

蛋白质组学技术在食品微生物安全评估与检测中的应用

吴晖¹, 冯广莉^{1,2}, 李晓凤¹, 刘洪伟¹

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

(2. 华南理工大学制浆与造纸国家重点实验室, 广东广州 510640)

摘要: 食源性微生物导致的食品安全问题在世界范围内一直备受关注。沙门氏菌 (*Salmonella Spp*)、李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)、大肠杆菌 O157:H7 等致病菌容易在食品加工过程中存活, 对消费者的生命健康造成危害。在食品快速流通及泛工业化生产的今天, 实现食品中的病原微生物以及微生物毒素的快速检测是保障食品安全的基本途径之一。作为 21 世纪六大热点技术之一, 蛋白质组学技术有望弥补目前基于免疫学、基因组学等快速检测方法的不足, 为监测食品中微生物种类与含量、保证食品安全提供新思路。本文主要探讨了蛋白质组学在食品微生物安全方面的最新研究进展, 内容涵盖了利用质谱鉴定食品微生物, 利用多肽指纹图谱识别食品中潜在病原微生物, 利用蛋白质组学的方法研究微生物在外界环境变化时蛋白质组上的响应以及与食品安全相关的生物膜的研究进展等。

关键词: 蛋白质组学; 质谱; 微生物安全; 食品安全

文章编号: 1673-9078(2013)11-2793-2799

Application of Proteomics in Safety Assessment and Monitoring of Food Microorganisms

WU Hui¹, FENG Guang-li^{1,2}, LI Xiao-feng², LIU Hong-wei¹

(1. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. State Key Lab of Pulp and Paper-making Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Food microbial-safety has attracted much attention in the world. *Salmonella Spp*, *Listeria monocytogenes*, *E.coli* O157:H7 can survive in food processing, causing health hazards to consumers. Nowadays, rapid detection of food pathogens and microbial toxins are considered to be important to ensure food safety in the fast food circulation. As one of the six major techniques in life sciences of the 21st Century, proteomics provide new route for safety assessment and monitoring food microbes, which might complement the shortages of the rapid detection methods based on immunology or genomics. This paper mainly discussed the application of proteomics on inspections of food microbial-safety, including identification of potential pathogenic microorganisms in foods by peptide fingerprints, analysis of the adaption of microorganisms to external environments, etc. Advanced studies on biofilm with proteomics method were also covered in this paper.

Key words: proteomics; mass spectrometry; microbial-safety; food safety

民以食为天, 食以安为先。俗话说病从口入, 饮食安全是身体健康的基本保证。直至今日, 食源性致病微生物 (Food-borne pathogens) 及其所产微生物毒

收稿日期: 2013-07-11

基金基金: 广东省自然科学基金(S2013010012486); 广东省科技创新项目(2012KJCX0006); 新世纪优秀人才支持计划项目(NGET-12-0192); 中央高校基本业务经费(2013ZM0044, 2013Z20068, 2013ZM0065)

作者简介: 吴晖 (1967-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品质量与安全

通讯作者: 李晓凤 (1977-), 女, 博士, 副研究员, 主要从事微生物催化、微生物发酵及生物催化天然化合物修饰转化等方面的研究

素(Microbial toxin)仍是人类饮食健康的重大威胁。在微生物导致的食品安全事件中, 相当数量的病例需要住院治疗, 情况严重时会导致病人死亡。统计显示, 美国每年有325,000例因食源性致病微生物引起的疾病, 其中5000余病例死亡。2009年夏, 在美国32个洲至少有74人因摄入带菌食物而感染了埃希氏大肠杆菌 O157:H7, 其中半数病例需要住院治疗^[1]。德国、英国等欧洲国家也深受食品微生物导致的食品安全问题的困扰, “毒黄瓜”、“毒菠菜”、“毒鸡蛋”等事件就是因为食品污染了大肠杆菌、沙门氏菌而引发的。在第三世

界国家,虽然食源性微生物安全事故没有或者仅有部分报告,但是情况要比欧美国家严重得多。在中国,上世纪80年代上海等地发生的食源性甲型肝炎事件波及近30万人;2001年,摄入H7型大肠杆菌污染的食物导致江苏、安徽等地约2万人中毒;2011年,一项关于食源性疾病的主动监测数据显示,我国平均6.5人中就有1人次罹患食源性疾病。因此,如何有效、快速地对食源性致病微生物进行检测与监控被认为是预防食源性疾病发生的关键。近年来,生物技术的兴起极大推动了食品微生物安全检测与监控技术的发展。目前,食品安全领域对食品微生物的检测技术主要涉及免疫学方法、核酸探针、聚合酶链式反应技术(Polymerase chain reaction, PCR)、基因芯片技术、生物传感器技术等^[2]。

