

小肠结肠炎耶尔森菌在猪肉中 失活/存活模型的初步研究

周艳明, 王琦, 于维军

(沈阳农业大学分析测试中心, 辽宁沈阳 110161)

摘要:采用预测微生物学的基本方法和程序, 研究小肠结肠炎耶尔森菌在特定条件下的生长规律, 并用 CurveExpert1.38 软件作为辅助工具, 从中选取了 Linear 模型对实验数据进行拟合。初步建立了肉汤中小肠结肠炎耶尔森菌 55、60℃ 的热失活模型, 以及猪肉中小肠结肠炎耶尔森菌的速冻失活模型和冷冻存活模型。

关键词:小肠结肠炎耶尔森菌, 失活模型, 存活模型

Preliminary study on inactivation/survival model of *Yersinia enterocolitica* in pork

ZHOU Yan-ming, WANG Qi, YU Wei-jun

(The Analyzes and Testing Center, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: The growth characteristic of *Yersinia enterocolitica* under specific condition was studied by using the basic method and procedure of predictive microbiology and the Linear Fit model which was selected from a complementary tool - CurveExpert 1.38 software was used to adjust to the experimental data. Hot inactivation model of *Yersinia enterocolitica* at 55, 60℃ in Modified Yeast Extract - Rose Bengal broth was established preliminary as well as deepfreeze inactivation and refrigeration survival model of *Yersinia enterocolitica* in pork.

Key words: *Yersinia enterocolitica*; inactivation model; survival model

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2008)04-0160-03

小肠结肠炎耶尔森菌属于重要的食源性致病菌, 很多国家都已将该菌列为进出口食品的常规检测项目。我国在 20 世纪 80 年代中期有两次较大的流行, 造成 500 多人感染^[1]。它除引起胃肠道症状外, 还能引起呼吸系统、心血管系统、骨骼结缔组织等疾患, 甚至可引起败血症, 造成死亡^[8]。由于小肠结肠炎耶尔森菌易在低温下生长, 所以在一些寒冷的国家和地区或在寒冷的季节较为常见, 因此有人称之为“冰箱病”。近年来冷藏食品日益普遍, 其对食品安全构成了很大的威胁。预测微生物学是建立于计算机基础上的对食品中微生物的生长、残存和死亡进行数量化的预测方法^[7], 它可以通过计算机及其配套软件, 在不进行微生物检测的条件下快速预测微生物指标, 提高食品货架期的安全性, 并有效的对致病菌进行风险评估^[3,4]。猪肉是目前人们餐桌上重要的动物性食品之一。我国目前人均猪肉占有量为 33kg, 超过世界平均水平^[6]; 且在各类动物中, 猪的小肠结肠炎耶尔森氏菌带菌率较高^[2]。因此, 对猪

肉中小肠结肠炎耶尔森氏菌进行科学的管理、控制、预防、监测极其重要。基于此, 本文初步建立了小肠结肠炎耶尔森菌的热失活模型及其速冻失活模型和冷冻存活模型。

1 材料与仪器

小肠结肠炎耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica*) 中国药品生物制品鉴定所; CIN-1 琼脂 (Cepulodin Irgasan Novobiocin Agar)、改良酵母浸汁孟加拉红肉汤 (Modified Yeast Extract-Rose Bengal Broth) 北京陆桥技术有限责任公司; 鲜猪肉 超市选购。

标准超净工作台 苏州净化设备厂; 2DX-35BI 型座式自动电热蒸汽压力灭菌器 上海申安医疗器械厂; 电热恒温培养箱 湖北省黄石市医疗器械厂; 数显恒温水浴锅 国华电器有限公司; 平板速冻机 大连冰山菱设速冻设备有限公司; 低温冰箱 北京东南仪诚实验室设备有限公司; 平皿、三角瓶、移液管等玻璃器皿。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种活化 配制改良酵母浸汁孟加拉红肉汤, 用蒸汽压力灭菌器在 121℃ 灭菌 15min, 冷却后放于 4℃ 冰箱中备用。以无菌操作, 取 1~2mL 改良酵母浸汁孟加拉红肉汤到小肠结肠炎耶尔森氏冻干菌

