

# 猪肉解冻过程中损伤型气单胞菌的检测及失活模型构建

董庆利, 梁 娜, 曾 静, 张浩博

(上海理工大学医疗器械与食品学院, 上海 200093)

**摘 要:** 研究猪肉在解冻过程中其表面的损伤型气单胞菌检测和生长模型的构建。以含质量分数 0.6% 酵母浸膏的胰酪胨大豆琼脂(TSAYE)为选择培养基, 气单胞菌的损伤培养基中分别添加质量分数 1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0% 的 NaCl, 经差异显著性分析得出 TSAYE+1.5% NaCl 作为合适损伤培养基并用于后续研究。损伤型气单胞菌的数量采用普通培养基的菌落数与损伤培养基的菌落数之差来计数。猪肉在 25℃ 解冻过程中, 损伤型气单胞菌的修复时间大约为 75min, 其失活符合 Polynomial 模型( $R^2 = 0.9937$ )及 Boltzmann 模型( $R^2 = 0.9884$ ), 通过模型的检验选择 Polynomial 模型拟合损伤型气单胞菌的失活过程。

**关键词:** 气单胞菌; 损伤; Boltzmann 模型; Polynomial 模型; 解冻猪肉

## Detection and Inactivation Modeling of Injured *Aeromonas* spp. in Thawing Pork

DONG Qing-li, LIANG Na, ZENG Jing, ZHANG Hao-bo

(School of Medical of Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

**Abstract:** In order to detect injured *Aeromonas* spp. and establish its inactivation model on the surface of thawing pork, TSAYE containing 0.6% yeast extract was selected and TSAYE supplemented with NaCl at various concentrations (1.0%, 1.5%, 2.0%, 2.5% and 3.0%) were used to culture *Aeromonas* spp. The results showed that TSAYE supplemented with 1.5% NaCl was the optimal injury medium. The number of injured *Aeromonas* spp. colonies was counted based on difference between ordinary medium and injury medium. This study indicated that the restoration time of *Aeromonas* spp. during the thawing process of pork at 25 °C was approximately 75 min, and the inactivation curve could be fitted with Polynomial model ( $R^2 = 0.9937$ ) and Boltzmann model ( $R^2 = 0.9884$ ), respectively. Moreover, polynomial model could better fit the inactivation process. This result can provide a theoretical reference for the detection and prediction of injured *Aeromonas* spp. in meat and meat products.

**Key words:** *Aeromonas* spp.; injury; Boltzmann model; polynomial model; thawing pork

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)07-0219-04

冷冻肉是国家调节肉制品市场的一个重要手段, 是肉类产品在进出口贸易和国内地区间流通的主要产品形态, 也是各种肉类加工企业的原料<sup>[1]</sup>。冷冻肉解冻后的安全以微生物影响最为显著。肉类经过包括冷冻在内处理后, 一部分微生物会死亡, 一部分可能存活, 另一部分可能会亚损伤<sup>[2]</sup>。肉类中的微生物经过冷冻冷藏处理后, 可遭受不同程度的亚致死性损伤而成为损伤菌<sup>[3]</sup>, 损伤菌在适宜的条件(如解冻)下可进行修复, 重新具有正常未损伤细菌的生理生化特性, 恢复其对选择性物质的耐受性, 可重新具有产毒、致病性。

损伤菌不能在含有选择性物质的培养基中生长, 可以将普通培养基与选择性损伤培养基上菌落数的差值作为损伤菌数<sup>[4]</sup>。有研究表明李斯特菌<sup>[5]</sup>、金黄色葡萄菌<sup>[6]</sup>、沙门氏菌<sup>[7]</sup>的热损伤及大肠杆菌<sup>[8]</sup>、乳酸菌<sup>[9]</sup>的冷冻损伤, 但冷冻损伤型气单胞菌的检测及生长模型的构建尚有待完善。

本研究以解冻猪肉中的优势腐败菌之一——气单胞菌为研究对象, 它在猪肉冷冻过程中存在“死亡、未损伤及损伤”3种形式。引入预测微生物学方法对猪肉解冻过程损伤型气单胞菌生长进行模拟, 完善气单胞菌

