

PCR-DGGE技术在肉品微生物生态学中的应用

李沛军¹, 孔保华^{1,*}, 郑冬梅¹, 王 营^{1,2}, 杨赫鸿¹

(1. 东北农业大学食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030;

2. 东北农业大学 乳品科学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘 要: 人们一直通过传统的纯化、培养方法对肉和肉制品中的微生物进行研究, 其操作过程复杂且无法准确描述完整的菌群结构。聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)技术因其具有快速、精确的特点在微生物生态学中得到了广泛应用。本文主要介绍PCR-DGGE技术的原理, 从非发酵肉制品腐败和发酵肉制品成熟两个角度综述其在肉品微生物生态学中的应用, 并对该技术今后在肉品微生物研究中的应用进行展望。

关键词: PCR-变性梯度凝胶电泳; 肉制品; 微生物生态; 原料肉; 发酵

Application of PCR-DGGE to Study Microbial Ecology of Meat: A Review

LI Pei-jun¹, KONG Bao-hua^{1,*}, ZHENG Dong-mei¹, WANG Ying^{1,2}, YANG He-hong¹

(1. College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: The traditional purification and culture method is used to study microorganisms present in meat and meat products all the time. However, this method is a tedious process and cannot accurately describe the complete microflora structure. Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) has been applied widely in microbial ecology research due to its high convenience and accuracy. In this paper, the principle of PCR-DGGE is introduced briefly, and its recent applications to study the spoilage of non-fermented meat products and the maturation of fermented meat products are reviewed. Moreover, some disadvantages of this technique and its further prospects are discussed.

Key words: PCR-DGGE; meat products; microbial ecology; raw meat; fermentation

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)19-0338-06

肉和肉制品在加工和贮藏过程中, 微生物生长是导致其腐败的重要因素^[1-2]; 同时, 人们利用自然发酵或者接种特定的微生物生产发酵肉制品, 可以促进产品成熟, 延长其保质期^[3]。长久以来, 由于研究方法所限, 人们大多采用常规的分离纯化和培养技术来研究肉品中的微生物, 但是这种方法存在着不可避免的缺陷, 难以对肉制品中的菌群结构进行实时、完整的分析。近年来, 随着应用分子生物学的发展, 一种不依赖于培养的分子技术——变性梯度凝胶电泳(denatured gradient gel electrophoresis, DGGE), 作为一种新的微生物群落分析方法, 已逐渐应用在食品科学等多个领域^[4]。本文主要综述PCR-DGGE技术在肉品微生物生态学中的应用进展。

1 PCR-DGGE概述

变性梯度凝胶电泳技术最初由Lerman等^[5]于20世纪80年代发明, 起初主要用于DNA片段点突变的检测^[6]。1993年, Muyzer等^[7]首次将其应用于微生物菌群结构的分析研究。此后, DGGE技术被广泛用于微生物分子生态学研究的各个领域, 主要包括环境科学^[8-9]、动物科学^[10]、医学^[11]和食品科学^[12]等, 目前已经发展成为研究微生物群落结构的主要分子生物学方法之一。

双链DNA分子在进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)时, 其迁移行为取决于分子大小和电荷, 因此, 不同长度的DNA片段可以区分开, 同样长度的DNA片段在胶中的迁移行为一样, 不能被区分。而DGGE技术是在聚丙烯酰胺凝胶体

收稿日期: 2011-09-02

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(200903012-02); 东北农业大学创新专项(CXZ011-2)

作者简介: 李沛军(1986—), 男, 博士研究生, 研究方向为畜产品加工与贮藏。E-mail: lipeijun1986@163.com

*通信作者: 孔保华(1963—), 女, 教授, 博士, 研究方向为畜产品加工。E-mail: kongbh@163.com

系中, 加入了变性剂(尿素和甲酰胺)梯度, 从而能够把同样长度但序列不同的DNA片段区分开来。这是因为DNA分子中A、T、C、G 4种碱基的组成和排列差异, 使不同序列的双链DNA分子具有不同的解链浓度。当双链DNA分子在含有变性剂的聚丙烯酰胺凝胶中电泳时, 因解链行为不同, 使不同序列的DNA片段滞留于凝胶的不同位置, 形成相互分开的谱带。因此可以由某一环境中微生物的总DNA得到样品中原始菌群的DGGE图谱, 从而了解其中微生物的种类, 结构和分布情况。

