

反复冻融对速冻水饺菌相变化的影响

韩齐, 孙清秀, 孙方达, 郑冬梅, 孔保华

(东北农业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要: 本文同时采用 PCR-DGGE (聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳) 方法和传统平板培养法两种方法研究了反复冻融条件下造成的温度波动对速冻水饺中微生物数量及其种类多样性的影响。并向水饺中人为添加金黄色葡萄球菌, 分析反复冻融条件下金黄色葡萄球菌数量的动态变化及其对水饺中菌相的影响。研究结果表明随着反复冻融次数的增加, 水饺中的微生物数量均呈显著增加趋势 ($P < 0.05$), 人工接种金黄色葡萄球菌处理组水饺中金黄色葡萄球菌数量从速冻后的 3.49 lgCFU/g 增加至 5.07 lgCFU/g, 已经达到了可导致葡萄球菌属中毒的水平 (10^5 CFU/g)。PCR-DGGE 结果表明, 乳酸菌、假单胞菌和热杀索丝菌为反复冻融过程水饺中的优势菌株, 葡萄球菌属在后期数量较多成为反复冻融后期的优势菌株, 与传统平凡培养方法结果基本一致。

关键词: 水饺; 聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳; 多样性; 优势菌群; 金黄色葡萄球菌

文章编号: 1673-9078(2015)5-206-211

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.5.033

Effect of Multiple Freeze-thaw Cycles on the Microflora of Quick-frozen Dumplings

HAN Qi, SUN Qing-xiu, SUN Fang-da, ZHENG Dong-mei, KONG Bao-hua

(College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: The effect of temperature fluctuations caused by repeated freeze-thaw cycles on the number and diversity of microorganisms in quick-frozen dumplings was investigated using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) and traditional plate culture methods. The dumpling fillers were inoculated with *Staphylococcus aureus* to analyze the dynamic changes in *S. aureus* itself and its influence on the dumpling microflora. The results showed that the quantity and diversity of microorganisms in the dumplings increased significantly ($p < 0.05$) with increasing freeze-thaw cycles. At the last cycle, *S. aureus* count in the inoculated dumplings increased from 3.49 to 5.07 \log_{10} CFU/g, which reached the minimum count for Staphylococcal toxicity, of 10^5 CFU/g. PCR-DGGE showed that lactic acid bacteria, *Pseudomonadales bacterium* and *Brochothrix thermosphacta* were the dominant strains in the dumplings during the freeze-thaw cycles, while the counts of *S. aureus* increased and finally became the dominant strain. The results of PCR-DGGE and the traditional culture method were generally consistent.

Key words: dumplings; polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis; diversity; dominant microflora; *Staphylococcus aureus*

水饺是由面皮包馅而成的一种深受中国人民喜爱的传统特色食品, 一般以小麦粉加工成饺子皮, 用肉、水产品、蛋、蔬菜等原料的一种或多种制成饺子馅。其原料的多样性构成了一个复杂的微生物体系, 非常适合微生物的生长繁殖。速冻水饺特殊的产品特性决定了其需要的运输与贮藏方式, 如达不到要求温度会造成产品质量的劣变, 甚至会产生安全性危害。尤其

收稿日期: 2014-09-02

基金项目: 黑龙江省科技计划项目 (GC13B212); “十二五” 国家科技支撑计划项目 (2012BAD28B02)

作者简介: 韩齐(1988-), 女, 博士研究生, 研究方向为畜产品加工与贮藏

通讯作者: 孔保华(1963-), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为畜产品加工与贮藏

在实际生产加工中, 从生产车间到冷冻车间, 从运输车辆到市场, 再到消费者购买的整个过程, 都会出现温度的波动从而导致水饺中微生物的变化, 以致影响产品的品质。目前, 国内外对加工条件和温度波动对于肌肉食品质量的相关研究较多, 而温度波动条件下水饺中菌相变化分析则较少。并且我国 GB 19295-2011 食品安全国家标准《速冻米面制品》中放宽了对金黄色葡萄球菌的要求, 其含量由不得检出调整到可限量检出并采用三级采样法, 每一批生制品抽查的 5 个样品中允许有 1 个样品含金黄色葡萄球菌量在 1000~10000 cfu/g 内, 这批产品即为合格产品。这意味着对水饺中金黄色葡萄球菌的监测和控制就变得尤其重要。