收稿日期: 2011-04-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(308008640)

作者简介: 董庆利(1979—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为畜产品安全与质量控制。E-mail: dongqingli@126.com

损伤模型的理论体系,为肉类工业中损伤型气单胞菌检测和预测提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

优质猪精腿肉购于上海卜蜂莲花超市,迅速分装置于冰箱中备用。

### 1.2 培养基

TSAYE(含0.6%酵母浸膏的胰酪胨大豆琼脂)、CMO841营养肉汁琼脂培养基、气单胞菌液体培养基,以上培养基的配制参照文献[10]。

### 1.3 仪器与设备

Autoclave SS-325型灭菌锅 日本Tomy公司; S·SW-CJ-IC型净化工作台、SPX-250B-II型生化培养箱 上海跃进医疗器械厂; XW-80A型漩涡混合器 上海精科实业有限公司; DHG-9203A型电热恒温鼓风干燥箱 上海华连医疗器械有限公司; HWS-150型恒温恒湿培养箱 上海比朗仪器有限公司; WAECO CF50型冰箱 美国电子(深圳)有限公司。

### 1.4 菌种选用及活化

气单胞菌(N0.23564)来源于中国工业微生物菌种保藏管理中心,于气单胞菌液体培养基中,27℃条件下活化3次,制得菌种原液。

### 1.5 菌悬液制备、接种

应用无菌生理盐水(0.85% NaCl溶液)稀释菌种原液制得菌悬液,称取25g肉样悬浮于80℃无菌水中10s进行灭菌。应用浸泡法进行肉样接种,即将灭菌后肉样浸入菌悬液中15s接种。接种后肉样封装于无菌袋中,测定起始接种量,放入-18℃冰箱并计时。

### 1.6 冷冻猪肉的解冻、取样及计数

将猪肉冷冻48h取出进行解冻,25℃条件下进行解冻1h,每组两个平行。参照GB/T 4789.2—2008《食品卫生微生物学检验 菌落总数测定》中平板计数法每30min进行取样测定活菌数<sup>[11]</sup>,同时分别选择TSAYE+NaCl(其中NaCl添加量分别设为1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%)为培养基进行平板计数,27℃进行培养。经差异显著性分析得出合适损伤培养基,再取出48h猪肉冷冻样本进行解冻,25℃解冻2h,每组两个平行,平板计数法每15min进行取样测定活菌数,TSAYE为选择培养基,TSAYE+合适NaCl质量分数为损伤培养基进行平板计数,27℃进行培养。损伤菌落数为两种培养基上菌落数之差。

### 1.7 统计分析及模型的构建

应用SPSS17.0软件分析不同的选择培养基计数的差异显著性,DPS9.50软件分析不同曲线的显著性分析,

Excel软件绘制解冻过程两培养基菌落数的变化曲线图。Origin8.0软件模拟损伤菌的生长曲线,其中多元回归Polynomial模型如下:

$$\lg Nt = A + B_1t + B_2t^2 + B_3t^3 \quad (1)$$

Boltzmann 模型:

$$\lg Nt = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + \exp((t - t_0)/dt)}$$

其中,

$$dt = \frac{4 \frac{dN_0}{dt_0}}{A_2 - A_1} \quad (2)$$

式中:  $t$  为解冻时间/h;  $Nt$  为  $t$  时菌落总数/(CFU/g);  $A$ 、 $B_1$ 、 $B_2$ 、 $B_3$  及  $A_1$ 、 $A_2$ 、 $t_0$ 、 $N_0$  为模型参数; Polynomial模型中  $A$  为初始损伤菌落数的对数值/(lg(CFU/g));  $B_1$ 、 $B_2$ 、 $B_3$  是不同的常量系数。Boltzmann模型中  $A_2$  表示修复后菌落数的对数值/(lg(CFU/g));  $A_1$  表示为初始损伤菌落数的对数值/(lg(CFU/g));  $t_0$  为表示损伤菌落数减少一半时的时间/h;  $N_0$  为损伤菌落数减少一半时的菌落数的对数值/(lg(CFU/g))。