利用DGGE技术研究微生物群落结构时, 要结合聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增技术, 用PCR扩增的特定DNA区域产物进行梯度凝胶电泳, 进而反映微生物群落的结构组成。进行DGGE电泳时, 真菌DNA片段通常选择为28S rDNA^[13]或26S rDNA^[14]。细菌DNA片段通常选择为16S rDNA^[15]。16S rDNA是16S rRNA的基因, 其基因序列全长1540bp, 由保守区和可变区组成, 保守区序列基本恒定, 可变区序列因不同细菌而异, 因此通过对不同细菌的可变区进行PCR扩增, 可以得到大小相同、序列不同的DNA扩增产物。16S rRNA分子分为V1~V9九个可变区, 之间间隔排列其恒定区。Ercolini^[15]、徐敏娟^[16]等分别综述了DGGE在食品科学和环境科学领域的应用, 大部分学者选择了V3可变区和V6~V8可变区进行PCR扩增, 并且多数用在乳酸菌方面的研究。

2 PCR-DGGE在原料肉和非发酵肉制品中的应用

原料肉在屠宰、加工和贮藏过程中会污染来自环境的微生物, 微生物在肉基质中生长, 导致产品腐败。PCR-DGGE技术可以用于原料肉和非发酵肉制品中的微生物菌群结构分析, 进而有利于鉴定肉制品腐败过程中的优势菌株。

2.1 原料肉腐败过程中微生物菌群结构分析

2.1.1 牛肉在不同贮藏条件下的菌群分布

气调包装是肉品工业常用的包装方式之一, 有利于保持鲜肉的颜色和品质。Ercolini等^[17]研究了牛肉在5℃贮藏, 不同气调包装条件(空气对照组, 60% O₂+40% CO₂以及20% O₂+40% CO₂+ 40% N₂)下, 牛肉腐败过程中的微生物群落变化情况。平板培养和DGGE结果发现, 在14d的贮藏过程中, 假单胞菌(*Pseudomonas*)、肠杆菌(*Enterobacteriaceae*)、热死环丝菌(*Brochothrix thermosphacta*)和乳酸菌是牛肉冷藏过程中生长的优势菌。牛肉样品同时进行了顶空气体, 水分损失和颜色变化情况测定, 结果表明, 在初始7d内, 60% O₂+40% CO₂组较好的保持了牛肉品质。此外, 研究者还对平板分离出的细菌的16S rRNA 基因的V6~V8区域进行了扩

增。对DGGE条带进行切割、测序的结果表明, 至少共有13个属, 17种微生物在牛肉中生长。他同时发现, 牛肉在5℃贮藏, 菌群分布情况会随着不同包装条件和贮藏时间不同而不同。在对照组中, 水生拉恩菌(*Rahnella aquatilis*)、假单胞菌和肉食杆菌属(*Carnobacterium*)是优势腐败菌; 假单胞菌和清酒乳杆菌(*Lactobacillus sakei*)是在高氧气调包装(MAP2)中生长的主要菌株; 而拉恩菌属和清酒乳杆菌则是20%O₂+40%CO₂+ 40%N₂包装条件下生长的优势菌株。因此, 利用PCR-DGGE技术可以对新鲜牛肉腐败微生物进行鉴定, 进而帮助建立合适的包装条件。这一点在随后的研究中得到验证, Russo等^[18]的研究结果表明, 热死环丝菌、假单胞菌、肠杆菌和乳酸菌是牛肉冷藏过程中生长的优势菌种。同时发现, 单独接种乳酸菌可以抑制热死环丝菌的生长; 而接种假单胞菌、肠杆菌和乳酸菌的混合菌株, 并不能达到抑制其增长的效果。因此可以利用菌株间的拮抗作用, 遏制冷藏牛肉中热死环丝菌的生长, 延缓牛肉腐败过程。

Fontana等^[19]从真空包装牛肉中提取出污染微生物的DNA, 对其中16S rRNA基因片段的V1和V3区域进行PCR扩增, 并对扩增产物进行梯度凝胶电泳, 变性梯度分别选择为30%~50%和35%~60%。结果表明, 明串珠菌属(*Leuconostoc*)、弯曲乳杆菌(*Lactobacillus curvatus*)和清酒乳杆菌是真空包装牛肉在冷藏期间的优势腐败菌。同时, 还建立了真空包装牛肉在2℃贮藏至第9周和8℃贮藏到第14天的DGGE变化图谱, 从而可以反映出真空包装牛肉微生物菌群的演替情况。

