

贮藏温度及香辛料提取物对真空包装红肠菌相变化的影响

韩齐¹, 孔保华¹, 姚来斌², 孙方达¹

(1. 东北农业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨 150030) (2. 黑龙江东方学院, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要: 本文将添加香辛料提取物的红肠和未添加的红肠进行真空包装后分别贮藏在室温(20±2℃)和4℃条件下,同时采用传统培养法和PCR-DGGE(聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳)两种方法研究不同贮藏温度和香辛料提取物对真空包装红肠中微生物菌相变化的影响。传统平板培养方法测定微生物变化的结果显示不同温度贮藏下的真空包装红肠中菌落总数、乳酸菌、假单胞菌、热杀索丝菌、葡萄球菌的数量均呈显著上升趋势($P<0.05$),且20℃红肠中微生物数量均高于4℃样品($P<0.05$),而香辛料提取物的添加可以显著的减少红肠中微生物的数量,相同贮藏条件下添加香辛料提取物组红肠中的微生物数量要少于未添加组。PCR-DGGE结果显示,贮藏期间假单胞菌、葡萄球菌、热杀索丝菌和乳酸菌是优势腐败菌,与平板培养方法测定的结果保持一致。

关键词: 真空包装红肠; 传统培养; 聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE); 菌相变化

文章编号: 1673-9078(2016)1-224-229

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.1.035

Influence of Storage Temperature and Spice Extracts on Microfloral Changes in Vacuum-packaged Sausage

HAN Qi¹, KONG Bao-hua¹, YAO Lai-bin², SUN Fang-da¹

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

(2. East University of HeiLongJiang, Harbin 150030, China)

Abstract: Sausages with or without additional spice extracts were vacuum packed and stored at room temperature (20℃) or 4℃, to study the effect of storage temperature and addition of spice extracts on changes in microflora of vacuum-packaged sausages. Both, traditional culture and polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) methods were used in this study. The results from traditional plate culture method revealed that the total bacterial count as well as that of *Lactobacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp., and *Brochothrix thermosphacta* showed a dramatic increase ($P < 0.05$), and the number of microorganisms in the sample stored at 20℃ was greater than that stored at 4℃ ($P < 0.05$). The addition of spice extracts significantly reduced the number of microorganisms in the sausage samples under the same storage condition ($P < 0.05$). PCR-DGGE results showed that *Lactobacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Brochothrix thermosphacta*, and *Staphylococcus* sp. were the dominant spoilage bacteria during storage, similar to the results from the traditional plate culture method.

Key words: vacuum-packaged sausage; traditional culture method; polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis; microflora change

红肠是我国北方的一种传统肉类灌肠制品,具有独特浓郁的香气、营养丰富且方便携带,受到了许多消费者的喜爱,但由于红肠本身含水量高且营养成分

收稿日期: 2015-03-19

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);黑龙江省博士后研究人员落户黑龙江科研启动资助金(LBH-Q12154)

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

较为丰富非常适合微生物的生长繁殖,所以红肠等肉类制品在加工、贮藏、包装、运输和销售等阶段极易污染微生物而发生变质使保质期缩短。因此研究红肠在贮藏过程中微生物的种类及生长动态变化就变得非常重要。低温和真空包装等贮藏条件都会对食品中微生物的生长有一定抑制作用,Kong^[1]等研究发现肉桂、迷迭香和丁香等香辛料提取物对真空包装猪肉中的大肠杆菌、荧光假单胞菌和植物乳杆菌均存在着抑制作用。Zhang^[2]等研究了14种香辛料提取物对4℃贮藏的气调包装猪肉和真空包装火腿中微生物的影响,发

现香辛料提取物可以有效的抑制常见的肉类腐败菌和致病菌生长, 具有抗菌活性的主要成分是二羟基亚硫酸盐、酚类、不饱和醛等。

食品中微生物的传统分析方法就是平板培养法, 但自然界中有 85%~90% 的微生物至今还不能被培养, 所以传统平板培养法并不能真实完全的反应出肉类制品中微生物的菌群结构和变化^[3], 并且微生物的分离和培养可能需要未知的生长因子和/或存在于天然环境但不存在于实验室的生长条件^[4]。而近年来兴起的 PCR-DGGE 技术由于具有可靠性强、可以鉴别无法培养的微生物等优点已经成为一种有效的研究肉类及肉制品菌相变化分子生物学方法^[5]。