收稿日期: 2007-09-17

作者简介: 周艳明 (1955-), 女, 教授, 主要从事农产品、食品安全与质量评价的教学、科研工作。

菌种管中,轻轻振摇使其混匀,再将其取出,接种到 CIN-1 琼脂斜面,传 1~2 代,于 26℃ 培养 48h。

1.2.2 菌悬液的制备 以无菌操作,取 CIN-1 琼脂斜面 26℃ 48h 培养物,挑取菌苔在无菌生理盐水中溶解,稀释,制成菌悬液。

1.2.3 样品制备 将猪肉切成肉丁,以每份 10g 进行封装,用⁶⁰Co 辐照杀菌。保存于-28℃,使用前置于室温下自然解冻。

1.2.4 小肠结肠炎耶尔森菌失活实验

1.2.4.1 热失活实验 无菌操作,将已灭菌的肉汤分别装入 50mL 无菌三角瓶中,放于已调节到实验所需温度的水浴锅中平衡一段时间。将制备好的菌悬液接种到温度已平衡的肉汤培养基中,用平板计数法进行原始菌液计数。50℃ 每隔 3min、60℃ 每隔 1min 分别取 1mL 改良酵母浸汁孟加拉红肉汤培养液,用稀释倒平板法计算菌数。每个处理做 2 个平行。

1.2.4.2 速冻失活实验 按无菌操作,在已灭菌的 10g/份的猪肉中分别加入 1mL 经适当稀释的菌悬液,密封,用平板计数法进行原始菌液计数。通过-35℃ 速冻机,取 1 份加 90g 无菌生理盐水,均质后取均质液 1mL,用平板计数法计数。每个处理做 2 个平行。

1.2.5 小肠结肠炎耶尔森菌冷冻存活实验 挑取菌苔在无菌生理盐水中制成菌悬液,用无菌生理盐水梯度稀释。按无菌操作,将已灭菌的猪肉分装为 10g/份(装入无菌袋内),加入 1mL 经适当稀释的菌悬液密封。放入-18℃ 低温冰箱中培养,每隔一段时间,取一份加 9mL 无菌生理盐水,用稀释倒平板法测菌数。每个处理做 2 个平行。

2 结果与分析

2.1 高温对小肠结肠炎耶尔森菌生长的影响

50、60℃ 时小肠结肠炎耶尔森氏菌在改良酵母浸汁孟加拉红肉汤中生长情况分别见图 1,图 2。实验结果表明,本菌在 50℃ 时,即呈指数方式死亡,在一定时间内,其细菌数的对数与时间呈线性。60℃ 时,本菌在 30s 菌数即可下降 4 个数量级。

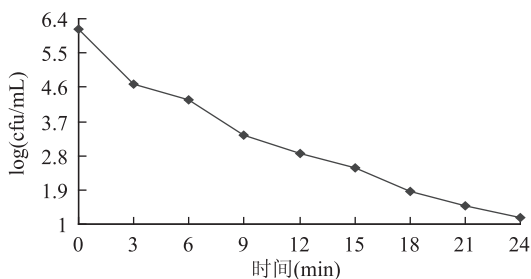


图 1 50℃ 改良酵母浸汁孟加拉红肉汤中小肠结肠炎耶尔森菌的失活曲线

2.2 速冻过程对小肠结肠炎耶尔森菌生长的影响

本步骤选取了小肠结肠炎耶尔森菌六个不同数

表 1 速冻失活实验结果

	A	B	C	D	E	F
初始浓度对数 log(cfu/mL)	1.6721	2.3139	3.1492	4.5293	5.732	6.5082
存活浓度对数 log(cfu/mL)	1.6335	2.2672	3.0986	4.486	5.6886	6.4497