应用判定系数( $R^2$ )、预测标准误差(SEP)和均方误差(MSE)评定模型,公式如下:

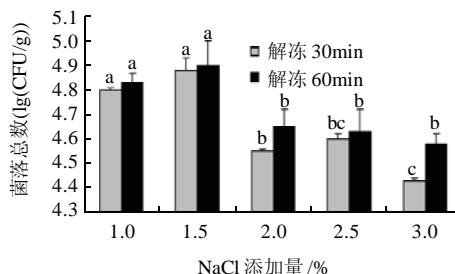
$$SEP = \frac{100}{\bar{N}_{\text{observed}}} \sqrt{\frac{\sum (N_{\text{observed}} - N_{\text{predicted}})^2}{n}} \quad (3)$$

$$MSE = \frac{\sum (N_{\text{observed}} - N_{\text{predicted}})^2}{n} \quad (4)$$

式中:  $N_{\text{predicted}}$  和  $N_{\text{observed}}$  分别为预测菌落数与观测菌落数/(CFU/g);  $n$  为实验次数。

## 2 结果与分析

### 2.1 解冻猪肉在不同损伤培养基上的菌落计数



不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

图1 解冻猪肉在不同损伤培养基上的菌落总数

Fig.1 Colony counts of thawing pork in different injury media

由图1可知,菌落总数在NaCl添加量为1.0%和

1.5% 之间无显著差异( $P > 0.05$ ), 当 NaCl 添加量大于 1.5% 时解冻 30min 和 60min 的菌落数均开始下降, 表明 NaCl 大于 1.5% 时, 损伤菌生长受到抑制, 因此可以 1.5% NaCl 为选择培养基的最适质量分数。NaCl 质量分数的选择由气单胞菌的损伤特性确定, Feeherry 等<sup>[12]</sup>在黑曲霉热损伤的研究中选择添加 0.9% NaCl 作为修复培养基, 表明不同微生物受到抑制的所需的 NaCl 不同。

## 2.2 解冻猪肉中损伤型气单胞菌的生长变化

利用 2.1 节结果选择 TSAYE + 1.5% NaCl 为损伤菌计数培养基, TSAYE 为普通培养基进行计数, 对冷冻 48h 的猪肉样本进行解冻, 时间为 2h, 取样间隔 15min。两培养基中损伤型气单胞菌变化规律如图 2 所示。

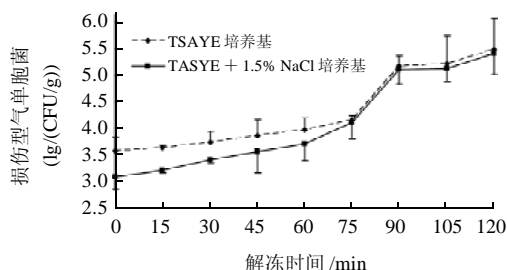


图 2 25℃解冻猪肉中损伤型气单胞菌的生长变化

Fig.2 Growth change of *Aeromonas* spp. during thawing at 25 °C

普通培养基上与损伤培养基上的菌落数接近或同时增加, 则表明损伤型气单胞菌达到完全修复, 此段时间为修复时间<sup>[13]</sup>。由图 2 可知, 75min 后普通培养基(TSAYE)与损伤培养基(TSAYE + 1.5% NaCl)中损伤型气单胞菌同时增长, 两培养基菌落数接近。但是 90~120min 两种培养基菌落数并无增长, 表明此时损伤型气单胞菌的生长进入迟滞期, 这与 Everis<sup>[14]</sup>研究的食品中损伤微生物的生长包含两个阶段, 前一阶段为微生物的修复阶段后一阶段为生长阶段是一致的。同时也说明了 75min 后两培养基中的损伤型气单胞菌会同时生长。并且两曲线经差异显著性分析得出  $P = 0.0342$ , 前 75min 的  $P = 0.0032$ , 75~120min 的  $P = 0.4794$ 。因此, 两曲线总体上是具有显著性差异, 并且前 75min 有极显著差异, 75~120min 无显著差异, 也间接说明了 75min 是冷冻损伤型气单胞菌的修复期。表明猪肉表面冷冻损伤型气单胞菌在 25℃解冻过程的修复时间约为 75min, 修复发生在繁殖之前。

