

文章编号:1673-1689(2011)06-0945-05

超高压处理抑制低温烟熏火腿中的优势腐败菌

束玮炜¹, 韩衍青², 徐幸莲^{*2}, 周光宏²

(1. 南京农业大学 食品科技学院, 南京 210095; 2. 南京农业大学 教育部肉品加工与质量控制重点实验室, 南京 210095)

摘 要: 研究尝试应用微生物菌体总 RNA 提取代替 DNA 提取, 进而通过反转录-PCR(RT-PCR), 结合变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)技术, 以期揭示超高压处理后低温烟熏火腿中腐败微生物的存活情况, 探索 RNA-DGGE 手段判定超高压处理后微生物存活状态的可行性。分别以 400 MPa 和 600 MPa 的压力在室温(22 ℃)条件下, 对包装后的烟熏火腿进行 10 min 超高压处理, 未经高压处理样品作对照, 于 4 ℃ 冷藏条件下, 贮藏 1、15、30、60、90 d, 直接提取样品中微生物的总 RNA, 对其进行 RT-PCR 和 DGGE 指纹图谱分析。DGGE 指纹图谱显示, 超高压处理对烟熏火腿中的优势腐败菌具有较强的抑制作用, 且随压力的升高抑菌效应增强; 超高压处理后烟熏火腿微生物种群结构变得单一, *Weissella viridescens* 和 *Leuconostoc mesenteroides* 是超高压处理后烟熏火腿中的优势腐败菌。基于菌体总 RNA 提取的 DGGE 手段能够有效检测超高压处理后微生物的存活状况, 揭示超高压对低温烟熏火腿中优势腐败微生物的抑菌效果。

关键词: 超高压; 低温火腿; DGGE; 腐败菌

中图分类号: TS 201

文献标识码: A

Inactivation of the Predominant *Spoilage Bacteria* in Sliced Cooked Ham by High Pressure

SHU Wei-wei¹, HAN Yan-qing², XU Xing-lian^{*2}, ZHOU Guang-hong²

(1. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Key Laboratory of Meat Processing and Quality Control, Ministry of Education, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In this study, total RNA, instead of genome DNA, was extracted from pressurized cooked ham and then performed with RT-PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis to explore whether this molecular method was feasible to reveal the active species in the samples. Sliced vacuum-packed cooked ham were high pressure treated at 400 MPa and 600 MPa for 10 min at room temperature (22 ℃) and then stored at 4 ℃. Directly RNA extraction from meat samples and RT-PCR-DGGE analysis was performed at storage time 1, 30, 60, 90 days

收稿日期: 2010-10-23

基金项目: 江苏省科技成果转化专项资金项目(BA2009007); 江苏省普通高校研究生创新计划项目(CX10B_310Z)。

* 通信作者: 徐幸莲(1962—), 女, 江苏吴江人, 工学博士, 教授, 主要从事畜产品加工与质量控制研究。

Email: xlxu@njau.edu.cn

(after HPP). Results showed that the major spoilage bacteria in the samples were largely inactivated by HPP and that higher level of pressure led to better effect. The microbial diversity of HPP samples during the whole refrigerated storage was extremely simple. Only *Weissella viridescens* survived the HPP of 600 MPa for 10 min at 22 °C and *Weissella viridescens* coupled with *Leuconostoc mesenteroides* survived the HPP of 400 MPa for 10 min at 22 °C. The RNA-based DGGE method adopted is shown to be an efficient tool for the detection of active bacteria in pressurized cooked ham.