2.1.2 猪肉在不同贮藏条件下的菌群分布

冷鲜猪肉通常采用托盘包装的形式进行售卖。Jiang Yun等^[20]利用PCR-DGGE技术研究了托盘包装猪肉在冷藏过程中的菌群变化, 并利用实时定量PCR(real-time PCR, RT-PCR)评价了测定肉样中主要腐败菌的相对含量。结果表明, 分别对肉中细菌的V3和V6~V8区域进行扩增, 均可发现假单胞菌是监测末期肉的主导菌。而RT-PCR定量结果显示, 假单胞菌在菌群中的比重随着贮存时间延长而增加。因此, 假单胞菌是导致托盘包装猪肉腐败的主要菌株。这与Li Miaoyun等^[21]的结果并不完全一致, 他观察到除假单胞菌外, 热死环丝菌也是托盘包装猪肉在冷藏过程中生长的优势菌株, 这可能是与肉取样部位有关, 前者选择的是腰部肉, 而后者选择的是背部最长肌。

此后, Jiang Yun等^[22]利用DGGE技术对真空包装猪肉在冷藏过程中的菌落演替情况进行了研究。对细菌的V3区域进行PCR扩增后进行梯度凝胶电泳, 结果表明乳酸菌是真空包装猪肉在冷藏过程中的主要菌株, 其中清酒乳杆菌是检测末期生长的主导菌。随着贮藏时间的延长, 乳酸菌逐渐生长, 清酒乳杆菌和乳球菌(*Lactococcus*)

等成为优势菌株。对乳杆菌进行特异性PCR扩增, DGGE结果显示不同贮藏时间乳酸菌群分布有差异, 最终清酒乳杆菌成为优势菌。研究发现, 无论采取哪种包装方式, 冷藏猪肉中菌群的多样性都会随着贮藏时间增加而减弱。最终会有一种或几种成为优势菌。

2.1.3 其他原料肉

除牛肉和猪肉外, 还有一些研究对鸡肉, 羊肉和火鸡肉等在贮藏过程中的微生物群落结构演替进行了分析。孙彦雨等^[23]应用基于16S rDNA的PCR-DGGE技术对冰鲜鸡肉在贮藏过程中微生物多样性进行了研究。分别选取鸡胸肉和鸡腿肉, 提取样品总DNA, 通过对16S rDNA的V6~V8区区域进行PCR扩增后进行变性梯度凝胶电泳, 将DGGE条带割胶、测序, 确定样品中的微生物群落, 并与传统培养方法进行比较。DGGE图谱表明, 初始污染数量较多的微生物不一定是腐败优势菌, 能适应低温低氧分压的微生物最终成为腐败优势菌, 且不同部位鸡肉的腐败优势菌存在一定差异性。和传统培养方法相比, DGGE割胶测序所得腐败优势菌的菌相不完全相同。综合两种研究方法, 确定冰鲜鸡肉中腐败优势菌为乳酸菌、热死环丝菌、腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*)、毗邻颗粒链菌(*Granulicatella adiacens*)和肉杆菌。Cocolin等^[24]从火鸡肉, 不同产地的鸡肉和羔羊肉样品中提取总DNA, 进行PCR-DGGE分析后发现, 新鲜原料肉中微生物群落结构复杂, 主要腐败菌为热死环丝菌, 弯曲乳杆菌和木糖葡萄球菌(*Staphylococci xylose*)。