本实验将香辛料提取物添加到红肠中, 对红肠进行真空包装并分别贮藏室温 (20±2 °C) 和 4 °C 条件下, 采用传统平板培养和 PCR-DGGE 两种方法研究香辛料提取物的添加对真空包装红肠菌相变化的影响, 并对两种方法进行比较研究, 更准确的反映红肠贮藏过程中微生物的动态变化和红肠中菌群结构的变化情况。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

亚硝酸盐、碱性磷酸盐、异抗坏血酸钠: 哈尔滨亿人食品添加剂公司; 营养琼脂、牛肉膏、蛋白胨: 北京奥博星生物技术有限责任公司; 假单胞菌 cfc 选择性培养基添加剂、热杀索丝菌添加剂: 青岛海博生物技术有限公司; DNA 荧光染料: 北京百泰克生物技术有限公司; 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。丙烯酰胺、N,N'-甲叉双丙烯酰胺、Tris 碱、乙二醇四乙酸和四甲基乙二胺 (TEMED): Sigma 试剂公司, 美国。

SXC12 型绞肉机: 上海双蝶厨具有限公司大溪分公司; UMC5 斩拌熔融釜: 德国 Stephan 公司; 真空灌肠机: 临沂大浩机械厂; SPX-250B-D2 型振荡培养箱: 上海博远事业有限公司医疗设备厂; ZHJH-1109 超净工作台: 上海智城分析仪器制造有限公司; Allegra 64R 型冷冻离心机: 美国 BECKMAN 公司; 超声波清洗器: 宁波新芝生物科技股份有限公司; TC-96/G/(b) 型 PCR 仪: 杭州博日科技有限公司; 变性梯度凝胶电泳: 美国 Bio-rad 公司; PowerPac 通用型电泳电源: 美国 Bio-rad 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 红肠的制作方法

红肠的制作参考孔保华等人^[6]的方法, 略作改动。工艺流程为:

原料肉修整→腌制 (肉馅中添加食盐 27 g/kg、异抗坏血酸钠 0.5 g/kg 和亚硝酸盐 50 mg/kg, 低温腌制 24 h) →绞肉→拌馅→灌制→烘烤 (70~80 °C 烘烤 25~30 min) →煮制 (85 °C 水中进行煮制约 30~40 min) →熏制→真空包装

实验组肉馅添加迷迭香和甘草的香辛料提取物的冻干粉, 添加量均为 0.2 g/kg, 提取制备方法参照陈璐等人^[7]。不添加香辛料提取物的红肠作为对照组。将红肠分别贮藏于室温 (20±2 °C) 和 4 °C, 添加香辛料提取物组红肠在第 0、5、10、15 和 20 d, 未添加香辛料提取物组红肠在第 0、5、10 和 15 d 测定两组红肠中的微生物数量并提取红肠中总细菌的 DNA。

1.2.2 微生物计数和培养条件

微生物计数参照 GB4789.2-2010 的方法, 使用选择性培养基对红肠中的微生物进行培养和计数。细菌菌落总数采用平板计数琼脂培养基 (PCA, Plate count agar) 在 37 °C 培养 48 h; 乳酸菌采用 MRSA 培养基 (De Man Rogosa Sharpe agar) 在 30 °C 培养 48 h; 假单胞菌属采用 PSA 培养基 (Pseudomonades selective agar) 在 25 °C 培养 48 h; 热杀索丝菌采用 STAA 培养基 (Streptomycin thalliumacetate actidion agar) 在 30 °C 培养 48 h; 葡萄球菌属采用 MSA 培养基 (Manntilo Salt Agar) 在 37 °C 培养 48 h。