蛋白质组学(Proteomics)是后基因组时代生命科学、医学等领域研究中非常重要的研究工具。蛋白质组学技术主要依赖于蛋白质分离、检测和鉴定技术,涉及到以计算机软件和网络数据库为核心的生物信息学。蛋白质的分离技术主要包括一维凝胶电泳、二维凝胶电泳(2-DE),高效液相色谱(HPLC),双向荧光差异电泳(2D-DIGE)等,分离出来的蛋白质的鉴定可通过质谱(MS)、串联质谱(tandem MS)获取图谱后再搜索网络数据库进行匹配得以实现。食品离子源的产生方式包括了基质辅助激光解析离子源(MALDI)和电喷雾离子源(ESI)。《Science》杂志将其列为二十一世纪生命科学领域六大研究热点之一^[3-4]。人和一些重要生物的基因组测序的完成标志着人类已经进入了生命科学领域研究的新阶段。

《Proteomics》杂志主编 Michael J. Dunn 认为,蛋白质组学为后基因组时代研究敞开了大门^[5]。自2004年起,几乎每年都有多篇蛋白质组学在食品上应用的综述。这些综述内容包括了蛋白质组学技术的发展^[5-6]、蛋白质组学在植物性食品加工、食品辐照处理中的应用,转基因食品及过敏原检测^[6,9],功能性食品蛋白质组学研究^[7-9],食品原材料的表征与标准化,食品批次之间质量变化与监控,食品质量安全,葡萄酒及啤酒使用安全^[6,9],营养与肥胖^[11],乳和乳酸菌蛋白质组学研究等^[9-10]。然而,迄今为止未见关于蛋白质组学在食品微生物安全上应用的相关综述。鉴于上述研究现状,本文对蛋白质组学技术及其在食品病原微生物检测、鉴定及食品微生物对环境变化响应等方面进行了综述。

1 利用蛋白质组学方法检测与鉴定食源性微生物

开发快速、灵敏的食品致病性和腐败性微生物的检测方法是确保食品安全的重要内容。虽然基于微生物学、化学、分子生物学和免疫学理论发展起来的微生物检验方法可以满足定量和定性检测的要求,但是都各自有严重的缺陷。一些传统的检测方法无法对难培养或不可培养的致病菌进行检测,也存在特异性不高、灵敏度低、耗时、不能实现有效的监测与预防作用等缺点。食品的复杂介质是PCR等基于DNA复制理论进行检测时遭遇的主要难题,另外与其相关的配套标准与法规尚难于制定。此外,一些细菌由于基因序列高度相似,也很难利用基于DNA的分子技术进行鉴定。作为后基因组时代的蛋白质组学技术为鉴定食品中的病原微生物提供了可供选择的解决办法。其中,基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS)可用于鉴定食品微生物,并具有快速、成本低与样品用量少的优点,其在食品病原微生物和腐败微生物检测方面具有良好的应用前景,可成为未来微生物鉴定的标准方法^[12-13]。

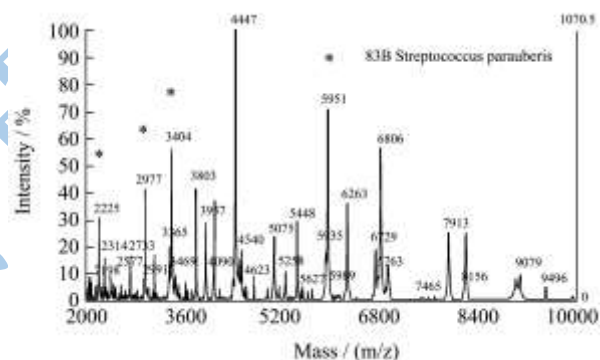


图1 利用MALDI-TOF MS鉴定副乳房链球菌指纹图谱^[17]