2.2 非发酵肉制品加工、贮藏过程中微生物菌群结构分析

2.2.1 非发酵肉制品加工过程中微生物群落结构分析

屠宰和加工过程中的污染是肉制品中微生物的主要来源, 也是导致肉制品腐败的重要原因。李苗云等^[25]应用PCR-DGGE技术和传统微生物培养相结合的方法研究了剥皮和烫毛工艺中猪胴体表面污染的微生物数量和菌群多样性的变化, 以及添加乳酸对猪胴体表面细菌总数和大肠菌群的影响。结果表明: 不同屠宰工艺对猪胴体的微生物群落分布影响很大; 微生物污染多是在前期屠宰工艺中引入; 与剥皮工艺相比, 烫毛后污染的微生物种类多, 污染程度也较为严重; 添加乳酸显著降低了剥皮工艺中的细菌总数, 使出库猪胴体表面细菌总数降低到了2.95 (lg(CFU/cm²)), 完全达到危害分析与关键控制点(HACCP)对微生物的控制要求。其后, 又利用PCR-DGGE技术研究了猪肉屠宰工艺中污染微生物的多样性, 并与贮藏阶段微生物菌群进行对比, 确定微生物的污染源^[26]。分别选取屠宰不同阶段(烫毛后, 修整后、出冷库后和分割后)猪肉胴体表面样品以及分割用案板, 刀具和洗刀具用水等各工序的样品。取4℃贮藏的托盘包装样品进行对比参照。结果表明, 贮藏阶段的托盘包装

冷却猪肉与屠宰后期猪胴体表面污染细菌的相似系数大于80%, 刀具和洗刀具用水与冷却猪肉的菌群相似性为86%, 而刀具和洗刀具用水之间相似系数高达95%。因此可以确定, 猪肉冷藏阶段微生物菌群的多样性是屠宰和分割过程中的污染源直接造成的, 刀具和洗刀具用水是主要的微生物污染源。

高压处理可以延长肉制品的保质期。Han Yanqing等^[27]利用传统的培养方法, PCR-DGGE和反转录PCR变性梯度凝胶电泳(RT-PCR-DGGE)技术研究了高压处理对真空包装火腿菌群分布的影响。火腿样品经过400MPa或600MPa的高压处理后, 提取其中微生物的总DNA和RNA, 对V3区域进行PCR扩增后, 进行变性梯度凝胶电泳分析。结果表明, 高压处理对不同致腐败细菌的抑制效果不同。低温火腿的主要致腐败菌, 包括清酒乳杆菌、弯曲乳杆菌、格氏乳球菌(*Lactococcus garvieae*)、食蜜魏斯氏菌(*Weissella cibaria*)、类肠膜魏斯氏菌(*Weissella paramesenteroides*)、肉鬐明串珠菌(*Leuconostoc carnosum*)和乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)对高压非常敏感, 经高压处理后未检测出来。而最终导致火腿腐败的是绿色魏斯氏菌(*Weissella viridescens*)和肠膜样明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*), 它们即使在22℃、600MPa的高压条件下处理10min仍不失活。研究发现, 基于RNA反转录得到DNA, 再进行的PCR-DGGE技术可以很好的应用于高压处理的火腿活菌的菌群分析^[28]。22℃、400MPa或600MPa高压处理10min, 对真空包装切片火腿的主要致腐败菌有很强的抑制效果, 因此可以降低体系中污染微生物的多样性, 提高产品品质。

2.2.2 非发酵肉制品贮藏过程中微生物群落结构分析

Hu Ping等^[29]利用DNA-DGGE图谱和进化树分析方法研究了真空包装火腿在4℃条件下贮藏时, 主要腐败菌的鉴定和动力学分析。提取出细菌总DNA后, 利用巢式PCR(nest PCR)技术对16S rDNA的V3区域进行了扩增。对DGGE图谱的结果进行分析显示, 真空包装火腿在4℃条件下贮藏, 主要的致腐败菌为清酒乳杆菌、弯曲乳杆菌以及少量的明串珠菌。为了延长真空包装火腿的货架期, 他将清酒乳杆菌B-2 (*Lactobacillus sakei* B-2)作为生物保护菌接入到真空包装切片火腿中, 对延长其在4℃贮藏货架期的作用进行研究评价^[30]。DGGE图谱表明, 清酒乳杆菌B-2可以很好地抑制优势腐败菌(清酒乳杆菌、弯曲乳杆菌和中肠明串珠菌)的生长。接种清酒乳杆菌B-2的切片火腿在4℃条件下贮藏, 保质期由通常的15d, 可以延长至35d, 大大提高了其货架期。因此, 可以利用PCR-DGGE技术, 通过描述微生物在肉制品贮藏期间的动态变化过程, 阐述生物保护菌与抑制目标菌之间的靶向抑制作用。