Key words: high pressure, cooked ham, DGGE, *Spoilage organism*, High Pressure Processing, HPP

作为一种非热杀菌手段,可以在室温或接近室温的条件下,显著地抑制微生物的生长,同时较好地保持食品的色、味、形及营养成分,延长食品的货架期^[1-3]。烟熏切片火腿是一类低温加工的西式肉制品,采用较低的温度(65~85 °C)进行热加工,在严格的低温车间生产,在低温冷链下运输和销售。低温肉制品集营养、风味、安全于一体,技术含量高、市场广阔,代表了肉品发展的主导方向。然而,由于蒸煮温度较低,以及后续切片包装过程中存在的二次污染,此类肉制品货架期很短,低温条件下(4~8 °C)仅2周左右就发生腐败变质。应用超高压手段延长肉制品货架期的研究早在20世纪90年代就已开始,现今,超高压技术在产业化火腿加工中已得到非常广泛的应用。

一般认为,作为一种纯物理手段,超高压处理后微生物存在3种状态:死亡、受伤和存活。受伤微生物经过一段时间的修复能够重新繁殖,转化为正常存活的微生物^[4]。目前,检测超高压食品微生物存活状况的方法中,传统培养方法和基于基因组DNA的分子分析方法都存在一定的缺陷,无法兼顾对受伤微生物的检测。传统培养方法工作量大,精确度不高。通过分析微生物基因组DNA,虽然可以判断样品中是否存在某种细菌,却不能判断这些细菌的存活情况^[5],Duineveld研究发现,基于DNA的细菌群落指纹技术不能反映不同土壤在生理特性、可培养细菌的数量和微生物存活状态上存在的明显差异,直接提取DNA不能准确的反映土壤微环境的变化^[6]。通常情况下,新陈代谢活跃的细胞中存在更多的细胞间16S rRNA^[7],而rRNA的合成与细胞生长关系密切。所以,分析目标rRNA比分析rDNA能够提供更多的关于存活微生物群落的信息^[8],从而更有说服力。

本实验结合相关研究^[9],应用400 MPa和600 MPa的压力在常温(22 °C)下对烟熏切片火腿进行

10 min 超高压处理,于4 °C贮藏条件下,直接提取样品的微生物总RNA进行RT-PCR-DGGE指纹图谱分析,探索通过提取总RNA研究存活微生物及其消长规律的可行性,并揭示超高压对低温烟熏火腿中主要腐败微生物的抑制情况,为超高压技术在低温肉制品杀菌中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 低温烟熏火腿加工

低温烟熏火腿加工流程参考文献^[10]的方法,加工过程在江苏雨润食品产业集团第一生产车间实施,切片按车间标准工序进行,每片厚约0.5 cm,质量15~17 g,包装材料为聚酰胺/聚乙烯包装袋,每6片一个包装(每袋100 g左右)。

1.2 超高压处理

超高压处理装置为包头科发高新技术食品机械公司制造的UHPF/2L/800MPa型食品高压设备。最高工作压力为750 MPa,升压速度约50 MPa/s,卸压速度约100 MPa/s。高压处理分为:对照组(non-treated, NT组)、400MPa/10min处理组(A组)和600MPa/10min处理组(B组)3组。处理时间不包括升压和卸压的时间,高压处理都在室温环境(22 °C)下进行。传压介质为葵二酸二辛酯液压油,高压处理结束后样品放入冰中,带回实验室。

1.3 贮藏与取样

样品贮藏于4 °C冷库,根据试验要求于1、15、30、60、90 d分别取样进行分子生物学分析。

1.4 样品中微生物总RNA的直接提取

参照RNAiso™提取说明书(大连宝生物工程有限公司, TaKaRa),并作部分修改,具体方法如下:火腿经击碎、混匀(袋内完成)后,无菌取样10 g稀释于50 mL蛋白胨-生理盐水中,匀浆后于4 °C振摇30 min,并静止5 min使大碎片沉降,移取35 mL上清液至50 mL无菌离心管,4 000 g,4 °C离心