Fig.1 Fingerprints for identification of *Streptococcus parauberis* by MALDI-MS

每种细菌的飞行时间质谱图都具有很强的特异性,能够在属、种甚至是种内加以区分鉴定^[14-15]。在最近5年内,利用蛋白质组学方法鉴定食源性致病微生物的报导的数量逐年增加。事实上,现存的图谱数据库每天都在发展更新,展现出能够满足现代微生物学高通量分析需要的趋势。例如,在海产品中存在大量可以导致其快速腐败的微生物,且这些微生物也是导致海产品食物中毒的主要因素。利用MALDI-TOF MS可快速鉴定海产品中腐败菌和革兰氏阳性致病菌。Karola Böhme等^[16]研究了海产品中主要的致病性和腐败性菌,包括了芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)、李斯特菌(*Listeria* spp.)、梭状芽孢杆菌(*Clostridium* spp.)、葡萄球菌(*Staphylococcus* spp.)和肉食杆菌(*Carnobacterium* spp.)。他们从样品中共分离出了20

种细菌,利用MALDI-TOF质谱进行了鉴定,建立了含有32个参考菌株的光谱指纹图谱的提取峰列表。属特异性和种特异性的峰质量数可作为生物标记物用来快速鉴定细菌。利用该数据库,他们成功地鉴定了六株从海产品中分离出来的细菌。I.C. Fernández-No等^[17]利用测序的方法将两株从涨袋的海产品中分离出的细菌鉴定为副乳房链球菌(*Streptococcus parauberis*)。他们对两株菌利用MALDI-TOF MS进行了表征,在2200~6000 m/z范围内鉴定出了五个副乳房链球菌的特异峰,这为快速鉴定海产品和其它食品中的致病性和腐败性菌提供了新思路。

Nicoletta Nicolaou等^[18]发明了对牛奶和猪肉中腐败菌进行定量检测的新方法。这种方法特点在于将基质辅助激光解析飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)与化学计量学结合使用对食品微生物安全进行检测。飞行时间质谱与核函数PLS或KPLS联合使用为牛奶和猪肉的腐败给出了很好的细菌定量结果,典型均方根误差在测试范围预测时为0.53和0.79 log单位;上述研究说明MALDI-TOF MS与化学计量学相结合的方法可以作为牛奶和肉品加工工业中对微生物进行常规快速定量检测的重要辅助方法。

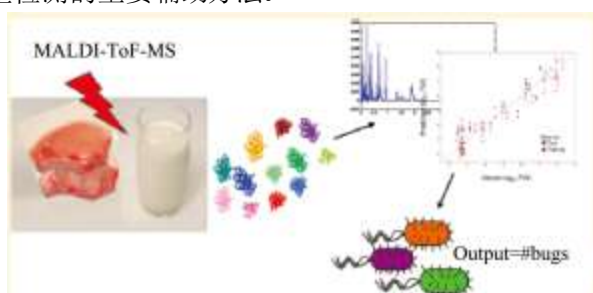


图2 利用飞行时间质谱检测牛奶与肉品中的致病性微生物^[18]

Fig.2 Identification of pathogenic microorganisms in milk and meat

发酵型食品中的微生物菌群种类和数量决定着食品的质量品质和安全,因此能够准确的标识食品中的微生物种类是发酵食品发展的趋势和要求之一。益生菌食品是在发酵罐里面加入发酵剂和益生菌制作而成的。能够在食品商标上准确地标识出益生菌的种类仍不容易。Emmanouil Angelakis等^[19]利用MALDI-TOF质谱对酸奶与其它益生菌食品中的细菌进行了鉴定。他们发现被测试的13个益生菌食物中都含有大量的活菌,为 10^6 ~ 10^9 个/g,这些益生菌包括乳酸清酒菌(*Lactobacillus casei*)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)、动物双歧杆菌(*Bifidobacterium animalis*)和嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*);其中一产品所含益生菌是乳酸乳球菌,而非标识的双歧杆菌属;另一产品中的益生菌是德氏乳杆菌(*L. delbrueckii*)和