盐水鸭是我国南京著名的传统肉制品品种。刘芳

等^[31]利用经典平板培养和PCR-DGGE指纹图谱相结合的方法,对盐水鸭在4℃贮藏期间的菌群多样性进行了分析。平板培养方法结果显示盐水鸭在贮藏期间细菌数量迅速增加。对DGGE胶条进行切割、测序,结果表明盐水鸭贮藏期间的主要腐败菌有腐生葡萄球菌(*Staphylococci saprophyticus*)、溶酪大球菌(*Macrococcus caseolyticus*)、魏斯氏菌(*Weissella* sp.)、中度嗜盐菌(*Halomonas* sp.)和盐单胞菌(*Cobetia* sp.)等。而平板培养物中仅可检测出腐生葡萄球菌、溶酪大球菌和魏斯氏菌。这表明,这种不依赖于培养的DGGE技术,可以更全面的应用于盐水鸭贮藏期间的腐败菌的检测和鉴定。

3 PCR-DGGE在发酵肉制品中的应用

发酵肉制品菌群结构相当复杂,主要包括各种类型的细菌、酵母和霉菌^[32]。利用新型不依赖于培养的分子生物学技术——PCR-DGGE,可以很好的对发酵肉制品在发酵和成熟过程中的微生物生长动力学进行研究。

3.1 发酵肉制品细菌群落结构分析

3.1.1 发酵香肠微生物群落结构分析

最初利用PCR-DGGE技术研究发酵香肠中微生物菌群分布的是意大利人Cocolin等^[32],他们对多种发酵香肠中菌群分布进行了研究。在对来自意大利Friuli-Venezia-Giulia地区的天然发酵香肠成熟过程的细菌动态变化的研究中^[33],他直接提取了香肠样品中微生物的总DNA和RNA,对V1区域进行PCR及反相PCR扩增后进行DGGE及序列分析。DNA和RNA的DGGE图谱表明,在发酵前3d,多种菌共存,葡萄球菌属为优势菌;而在10d后只有乳酸菌存在。清酒乳杆菌和弯曲乳杆菌在整个发酵阶段一直存在,而植物乳杆菌只在第1天可以观察到。因此,发酵香肠在发酵初期的菌群结构明显比末期复杂。这一点在他随后的研究中得到证实^[24],他们观察到在原料肉和发酵香肠中,发酵末期的菌群结构要更为简单。此外,他们还从意大利自然发酵香肠中分离出了90株微球菌科菌株,分别提取细菌DNA后采用引物338f和518r对16S rDNA的V1区域进行PCR扩增及变性梯度凝胶电泳^[34]。结果表明,意大利自然发酵香肠成熟过程中主要是木糖葡萄球菌、肉葡萄球菌和模仿葡萄球菌(*Staphylococci simulans*)3种葡萄球菌在起作用。

色拉米肠是世界上著名的香肠制品。Silvestri等^[13]研究了22种市售色拉米香肠的微生物菌群分布情况。从色拉米香肠中提取细菌的DNA后,选取合适引物进行16S rDNA PCR扩增。DGGE图谱和测序结果显示,在所有香肠样品中,最常见的是清酒乳杆菌和弯曲乳杆菌。Cocolin等^[32]的研究也得到了类似的结论。他在对来源于意大利Marche地区的色拉米香肠进行PCR-DGGE的研究

中发现了5种乳酸菌的存在:植物乳杆菌、清酒乳杆菌、弯曲乳杆菌、乳酸片球菌和乳酸乳杆菌,而最为常见的依旧是弯曲乳杆菌和清酒乳杆菌。

PCR-DGGE技术也可用于阿根廷香肠细菌群落结构的分析。Fontana等^[35]对发酵香肠中提取的细菌16S rRNA基因的V3区域进行扩增,在0d时得到的DGGE图谱极其复杂,主要包括植物乳杆菌、乳酸片球菌、清酒乳杆菌、弯曲乳杆菌和变异棒状杆菌等。在发酵的第5天和第14天,植物乳杆菌、弯曲乳杆菌和腐生葡萄球菌(*Staphylococci saprophyticus*)成为优势菌群。而对阿根廷另一种发酵香肠的研究也证实了这一点^[36],在发酵初期,植物乳杆菌和腐生葡萄球菌是其中的优势菌群。