## 2.3 解冻猪肉中损伤型气单胞菌失活模型的构建

利用 Origin8.0 软件模拟损伤型单胞菌的失活曲线, 解冻时间为 75min, 间隔 15min 进行取样。基于 Polynomial 模型和 Boltzmann 模型的拟解冻猪肉表面损伤型气单胞菌的失活曲线如图 3 所示, 图中各散点为损伤型气单胞菌总数, 用来拟合模型。构建的方程表达式为:

Polynomial 模型:  $\lg N_t = 3.67 - 0.01t - 0.29 \times 10^{-4}t^2 + 3.65 \times 10^{-6}t^3$  ( $R^2 = 0.9937$ )

Boltzmann 模型:  $\lg N_t = 2.63 + \frac{3.85 - 2.63}{1 + \exp((t - 25.89)/14.82)}$  ( $R^2 = 0.9884$ )

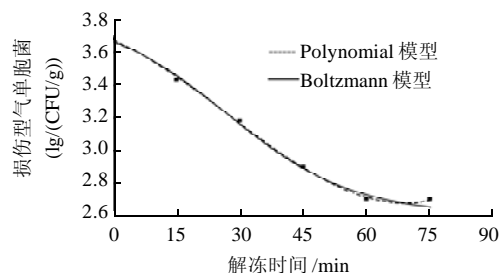


图 3 25℃解冻过程中损伤型气单胞菌失活曲线图

Fig. 3 Inactivation curve of injured *Aeromonas* spp. during thawing at 25 °C

通过 Polynomial 模型及 Boltzmann 模型的 SEP 值分别为 0.4564 和 0.8117, SEP 越小, 说明预测模型能够更好的描述实验数据<sup>[15]</sup>。MSE 值分别为 0.0012 和 0.0038, MSE 可以评价数据的变化程度, MSE 值越小, 说明预测模型描述实验数据具有更好的精确度<sup>[16]</sup>。由于 Polynomial 模型的  $R^2$  ( $R^2 = 0.9937$ ) 较 Boltzmann 模型 ( $R^2 = 0.9884$ ) 高, SEP 值和 MSE 值均较低。故可选 Polynomial 模型作为损伤微生物失活的规律研究。

## 3 讨论

3.1 TSAYE 用来作为冷冻、加热、高压等处理的修复计数培养基, 如大肠杆菌的冷冻损伤、沙门氏菌的热损伤以及李斯特菌的高压损伤等, 如 Miller<sup>[17]</sup>、Busch<sup>[18]</sup>等对李斯特菌的热损伤研究也选用了 TSAYE 作为基础培养基, 但与本实验采用的 NaCl 质量分数 1.5% 对李斯特菌的研究差异较大, 主要原因是气单胞菌为革兰氏阴性菌, 细胞壁等特征与阳性菌差异极大。

3.2 在温度 25~37℃ 对损伤菌的修复有利, 微生物修复可发生在 1~6h 内, 时间的长短与菌种类型、损伤类型及程度有关<sup>[19]</sup>。在 -18℃ 的贮藏过程中, 可能由于气单胞菌处于不同的生理状态, 致使受到不同程度的损伤; 25℃ 解冻过程中, 在损伤严重的气单胞菌得到修复的时间内, 可能造成未损伤菌的繁殖, 本实验表明冷冻猪肉在 25℃ 解冻过程中, 其表面损伤型气单胞菌的修复时间大约为 75min, 修复发生在繁殖之前。

3.3 选择 Polynomial 模型 ( $R^2 = 0.9937$ ) 及 Boltzmann 模型 ( $R^2 = 0.9884$ ) 进行拟合, 两模型拟合优度均较高。但通过模型的检验分析得出 Polynomial 模型更符合损伤型气单胞菌失活的研究。在失活模型构建研究中, 董庆利等<sup>[20-21]</sup>研究了乳酸菌冷藏失活和生孢梭菌热失活的非线性

