

气调包装生鲜冷却牛肉贮藏中微生物多样性分析

徐晓瑾¹ 欧杰^{1*} 严维凌² 马晨晨¹

(1. 上海海洋大学 食品学院 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心 上海 201306)

(2. 上海市食品研究所 上海 200235)

摘 要: 【目的】分析普通包装和气调包装(65% O₂ 和 35% CO₂)生鲜冷却牛肉在贮藏(4 °C)过程中的微生物多样性。【方法】通过 16S rDNA V3 区 PCR-DGGE (变性梯度凝胶电泳)方法和 16S rDNA 克隆分析法研究生鲜冷却牛肉中微生物菌落结构及菌相变化规律。【结果】初始菌相主要有嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)。贮藏过程中, 普通包装和气调包装生鲜冷却牛肉中优势菌均为 *Brochothrix* 和 *Pseudomonas*。气调包装冷却牛肉中细菌种类较少, 两种包装生鲜牛肉在贮藏前期菌相变化明显。【结论】不同包装冷却牛肉中微生物菌落结构有较大差异, 气调包装中 CO₂ 对 *Pseudomonas* 等细菌起到了一定的抑制作用。

关键词: 冷却牛肉, PCR-DGGE, 气调包装, 微生物多样性

Microbial diversity analysis of chilled beef during MAP storage

XU Xiao-Jin¹ OU Jie^{1*} YAN Wei-Ling² MA Chen-Chen¹

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China)

(2. Shanghai Food Research Institution, Shanghai 200235, China)

Abstract: [Objective] Analysis microbial diversity of chilled beef with MAP (modified at-

基金项目: 上海市科委工程中心建设项目(No. 11DZ2280300); 上海市科委重点科技攻关项目(No. 10391902300)

*通讯作者: Tel: 86-21-61900382; 信箱: jou@shou.edu.cn

收稿日期: 2012-07-31; 接受日期: 2012-09-19

mosphere packaging, 65% O₂ and 35% CO₂) and conventional packaging during storage (4 °C). [Methods] PCR-DGGE (polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis) of V3 area fragment of 16S rDNA and cloning analysis method of 16S rDNA were used to analysis the microbial diversity and dynamic changes of predominant bacteria in chilled beef with MAP and conventional packaging. [Results] *Psychrobacter* and *Pseudomonas* were the initial dominant bacteria. During storage, *Pseudomonas* and *Brochothrix* turned into the dominant bacteria in chilled beef with conventional and MAP packaging. The species of bacteria in beef with conventional packing were more abundant, and bacteria changed significantly at earlier storage. [Conclusion] The results showed a big difference in microbial community structure between two kinds of packing beef, and indicated that CO₂ played a certain inhibitory action in beef with MAP.

Keywords: Chilled beef, PCR-DGGE, MAP, Microbial diversity

生鲜冷却牛肉可为人体提供丰富的营养物质, 是深受人们喜爱的肉制品之一, 但其高营养高水分的特点使之成为极易腐败的食品^[1]。为了提高肉制品卫生品质, 冷却肉在流通过程中始终保持在 0–4 °C 范围内。气调包装(MAP)可较好地保持肉制品的口感、色泽、形状及营养, 同时可达到较长的保鲜期, 牛肉等红肉制品气调保鲜包装的保护气体由 O₂ 和 CO₂ 组成, O₂ 的浓度超过 60% 才能保持肉的红色色泽, CO₂ 的浓度不低于 25% 才能有效地抑制细菌的繁殖^[2]。

在冷却肉的贮藏过程中, 微生物的生长繁殖是导致腐败变质的主要原因。在低温冷藏条件下, 大多数微生物生长受抑制, 但有些嗜冷菌仍可以生长繁殖, 对冷却肉的品质和安全造成威胁^[3–4]。因此研究生鲜冷却牛肉中菌群构成与演替规律具有重要意义。目前国外已有一些生鲜牛肉中腐败微生物的分析报道^[4], 国内也有一些研究^[6–7], 但多集中于菌落结构研究, 对贮藏过程中菌相变化规律及气调包装的影响作用报道较少。