3.1.2 发酵鱼制品微生物群落结构分析

Aji-narezushi(一种添加有大米,并经长期发酵的竹荚鱼制品)和Iwashi-nukazuke(一种添加有麦麸,并经长期发酵的沙丁鱼制品)是两种具有日本特色发酵鱼制品,An等^[37]利用PCR-DGGE技术研究了其中微生物菌群结构分布情况。平板培养结果显示Aji-narezushi和Iwashi-nukazuke中活菌数分别达到了大约 $10^{6.45}$ CFU/g和 $10^{6.3}$ CFU/g。进行PCR-DGGE分析,发现马乳杆菌(*Lactobacillus acidipiscis*)是Aji-narezushi成熟过程中的优势菌,而四联球菌属(*Tetragenococcus*)是Iwashi-nukazuke样品中生长的主要细菌。

鱼露是东亚和东南亚地区生产的一种季节性自然发酵腌制鱼制品,在其长期的发酵过程中,由于微生物的生长会伴有不良风味的产生。Yoshikawa等^[14]在非无菌条件下向大马哈鱼露中接种多种微生物,经过35℃发酵84d后,对样品进行PCR-DGGE分析,研究了接种不同微生物对发酵大马哈鱼露菌群分布的影响。结果表明,耐盐乳酸菌只可在单独接种耐盐四联球菌(*Tetragenococcus halophilus*)的样品或者在共同接种耐盐四联球菌和耐盐酵母(*Candida versatilis*)发酵的前28d样品中存在。因此,通过接种微生物可以改变鱼露发酵过程中的微生态环境,减少不良风味产生,提高产品品质。

3.2 发酵肉制品真菌群落结构分析

与分析发酵肉制品中细菌群落结构相比,利用PCR-DGGE技术分析发酵肉制品中酵母和霉菌的研究较少。Flores等^[38]在对一种低温发酵意大利香肠的研究中发现,汉逊德巴利酵母(*Debaryomyces hansenii*)是其中生长的优势酵母菌。这一点随后得到多次验证。Cocolin等^[39]在对意大利自然发酵香肠的研究中发现,经过60d发酵后对样品进行DNA和RNA变性梯度凝胶电泳,发现汉逊德巴利酵母是其中的优势菌种,并且一直处于活性状态。Silvestri等^[13]研究了色拉米香肠中微生物菌群分布情况。从香肠中提取真菌DNA后,选取合适引物进行28S rDNA-PCR扩增, DGGE图谱和测序结果再次显示,汉逊德巴利酵母

是香肠中生长的优势酵母菌。

Yoshikawa等^[14]在自然条件下向大马哈鱼露中接种多种耐盐酵母,经过35℃发酵84d后,对样品中酵母菌的生长情况进行分析,研究了接种不同微生物对发酵大马哈鱼露菌群分布的影响。对样品真菌的26S rDNA的D1区域进行PCR-DGGE分析表明,在鱼露发酵过程中只检测到四种真菌存在,包括鲁氏接合酵母(*Zygosaccharomyces rouxii*)、耐盐酵母(*Candida versatilis*)、季也蒙毕赤酵母(*Pichia guilliermo*)和米曲霉(*Aspergillus oryzae*)。因此,在鱼露发酵初期接种耐盐酵母菌,可以有效地预防野生酵母的生长,避免鱼露生产过程中不良风味产生,提高产品品质。

4 结 语

近年来,大量的研究表明依赖于培养和不依赖培养的微生物分析方法结果有显著差异。如今,依赖于培养的传统微生物分析方法无法准确描述完整的菌群结构已成为科学界的共识^[32]。而PCR-DGGE技术在肉品微生物学领域中的应用虽然起步较晚,但是凭借着其不依赖于培养,精确的特点,在原料肉和多种肉制品的微生物群落结构分析中得到了广泛应用。

利用PCR-DGGE技术研究菌群结构时,通常选用的目标分子为DNA或RNA。两种分子的DGGE结果显示的信息不同。DNA分子非常稳定,即使在细胞死亡后的很长时间内依旧存在;而RNA分子则相反,尤其是mRNA,存活时间很短。因此,基于DNA的DGGE结果主要用来描述微生物菌群的微生态和多样性,而RNA分析结果则更注重具有代谢活性的细菌,即影响腐败或者发酵过程的微生物^[32]。因此,要对肉和肉制品中的菌群结构进行全面分析,需要对两种分子同时进行PCR-DGGE分析。