目前微生物多样性的鉴定多采用平板培养法,而传统方法通过培养、分离和鉴定的方法受到许多因素限制并且不能完全体现出微生物的多样性和其动态变化。而且有研究表明目前无法培养的微生物占自然界的85%~90%^[1],近年兴起的基于16SrDNA的变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)技术,使得对于更为复杂的微生物体系分析变得更为有效^[2]。

本文采用传统平板培养和PCR-DGGE结合的方法分析反复冻融条件下造成的温度波动对速冻水饺微生物菌相及数量的动态变化,同时人为添加金黄色葡萄球菌,分析温度波动对水饺中金黄色葡萄球菌的影响,为降低金黄色葡萄球菌在水饺中存在的风险和改善水饺生产管理体系提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 原料与主要仪器设备

猪肩颈肉、背部肥膘,葱姜,购于哈尔滨市家乐福超市;食盐,中盐宏博有限公司;五香粉,易鑫源食品有限公司;大豆油、香满园饺子专用粉,益海嘉里集团;酱油,哈尔滨正阳河调味食品有限公司;丙烯酰胺、N,N'-甲叉双丙烯酰胺、去离子甲酰胺,北京索莱宝生物科技有限公司;Tris碱、四甲基乙二胺(TEMED)、过硫酸铵(APS),美国Sigma公司;β-巯基乙醇,美国Amersco试剂公司;DNA,分子量标准I、细菌基因组DNA提取试剂盒、Golden PCR反应试剂盒,北京天根生化科技有限公司;DNA荧光染料,北京百泰克生物技术有限公司;其他试剂均为国产分析纯;金黄色葡萄球菌ATCC25923,东北农业大学实验室提供。

Allegra 64R型冷冻离心机,美国BECKMAN公司;SPX-250B-D2型振荡培养箱,上海博远事业有限公司医疗设备厂;DHP-9162型电热恒温培养箱,上海一恒科技有限公司;DCode System型变性梯度凝胶电泳、PowerPac通用型电泳电源,美国Bio-rad公司;TC-96/G/(b)型PCR仪,杭州博日科技有限公司;Tanon4200型凝胶成像系统,上海天能科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 水饺的制作及反复冻融过程

将猪肩颈肉和背部肥膘通过4 mm孔径电动绞肉机制成肉糜,并按表1配方,将肥、瘦肉糜与辅料混合、搅拌均匀。每个水饺取10.0 g±0.1 g肉馅手工包制,于-30℃下速冻后分装封口。所用器具均经过高

温杀菌。共包制3批水饺,每一批次用于一个重复试验,将不同处理的水饺均贮藏于-18℃条件下。在室温(约25℃)条件下解冻1 h完成第一次冻融,使水饺中心温度接近0℃,留下第一次冻融样品(每批共60个水饺,每次冻融完成后取出8个水饺用于微生物计数和PCR-DGGE分析),其余样品放回-18℃冰柜中进行贮藏。依次类推,间隔时间为2天分别进行第2~7次冻融,即时间分别为第3、5、7、9、11、13 d,共进行7次冻融。

表1 水饺馅料配方(g)

Table 1 Recipe of dumpling fillers (g)

瘦肉	肥膘	大豆油	食盐	酱油	水	鲜姜	葱	五香粉	总量
400.0	100.0	3.0	15.0	20.0	50.0	10.0	10.0	4.0	612.0

1.2.2 人工接种样品制备

在胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)中接种金黄色葡萄球菌株,置于37℃、200 r/min下震荡活化培养3次,将所得菌种原液在4℃、6800×g下冷冻离心6 min收集菌体,用0.85%生理盐水溶解菌体,最终菌悬液浓度约为10³~10⁴ cfu/mL。将经过适当稀释的菌悬液接种于水饺肉馅中,搅拌均匀按1.2.1步骤制作水饺,使水饺肉馅中金黄色葡萄球菌初始数量约在10³ cfu/g。整个过程均在无菌操作台中完成。

1.2.3 微生物计数和培养

微生物计数参照GB 4789.2-2010^[3]的方法,使用选择性培养基对水饺中微生物进行培养及计数。金黄色葡萄球菌培养及计数则参照韩齐^[4]等人方法进行。葡萄球菌培养基:牛肉膏1 g,示蛋白胨10 g, D-甘露醇10 g, NaCl 75 g, 1%酚红2.5 mL蒸馏水1000 mL,琼脂20 g,调节pH至7.2~7.6。其余培养基及培养条件如表2所示:

表2 水饺贮藏过程中各种细菌的选择性培养基及培养条件

Table 2 Selective media and culture conditions for bacteria

during storage of dumplings		
细菌类别	培养基名称	培养条件
细菌总数	Plate count agar(PCA)	37℃, 48 h
假单胞菌属	Pseudomonades selective agar(PSA)	25℃, 48 h
乳酸菌	De Man Rogosa Sharpe agar(MRSA)	30℃, 48 h
环丝菌属	Streptomy cin thalliumacetate actidion agar(STAA)	30℃, 48 h
葡萄球菌	葡萄球菌属培养基	37℃, 48 h
金黄色葡萄球菌	Baird-Parker (BP)	37℃, 48 h

1.2.4 水饺中细菌DNA的提取

水饺细菌DNA的提取参照Han^[5]的方法进行,略作改动。无菌操作取20 g水饺肉馅(约2个水饺)于

80 mL 0.9%生理盐水中, 4 °C振荡 30 min; 静置 5 min, 去沉淀。取 60 mL 上清液, 加入至 100 mL 无菌离心管中。4 °C, 800×g 下离心 10 min 后弃去沉淀。无菌操作吸取 40 mL 上清液加入到 100 mL 无菌离心管中。4 °C, 10,000×g 离心 10 min, 得菌体沉淀。根据天根公司细菌基因组 DNA 提取试剂盒的方法操作, 提取细菌总 DNA。最终提取 DNA 用 TE 缓冲液冲洗, 贮存于-20°C。

1.2.5 聚合酶链式反应 (PCR)

表 3 PCR 扩增引物及反应条件

Table 3 PCR primer and reaction conditions

引物名称	引物序列	PCR 反应条件		
		预变性	扩增	循环数 后延伸
上游引物: 带 GC 夹子的 U968	CGCCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGGCGG GGGCACGGGGGAACGCGAAGAACCCTTAC	94 °C, 3 min	95 °C 变性 30 s; 55 °C 退火 30 s; 72 °C 延伸 1 min	35 72 °C, 5 min
下游引物: L1401	GCGTGTGTACAAGACCC			

1.2.6 变性梯度凝胶电泳 (DGGE)

对 1.2.5 步骤中 V6~V8 区段的扩增产物进行 DGGE 电泳分析, 根据 Muzer^[6]的方法, 略作改动: 聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8% (丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、尿素、甲酰胺和甘油), 尿素体积分数梯度为 40%~70%。75 V 预电泳 30 min, 上样, 75 V 电泳 14 h。

1.2.7 纯化、测序与相似性比对

对 1.2.6 步骤中凝胶上的特异性条带进行 DNA 回收, 以回收的 DNA 为模版, 按照 1.2.5 步骤进行 PCR 扩增并纯化, 回收最终单一条带进行 PCR 扩增 (引物为 U968: AACGCGAAGAACCCTTAC 和 L1401: GCGTGTGTACAAGACCC, 扩增反应条件同 1.2.5)。将最终扩增产物回收, 由深圳华大基因公司测序, 所得序列与 NCBI 数据库中的已知序列进行相似性比对 (BLAST), 鉴定微生物菌种, 进而确定水饺中微生物种类。

1.3 数据统计分析

每个试验重复三次, 结果表示为平均数±SD。数据统计分析采用 Statistix 8.1 (分析软件, St Paul, MN) 软件包中 Linear Models 程序进行, 差异显著性 ($P < 0.05$) 分析使用 Tukey HSD 程序, 采用 sigmaplot 11.0 软件作图。

2 结果与讨论

2.1 平板培养分析反复冻融过程中速冻水饺

微生物数量的变化

对 1.2.4 步骤中提取的细菌总 DNA 中的 V6-V8 区域进行 PCR 扩增, 反应条件参考北京天根生化科技有限公司生产的 Golden PCR 反应试剂盒的使用说明并稍作修改。PCR 反应体系 (50 μL): 包括 0.5 μL Taq DNA 聚合酶, 1 μL 引物 U968-GC 和 L1401, 4 μL DNA 模板, 25 μL 2×Reaction Mix 缓冲液和 18.5 μL 去离子水。PCR 扩增引物序列及反应条件见表 3, 扩增后冷却到 4 °C。利用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果, 于-20 °C 保存备用。