10 min。转移 20 mL 上清液至 50 mL 无菌离心管中,10 000 g,4 ℃离心 20 min。得到的菌体沉淀转移至 2 mL 无菌管,加入 1 mL RNAiso™(大连宝生物工程有限公司),涡旋式混合 2 min 后,于室温(15~25 ℃)静置 5 min。再加入 200 μ L 氯仿,静置 5 min 使其充分混合。12 000 g,4 ℃条件下离心 15 min,移取上清液至 1.5 mL 无 RNase 的离心管,加入 400 μ L 异丙醇,室温静置 10 min,再次 12 000 g,4 ℃离心 10 min。弃去上清液后,沿离心管壁加入体积分数 75% 的乙醇 1 mL,上下颠倒洗涤离心管管壁,12 000 g,4 ℃离心 5 min。弃净上清液,加入适量的 RNase-free 水(大连宝生物工程有限公司)充分溶解沉淀。沉淀溶解后,加入 1 μ L RNase Free DNase I (5 U/ μ L, 大连宝生物工程有限公司),于 37 ℃放置 20~30 min 以除去基因组 DNA。纯化后的 RNA 于-80 ℃冻藏备用。

1.5 RT-PCR

RT-PCR 扩增在 Mastercycler ep PCR 仪(Eppendorf, Germany)上进行。采用 RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0(大连宝生物工程有限公司)试剂盒,以 Random 9 mers 为反转录引物,1 μ L 总 RNA (100~300 ng)作模板,按照试剂盒操作完成 cDNA 的合成。反转录程序如下:30 ℃,10 min;42 ℃,30 min;99 ℃,5 min;5 ℃,5 min;最后冷却至 4 ℃。然后对细菌 16S rDNA 的 V3 可变区进行 PCR 扩增。上游引物为 gc338f (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')[11]。以 cDNA 作为模板合成双链 DNA,PCR 反应条件如下:94 ℃预变性 2 min,30 个循环(94 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s),最终 72 ℃延伸 1 min,冷却至 4 ℃。得到的 PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 DGGE 分析

PCR 产物(约 230 bp)使用 Dcode™突变检测系统(BioRad, Richmond, CA)进行 DGGE 分析。分析方法参照参考文献[12-13]。PCR 产物上样量为 7~8 μ L。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 35% 到 55%(100% 变性剂含有 7 mol/L 尿素和 40% 甲酰胺),在 0.5×TAE 缓冲液中,先 200 V 预电泳 10 min,然后在 85V 的恒定电压下电泳 16 h。用 ethidium bromide (0.5 mg/L)的 0.5×TAE 缓冲液中染色 20 min,然后在 10 min 内用超纯水洗脱 2

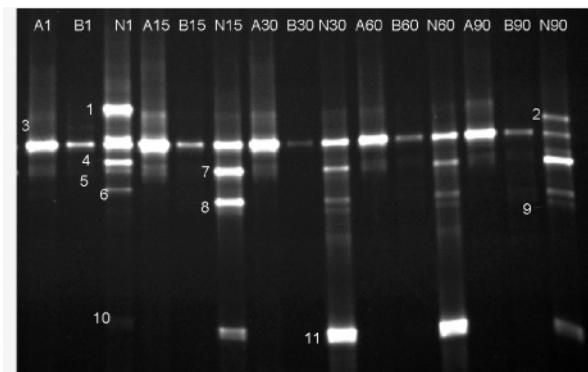
次,凝胶成像仪(BioRad)拍照,得到的图像用 Quantity one(Bio-rad)软件编辑、分析。

1.7 测序

用无菌手术刀切下 DGGE 胶上不同位置的条带,分别放入 1.5 mL DNA-Free 离心管中(Invitrogen 公司,上海),并加入 20 μ L 无菌水,于 4 ℃条件下保存过夜。以 2~4 μ L 洗脱液作为模板,进行 PCR 扩增,引物为不含 gc 夹子的 338f 和 518r,扩增程序同 1.5 节中 PCR 扩增所述。PCR 产物送上海 Invitrogen 公司测序,测序结果与美国国立生物技术信息中心(NCBI)数据库中的已知序列比对。通过 Blast 在 Genbank 中搜索与此局部 16S rDNA 序列最接近的已知序列。