1.2.3 红肠中细菌 DNA 的提取

根据 Han^[8]的方法进行红肠中细菌 DNA 的提取, 略有改动。在无菌超净工作台中取红肠样品 20 g 于 80 mL 生理盐水中, 4 °C 振荡 30 min, 沉淀 5 min 后去除沉淀。取 40 mL 上清液, 加入 50 mL 灭菌离心管中, 1000×g、4 °C 离心 15 min 后, 无菌操作取 25 mL 上清液再次加入到 50 mL 灭菌离心管中, 10,000×g、4 °C 离心 20 min, 取菌体沉淀用于细菌 DNA 提取。按照天根生物技术有限公司细菌基因组 DNA 提取试剂盒所述方法操作, 提取红肠中细菌总 DNA, 最后用 TE 缓冲液冲洗所提 DNA 数次, 贮藏于 -20 °C 备用。

1.2.4 聚合酶链式 (PCR) 反应

对红肠中提取的细菌总 DNA 的 V6~V8 区域进行 PCR 扩增。PCR 反应中, 上游引物为带 GC 夹子的 U968 (序列: CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGCGGGGACCGGGGG AACGCGAAGAACC TTAC), 下游扩增引物为 L1401 (序列: GCGTGTGTACAAGACCC)。使用 Golden Easy PCR System 产品进行 PCR 扩增, 反应体系为 25 μL, 其中包含 Taq DNA 聚合酶 0.2 μL, 引物 U968-GC 和 L1401 各 1 μL,

DNA 模板 3 μL , 2 \times Reaction Mix 12.5 μL 和去离子水 7.3 μL 。PCR 扩增反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3 min; 31 个循环: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min, 随后温度降至 4 $^{\circ}\text{C}$ 。采用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 扩增结果, 贮藏于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.2.5 变性梯度凝胶电泳 (DGGE)

对 PCR 扩增之后 DNA 的 V6~V8 区域进行变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 分析, 参照 Muyzer 等人^[9] 的方法, 略有改动。本实验采用 8% 聚丙烯酰胺凝胶系统 (包括甲叉丙烯酰胺、丙烯酰胺、甲酰胺、甘油和尿素), 尿素梯度为 40%~70%。65 $^{\circ}\text{C}$, 100 V 进行预电泳 25 min, 上样后在 60 $^{\circ}\text{C}$, 75 V 条件下电泳 14 h。

1.2.6 纯化、测序和相似性检测

DGGE 胶片用 DNA 荧光染料染色, 后置于紫外灯下切下不同位置条带, 将条带分别放置于 1.5 mL 灭菌离心管中, 用 1 mL 生理盐水洗涤三次。然后分别加入 TE 缓冲液 20 μL , 4 $^{\circ}\text{C}$ 浸泡 24 h。将重新回收的 DNA 作为模板, 再次进行 PCR 扩增反应, 其中引物以及实验程序与上述 PCR 反应完全相同。反复进行切胶纯化和 DGGE 反应, 直至条带单一为止。最终将条带切割纯化回收, 进行最后的 PCR 反应, 引物为 U968 (序列: AACGCGAAGAACCCTTAC) 和 L1401 (序列: GCGTGTGTACAAGACCC)。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测出现目标条带后, 送往华大基因公司测序。最后将所得序列与 NCBI 数据库中的序列进行相似性对比, 从而最后确定微生物种属。