微生物菌落结构研究多采用传统的纯培养方法, 这种方法存在操作繁琐、工作量大的局限性。PCR-DGGE 方法不仅检测速度快, 而且能检测难以培养或不能培养的微生物^[8], 此方法已广泛应

用于微生物菌落多样性和种群差异研究^[9–10]。

本研究的主要目的是利用 PCR-DGGE 方法分析生鲜冷却牛肉的初始菌相、普通包装和气调包装(65% O₂ 和 35% CO₂)的生鲜冷却牛肉在低温贮藏(4 °C)过程中的微生物菌落结构和菌相变化规律, 了解生鲜冷却牛肉中微生物多样性及气调包装方式对微生物的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: 用于 PCR 扩增的全套试剂及扩增引物均购于上海生工生物工程技术服务有限公司; Biospin 细菌基因组 DNA 试剂盒和回收盒均购于 Biospin; pGEM-T Easy 载体; DH5 α 感受态细胞等链接转化所用全套试剂均购自 Promega 公司; Eppendorf AG 22331 Hamburg PCR 仪; SETA-Z-020 调温调湿箱(–40 °C–100 °C, ± 0.3 °C)上海爱斯佩克环境设备有限公司。

1.1.2 样品: 整牛去骨后腿肉于 2012 年 2 月购于上海某清真牛羊肉公司, 为当天屠宰, 冰藏, 1 h 内运至实验室, 无菌分割成约 100 g 肉块, 用 PET 材料进行普通包装和气调包装。样品于调温调湿箱(4 °C)保藏, 分别于 0、5、10 和 15 d 提取总细菌 DNA。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取: 取样品于 100 mL 灭菌生理盐水中拍击 90 s, 将液体 2 000 r/min 离心 3 min, 取上清液于 5 000×g 离心 10 min, 沉淀依次用 25 mL 和 1 mL 无菌水洗涤后 5 000×g 离心 5 min, 弃上清, 用 Biospin 细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取细菌总 DNA。所提取的 DNA 溶于 100 μL TE 缓冲液, -20 °C 条件下保存备用。

1.2.2 V3 可变区的 PCR 扩增: 用于 DGGE 分析的 PCR 扩增区域是 16S rDNA 的 V3 可变区。以总 DNA 为模板, 选择 V3 可变区引物 V3-2 和 V3-3 为引物进行扩增。PCR 反应体系为 Mix 体系: Premix Ex Taq 10 μL, ddH₂O 8 μL, V3-2 (10 μmol/L) 0.5 μL, V3-3 (10 μmol/L) 0.5 μL; 降落 PCR 反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 45 s, 65 °C 45 s, 72 °C 45 s, 共 18 个循环, 每个循环退火温度递减 0.8 °C; 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 45 s, 共 12 个循环; 72 °C 10 min。以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。

1.2.3 DGGE 分析: V3 区扩增产物进行 DGGE 分析, 选择变性梯度范围为 30%–60%, 进样量 10 μL, 电泳温度为 60 °C。利用 Dcode DGGE 系统(Bio Rad) 60 V 电泳 16 h 后, 用 SYB green I 染色 20 min, 冲去染液, Gel DocTM XR+成像系统成像并分析。根据电泳图谱中每个条带的亮度, 用香浓-威纳多样性指数(Shannon-Wiener index, H), 丰富度(S)和均匀度指数(E_H)等指标分析各样品多样性^[11]。