嗜热链球菌,而非所标识的双歧杆菌活菌属(*Bifidus spp*)。可见,利用飞行时间质谱能够实现快速准确地对益生菌进行种属水平上的鉴定。另外,动物源双歧杆菌包含了两个亚种,分别是*Bifidobacterium animalis*和*Bifidobacterium lactis*。在这两个亚种中*B. animalis* subsp. *Lactis*由于在益生乳生产中的广泛应用而显得尤为重要。在食品工业应用中,对这些微生物要求能够运用快速、准确、低廉的方法在种间进行区分。尽管各种基于基因的方法被用于区分这两个亚种,但都不满足工业上快速鉴定的需求。而采用蛋白质组学方法,可以利用现有鉴定四种蛋白质标记物(即L1、L2、A1和A2)。由于这四种物质对于种间的区分十分有效,故采用这个方法只需要20 min即可实现对动物源双歧杆菌的鉴定^[20],因此MALDI-TOF MS是一很有潜力的快速鉴定益生菌的方法。

2 蛋白质组学技术在食品微生物环境因素研究上的应用

近些年,蛋白质组学技术在食品中致病性微生物行为和鉴定方面的研究逐渐成为热点,所研究菌种涉及肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica*)、李斯特假单胞菌(*Listeria monocytogenes*)、弯曲杆菌(*Campylobacter spp*)和大肠埃希氏杆菌O157:H7等。尤其是最近几年,不仅传统加热、冷冻等处理方式仍在使用,一些新型技术,例如利用非热处理技术(包括高静压技术HPP、脉冲电场、放射辐照等)处理食品的应用也逐渐增加,这可以产生更营养、更新鲜、更安全的食品。研究发现,食品工业化生产中诸多处理方式,包括加热、高压、辐照处理,食品添加剂的使用,运输保藏过程中的低温、冷冻,包装时高真空的无氧环境都可能直接或间接形成不利于微生物生长的因素。采用蛋白质组学技术可以用来研究食品微生物受到加工处理中的极端环境时的变化响应,从而对食品生产及供应链中致病微生物进行风险评估。

2.1 高静压(HHP)及辐照处理对微生物影响的蛋白组学研究

高静压能够在室温或更低温度下抑制或杀灭微生物,该压力仅影响食物组分中非共价键的结合,对食品质量如色、味及营养组成影响很小^[21],具有良好的商业应用价值。辐照方法在美国及拉丁美洲食品工业中已经得到广泛使用。但食品辐照对微生物的影响在蛋白组学水平上并没有被研究过。有研究认为,HHP

与 γ 辐照相结合可以减少 γ 辐照的剂量,减少某种目标性微生物。

不同食品致病菌对于HHP的耐受程度并不相同。通常革兰氏阳性菌比革兰氏阴性菌压力耐受性要高,但是*Escherichia coli* O157:H7对压力的耐受程度较高。Vanlint等^[22]利用选择性富集的方法检测并研究了大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*),福氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*),鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*),肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*),小肠结肠炎耶尔森菌(*Yersinia enterocolitica*),嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*),绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和无害李斯特菌(*Listeria innocua*)对压力的耐受情况。Martínez-Gomariz等^[23]分析了蜡状芽孢杆菌在HHP处理后的蛋白质组的变化,并对其中较为重要的一些组分进行了鉴定。如预期的那样,该研究鉴定出了参与核苷代谢过程的酶蛋白,但是其它的一些蛋白质,诸如参加碳水化合物代谢、转运、重折叠、氨基酸生物合成和细菌鞭毛运动性蛋白的表达也因HHP处理而发生了变化。这个研究有助于解释为什么诸如蜡状芽孢杆菌等细菌能够在HHP处理中得以逃避高压处理造成的不利影响。空肠弯曲杆菌(*C. jejuni*)对压力较为敏感,检测其压力处理后的蛋白质组变化情况表明其只有诱导产生了氧化压力因子,这可解释为什么空肠弯曲杆菌比其它革兰氏阳性菌更容易受到压力产生的不利影响^[24]。