尽管PCR-DGGE技术在肉品微生物群落结构分析中得到了广泛应用,已大量用于样品中微生物菌群的多样性和群落演替研究,但需要指出的是诸多因素,比如样品处理、DNA提取、DNA纯度、PCR条件等都会影响最终的DGGE结果^[15]。另外,当食品体系中菌体浓度低于 $10^3 \sim 10^4$ CFU/g^[34]或占整个群落细菌数量1%以下时^[7],DGGE技术很难检测出来。因此,需要开发更多的分子生物分子学技术与PCR-DGGE相结合,提高其灵敏性,从而更真实,精确的反映微生物群落结构。此外,如何将PCR-DGGE技术应用到肉制品在线检测上,对整个肉制品生产过程进行实时监测,保障产品品质和微生物安全性,是PCR-DGGE技术发展的必然趋势。

参考文献:

- [1] MELLOR G E, BENTLEY J A, DYKES G A. Evidence for a role of biosurfactants produced by *Pseudomonas fluorescens* in the spoilage of fresh aerobically stored chicken meat[J]. Food Microbiology, 2011, 28(5): 1101-1104.
- [2] AT-KADDOUR A, BOUBELLOUTA T, CHEVALLIER I. Development of a portable spectrofluorimeter for measuring the microbial spoilage of minced beef[J]. Meat Science, 2011, 88(4): 675-681.
- [3] STOLLEWERK K, JOFR A, COMAPOSADA J, et al. Ensuring food safety by an innovative fermented sausage manufacturing system[J]. Food Control, 2011, 22(12): 1984-1991.
- [4] 江芸,高峰,徐幸莲,等.真空包装冷却猪肉冷藏过程中菌相变化[J].食品科学,2011,32(4): 241-245.
- [5] LERMAN L S, FISCHER S G, HURLEY I, et al. Sequence-determined DNA separations[J]. Annual Review of Biophysics and Bioengineering, 1984, 13(1): 399-423.
- [6] MYERS R M, FISCHER S G, LERMAN L S, et al. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis[J]. Nucleic Acids Research, 1985, 13(9): 3131-3145.
- [7] MUYZER G, de WAAL E C, UITTERLINDEN A G. 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(3): 695-700.
- [8] AVRAHAMI S, LIESACK W, CONRAD R. Effects of temperature and fertilizer on activity and community structure of soil ammonia oxidizers[J]. Environmental Microbiology, 2003, 5(8): 691-705.
- [9] NORRIS T B, WRAITH J M, CASTENHOLZ R W, et al. Soil microbial community structure across a thermal gradient following a geothermal heating event[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(12): 6300-6309.
- [10] REESON A F, JANKOVIC T, KASPER M L, et al. Application of 16S rDNA-DGGE to examine the microbial ecology associated with a social wasp *Vespa germanica*[J]. Insect Molecular Biology, 2003, 12(1): 85-91.
- [11] BURTON J P, CADIEUX P A, REID G. Improved understanding of the bacterial vaginal microbiota of women before and after probiotic instillation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(1): 97-101.
- [12] TU R J, WU H Y, LOCK Y S, et al. Evaluation of microbial dynamics during the ripening of a traditional Taiwanese naturally fermented ham[J]. Food Microbiology, 2010, 27(4): 460-467.
- [13] SILVESTRI G, SANTARELLI S, AQUILANTI L, et al. Investigation of the microbial ecology of Ciauscolo, a traditional Italian salami, by culture-dependent techniques and PCR-DGGE[J]. Meat Science, 2007, 77(3): 413-423.
- [14] YOSHIKAWA S, YASOKAWA D, NAGASHIMA K, et al. Microbiota during fermentation of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) sauce mash inoculated with halotolerant microbial starters: analyses using the plate count method and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)[J]. Food Microbiology, 2010, 27(4): 509-514.
- [15] ERCOLINI D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food[J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 56(3): 297-314.
- [16] 徐敏娟,王志跃.变性梯度凝胶电泳及其在微生态领域应用的研究进展[J].家畜生态学报,2008(6): 147-150.