1.3 数据统计分析

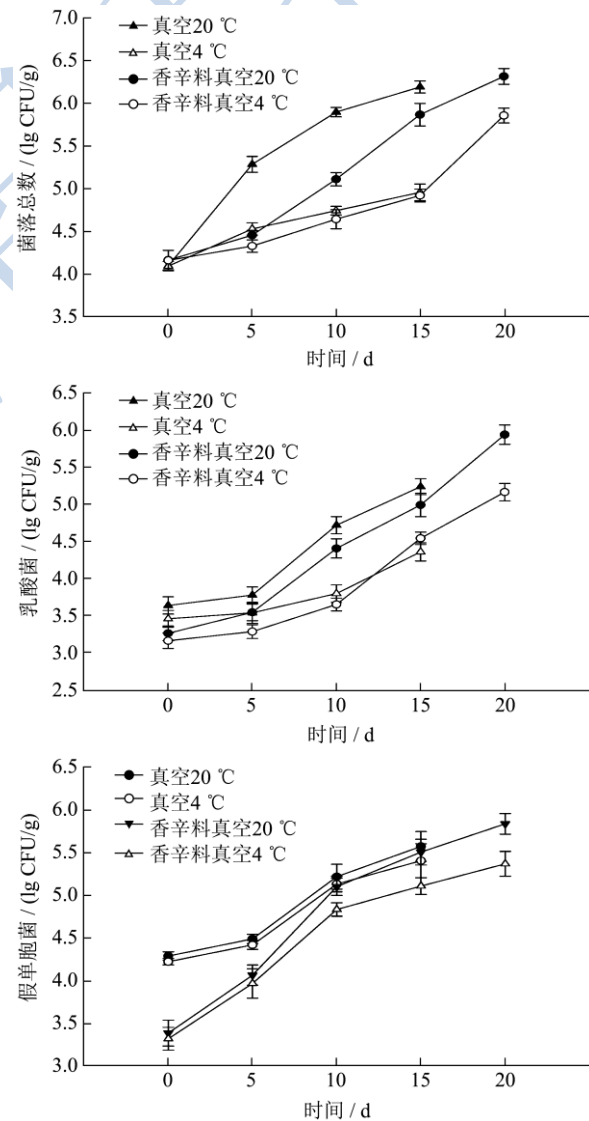
每个试验重复三次, 结果表示为平均数 \pm SD。数据统计分析采用 Statistix 8.1 (分析软件, St Paul, MN) 软件包中 Linear Models 程序进行, 差异显著性 ($P<0.05$) 分析使用 Tukey HSD 程序, 采用 sigmaplot 11.0 软件作图。

2 结果与讨论

2.1 传统平板培养方法分析真空包装红肠微生物菌相

从图 1 中可以看出, 添加香辛料提取物组真空包装红肠初始菌落总数为 4.2 lgCFU/g 左右, 未添加组红肠初始菌落总数为 4.1 lgCFU/g 左右, 符合国家标准中肉制品中细菌总数的规定。随着贮藏时间的延长, 不

同处理组的菌落总数均呈显著上升趋势 ($P<0.05$)。贮藏过程中, 香辛料提取物添加组中 20 $^{\circ}\text{C}$ 贮藏红肠的菌落总数要明显高于 4 $^{\circ}\text{C}$ 贮藏的红肠, 且少于在 20 $^{\circ}\text{C}$ 条贮藏的未添加组红肠, 这说明香辛料提取物和低温条件可以有效的抑制微生物的生长繁殖。20 $^{\circ}\text{C}$ 贮藏条件下, 添加香辛料提取物组红肠在第 15 d 之后菌落总数的生长速率较之前的生长速率开始变慢, 这是由于红肠在贮藏过程中受到外界环境因素的影响使得菌落总数不断增加, 但微生物生长进入对数增长后期后其生长繁殖的速率逐渐降低, 与 Kesmen^[10] 等人的研究结果是一致的。未添加香辛料提取物组红肠在 20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下贮藏第 15 d 菌落总数可以达到 6.31 lg CFU/g, 而添加组 20 $^{\circ}\text{C}$ 贮藏的红肠菌落总数尚为未超过 6.0 lg CFU/g。整体上来看在相同温度条件下贮藏的真空包装红肠中香辛料提取物添加组红肠中的菌落总数要少于未添加组。