2.2 极端温度对微生物影响的蛋白组学研究

蛋白质组学研究表明微生物在极端高温条件下(如加热处理时)会诱导产生分子伴侣(Molecular chaperones)和参与蛋白质翻转的蛋白酶;其中耐热菌株会过度表达诸如热休克蛋白DnaK、分子伴侣蛋白GroEL和与糖酵解机制相关的蛋白,如烯醇酶和3-磷酸甘油脱氢酶及其它诸如DNA结合蛋白II和依赖ATP的蛋白酶等^[25]。在蜡状芽孢杆菌中,热处理还强烈激活 δ^B 因子。 δ^B 因子是革兰氏阳性菌,如蜡状芽孢杆菌、李斯特菌和葡萄球菌响应压力变化时的重要调控因子,它还可以被乙醇,渗透压和酸处理等诱导产生。但是对大多乳酸菌来说,环境压力不会诱导产生 δ^B 因子,这说明细菌在压力响应方面进化出了不同的应对机制^[26]。某些微生物在低温冷冻等极端条件下处理食品时也会做出一系列的响应。F Mihoub等研究了冷适应条件对两种大肠埃希氏菌I2与R3生存情况的影响,在-20℃冷冻24 h后在37℃下解冻45 min,再利用选择性和非选择性培养基进行检测,发现冷冻处理对冷冻更为敏感的R3菌株作用更为明显。他们利用二维凝胶电泳分离细

胞质和外膜上的蛋白并且利用质谱鉴定,然后利用Edman方法对上述蛋白进行了测序,发现冷适应导致了某些蛋白质表达的变化。其中,在R3菌株中看到了可介导氨酰-tRNA进入核糖体空位的EF-TU延长因子(Elongation factor thermo unstable)在外细胞膜上的过度表达,鞭毛素蛋白FLIC在细胞质中表达量下降;而上述改变在I2菌株中未被发现^[27]。

2.3 极端pH环境对微生物影响的蛋白组学研究

碱性溶液常用来清洁食品生产环境,但常用此类试剂也可能导致具有高pH耐受性菌株的产生。为了解食品行业中李斯特菌对碱溶液的抗性,Rolf E. Nilsson等^[26]利用鸟枪法蛋白质组学技术对李斯特菌响应碱性条件处理的机制进行了研究,发现李斯特菌能够进行胞内pH调节,减少细胞分裂;同时发现上述变化与李斯特菌是否是长期污染菌无关。碱性环境带来的生存压力能够在不同的李斯特菌群体中诱导“稳定的生理状态”,且这些菌株都展现出相似的生理响应。从这个角度来讲,Carpentier提出的“早期清理和消毒”的措施在防止顽固性李斯特菌污染中是十分必要的。

2.4 化学试剂对微生物影响的蛋白组学研究

某些化学试剂的添加对微生物生长的抑制作用的机理可以采用蛋白质组学技术进行研究。例如针对单宁酸(TA)对希氏乳杆菌(*Lactobacillus hilgardii*)生长具有抑制作用这一结论,有研究利用二维凝胶电泳对暴露在单宁酸细胞中提取的总蛋白进行了检测,发现TA作用后细胞蛋白密度显著减少。大部分减少的蛋白是参与代谢的不同酶类,分布在细胞质和细胞膜上;TA对于细胞的影响是通过代谢酶类和单宁蛋白质相互作用实现的。单宁对于在自然环境下诸如在红酒中抑制细菌生存和生长可能起作用^[28]。过氧化氢溶液是食品工厂中消毒液中的主要成分。研究表明蜡状芽孢杆菌ATCC 14579受 H_2O_2 处理时,它除了可以产生压力响应中常见的重要转录调控因子 δ^B 之外,编码过氧化氢酶的kat A基因的转录水平也显著提高。这一机制在这一变种细菌对过氧化氢产生抗性过程具有重要作用^[29]。生物杀菌剂的应用能导致微生物对一种或多种生物杀菌剂产生抗性,并且伴随着交叉性抗生素抗性的出现。在蛋白质组学水平上对二氯苯氧氯酚敏感的鼠伤寒沙门氏菌和不敏感的突变株的研究揭示了生物杀菌剂产生抗性的细胞机制。研究采用差异性二维凝胶电泳比较了在2,4,4-三氯-2-羟基二苯醚(Triclosan)存

在时原始和变异沙门氏菌蛋白的差异,对表达量发生变化的蛋白利用质谱进行了鉴定,并且将其分成了两组:其中A组在triclosan易受和耐受性沙门氏菌之间进行表达,并且包括了已知的目标Fab I,其在Triclosan目标结合位点有变异;B组,响应triclosan暴露的蛋白并且定义了普遍的细胞防御网络。他们还发现,只有四种蛋白两组蛋白共有,这说明沙门氏菌抵抗生物抑菌剂的途径的多样性^[30]。这些数据还显示亚致死量的triclosan诱导了沙门氏菌的蛋白质组的明显改变,这对研究沙门氏菌的响应机制具有重要意义。