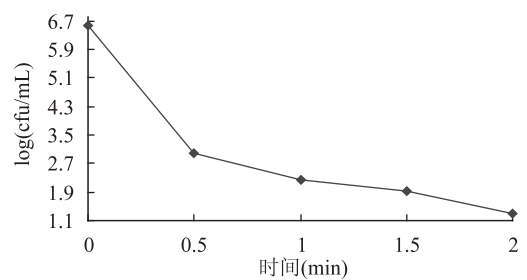


图 2 60℃ 改良酵母浸汁孟加拉红肉汤中小肠结肠炎耶尔森菌的失活曲线

量级的浓度进行实验。由表 1 的实验结果可以得出,速冻后细菌数量只是略有降低,大多数仍能存活。

2.3 冷冻过程对小肠结肠炎耶尔森菌生长的影响

由图 3 可以看出,在冷冻低温下小肠结肠炎耶尔森菌的生长完全受到抑制,菌数呈缓慢下降趋势,但在很长的时间内仍有存活。

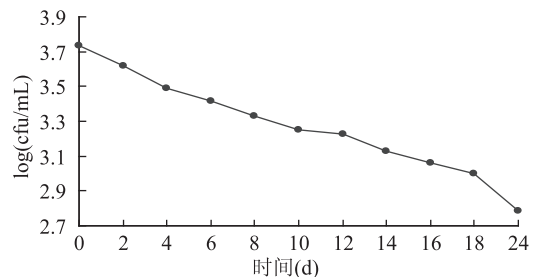


图 3 猪肉中小肠结肠炎耶尔森菌在-18℃ 的存活曲线

2.4 小肠结肠炎耶尔森菌失活/存活模型的建立

采用 CurveExpert1.38 软件^[9],从中选取 Linear 方程进行拟合,分别建立 55℃ 改良酵母浸汁孟加拉红肉汤中小肠结肠炎耶尔森菌的失活模型、猪肉中速冻过程中小肠结肠炎耶尔森菌的失活模型以及-18℃ 猪肉中小肠结肠炎耶尔森菌的存活模型,拟合曲线如图 4~图 6。模型方程及其标准差、相关系数如表 2。

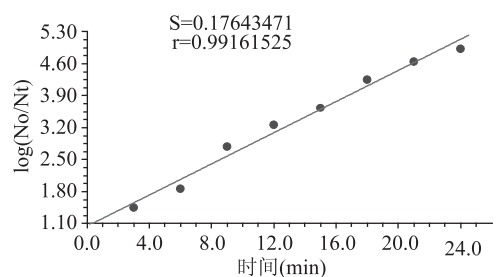


图 4 Linear 方程拟合的 50℃ 改良酵母浸汁孟加拉红肉汤中小肠结肠炎耶尔森菌的失活曲线

3 结论

猪是小肠结肠炎耶尔森氏菌的主要宿主,具有重要的流行病学研究价值。Tadxe 等发现,感染耶尔森氏菌与食生猪肉有关^[5]。因此,对猪肉中小肠结肠炎耶尔森氏菌的及时监控与人类的健康密切相关。

表2 不同条件下小肠结肠炎耶尔森菌预测模型方程

条件	模型方程	标准差(S)	相关系数(R)
50℃	$\text{Log}(N_0/N_t) = 1.0477287 + 0.1705726T$	0.17643471	0.99161525
-18℃	$\text{Log}(N_0/N_t) = 0.091057233 + 0.036013901T$	0.02426666	0.99566692
速冻	$\text{Log}N_t = -0.0651058 + 0.97683871\text{Log}N_0$	0.05583935	0.99965457

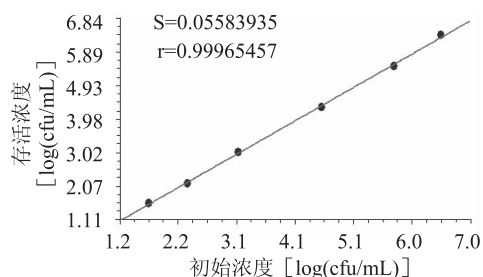


图5 Linear方程拟合的猪肉中小肠结肠炎耶尔森菌在速冻过程中的失活曲线

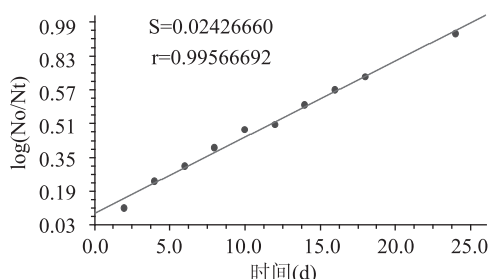


图6 Linear方程拟合的-18℃小肠结肠炎耶尔森菌在猪肉中的存活曲线

从实验结果可以得出,小肠结肠炎耶尔森氏菌对高温特别敏感,温度越高,杀菌时间越短。在生猪肉中接种不同浓度的小肠结肠炎耶尔森菌,通过速冻机,使其中心温度在30min内达到-18℃,只能使部分小肠结肠炎耶尔森菌失去活性。因此在猪肉加工中,应在速冻前控制小肠结肠炎耶尔森菌的数量,