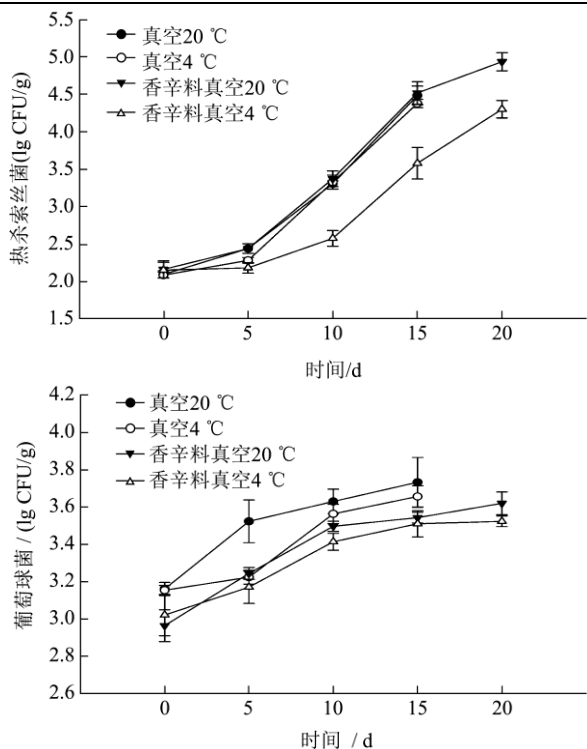


图1 真空包装红肠贮藏过程中微生物生长变化趋势

Fig.1 Changes in bacterial counts in vacuum-packaged sausages during storage

随着贮藏时间的延长,不同处理条件的真空包装红肠中的乳酸菌数量均增加显著 ($P < 0.05$) 且 10~15 d 时乳酸菌的生长速率最快,这说明在贮藏末期乳酸菌是真空包装红肠主要的腐败微生物之一,并且真空包装的厌氧条件也有利于乳酸菌生长产酸,导致红肠的 pH 值下降,加速红肠的变质。Russo^[11]等人在对肉类制品腐败微生物热死环丝菌的研究中也发现肉类制品中的主要腐败微生物为热死环丝菌 (*B. thermosphacta*)、假单胞菌 (*Pseudomonas spp*)、肠杆菌 (*Enterobacteriaceae*) 和乳酸菌 (*Lactic acid bacteria*)。从图 1 中也可以看出不同的贮藏温度对乳酸菌的生长繁殖也有较为明显的影响,相同处理条件下 20 °C 贮藏的真空包装红肠中乳酸菌数量要明显高于 4 °C 贮藏的真空包装红肠,并且相同的贮藏温度,香辛料提取物的添加也可以有效的抑制乳酸菌的生长繁殖。

假单胞菌是低温肉制品中主要的腐败菌,虽然不同贮藏温度下真空包装红肠中假单胞菌的数量随着时间的增加都呈显著上升趋势 ($p < 0.05$),但是 20 °C 贮藏的红肠中假单胞菌增长速度和数量均大于 4 °C 贮藏的红肠,相同贮藏温度下未添加香辛料提取物组红肠大于添加组,这说明香辛料提取物的添加对于抑制假单胞菌的生长是有效的。在第 10 d 后假单胞菌数量逐渐增大,说明假单胞菌为红肠后期主要的腐败菌, Li

等^[12]对冷却猪肉在贮藏过程中微生物菌相变化的研究中也发现假单胞菌是猪肉贮藏过程中的优势腐败微生物。

不同贮藏条件的真空包装红肠贮藏在 0~5 d 时热杀索丝菌数量基本保持不变,第 5 d 后生长繁殖速率迅速变快,其中添加香辛料提取物组红肠在 20 °C 贮藏第 20 d 时热杀索丝菌数量可以达到 5.0 lgCFU/g,在 4 °C 贮藏第 20 d 时也达到了 4.2 lgCFU/g 左右,但均少于相同贮藏条件下未添加香辛料提取物组,这表明香辛料提取物对于热杀索丝菌的生长有抑制作用。同时红肠初始阶段热杀索丝菌的生长受到抑制,随着时间的推移以及红肠内部理化性质的变化,热杀索丝菌逐渐进入生长对数期。

在真空包装红肠样品中,在不同贮藏温度下葡萄球菌的数量整体变化范围不是很大,香辛料提取物添加组红肠在 20 °C 贮藏第 20 d 时才接近 3.6 lgCFU/g,而 4 °C 贮藏的香辛料提取物添加组红肠在第 20 d 时葡萄球菌数量仅为 3.5 lgCFU/g,均少于相同贮藏条件下的未添加组,表明香辛料提取物对葡萄球菌的生长起到了抑制作用。同时,红肠体系中可能不适合葡萄球菌的生长,并且乳酸菌产酸也会抑制葡萄球菌的生长,这与陈晓蔚^[13]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。