3 利用蛋白质组学对于食品生产中生物膜的研究

由多种微生物通过共生等关系粘附在一起或附着于其他介质表面而形成的生物膜具有高密度特性,能够使微生物在极端环境下存活,生物膜中的微生物细胞的蛋白质组分析对理解微生物在食品加工、食品污染、食品毒性及微生物对抗生素的行为的研究中有重要意义。生物膜是食品行业中在清洗容器及加工设备表面时要考虑的重要因素。研究表明,生物膜中的微生物对于抗生素的敏感程度只是浮游状态下的1/10~1/1000^[31]。生物膜中的细菌与他们在浮游状态时蛋白质组表达不相同,因此蛋白质组学为分析生物膜中微生物在工业处理、寄主感染、共生及对抗微生物试剂抗性行为提供了重要信息。蜡状芽孢杆菌可以在各种生产界面形成生物膜,它也是乳品生产中重要的有害菌^[32]。李斯特菌和沙门氏菌是世界范围内导致食源性疾病暴发的两种重要致病细菌,它们形成的生物膜在工业上很难清洗“干净”^[33]。被生物膜污染的生产设备加工出的食品可能会有货架期短的缺陷,甚至导致食源性疾病的发生。为了减少生物膜造成的食品污染,工业上可应用的清洗剂呈现不断翻新的态势,诸如酶,噬菌体和抗生素等都被用来制成溶液用以清洗食品设备和管道。利用基于DIGE的蛋白质组学方法鉴定了白色假丝酵母(*Candida albicans*)微生物膜形成的早期和成熟阶与游离状态下蛋白质的表达差异,结果表明细胞壁和荚膜蛋白表达都有显著差异^[34]。

4 蛋白质组学技术在食品微生物安全其它方面的应用

相对前述的蛋白质组学技术在食品微生物响应外界环境变化的研究而言,目前很多蛋白质组学的研究主要集中于纯蛋白质组的研究,这一方面产生了大量

的生物信息学数据,可以构建更为强大的蛋白质数据库,另一方面在蛋白质组研究过程中有助于发现食品微生物安全的标记分子,故在实际微生物安全检测方面具有重要的应用价值。例如,空肠弯曲杆菌是导致食品和水疾病传播的主要致病微生物之一,有研究通过2-DLC/MS/MS方法鉴定出了432个空肠弯曲杆菌JHH1膜蛋白质组蛋白,其中206个被预测出与膜相关^[35]。此外,病原微生物引起的奶牛乳房炎会造成牛奶质量和产量下降,并增加奶牛的死亡率和奶的不可食用性。针对此,Boehmer等研究了奶牛在感染大肠埃希菌前后的乳清样品中蛋白质组的变化,以寻找相关治疗手段在治疗乳房炎过程中的有效蛋白标记。研究表明,急性期蛋白,如转甲状腺素蛋白与补充物C3在奶牛感染18 h后的乳清蛋白中被发现,一些抗微生物肽和 α -1-酸糖蛋白也被检测到。这些蛋白都可作为未来奶牛感染细菌性乳房炎的生物标记分子^[36]。朊病毒,也称传染性海绵状脑病毒,可感染人和动物,也可通过血液在人与人之间传播,往往在起病后5个月~1年内死亡,死亡率99.2%,远远高于癌症。蛋白质组学技术非常适合用来寻找人体和肉制品中朊病毒的蛋白质分子标记,所找到的目标蛋白质分子结合ELLISA方法,可实现朊病毒的大通量筛查。

不仅如此,蛋白质组学技术在益生菌方面的研究也有重要的应用。双歧杆菌和乳杆菌是最经常添加到食品中的益生菌,在2008年时就人们就已经获得了双歧杆菌的蛋白质图谱。未来对于益生菌的研究趋势将包括这些细菌的存活机制以及其在胆汁盐、高温和渗透压等人体肠道环境条件下、食品加工过程中蛋白质表达的变化。这些研究也可以作为研究其它细菌在相同生长条件下的模型来研究它们的生存状况。另外,随着商业益生菌的出现,益生菌的安全性问题日益受到人们的关注。目前,益生菌存在四个方面的安全问题:致病和感染、有害的代谢活动、过度免疫响应和潜在的基因转移。鉴于传统的毒理学和安全评估方式在市售食品、药品中益生菌的安全评估方面受到一定限制,多学科的方法对于益生菌系统性安全评估日益受到重视^[37];该方法可能涉及到包括蛋白质组学、基因组学、代谢组学等组学方法在内的联合使用。