$$H = -\sum_{i=1}^S P_i \ln P_i$$

$$E_H = H / \ln S$$

式中: H 为香浓-威纳多样性指数, S 为 DGGE 胶中条带数量, P_i 为 i 条带所占百分比, E_H 为均匀度指数。

利用 NTSYS-pc 2.10e 软件中 Interval data 产

生是相似性系数分析各泳道相似性, 并用 SHAN 和 UPGMA 方法进行聚类分析。

1.2.4 16S rDNA 克隆分析: 染色并成像后对 DGGE 电泳胶上的优势条带(图 1 中条带 1、4、7、9 和 10)和变化明显的条带(图 1 中条带 2、3、5、6、8 和 11)进行割胶, 以回收的 DNA 为模板, 不含 GC 夹子的 V3-1 和 V3-2 为引物进行 PCR 扩增(同 V3 可变区扩增)。扩增产物割胶纯化后连接至 pGEM-T Easy 载体, CaCl₂ 方法导入大肠杆菌 DH5α, 在含有 Amp、X-gal 和 IPTG 的 LA 平板上检出含有重组子的白色菌落, 挑取单菌落于 LB 培养基中 37 °C 过夜, 对克隆菌液电泳检查插入片段大小正确后送往上海生工生物工程有限公司测序。所得序列在 GenBank 数据库中进行 BLAST 对比分析, 采用 MEGA 3.1 软件, 以 Bootstrap-NJ 法构建系统进化树, 并将测序结果提交 NCBI 获得 GenBank 数据库登录号。

2 结果与分析

7 个样品(a 为初始样品, b、c、d 和 e、f、g 分别为普通包装和气调包装贮藏 5、10 和 15 d 的样品)的 DGGE 电泳结果如图 1 所示。由图 1 可

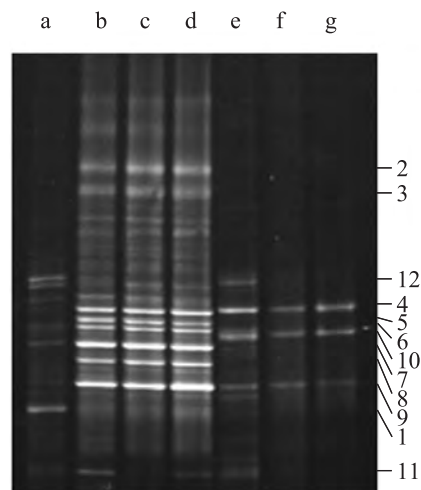


图 1 牛肉样品 DGGE 电泳图

Fig. 1 DGGE profile of beef samples

知，每个样品经变性梯度凝胶电泳后都分离出数目不等的电泳条带，且各条带的强度和迁移率各不相同，直观地反映了生鲜冷却牛肉贮藏过程中微生物的多样性。每个样品中强度高的条带在泳道中的迁移率不同，说明各样品中优势菌群有所不同。

初始样品电泳条带为 9 条，普通包装平均电泳条带为 22 条，气调包装平均电泳条带为 6 条。DGGE 图谱上一个条带大致与一种细菌相对应，因此 DGGE 电泳条带数越多，说明生物多样性越丰富。与初始相比，普通包装中细菌种类增加了约 1.4 倍，气调包装中细菌种类减少了约 0.33 倍，气调包装比普通包装中细菌种类少很多。多样性指数是研究群落物种数和个体数及其分布均匀度的综合指标。由表 1 可知，各样品细菌种群的均匀度较为接近，在 0.71–0.81。多样性指数有所不同，整体看来，普通包装样品的多样性指数高于气调包装样品，最低的样品 f 为 0.83，最高的样品 b 为 2.52。

DGGE 图谱的聚类分析及相似系数见图 2 和表 2。由图 2 可知，所有样品相似性在 65%–88%，说明各样品种群结构有所差异。图 2 表明，包装方式相同的样品被聚为一类，如气调包装样品 e、f、g 被聚类为一类，显示出他们具有较为相似的种群结构，它们的平均相似系数为 0.83，属于极

相似水平；普通包装样品 b、c、d 平均相似系数为 0.73，属于中等相似水平，说明包装方式是影响生鲜冷却牛肉中细菌种群多样性的重要因素，两种包装生鲜牛肉在贮藏过程中微生物种类变化都较小，贮藏时间对微生物种类影响较小。样品 a 和 b、c、d 的平均相似系数为 0.38，属于中

表 1 样品细菌种群多样性指数、均匀度及丰富度
Table 1 Shannon-Wiener index (H), evenness (E_H) and richness (S)

样品 Sample	多样性指数 H	均匀度 E_H	丰富度 S
a	1.60	0.73	9
b	2.52	0.80	23
c	2.47	0.81	21
d	2.39	0.79	21
e	1.71	0.71	11
f	0.83	0.76	3
g	0.85	0.77	3