2 结果与讨论

整个贮藏过程中各处理组微生物种群变化的 DGGE 图谱如图 1 所示。图中各条带所代表的微生物名称列于表 1。



(A)600 MPa 处理组;(B)对照组;(N)RNA-DGGE 图谱

图 1 贮藏 1、15、30、60、90 d 400 MPa 处理组

Fig. 1 RNA-DGGE profile of bacterial community in pressure treated and non-treated samples at storage time 1, 15, 30, 60 and 90 days

表 1 DGGE 割胶条带序列比对结果

Tab. 1 Identification of the bands excised from DGGE gels

条带 编号	亲缘关系 最近的菌株	相似性 ID (%)	序列 登录号
1	<i>Lactococcus garvieae</i>	100	GU363927
2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100	GU363929
3	<i>Weissella viridescens</i>	100	GU363930
4	<i>Weissella cibaria</i>	100	GU363931
5	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99	GU363932
6	<i>Weissella paramesenteroides</i>	99	GU363934
7	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99	GU363932

续表 1

条带 编号	亲缘关系 最近的菌株	相似性 ID (%)	序列 登录号
8	<i>Lactobacillus sakei</i>	100	GU363935
9	<i>Lactobacillus curvatus</i>	100	GU363936
10	<i>Leuconostoc carnosum</i>	99	GU363937
11	<i>Leuconostoc carnosum</i>	99	GU363937

总体来讲,超高压处理后微生物菌相变得单一,仅有 1~2 株微生物存活。对照组微生物菌相对复杂,大量微生物种群主导产品的菌相。贮藏初期,对照组微生物种群较多,共有 6 条条带,分别为 *Lactococcus garvieae* (条带 1)、*Weissella viridescens* (条带 3)、*Weissella cibaria* (条带 4)、*Leuconostoc mesenteroides* (条带 5, 7)、*Weissella paramesenteroides* (条带 6) 和 *Leuconostoc carnosum* (条带 10, 11)。随着贮藏时间的延长,*Weissella cibaria* (条带 4)、*Weissella paramesenteroides* (条带 6) 和 *Lactococcus garvieae* (条带 1) 依次消失,说明其在贮藏阶段竞争力下降,逐渐死亡。而 *Weissella viridescens* (条带 3)、*Leuconostoc mesenteroides* (条带 5, 7)、*Lactobacillus sakei* (条带 8)、*Lactobacillus curvatus* (条带 9) 和 *Leuconostoc carnosum* (条带 10, 11) 在整个贮藏过程中始终存在,作为优势菌主导该类产品的腐败。

超高压处理后,优势腐败菌 *Lactobacillus sakei* (条带 8)、*Lactobacillus curvatus* (条带 9) 和 *Leuconostoc carnosum* (条带 10, 11) 的生长受到了有效的抑制。仅有 *Weissella viridescens* (条带 3) 能够耐受 600 MPa 的压力,而 *Leuconostoc mesenteroides* (条带 5, 7) 能够在 400 MPa 的压力处理后存活。此结果与 Diez 等人的研究结果相一致^[14],他们研究发现血肠(blood sausage)中 *Weissella viridescens* 比 *Leuconostoc mesenteroides* 相对耐压。Patterson 等的研究也发现了 *Weissella viridescens*

和 *Leuconostoc mesenteroides* 具有耐压特性^[15]。

Hu 的研究认为,*Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus* 和 *Leuconostoc mesenteroides* 是主导低温烟熏火腿腐败的优势菌^[13]。本试验中,经超高压处理后,*Lactobacillus sakei* 和 *Lactobacillus curvatus* 均被抑制,唯有 *Leuconostoc mesenteroides* 存活,与 *Weissella viridescens* 一起作为优势腐败菌主导产品的腐败。

试验采用直接提取样品微生物总 RNA 的方法研究超高压处理后烟熏火腿中微生物的存活情况,试图揭示超高压处理后真实存活的、能够影响产品腐败的微生物种群。可以肯定的是超高压能够导致大部分微生物种群的失活或死亡(*Lactococcus garvieae*, *Weissella cibaria*, *Weissella paramesenteroides*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus* 和 *Leuconostoc carnosum*),仅有少数几株耐压微生物种群存活(*Weissella viridescens* 和 *Leuconostoc mesenteroides*),并最终主导烟熏火腿腐败微生物的菌相。超高压处理在降低微生物种群多样性的同时,有效增强了食品的食用安全性,延长产品货架期。