5 蛋白质组学在食品微生物安全应用上的局限及前景分析

作为上个世纪90年代才发展起来的新技术,蛋白质组学技术目前已在多个研究领域及行业取得了较大进步。特别地,其在食品微生物安全上的应用在最近几年

内也已初见成效,尤其是在快速鉴定海鲜、肉制品源微生物方面。该方法相比于其它传统微生物学方法和分子生物学方法更省时、操作简单、花费较少,而且能够用于解决目前基于基因方法尚难以解决的问题,例如实现对微生物种内的区分。由于蛋白质组学技术是以基因表达产物蛋白质作为研究对象,可以从蛋白质水平上研究食品微生物,例如研究食品性致病微生物对食品热加工,高压灭菌、车间消毒等操作的响应,这为预测和控制食品生产中有害微生物提供了理论指导依据。

在风险评估(MRA)方面,由于食品介质较为复杂,尚没有可以参考的蛋白质组检测的标准和可行性参考;另外,蛋白质组学在风险评估方面存在的一个难题是该分析具有相当的可变性,重复性不高。此外,尽管蛋白质组分析能够揭示两个或者更多样品的不同,但是由于蛋白质组成不严格的控制代谢组,蛋白质前后变化与食品安全的关系还不清晰。故到目前为止,对食品中涉及安全和具有风险的蛋白质组尚无法区分。因此,将蛋白质组学与上游的基因组学、下游的代谢组学相结合进行相关研究,将是蛋白质组学在未来食品微生物安全方面研究和应用的一个重要方向。

参考文献

- [1] Ochoa ML, Harrington PB. Immunomagnetic isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef and identification by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry and data-base searches [J]. *Analytical Chemistry*, 2005, 77: 5258-5267
- [2] Havelaar AH, Brul S, de Jong A, et al. Future challenges to microbial food safety [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 139 Suppl 1: S79-94
- [3] Han JZ, Wang YB. Proteomics: present and future in food science and technology [J]. *Trends in Food Science and Technology*, 2008, 19: 26-30
- [4] Patterson SD, Aebersold RH. Proteomics: the first decade and beyond [J]. *Nature Genetics*, 2003, 33: 311-323
- [5] Dunn MJ. Proteomics review 2011 [J]. *Proteomics*, 2011, 11: 509-512
- [6] Pedreschi R, Hertog M, Lilley KS, et al. Proteomics for the Food Industry: Opportunities and challenges [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2010, 50: 680-692
- [7] Gašo-Sokač D, Kovač S, Josić D. Application of proteomics in food technology and food biotechnology: process development, quality control and product safety [J]. *Food Technology and Biotechnology*, 2010, 48(3): 284-295
- [8] Carbonaro M. Proteomics: present and future in food quality evaluation [J]. *Trends in Food Science and Technology*, 2004, 15: 209-216
- [9] D'Alessandro A, Zolla L. Food safety and quality control: Hints from proteomics [J]. *Food Technology and Biotechnology*, 2012, 50(3): 275-285
- [10] Gagnaire V, Jardin J, Jan G, et al. Invited review: Proteomics of milk and bacteria used in fermented dairy products: From qualitative to quantitative advances [J]. *Journal of dairy science*, 2009, 92: 811-825
- [11] Fuchs D, Winkelmann I, Johnson IT, et al. Proteomics in nutrition research: principles, technologies and applications [J]. *British Journal of Nutrition*, 2007, 94(3): 302-314
- [12] Bizzini A, Durussel C, Bille J, et al. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010, 48: 1549-1554
- [13] Seng P, Drancourt M, Gouriet F, et al. Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry [J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2009, 49: 543-551
- [14] Giebel R, Worden C, Rust SM, et al. Microbial fingerprinting using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) applications and challenges [J]. *Advances in Applied Microbiology*, 2010, 71: 149-184
- [15] Lay JO. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria [J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 2001, 20: 172-194
- [16] Böhme K, Fernández-No IC, Gallardo JM, et al. Assessment of fresh and processed seafood products by MALDI-TOF Mass fingerprinting [J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2011, 4: 907-918
- [17] Fernández-No IC, Böhme K, Calo-Mata P, et al. Isolation and characterization of *Streptococcus parauberis* from vacuum-packaging refrigerated seafood products [J]. *Food Microbiology*, 2012, 30: 91-97
- [18] Nicolaou N, Xu Y, Goodacre R. Detection and quantification of bacterial spoilage in milk and pork meat using MALDI-TOF-MS and multivariate analysis [J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84: 5951-5958
- [19] Angelakis E, Million M, Henry M, et al. Rapid and Accurate Bacterial Identification in Probiotics and Yoghurts by MALDI-TOF Mass Spectrometry [J]. *Journal of Food*