2.2 PCR-DGGE 方法分析真空包装红肠微生物菌相

2.2.1 真空包装红肠中细菌 DNA 的 V6~V8 区域 PCR 扩增结果

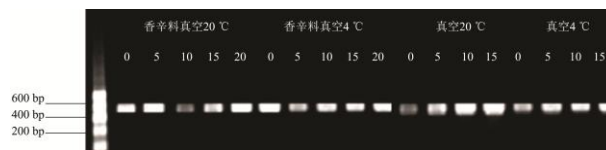


图2 真空包装红肠提取细菌 DNA 的 V6~V8 区 PCR 扩增结果

Fig.2 Results of PCR amplification of bacterial DNA (V6~V8 region) extracted from vacuum-packaged sausage

在不同贮藏温度条件下添加香辛料提取物组的真空包装红肠中选取第 0 d、5 d、10 d、15 d 和 20 d 的样品,不同贮藏温度的未添加香辛料提取物组的真空包装红肠中选取第 0 d、5 d、10 d 和 15 d 的样品,分别直接使用 DNA 提取试剂盒提取红肠的总 DNA,使用专用引物以及 PCR 反应试剂盒对其 V6~V8 区域进行 PCR 扩增。如图 2 所示,PCR 扩增后 DNA 产物均为 400 bp 左右,条带单一,说明 PCR 操作过程中没有污染杂菌,可以用于后续试验。

2.2.2 真空包装红肠样品在贮藏过程中微生物菌相的变化

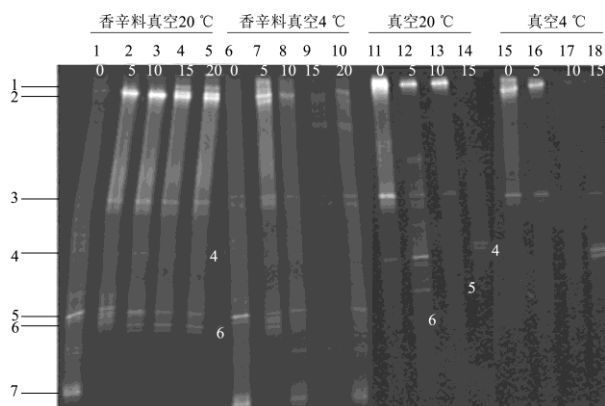


图3 真空包装红肠提取细菌 16S rDNA 基因 V6-V8 区的 DGGE 电泳谱

Fig.3 DGGE profiles of PCR amplification of the V6-V8 region of the 16S rDNA gene in DNA extracted directly from vacuum-packaged sausages

注：1~5泳道为香辛料添加组在室温（20±2℃）条件下贮藏的红肠第0、5、10、15和20 d样品；6~10泳道为香辛料添加组在4℃条件下贮藏的红肠第0、5、10、15和20 d样品；11~14泳道为未添加香辛料组红肠在室温（20±2℃）条件下贮藏第0、5、10和15 d样品；15~18泳道为未添加香辛料组红肠在4℃条件下贮藏第0、5、10和15 d样品。

对真空包装红肠样品的PCR扩增产物用琼脂糖电泳检测后进行DGGE电泳。电泳结果如图3所示，图中不同处理条件组真空包装红肠样品中显示出的DGGE图谱均不同，这表明不同的贮藏温度和不同的贮藏时间内真空包装红肠中的微生物菌相发生了明显的变化，并且香辛料提取物的添加也对真空包装红肠的菌群结构产生了影响。从DGGE图谱中也可以看出，相比于20℃贮藏条件下的真空包装红肠，4℃贮藏条件下红肠样品中的微生物种类明显变少，如4℃贮藏条件下添加香辛料提取物组红肠较20℃贮藏条件下香辛料提取物添加组红肠条带4和条带6的减少，未添加香辛料提取物组红肠在4℃贮藏条件下较20℃贮藏条件下条带4、5、6的减少。同时添加香辛料提取物后的红肠样品中条带的亮度要比未添加组低，这也从一定程度上反映出香辛料提取物添加组红肠中的微生物数量低于未添加组，说明香辛料提取物的添加可以有效的抑制微生物的生长繁殖，这和传统平板培养方法鉴定的结果基本一致。并且不同处理条件的真空包装红肠在贮藏末期条带都有所增加，这表明随着贮藏时间的增加，优势腐败菌逐渐占据优势，这与Lu等^[14]的研究结果极为相似。而相同贮藏温度下，香辛料提取物

