

熟畜肉中金黄色葡萄球菌污染标记物 动态变化及与菌体生长关联分析

胡凯丽, 陈娟*, 唐俊妮, 代义闯, 左子珍

(西南民族大学, 四川成都 610041)

摘要:为考察不同类型的熟猪肉、牛肉、羊肉对金黄色葡萄球菌污染标记物的影响,采用顶空固相微萃取/气相色谱质谱联用技术对三种熟肉进行本底值检测,并对人工染菌的三种熟肉进行标记物动态分析和细菌生长数量变化测定。结果表明,在采集的大量样本中,三种熟肉基质都检出一定强度的3-甲基丁醛和3-甲基丁酸信号,作为熟畜肉的本底值。对于受金黄色葡萄球菌污染的三种熟肉,3-甲基丁醛信号均在第12 h时($1\sim 3 \times 10^7$ CFU/g)出现显著增长($p < 0.05$),强度增长到最大值后迅速下降;3-甲基丁酸信号均在第14 h时($0.7\sim 2 \times 10^8$ CFU/g)出现显著增长($p < 0.05$),在整个培养过程中强度不断上升。对于三种熟肉,3-甲基丁醛(0~18 h)和3-甲基丁酸(0~24 h)的信号强度分别与金黄色葡萄球菌生长量之间均具有极显著($p < 0.01$)的相关性。结论:金黄色葡萄球菌生长量分别达到 10^7 、 10^8 CFU/g时开始检测到3-甲基丁醛和3-甲基丁酸的增长,之后在一定的培养周期内这两个物质稳定存在并与菌体生长显著相关。研究结果为建立畜肉中金黄色葡萄球菌污染标记物检测技术奠定了前期基础。

关键词:顶空固相微萃取/气相色谱质谱联用,金黄色葡萄球菌,熟肉,挥发性标记物,菌体生长

The Variation Characteristics of the Volatile Markers and Its Relation to Growth Status of *Staphylococcus aureus* Growing on Cooked Meats

HU Kai-li, CHEN Juan*, TANG Jun-ni, DAI Yi-chuang, ZUO Zi-zhen

(Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China)

Abstract: To explore the influences of different meats on the volatile markers of *Staphylococcus aureus* contaminating on cooked meat, headspace-solid phase micro-extraction/gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME-GC/MS) was employed to measure the background values of three cooked meats (pork, beef and mutton) and production regularities of volatile markers of *S. aureus* growing on meats. The growth of *S. aureus* was determined by enumerating bacterial cells. The results showed that all of three cooked meat were detected both 3-methyl-butanal and 3-methyl-butanoic acid signals, so that the contamination of *S. aureus* on meat could be judged by the detection value obvious above meat background values. For *S. aureus* growing on these three cooked meats, the 3-methyl-butanal signal increased significantly ($p < 0.05$) at the 12th hour (corresponding to $1\sim 3 \times 10^7$ CFU/g), then it showed an increase up to the maximum with a sharp decrease. The 3-methyl-butanoic acid signal increased significantly ($p < 0.05$) at the 14th hour (corresponding to $0.7\sim 2 \times 10^8$ CFU/g), then increased continuously during the whole incubation process. And the correlation between 3-methyl-butanal intensities and bacterial counts of *S. aureus* were extremely significant during 0~18 h, also the correlation between 3-methyl-butanoic acid intensities and bacterial counts of *S. aureus* were extremely significant during 0~24 h ($p < 0.01$). Therefore, the increasing of 3-methyl-butanal and 3-methyl-butanoic acid was detected while the bacterial cells of *S. aureus* reached up to 10^7 and 10^8 CFU/g respectively. Subsequently, the two volatile markers were stable and significantly correlative with bacterial counts of *S. aureus* during a certain period of incubation. These results provided foundations for the establishment of the detection of *S. aureus* contaminating on meat based on volatile markers.

Key words: headspace-solid phase micro-extraction/gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME-GC/MS); *Staphylococcus aureus*; cooked meat; volatile markers; bacterial growth

中图分类号: TS201.6

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2019)08-0108-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2019.08.019

引文格式: 胡凯丽, 陈娟, 唐俊妮, 等. 熟畜肉中金黄色葡萄球菌污染标记物动态变化及与菌体生长关联分析[J]. 食品工业科技, 2019, 40(8): 108-113, 119.

收稿日期: 2018-07-03

作者简介: 胡凯丽(1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 畜产品加工与安全, E-mail: 836213319@qq.com.

* 通讯作者: 陈娟(1980-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 食品微生物与食品安全, E-mail: chenjl221@126.com.

基金项目: 十三五重点研发项目(2018YFD0500500); 四川省科技计划项目(2018JY0540); 中央高校基本科研业务费专项资金青年教师基金项目(2018NQNS9).