3 结 语

超高压处理能够有效抑制低温烟熏火腿中的优势腐败微生物,且随压力的升高抑菌效应增强,超高压处理后烟熏火腿微生物种群结构变得单一。*Weissella viridescens* 和 *Leuconostoc mesenteroides* 是超高压处理后烟熏火腿中的优势腐败菌,超高压处理后低温烟熏火腿的腐败最终由二者主导。

致谢 感谢江苏雨润食品产业集团技术中心徐宝才总经理给予的试验取样方面的帮助以及南京财经大学鞠兴荣副校长和高瑀珑老师给予的高压设备的帮助。

参考文献(References):

- [1] Raso J, Barbosa-Canovas GV. Non-thermal preservation of foods using combined processing techniques [J]. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2003, 43(2): 265—285.
- [2] 陈淑花, 赵启成, 夏远景, 等. 超高压与低温协同作用对黄花鱼品质影响的研究 [J]. **食品与生物技术学报**, 2009, (4): 517—520.
CHEN Shu-hua, ZHAO Qi-cheng, XIA Yuan-jing, et al. Quality related aspects of high pressure low temperature processed fish[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, (4): 517—520. (in Chinese)
- [3] Matser AM, Krebbers B, Robert W, et al. Advantages of high pressure sterilization on quality of food products [J]. **Trends in Food Science & Technology**, 2004, 15(2): 79—85.

- [4] Cheftel JC. Review: High-pressure, microbial inactivation and food preservation [J]. **Food Science and Technology International**, 1995, 1: 75—90.
- [5] Díez, AM, Urso R, Rantsiou K, et al. Spoilage of blood sausages morcilla de Burgos treated with high hydrostatic pressure [J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2008, 123: 246—253.
- [6] Duineveld B, Kowalchuk G, Keijzer A, et al. Analysis of bacterial communities in the rhizosphere of chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA as well as DNA fragments coding for 16S rRNA [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2001, 67: 172—178.
- [7] Hoshino YT, Matsumoto N. DNA-versus RNA-based denaturing gradient gel electrophoresis profiles of a bacterial community during replenishment after soil fumigation [J]. **Soil Biology and Biochemistry**, 2007, 39: 434—444.
- [8] Wagner R. The regulation of ribosomal RNA synthesis and bacterial cell growth[J]. **Archives of microbiology**, 1994, 161: 100—109.
- [9] Cheftel J C, Culioli J. Effects of high pressure on meat: A review [J]. **Meat Science**, 1997, 46(3): 211—236.
- [10] 韩衍青, 张秋勤, 徐幸莲, 等. 超高压处理对烟熏切片火腿保质期的影响[J]. 农业工程学报, 2009, 25(8): 305—311.
HAN Yan-qing, ZHANG Qiu-qin, XU Xing-lian, et al. Effect of high pressure processing on refrigerated shelf-life of sliced smoked cooked ham [J]. **Transactions of the CSAE**, 2009, 25(8): 305—311. (in Chinese)
- [11] Ampe F, ben Omar N, Moizan C, et al. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1999, 65:54—64.
- [12] Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1993, 59: 695—700.
- [13] Hu P, Zhou G, Xu X, et al. Characterization of the predominant spoilage bacteria in sliced vacuum-packed cooked ham based on 16S rDNA-DGGE[J]. **Food Control**, 2009, 20: 99—104.
- [14] Díez AM, Santos EM, Jaime I, et al. Effectiveness of combined preservation methods to extend the shelf life of Morcilla de Burgos[J]. **Meat Science**, 2009, 81: 171—177.
- [15] Patterson MF, McKay AM, Connolly M, et al. Effect of high pressure on the microbiological quality of cooked chicken during storage at normal and abuse refrigeration temperatures[J]. **Food Microbiology**, 2010, 27(2): 266—273.