添加组红肠中的微生物种类数量略多于未添加组，这可能是由于香辛料提取物冻干粉在贮藏过程中污染了一些微生物而导致的，或者可能是由于样品在处理过程中受到了污染。

对DGGE电泳图谱中的不同条带进行回收测序分析，将不同位置条带进行切割，用去离子水清洗三次后用TE缓冲液浸没，4℃贮藏过夜。根据回收后的DNA为模板，进行重复PCR扩增，之后在对PCR产物进行相同条件下的DGGE电泳，重复做此步骤，直到电泳结果显示为均一条带为止。最后以不含GC夹子的U968和L1401为引物，经过PCR扩增反应后对其测序。

表1 不同红肠样品中直接提取的细菌总DNA经过DGGE电泳分离后的细菌16S rDNA序列鉴定

Table 1 Bacterial identification by 16S rDNA sequencing of DNA fragments in DGGE bands of total bacteria community DNA directly extracted from Harbin sausage samples

编号	最相似菌株	相似性/%	登录号
1	<i>Staphylococcus</i> sp.	99	KF577516.1
2	<i>Staphylococcus</i> sp.	99	KC182742.1
3	<i>Lactobacillus</i> sp.	99	AB911479.1
4	<i>Pseudomonas</i> sp.	100	JQ691536.1
5	<i>Pseudomonas</i> sp.	97	KF889270.1
6	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	98	KC618438.1
7	<i>Enterococcus</i> sp.	98	KF048929.1

经测序后采用BLSAT（Basic Local Alignment Search Tool）软件比对，找到和测序结果相似度最高的菌株，结果如表1所示。由表1和图3结合可知，红肠在贮藏末期优势腐败菌主要以葡萄球菌（*Staphylococcus* sp.）、乳酸菌（*Lactobacillus* sp.）、假单胞菌（*Pseudomonas* sp.）、热杀索丝菌（*Brochothrix thermosphacta*）为主，与传统平板培养方法鉴定的优势腐败菌保持一致，并且乳酸菌的生长尤其迅速且数量最多。Li等^[12]对托盘包装猪肉在贮藏过程中优势腐败菌进行了鉴定，假单胞菌与热杀索丝菌是导致猪肉腐败的优势菌种，与本实验的结论基本一致。Jiang等^[15]分析了猪肉在托盘包装中贮藏期间的菌相变化，并且利用了PCR-DGGE和实时定量PCR技术对该猪肉的菌落结构进行鉴定，同样证明了假单胞菌是贮藏末期的主要菌种。本试验中条带7为粪肠球菌，出现此类菌种的原因很可能是在制备样品的过程中由外界环境引入。假单胞菌、乳酸菌和热杀索丝菌对应的条带最亮，表明在真空包装红肠贮藏过程中假单胞菌、乳酸菌和热杀索丝菌为贮藏过程中的优势菌株。