图 1 为反复冻融过程水饺中微生物含量的动态变化, 普通加工水饺的初始菌落总数为 4.70 lgCFU/g, 速冻后有一个显著的降低 ($P < 0.05$), 随着反复冻融次数的增加, 菌落总数呈明显升高的趋势 ($P < 0.05$), 反复冻融 7 次后可达到 5.90 lg CFU/g。人工接种加工处理的水饺由于人为添加了金黄色葡萄球菌, 其菌落总数略高于普通加工水饺, 生长趋势同普通水饺相似。

不同处理方法水饺中的乳酸菌总数均呈升高趋势。普通加工水饺增加趋势显著 ($P < 0.05$), 且略高于人工接种水饺, 这可能是由于反复冻融末期人工接种组金黄色葡萄球菌大量生长繁殖与同样数量较多的乳酸菌竞争导致的, 这与陈晓蔚^[7]等人的研究发现乳酸菌与金黄色葡萄球菌间存在拮抗作用相符合。且在普通加工水饺中乳酸菌的总量要高于假单胞菌、热杀索丝菌和葡萄球菌, 证明反复冻融过程中乳酸菌是水饺中的优势菌。

假单胞菌和热杀索丝菌随着冻融次数的增加, 二者均呈显著性增加 ($P < 0.05$), 但热杀索丝菌总数增长速度较为缓慢。这证明反复冻融可以引起一些腐败菌和致病菌的再次生长繁殖, Azizoglu 等人的研究发现单增李斯特菌在-20 °C 和 37 °C 反复冻融条件下培养和 37 °C 恒定温度下培养后得到的细菌总量基本相同同样证明了这一点^[8]。

不同加工处理水饺中葡萄球菌均呈显著增加趋势。人工接种处理组由于添加了金黄色葡萄球菌而明显高于普通处理组。普通处理组水饺中金黄色葡萄球菌初始菌数较低, 为 2.95 lgCFU/g, 速冻后显著降低, 在随后的反复冻融中金黄色葡萄球菌总数增长趋势显著 ($P < 0.05$), 第 5 次冻融时金黄色葡萄球菌总数已接

近 10^4 cfu/g, 这说明温度的波动会导致水饺中金黄色葡萄球菌总数的升高, 给速冻食品带来较大的不安全因素。虽然速冻可以减少金黄色葡萄球菌数量, 但是不能完全杀死, 部分金黄色葡萄球菌处于一种亚致死性损伤状态, 在适当的条件下可以得到修复再次生长。这也解释了为什么日常销售的速冻产品中频繁的检测出金黄色葡萄球菌。人工接种处理组水饺中金黄色葡萄球菌数量随着反复冻融显著 ($P<0.05$) 增加, 速冻后为 $3.49 \lg\text{CFU/g}$, 在第 5 次冻融时其数量已经接近能够造成金黄色葡萄球菌食物中毒的水平 10^5 cfu/g, 到第 7 次冻融时数量增加至 $5.07 \lg\text{CFU/g}$, 已达到 10^5 cfu/g, 可造成食品安全性危害^[9]。

由图 1 反复冻融过程中水饺中的微生物数量均呈显著增加趋势, 可得出结论反复冻融对水饺中微生物存在有着明显的影响。虽然速冻和 $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 下冷冻贮藏可以抑制微生物的生长, 但冷冻并不是一种杀菌手段。当冷链被破坏, 温度范围出现波动时, 可能会造成水饺中腐败菌及致病菌的再次生长。