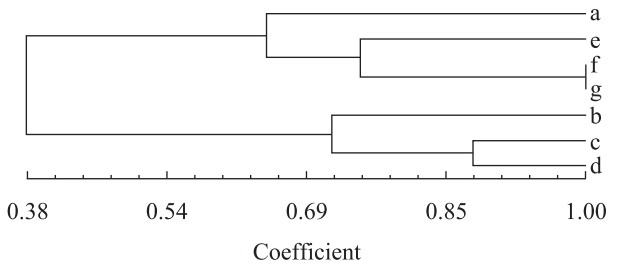


图 2 DGGE 图谱的聚类分析
Fig. 2 Cluster analysis of DGGE fingerprinting profile

表 2 DGGE 图谱的相似系数
Table 2 Similarity coefficients of DGGE fingerprinting profile

样品 Sample	a	b	c	d	e	f	g
a	1.00						
b	0.31	1.00					
c	0.38	0.69	1.00				
d	0.44	0.75	0.88	1.00			
e	0.69	0.38	0.44	0.50	1.00		
f	0.63	0.31	0.38	0.38	0.75	1.00	
g	0.63	0.31	0.38	0.38	0.75	1.00	1.00

等不相似水平,说明与初始相比,普通包装样品中微生物种类发生了较大变化,且微生物种类变化主要发生在贮藏前期。样品 a 和 e、f、g 的平均相似系数为 0.65,属于中等相似水平,说明气调包装对微生物起到了一定的抑制作用。

克隆测序后经 NCBI 数据库网上 BLAST 获得他们的系统发育信息(见表 3),并将测序结果提交 NCBI 获得 GenBank 数据库中登录号 JX310664–JX310675。

初始菌主要包括 *Psychrobacter* (1 和 12, 27.6%和 23.3%)和 *Pseudomonas* (7, 8.8%); 普通包装牛肉样品中优势菌为 *Pseudomonas* (7, 13.3%–14.5%)和 *Brochothrix* (9, 15.2%–21.3%); 气调包装牛肉样品中优势菌为 *Pseudomonas* (4, 24.7%–49.7%)和 *Brochothrix* (10, 24%–40.2%),贮藏过程中,优势菌所占比例均呈明显的上升趋势。与普通包装冷却牛肉相比,气调包装生鲜冷却牛肉中优势菌所占比例大。

两种包装牛肉在贮藏 0–5 d 内优势菌种类变化明显,在 5–15 d 变化不明显。在 0–5 d 内,普

通包装中初始菌 *Psychrobacter* (1 和 12)减弱, *Pseudomonas* (7)增强并成为优势菌,同时出现了较多的细菌 *Pseudomonas* (2、3、4、6 和 8)和 *Brochothrix* (5 和 9); 气调包装中 *Psychrobacter* (12)减弱, *Psychrobacter* (1)和 *Pseudomonas* (7)消失,同时出现 *Pseudomonas* (4)和 *Brochothrix* (9 和 10)。在 5–15 d 贮藏时间内,普通包装中优势菌种类变化不明显,气调包装中 *Arthrobacter* (11)和 *Psychrobacter* (12)逐渐消失。

Li M. Y.等^[12]利用 PCR-DGGE 方法分析猪肉贮藏过程中微生物种群结构的变化,得出 9 种腐败菌:节细菌属(*Arthrobacter* sp.)、肠球菌属(*Enterococcus* sp.)、假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)、乳酸菌属(*Lactobacillus* sp.)等。本实验中利用 PCR-DGGE 方法得出生鲜冷却牛肉贮藏中腐败菌有嗜冷菌属(*Psychrobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、索丝菌属(*Brochothrix*)、节杆菌属(*Arthrobacter*),初始菌主要是 *Psychrobacter* 和 *Pseudomonas*,与李正堂等^[7]采用 PCR-DGGE 和克隆文库技术分析冷却牛肉微生物群落结构的