2.2.3 真空包装红肠中菌群相似性分析

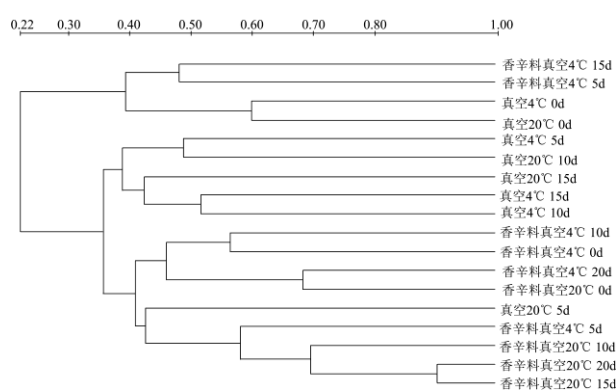


图4 PCR-DGGE 电泳条带聚类相似分析

Fig.4 Cluster analysis of electrophoretic bands generated by PCR-DGGE

通过聚类相似性分析软件,对 PCR-DGGE 电泳结果进行分析。由图 4 可以看出,添加香辛料提取物之后真空包装红肠在贮藏过程中,20℃贮藏样品 0 d 与后期 15 d 产品中菌群结构相似度仅为 43%,而 5 d、10 d、15 d 样品相似性明显升高,其中 15 d 与 20 d 菌群结构相似度增加到 90%,这表明优势腐败菌从贮藏中期开始迅速繁殖,当数量达到一定程度后,开始抑制其他腐败微生物的生长,最终在菌群中占据优势地位,使得贮藏末期的菌群结构变化较小,此结果与 Audenaert 等^[16]的结果极为相似。这也说明贮藏后期优势腐败菌占有了红肠中大部分营养成分用于生长,同时对其他微生物有抑制作用。

3 结论

本研究同时采用传统培养法和 PCR-DGGE 方法研究不同贮藏温度及香辛料提取物的添加对真空包装红肠菌相变化的影响。研究发现随着贮藏时间的延长,不同贮藏条件的真空包装红肠的菌落总数、乳酸菌、假单胞菌、热杀索丝菌、葡萄球菌的数量均呈显著上升趋势,且 20℃样品微生物数量多于 4℃,添加香辛料提取物样品微生物少于未添加组,证明低温和香辛料提取物能够有效的抑制微生物的生长繁殖。而 PCR-DGGE 结果显示,贮藏期间假单胞菌、葡萄球菌、热杀索丝菌和乳酸菌是优势腐败菌。将 PCR-DGGE 和传统培养结果进行对比发现香辛料提取物的添加对红肠的微生物种类影响不大,但对于微生物的数量起到了限制作用。

参考文献

[1] Kong B H, Wang J Z, Xiong Y L. Antimicrobial activity of several herb and spice extracts in culture medium and in vacuum-packaged pork [J]. Journal of Food Protection, 2007,

70(3): 641-647

- [2] Zhang H Y, Kong B H, Xiong Y L, et al. Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4℃ [J]. Meat Science, 2009, 81(4): 686-692
- [3] Fontana C, Cocconcelli 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
- [4] Mayo B, Rachid C T C, Alegre A, et al. Impact of next generation sequencing techniques in food microbiology [J]. Current Genomics, 2014, 15(4): 293-309
- [5] 乌日娜,于美玲,孟令帅,等.PCR-DGGE 分析东北自然发酵酸菜中的微生物多样性[J].现代食品科技, 2014, 30(10): 8-12/35
- WU Ri-na, YU Mei-ling, MENG Ling-shuai, et al. PCR-DGGE analysis of the microbial diversity in naturally fermented suan-cai from northeast China [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(10): 8-12/35
- [6] 孔保华,玛丽珍.肉品科学与技术[M].北京:中国轻工业出版社,2003
- KONG Bao-hua, MA Li-zhen. Meat Science and Technology [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2003
- [7] 陈璐,孔保华,刘骞,等.香辛料提取物对速冻牛肉丸脂肪氧化控制的研究[J].食品科学,2012,33(14):281-285
- CHEN Lu, KONG Bao-hua, LIU Qian, et al. Inhibition effect of spice extracts on lipid oxidation in quick-frozen beef balls [J]. Food Science, 2012, 33(14): 281-285
- [8] Han Y Q, Xu X L, 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: 1719-1724
- [9] 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
- [10] Kesmen Z, Yetiman A E, Gulluce A, et al. Combination of culture-dependent and culture-independent molecular methods for the determination of lactic microbiota in sucuk [J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 153(3): 428-435
- [11] 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
- [12] Li M Y, Zhou G H, Xu X L, 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] 陈晓蔚,丁洁,王伟,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
- [14] Lu S L, Xu X L, Zhou G H, et al. Effect of starter cultures on microbial ecosystem and biogenic amines in fermented sausage [J]. Food Control, 2010, (21): 444-449
- [15] Jiang Y, Gao F, Xu X L, 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
- [16] Audenaert K, D'Haene K, Messens K, et al. Diversity of lactic acid bacteria from modified atmosphere packaged sliced cooked meat products at sell-by date assessed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis [J]. Food Microbiology, 2010, 27(1): 12-18