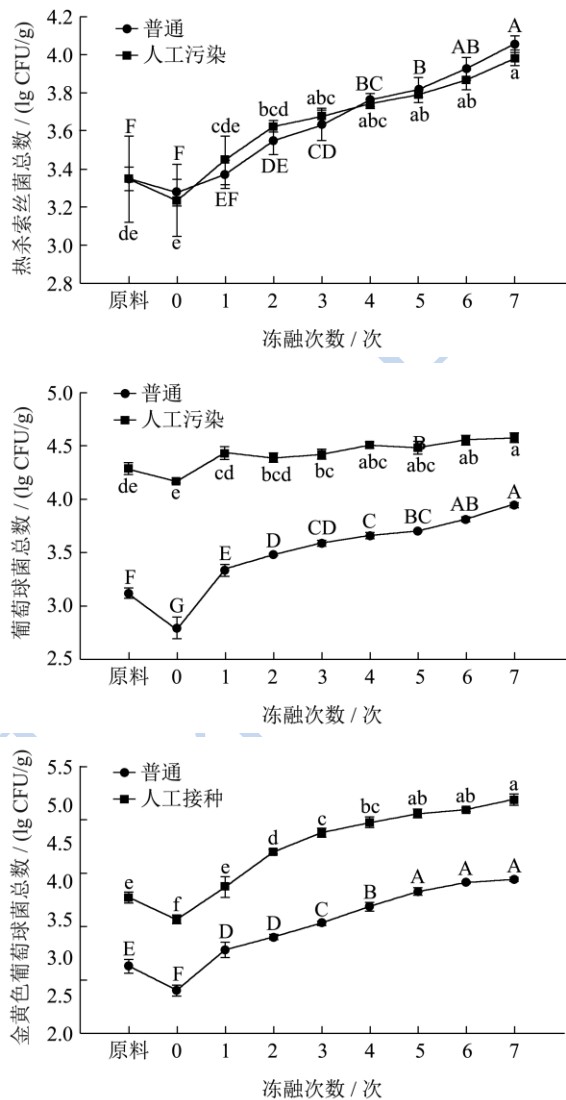
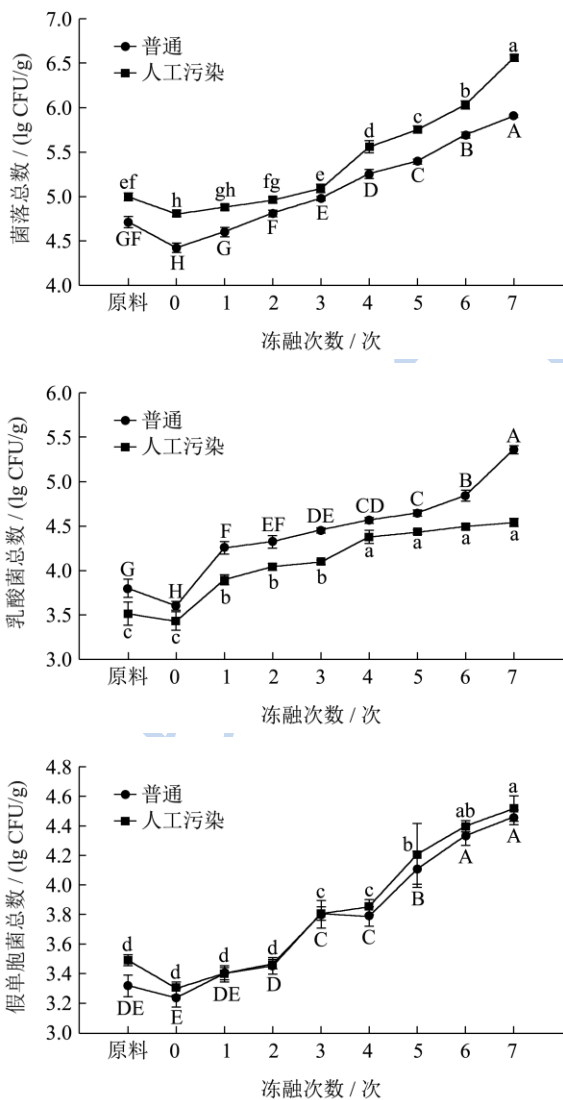


图 1 水饺反复冻融过程中微生物的动态变化

Fig.1 Dynamic changes in bacterial counts during multiple freeze-thaw cycles

注: A~H, a~h图中大、小写字母不同分别表示不同处理组水饺间的差异显著 ($P<0.05$)。

2.2 PCR-DGGE 方法分析反复冻融过程中速冻水饺微生物种类的变化

图 2 为反复冻融过程中直接提取水饺中细菌 DNA, 并对其 V6~V8 区进行 PCR 扩增的结果。由图可看出, 不同时期提取结果相似, 均为单一条带, 各个时期经过引物 gcU968 和 L1401 进行扩增, 均得到了 400~500 bp 之间的特异性扩增片段, 证明扩增过程没有污染杂菌, 适用于后续试验。