- [17] 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.
- [18] RUSSO F, ERCOLINI D, MAURIELLO G, et al. Behaviour of *Brochothrix thermosphacta* in presence of other meat spoilage microbial groups[J]. Food Microbiology, 2006, 23(8): 797-802.
- [19] FONTANA C, SANDRO COCCONCELLI P, VIGNOLO G. Monitoring the bacterial population dynamics during fermentation of artisanal Argentinean sausages[J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 103(2): 131-142.
- [20] JIANG Yun, GAO Feng, XU Xinglian, et al. Changes in the composition of the bacterial flora on tray-packaged pork during chilled storage analyzed by PCR-DGGE and real-time PCR[J]. Journal of Food Science, 2011, 76(1): M27-M33.
- [21] LI Miaoyun, ZHOU Guanghong, XU Xinglian, 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.
- [22] JIANG Yun, GAO Feng, XU Xinglian, 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.
- [23] 孙彦雨, 周光宏, 徐幸莲. 冰鲜鸡肉贮藏过程中微生物菌相变化分析[J]. 食品科学, 2011, 32(11): 146-151.
- [24] COCOLIN L, DIEZ A, URSO R, et al. Optimization of conditions for profiling bacterial populations in food by culture-independent methods[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 120(1/2): 100-109.
- [25] 李苗云, 周光宏, 徐幸莲, 等. 不同屠宰工艺(剥皮和烫毛)对猪胴体表面微生物的多样性影响及关键点的控制研究[J]. 食品科学, 2006, 27(4): 170-173.
- [26] 李苗云, 周光宏, 赵改名, 等. 冷却猪肉屠宰过程中微生物污染源的分析研究[J]. 食品科学, 2008, 29(7): 70-72.
- [27] HAN Yanqing, JIANG Yun, XU Xinglian, et al. Effect of high pressure treatment on microbial populations of sliced vacuum-packed cooked ham[J]. Meat Science, 2011, 88(4): 682-688.
- [28] HAN Yanqing, XU Xinglian, JIANG Yun, et al. Inactivation of food spoilage bacteria by high pressure processing: evaluation with conventional media and PCR-DGGE analysis[J]. Food Research International, 2010, 43(6): 1719-1724.
- [29] HU Ping, ZHOU Guanghong, XU Xinglian, et al. Characterization of the predominant spoilage bacteria in sliced vacuum-packed cooked ham based on 16S rDNA-DGGE[J]. Food Control, 2009, 20(2): 99-104.
- [30] HU Ping, XU Xinglian, ZHOU Guanghong, et al. Study of the *Lactobacillus sakei* protective effect towards spoilage bacteria in vacuum packed cooked ham analyzed by PCR-DGGE[J]. Meat Science, 2008, 80(2): 462-469.
- [31] 刘芳, 王道营, 徐为民, 等. 应用PCR-DGGE指纹图谱技术分析盐水鸭贮藏过程中的细菌多样性[J]. 南京农业大学学报, 2011(2): 135-138.
- [32] COCOLIN L, DOLCI P, RANTSIOU K. Biodiversity and dynamics of meat fermentations: the contribution of molecular methods for a better comprehension of a complex ecosystem[J]. Meat Science, 2011, 89(3): 296-302.
- [33] COCOLIN L, MANZANO M, CANTONI C, et al. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(11): 5113-5121.
- [34] COCOLIN L, MANZANO M, AGGIO D, et al. A novel polymerase chain reaction (PCR): denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for the identification of Micrococcaceae strains involved in meat fermentations. Its application to naturally fermented Italian sausages[J]. Meat Science, 2001, 58(1): 59-64.
- [35] 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): 254-263.
- [36] FONTANA C, SANDRO COCCONCELLI P, VIGNOLO G. Monitoring the bacterial population dynamics during fermentation of artisanal Argentinean sausages[J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 103(2): 131-142.
- [37] AN C, TAKAHASHI H, KIMURA B, et al. Comparison of PCR-DGGE and PCR-SSCP analysis for bacterial flora of Japanese traditional fermented fish products, aji-narezushi and iwashi-nukazuke[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010, 90(11): 1796-1801.
- [38] FLORES M, DUR M A, MARCO A, et al. Effect of *Debaryomyces* spp. on aroma formation and sensory quality of dry-fermented sausages[J]. Meat Science, 2004, 68(3): 439-446.
- [39] COCOLIN L, URSO R, RANTSIOU K, et al. Dynamics and characterization of yeasts during natural fermentation of Italian sausages[J]. FEMS Yeast Research, 2006, 6(5): 692-701.