曲线拟合, 得出 Weibull 模型为较优拟合模型, 但并不适用于本研究对损伤型气单胞菌失活模型的构建, 说明损伤失活涉及的生理变化比普通的失活更加复杂, 需要在相关机制方面深入研究后才能探讨损伤性微生物失活的一般规律。

#### 参考文献:

- [1] 余小领, 李学斌, 马汉军, 等. 直接冻结工艺与两阶段冻结工艺对猪肉的保水性和组织结构的影响[J]. 江苏农业科学, 2007(5): 196-200.
- [2] WU V C H. A review of microbial injury and recovery methods in food [J]. Food Microbiology, 2008, 25(3): 735-744.
- [3] BAIRD-PARKER A C. The effect of recovery medium on the isolation of *Staphylococcus aureus* after heat treatment and after the storage of frozen or dried cells[J]. Applied Bacteriology, 1965, 28(1): 390-402.
- [4] 张勇, 刘衡川, 殷强仲, 等. 金黄色葡萄球菌—20℃冷冻损伤修复[J]. 预防医学情报杂志, 2005, 21(3): 146.
- [5] JASSON V, UYTENDAELE M, RAJKOVIC A, et al. Establishment of procedures provoking sub-lethal injury of *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* O157 to serve method performance testing[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 118(1): 241-249.
- [6] SOGIN S J, ORDAL Z J. Regeneration of ribosomes and ribosomal ribonucleic acid during repair of thermal injury to *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Bacteriology, 1967, 94(4): 1082-1087.
- [7] CLARK C W, JOHN Z O. Thermal injury and recovery of *Salmonella typhimurium* and its effect on enumeration procedures[J]. Applied Microbiology, 1969, 18(3): 332-336.
- [8] WARSECK M, RAY B, SPECK M L. Repair and enumeration of injured coliforms in frozen foods[J]. Applied Microbiology, 1973, 26(6): 919-924.
- [9] 刘振民, 骆承庠. 乳酸菌冷冻损伤研究[J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(10): 18-21.
- [10] 陈天寿. 微生物培养基的制造与应用[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995: 250-579.
- [11] GB 4789.2—2008 食品卫生微生物学检验 菌落总数测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [12] FEEHERRY F E, MUNSEY D T, ROWLEY D B. Thermal inactivation and injury of *Bacillus stearothermophilus* spores[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1987, 53(2): 365-370.
- [13] 孟昭赫. 食品卫生检验方法注解微生物学部分[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1990: 860-870.
- [14] EVERIS L. Injured bacteria in foods[J]. Nutrition and Food Science, 2001, 31(2): 84-87.
- [15] DONG Qingli, TU Kang, GUO Liyang, et al. Response surface model for prediction of growth parameters from spores of *Clostridium sporogenes* under different experimental conditions[J]. Food Microbiology, 2007, 24(4): 624-632.
- [16] CAYRE M E, VIGNOLO G, GARRO O. Modeling lactic acid bacteria growth in vacuum-packaged cooked meat emulsions stored at three temperatures[J]. Food Microbiology, 2003, 20(14): 561-566.
- [17] MILLER F A, BRANDÃO T R S, TEIXEIRA P, et al. Recovery of heat-injured *Listeria innocua*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 112(3): 261-265.
- [18] BUSCH S V, DONNELLY C W. Development of a repair-enrichment broth for resuscitation of heat-injured *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58(1): 14-20.
- [19] 张勇, 刘衡川, 殷强仲, 等. —20℃冷冻损伤大肠杆菌修复的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(3): 289-292.
- [20] 董庆利, 李保国, 蔡佳彦, 等. 冷藏温度下乳酸菌饮料中乳酸菌失活模型的构建[J]. 中国乳品工业, 2009, 37(5): 6-8.
- [21] 董庆利. Weibull模型拟合细菌非线性失活曲线的应用研究[J]. 上海理工大学学报, 2009, 31(4): 387-380.