在速冻以及贮存、销售时应主要防止交叉污染。小肠结肠炎耶尔森菌可以在低温储存的食品中繁殖,对于在冰箱内长期冷冻保存的猪肉,应注意冰箱卫生,以防二次污染。

参考文献:

- [1] 景怀琦,徐建国. 小肠结肠炎耶尔森菌感染性疾病[J]. 疾病监测,2005,20(9):449~450.
- [2] 郑浩轩,姜泊. 小肠结肠炎耶尔森菌研究概况[J]. 中国微生物学杂志,2006,18(5):416~419.
- [3] Walls I, Scott V N. Use of predictive microbiology in microbial food safety risk assessment[J]. Int J Food Microbiol, 1997,36:97~102.
- [4] 郭全友,钱志伟. 预测微生物学在食品品质和安全评估上的运用[J]. 海洋渔业,2003,25(3):157~161.
- [5] Asplund K,等. 育肥猪和猪肉小肠结肠炎耶尔森氏菌流行情况调查[J]. 肉品卫生,1992,91(1):26~28.
- [6] 朱虹波. 我国猪肉屠宰加工及销售业特点及发展趋势[J]. 中外食品,2004(10):20~21.
- [7] McMeekin T A. Predictive microbiology: theory and application[M]. Taunton,UK:Research Studies Press,1993.
- [8] 夏云,胡宏. 小肠结肠炎耶尔森氏菌致病性研究的进展[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册,1989,10(5):1~2,6.
- [9] 李国强,马溶慧,朱云集. CurveExpert在农业实验数据曲线拟合中的应用[J]. 农业网络信息. 2005(5):49~51.

(上接第159页)

2.2.1 培养基配方的正交实验 根据正交实验分析,葡萄糖、豆饼粉、 KH_2PO_4 和 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的浓度对Cs11深层发酵的影响程度由大到小依次为:豆饼粉>葡萄糖> KH_2PO_4 > $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,培养基配方的最佳组合为 $\text{A}_2\text{B}_2\text{C}_3\text{D}_2$,即豆饼粉2%、葡萄糖4%、 KH_2PO_4 0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075%。

2.2.2 培养条件的正交实验 根据正交实验分析,接种量、装液量、pH和摇床转速四个因素对Cs-4深层发酵的影响程度由大到小依次为:接种量>摇床转速>装液量>pH,培养条件的最佳组合为 $\text{A}_3\text{B}_2\text{C}_3\text{D}_3$,即接种量10%、装液量150mL/500mL、pH6.5、摇床转速170r/min。

2.3 验证实验

以正交实验所得最佳培养基配方为葡萄糖4%,豆饼粉2%, KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075%,并在最适培养条件:24℃、170r/min、pH6.5,接种量10%,培养菌丝体,可获得腺苷>0.16%,甘露醇>8.0%,菌粉得率高达2.35%等较高的综合效果。

3 结论

通过对冬虫夏草菌(Cs11)的深层发酵条件,如

pH、接种量及转速的探讨及对深层发酵培养基碳氮源和无机盐的筛选,确定了其深层培养所需条件及最佳碳氮源和无机盐。实验结果表明:冬虫夏草菌深层发酵的最适培养条件应为24℃、170r/min、pH6.5,接种量10%,装液量150mL/500mL,菌丝生长的最佳碳源为葡萄糖2%,最佳氮源为豆饼粉0.2%,最佳无机盐为 KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075%,可获得菌粉得率和甘露醇、腺苷含量等较高的综合效果。

参考文献:

- [1] 许超德. 冬虫夏草的研究进展[J]. 菌物研究,2006,4(2):60~64.
- [2] 雷万生,谢联斌,陈和平. 冬虫夏草的研究概况[J]. 海军医学杂志,2006,27(3):262~268.
- [3] 武忠伟,郭爱莲,张海滨. 不同培养条件对冬虫夏草菌丝体甘露醇的影响[J]. 食品科学,2004,25(12):90~92.
- [4] 吕献康,沈建华,舒小英. 冬虫夏草生态生物学特性考察报告[J]. 中国现代应用药学,2005,22(2):134~135.
- [5] 魏玲,赵应华,郭遂. 冬虫夏草活性成分的含量研究概况[J]. 华西药学杂志,2003,18(5):359~360.