图 3 为水饺反复冻融过程中细菌的 DGGE 图谱。由图可看出, 包括原料和速冻后在内的所有泳道中共有的条带为 2、4、5、6、7、8。水饺速冻后的泳道 2

和 12 与原料泳道 1 和 11 比较条带减少 (如条带 10 消失), 证明速冻可以抑制部分微生物的生长, 但不能杀灭所有微生物, 因此部分条带仍存在。不同加工处理水饺初期条带数量较少, 随着反复冻融的次数增加条带数逐渐增多。

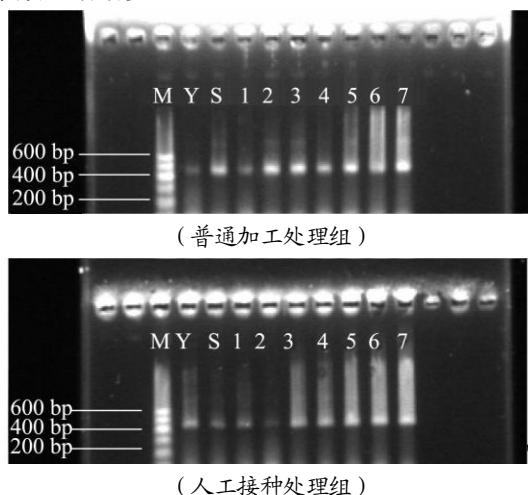


图2 反复冻融过程提取水饺中细菌 DNA 的 V6~V8 区 PCR 扩增结果

Fig.2 Electrophoresis (2% agarose) pattern for PCR products of bacterial DNA (V6 to V8 region) extracted from bacteria in the dumpling during multiple freeze-thaw cycles

注: M泳道为Marker, Y泳道为原料, S泳道为速冻后, 1~7泳道为反复冻融过程。

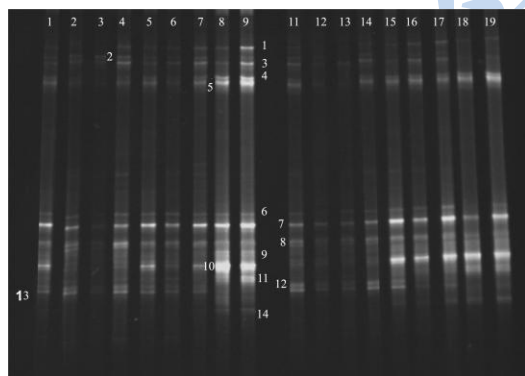


图3 水饺反复冻融过程中细菌的 DGGE 图谱

Fig.3 DGGE profiles of bacteria in the dumpling during multiple freeze-thaw cycles

注: 1~9泳道为普通加工处理水饺: 1为原料, 2为速冻后, 3~9为反复冻融过程; 11~19为人工接种处理加工处理水饺: 11为原料, 12为速冻后, 13~19为反复冻融过程。

为了对 DGGE 图谱中的条带进行测序分析, 切下图谱中不同位置的条带, 清洗三次后, 加入 TE 缓冲液使胶条完全浸没, 4 °C 过夜。以回收的 DNA 为模版, 按照 1.2.7 步骤进行测序和相似性比对, 在 GenBank 找到与其近似度最高的菌株, 结果如表 4 所示:

表4 直接提取水饺中细菌总 DNA 经 DGGE 条带分离的细菌 16S rDNA 部分序列鉴定

Table 4 Partial sequence identification of 16S rDNA gene fragments from DGGE bands of total DNA directly extracted from the bacterial community in dumplings

条带编号	最相似菌株	相似性/%	登录号
1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99	KF023229.1
2	<i>Staphylococcus xylosus</i>	99	KC790245.1
3	<i>Macrococcus</i> sp.	99	JQ342093.1
4	<i>Staphylococcus aureus</i>	100	CP007539.1
5	<i>Staphylococcus</i> sp.	99	JX482509.1
6	<i>Lactic acid bacterium</i>	98	FN646074.1
7	<i>Pseudomonadales bacterium</i>	99	KC404003.1
8	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	99	AY543025.1
9	<i>Uncultured bacterium</i>	99	GQ011032.1
10	<i>Carnobacterium</i> sp.	99	DQ343755.1
11	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	99	GU994747.1
12	<i>Carnobacterium</i> sp.	94	DQ405248.1
13	<i>Arthrobacter</i> sp.	99	AM900505.1
14	<i>Citrococcus</i> sp.	98	KF768824.1