- Science. 2011, 76(8): 568-572
- [20] Ruiz-Moyano S, Tao N, Underwood MA, et al. Rapid discrimination of *Bifidobacterium animalis* subspecies by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry [J]. Food Microbiology, 2012, 30: 432-437
- [21] Meersman F, Heremans K. High hydrostatic pressure effects in the biosphere: from molecules to microbiology. In: Michiels C, Bartlett D, Aertsen A, editors. High-Pressure Microbiology [M]. Washington DC: ASM Press; 2008
- [22] Vanlint D, Rutten N, Michiels CW, et al. Emergence and stability of high pressure resistance in different foodborne pathogens [J]. Applied and environmental microbiology, 2012, 78(9): 3234-3241
- [23] Martínez-Gomariz M, Hemáez ML, Gutiérrez D, et al. Proteomic analysis by two-dimensional differential gel electrophoresis (2D DIGE) of a high-pressure effect in *Bacillus cereus* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57: 3543-3549
- [24] Solomon E, Hoover D. Inactivation of *Campylobacter jejuni* by high hydrostatic pressure [J]. Letters in Applied Microbiology, 2004, 38: 505-509
- [25] Bossi A, Rinalducci S, Zolla L, et al. Effect of tannic acid on *Lactobacillus hilgardii* analysed by a proteomic approach [J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 102(3): 787-95
- [26] Nilsson RE, Latham R, Mellefont L, et al. MudPIT analysis of alkaline tolerance by *Listeria monocytogenes* strains recovered as persistent food factory contaminants [J]. Food Microbiology, 2012, 30: 187-196
- [27] Mihoub F, Mistou MY, Guillot A, et al. Cold adaptation of *Escherichia coli*: microbiological and proteomic approaches [J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 89(2-3): 171-184
- [28] Bossi A, Rinalducci S, Zolla L, et al. Effect of tannic acid on *Lactobacillus hilgardii* analysed by a proteomic approach [J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 102(3): 787-795
- [29] Van Schaik W, Zwietering MH, Vos WMD, et al. Deletion of the sigB gene in *Bacillus cereus* ATCC 14579 leads to hydrogen peroxide hyperresistance [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(10): 6427-6430
- [30] Condell O, Sheridan Á, Power KA, et al. Comparative proteomic analysis of *Salmonella* tolerance to the biocide active agent triclosan [J]. Journal of proteomics, 2012, 75(19): 4505-4519
- [31] Kumar CG, Anand SK. Significance of microbial biofilms in food industry: a review [J]. International Journal of Food Microbiology, 42(1-2): 9-27
- [32] Oosthuizen MC, Steyn B, Theron J, et al. Proteomic analysis reveals differential protein expression by *Bacillus cereus* during biofilm formation [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68: 2770-2780
- [33] Trémoulet F, Duché O, Namane A, et al. Comparison of protein patterns of *Listeria monocytogenes* grown in biofilm or in planktonic mode by proteomic analysis [J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 210: 25-31
- [34] Lattif AA, Chandra J, Chang J, et al. Proteomics and pathway mapping analyses reveal phase-dependent over-expression of proteins associated with carbohydrate metabolic pathways in *Candida albicans* biofilms [J]. Open Proteomics Journal, 2008, 1(1): 5-26
- [35] Cordwell SJ, Alice CLL, Touma RG, et al. Identification of membrane-associated proteins from *Campylobacter jejuni* strains using complementary proteomics technologies [J]. Proteomics, 2008, 8(1): 122-139
- [36] Boehmer JL. Proteomic Analyses of Host and Pathogen Responses during Bovine Mastitis [J]. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, 2011, 16(4): 323-338
- [37] Sanchez B, L Ruiz, et al. Proteomics of stress response in *Bifidobacterium* [J]. Frontiers in Bioscience, 2008, 13: 6905-6919