表 3 DGGE 割胶条带序列比对结果
Table 3 Identification of the bands excised from DGGE gels

Number of bands	Closest relative	Similarity (%)	Accession No. of closest relative	Accession No.
1	<i>Psychrobacter maritimus</i>	100	JQ409519.1	JX310664
2	<i>Pseudomonas putida</i>	100	JNT11451.1	JX310665
3	<i>Pseudomonas</i> sp.	100	JQ316350	JX310666
4	<i>Pseudomonas fragi</i>	100	AB685610.1	JX310667
5	<i>Brochothrix</i> sp.	100	JQ595474.1	JX310668
6	<i>Pseudomonas</i> sp.	100	JQ862012.1	JX310669
7	<i>Pseudomonas</i> sp.	100	JQ313051.1	JX310670
8	<i>Pseudomonas citronellolis</i>	97	AF492398.1	JX310671
9	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	100	JF756251.1	JX310672
10	<i>Brochothrix campestris</i>	100	AB680897.1	JX310673
11	<i>Arthrobacter</i> sp.	100	JQ691547.1	JX310674
12	<i>Psychrobacter faecalis</i>	100	JF710999.1	JX310675

结果相比, 本实验所检出初始腐败菌种类明显偏少, 可能是由于牛肉来源不同所致。本实验样品为刚下生产线牛肉, 且运输和实验过程污染较少, 因此所检出细菌主要为原料中原有细菌。

普通包装生鲜牛肉贮藏过程中微生物种类较多, 大多属于 *Pseudomonas*, 这类菌广泛存在于土壤、水和动植物体表中, 容易导致肉类变粘, 代谢产生过氧化物或硫化氢使肉类变色。在无氧或低氧条件下, 假单胞菌生长会受到较大抑制。 CO_2 具有抑菌作用, 它可以通过改变细胞内酶机构或影响细胞膜功能等方式抑制细菌生长代谢^[13]。在富含 CO_2 的条件下, 假单胞菌的生长也会受到强烈抑制^[3], 本实验中普通包装牛肉远比气调包装牛肉菌相构成丰富, 体现了气调包装中 CO_2 对假单胞菌属等微生物的抑制作用。气调包装生鲜冷却牛肉中索丝菌属(*Brochothrix*)成为优势菌。索丝菌广泛存在于环境中, 是肉类食品中重要的腐败菌, 通常被认为是冷藏温度下引起真空包装肉及肉制品腐败的主要微生物^[14]。贮藏过程中, 节杆菌属(*Arthrobacter*)所对应的条带一直

不是很亮, 呈逐渐消失状, 不作为优势菌, 这与李苗云等^[15]所报道的猪肉中的优势菌结果一致, 目前关于该微生物的报道较少。节杆菌属广泛分布于环境, 主要存在于土壤中, 专性好氧, 利用葡萄糖或其他糖产生少量酸或不产酸。两种包装生鲜牛肉在贮藏前期微生物变化非常明显, 因此在生鲜牛肉安全控制中应在前期采取控制措施。

根据测序结果构建系统进化树(图 3)。优势菌有两大类群。假单胞菌属细菌 2、3、4 和 8 亲缘关系接近, 与 6、7 和 12 亲缘关系较远, 属于不同类群。索丝菌属细菌 5 和 9 同源性较高(98%), 但在 DGGE 图谱上所对应的条带迁移率有所差别, 说明它们的结构存在一定差异。

3 结论

(1) 生鲜牛肉初始菌相主要是 *Psychrobacter* 和 *Pseudomonas*, 普通包装和气调包装生鲜冷却牛肉贮藏过程中优势菌均为 *Brochothrix* 和 *Pseudomonas*。