由图3水饺反复冻融过程中细菌的 DGGE 图谱与表4条带鉴定结果结合分析, 发现反复冻融过程中水饺共有的条带 2、4、5、6、7、8 分别为木糖葡萄球菌 (*Staphylococcus xylosus*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus* sp.)、乳酸菌 (*Lactic acid bacterium*)、假单胞菌 (*Pseudomonadales bacterium*) 和热杀索丝菌 (*Brochothrix thermosphacta*), 其中条带 6、7、8 在整个过程中始终较为明亮且随着反复冻融次数的增加变亮, 因此乳酸菌、假单胞菌和热杀索丝菌为反复冻融过程水饺中的优势菌株, 葡萄球菌属在后期数量较多成为反复冻融后期的优势菌株。李苗云^[10]等人在分析冷却猪肉贮藏过程中也发现假单胞菌、热杀索丝菌是冷却猪肉贮藏过程中的优势菌。随着反复冻融次数的增加, 条带 1、3、10 出现且逐渐变亮, 分别为植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)、巨球菌 (*Macrococcus* sp.) 和肉食杆菌 (*Carnobacterium* sp.)。翁丽华^[11]等人在利用 PCR-DGGE 技术研究热鲜肉贮藏过程中的菌相变化时, 也发现肉中存在巨球菌。在泳道 8、9 和泳道 17、18、19 即反复冻融后期出现条带 11 和 14, 分别为寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas* sp.) 和 *Citrococcus* sp.。寡养单胞菌属是一个新命名的菌属, 属于假单胞菌科, 广泛存在于自然界水源, 如河水、井水及自来水中。Didienne^[12]等人在分析一种被称为 “gerles” (用于制作 Salers 奶酪的木桶) 上的微生物

特性时, *Citrococcus* sp.为其菌相中的一种,是一种革兰氏阳性过氧化氢酶阳性细菌。而条带9经对比结果为非培养细菌,这说明 PCR-DGGE 技术可以较为全面的分析食品中微生物体系。而序列鉴定结果中除肉食杆菌相似性较低外,其余均能达到98%以上,说明本试验的测序结果可信度很高^[13]。

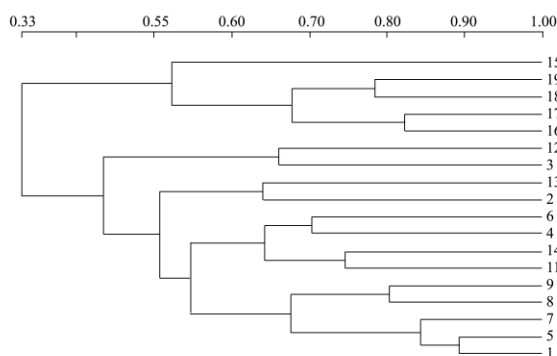


图4 水饺反复冻融过程中细菌发育树图谱

Fig.4 Phylogenetic tree profiles of bacteria in the dumplings during multiple freeze-thaw cycles

注: 1~9泳道为普通加工处理水饺: 1为原料、2为速冻后、3~9为反复冻融过程; 11~19为人工接种处理加工处理水饺: 11为原料、12为速冻后、13~19为反复冻融过程。

图4为反复冻融过程中水饺中细菌发育树图谱,可以说明不同泳道间菌相的相似性。从图中可看出,16、17、18、19四条泳道相似性较高、7、8、9三条泳道相似性较高,均可达到68%以上,说明人工接种处理组和普通加工处理组水饺在反复冻融末期菌相趋于稳定。泳道1和5分别为普通处理组原料和反复冻融第三次,相似性为89%;泳道11和14分别为人工接种组原料和反复冻融第二次,相似性为80%,说明随着反复冻融次数的增加水饺中微生物种类逐渐与速冻杀菌前类似,表明随着温度的波动水饺中微生物重新生长繁殖。泳道2和9、12和19分别为不同处理组速冻后和反复冻融末期,相似性分别为51%和33%说明随着反复冻融次数增加水饺菌相发生了改变。

