 个门、58 个纲、90 个目、110 个科和 261 个属。各样品测序情况及各分类地位数量如表 1-2 所示。

表 1-2 样品测序情况及各分类地位数量

样品编号	序列数/条	OTU 数 /个	门/个	纲/个	目/个	科/个	属/个	超 1 指数	香农 指数
LC1	30 005	2 737	10	21	45	88	203	1 348	6.65
LC2	31 829	1 827	12	25	52	99	199	1 120	5.08
LC3	50 590	2 560	5	13	24	46	75	1 295	4.36
LC4	37 575	1 759	7	14	32	61	102	1 157	4.26
LC5	43 357	1 401	6	13	28	55	93	865	1.49

注: 超 1 指数和香农指数均在测序量为 28 410 条序列时计算所得。

由表 1-2 可知, LC1 样品的超 1 指数和香农指数值均最大, 而 LC5 样品的两个值均最小, 这说明 LC1 样品的细菌多样性最高而 LC5 最低, 与 PCR-DGGE 结果一致。本研究进一步在门水平上对腊肠样品中细菌多样性进行了解析, 结果如图 1-4 所示。

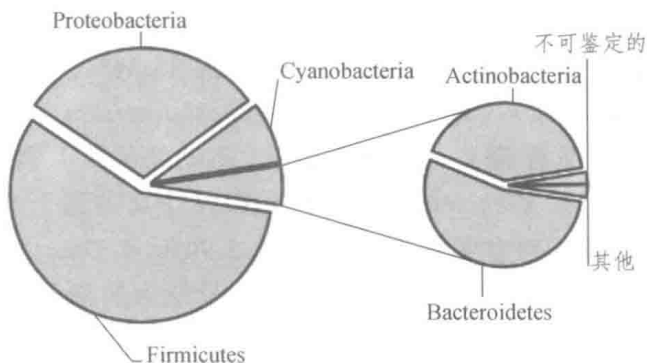


图 1-4 腊肠中优势细菌门相对含量的比较分析