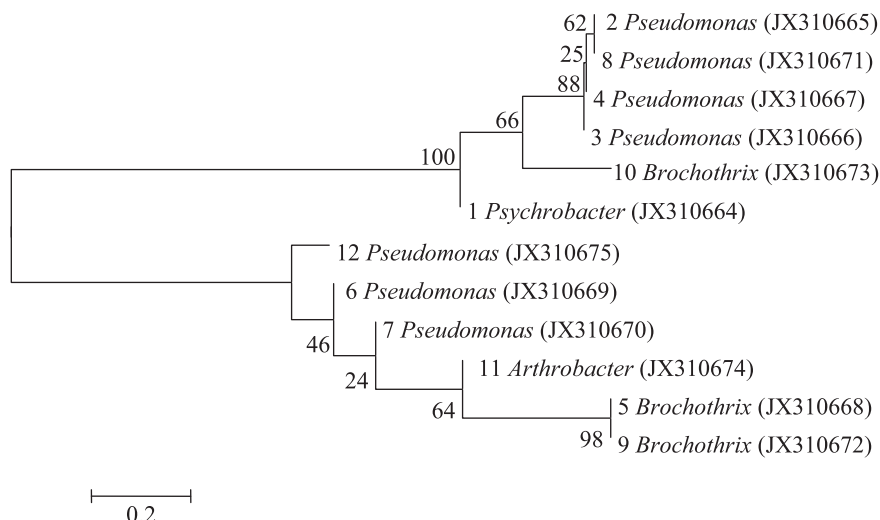


图 3 优势菌进化树

Fig. 3 The cladogram of bacteria predominant

(2) 气调包装生鲜牛肉中细菌种类较少, 其中 CO_2 对假单胞菌属等细菌起到了一定的抑制作用。

(3) 两种包装生鲜牛肉在贮藏前期微生物种类变化较大, 因此在生鲜牛肉安全控制中应在前期采取措施。

参 考 文 献

- [1] Ercolini D, Russo F, Torrieri E, et al. Changes in the spoilage-related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(7): 4663–4671.
- [2] <http://www.pack.cn/SellDetail/1672256.html>
- [3] 曾晓房, 林慧珍, 邝智祥, 等. 冰鲜肉中腐败菌的研究现状[J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(34): 19550–19552, 19558.
- [4] 孙承锋, 戴瑞彤, 曲富春, 等. 微生物与肉类食品的腐败[J]. *肉类研究*, 2001(1): 32–36.
- [5] Ercolini D, Ferrocino I, La Storia A, et al. Development of spoilage microbiota in beef stored in nisin activated packaging[J]. *Food Microbiology*, 2010, 27(1): 137–143.
- [6] 罗欣, 朱燕. Nisin 在牛肉冷却肉保鲜中的应用研究[J]. *食品科学*, 2000, 21(3): 53–57.
- [7] 李正堂, 李柏林, 欧杰, 等. 市售冷却牛肉中主要细菌的常规分离与鉴定[J]. *微生物学通报*, 2009, 36(2): 198–204.
- [8] 张香美, 贾月梅, 薛胜平, 等. DGGE 指纹技术在传统发酵食品开发中的应用[J]. *食品研究与开发*, 2008, 29(5): 167–170.
- [9] Jiang Y, Gao F, Xu XL, et al. Changes in the bacterial communities of vacuum-packaged pork during chilled storage analyzed by PCR-DGGE[J]. *Meat Science*, 2010, 86(4): 889–895.
- [10] 胡萍, 周光宏, 徐幸莲, 等. 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.
- [11] Luo HF, Qi HY, Zhang HX. Assessment of the bacterial diversity in fenvalerate-treated soil[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2004, 20(5): 509–515.
- [12] Li MY, Zhou GH, Xu XL, et al. Changes of bacterial diversity and main flora in chilled pork during storage using PCR-DGGE[J]. *Food Microbiology*, 2006, 23(7): 607–611.
- [13] Jydegard-Axelsen AM, Høiby PE, Holmstrom K, et al. CO_2 and anaerobiosis-induced changes in physiology and gene expression of different *Listeria monocytogenes* strains[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(7): 4111–4117.
- [14] Kotzekidou P, Bloukas JG. Effect of protective cultures and packaging film permeability on shelf life of sliced vacuum-packed cooked ham[J]. *Meat Science*, 1996, 42(3): 333–345.
- [15] 李苗云, 周光宏, 徐幸莲. 应用 PCR-DGGE 研究冷却猪肉贮藏过程中的优势菌[J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2008, 36(9): 187–189.