3 结论

本文采用 PCR-DGGE 法和平板培养法分析了速冻水饺在反复冻融过程中微生物种类及数量的变化,结果表明随着反复冻融次数的增加,不同处理组水饺中的菌落总数、乳酸菌、假单胞菌、热杀索丝菌和葡萄球菌等腐败菌数量均呈显著上升 ($P<0.05$),人工污染处理组中金黄色葡萄球菌数量在反复冻融第5次时已经接近能够造成金黄色葡萄球菌食物中毒的水平 10^5 cfu/g。普通处理组中金黄色葡萄球菌数量在冻融末期(第5次冻融)接近 10^4 cfu/g,虽然没有达到食

物中毒的水平,但菌数增加也十分显著 ($P<0.05$)带来了一定的安全隐患。PCR-DGGE 结果表明随着反复冻融次数的增加,反复冻融过程中始终存在并随着冻融次数增加逐渐成为水饺中优势腐败菌的为葡萄球菌属、乳酸菌、假单胞菌和热杀索丝菌。同时随着冻融次数增加, DGGE 图谱中条带数目变多说明水饺中微生物种类增加,在冻融末期检测到了植物乳杆菌、巨球菌、肉食杆菌及寡养单胞菌属等。

参考文献

- [1] Fontana C, Coconcelli P S, Vignolo G. Monitoring the bacterial population dynamics during fermentation of artisanal Argentinean sausages [J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 103: 131-142
- [2] Zhang JC, Liu W, Sun Z H, et al. Diversity of lactic acid bacteria and yeasts in traditional sourdoughs collected from western region in Inner Mongolia of China [J]. Food Control, 2011, 22(5): 767-774
- [3] GB4789.1-2010, 食品安全国家标准食品微生物学检验总则 [S]
GB4789.1-2010, National food safety standard food microbiological examination: general guidelines [S]
- [4] 韩齐,陈倩,孙方达,等.水饺馅料中金黄色葡萄球菌预测模型的建立[J].食品工业科技,2013,34(23):93-96
HAN Qi, CHEN Qian, SUN Fang-da, et al. Construction of growth kinetics model of staphylococcus aureus in dumplings fillers [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(23): 93-96
- [5] Han Y, Xu X, Jiang Y, 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
- [6] 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 16SrRNA [J]. Applied and environmental microbiology, 1993, 59(3): 695-700
- [7] 陈晓蔚,丁洁,王炜,等.不同乳酸菌对金黄色葡萄球菌生长和产毒的抑制作用研究[J].中国卫生检验杂志, 2004, 14(3): 306-307
CHEN Xiao-wei, DING Jie, WANG Wei, et al. Inhibiting effects of different lactobacilli on growth and toxin production of Staphylococcus aureus [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2004, 14(3): 306-307
- [8] Azizoglu R O, Osborne J, Wilson S, et al. Role of growth

- temperature in freeze-thaw tolerance of listeria spp [J]. Applied Environmental Microbiology, 2009, 75(16): 5315-5320
- [9] Valero A, Pérez-Rodríguez F, Carrasco E, et al. Modelling the growth boundaries of *Staphylococcus aureus* : Effect of temperature, pH and water activity [J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 133(1-2): 186-194
- [10] 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, 2008, 36(9): 185-189
- LIMiao-yun, ZHOU Guang-hong, XU Xing-lian. Study on the dominant bacteria during the storage period on chilled pork using PCR-DGGE [J]. Journal of Northwest A & F University, 2008, 36(9): 185-189
- [11] 翁丽华,江芸,徐幸莲,等.PCR-DGGE研究热鲜肉贮藏过程中的菌相变化[J].食品科学,2012,33(23):199-203
- WENG Li-hua, JIANG Yun, XU Xing-lian, et al. Changes in microflora of hot-boned pork during storage as analyzed by PCR-DGGE [J]. Food Science, 2012, 33(23): 199-203
- [12] Didienne R, Defargues C, Callon, et al. Characteristics of microbial biofilm on wooden vats ('gerles') in PDO Salers cheese [J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 156(2): 91-101
- [13] Doulgeraki AI, Paramithiotis S, Kagkli DM, et al. Lactic acid bacteria population dynamics during minced beef storage under aerobic or modified atmosphere packaging conditions [J]. Food Microbiology, 2010, 27: 1028-1034