金黄色葡萄球菌在自然界中广泛存在,在空气、水、灰尘、人和动物的排泄物中都可以找到,因此金黄色葡萄球菌极易污染食物。熟肉制品因其方便美味,受到广大消费者的普遍喜爱,但是熟肉制品在加工、运输、销售的过程中往往极易受到金黄色葡萄球菌的污染,从而引发食物中毒。容冬丽等^[1]对我国15个代表性城市的即食食品中金黄色葡萄球菌污染调查表明,卤肉中污染率为16.3%,烤肉为9.2%。鲁延迅等^[2]报道了吉林长春市熟猪肉和熟牛肉制品中金黄色葡萄球菌污染率分别为31.1%和21.3%。Young等^[3]从香港商店采集的50份烤猪肉样品中检出25份(50%)受到金黄色葡萄球菌的污染。许振伟等^[4]对上海市场抽样调查发现,酱肉制品和腌腊肉制品中金黄色葡萄球菌污染率为23.1%和19.1%。可见,熟肉制品中金黄色葡萄球菌的污染率很高,对广大消费者的生命健康存在安全隐患。

一直以来,传统培养法和聚合酶链式反应技术(Polymerase chain reaction, PCR)都是常用的微生物鉴定方法。然而,传统培养法存在操作繁琐、耗时费力等缺点,PCR方法也存在假阳性率较高、食物样品前处理复杂等不足之处。随着代谢组学研究技术的逐渐成熟,寻找食源性致病微生物的特征性代谢产物及代谢产物谱已成为致病菌快速检测和鉴定研究的一个重要方向。学者们建议将食源性致病菌挥发性代谢产物分析作为临床和食品中致病菌鉴别的替代方法^[5-6]。细菌挥发性代谢产物是由复杂的挥发性化学成分组成,包括各种不同化学结构和极性的挥发性化合物^[7]。尽管某些种或属的细菌被发现存在着交迭的挥发性代谢产物类型,但各种或属的细菌都有着独特的代谢方式,典型的挥发性成分和挥发性特征必定是种或属特有的,可以视为鉴别的生物标志^[8]。常见致病菌挥发性代谢轮廓的多元统计分析表明,金黄色葡萄球菌具有区别于其他致病菌的典型挥发性代谢特征^[9-10]。在金黄色葡萄球菌胰蛋白胨大豆肉汤培养物的挥发性代谢产物中,3-甲基丁醛、3-甲基丁酸、甲硫醇和3-羟基-2-丁酮的产生量显著高于培养基中的本底值,是金黄色葡萄球菌释放的主要代谢产物^[11]。Bos等^[12]综合分析了大量文献得出,3-甲基丁醛和3-甲基丁酸是金黄色葡萄球菌的特征挥发性代谢产物。本课题组的前期研究也发现,金黄色葡萄球菌的胰蛋白胨大豆肉汤培养物产生了3-甲基丁醛和3-甲基丁酸,且产量显著高于其它致病菌^[13]。因此,本研究将这两个化合物作为金黄色葡萄球菌的挥发性标记物。

本研究采集不同来源和部位的猪肉、牛肉和羊肉,分别调查肉中两个标记物的本底值范围;然后分别接种金黄色葡萄球菌,动态测定标记物的信号强度以及金黄色葡萄球菌的生长数量,旨在探索标记物的释放规律及与金黄色葡萄球菌生长的关联性,揭示不同类型的肉基质对金黄色葡萄球菌生长和代谢的影响,为建立基于挥发性标记物的肉中金黄色葡萄球菌快速检测技术提供基础科学数据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

金黄色葡萄球菌参考菌株 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 中国工业微生物菌种保藏管理中心(China Center of Industrial Culture Collection);胰蛋白胨大豆肉汤(Tryptone Soy Broth, TSB)培养基, Baird-Parker(BP)琼脂基础、亚碲酸盐卵黄增菌液 青岛高科园海博生物技术有限公司;猪精瘦肉、牛精瘦肉、羊精瘦肉(见表2~表3) 成都及周边的超市、便利店、零售肉摊和公司。

Trace DSQ型GC-MS联用仪(配置Triplus自动进样器) 美国Thermo公司;MOF-4086S低温冰箱、MLS-3020高压蒸汽灭菌锅 日本三洋公司;SW-CJ-1F超净工作台 苏州安泰空气技术有限公司;DHG-9203A电热恒温鼓风干燥箱 上海一恒科技有限公司;GHP-9280隔水式恒温培养箱 上海齐欣科学仪器有限公司;HZQ-F160恒温振荡培养箱 太仓市实验设备厂;50/30 μm 碳分子筛/二乙基苯/聚二甲甲基硅氧烷(carboxen/divinylbenzene/polydimethylsiloxane, DVB/CAR/PDMS)萃取头 美国Supelco公司。

1.2 实验方法

1.2.1 原料肉的预处理 将购买的猪精瘦肉、牛精瘦肉和羊精瘦肉经绞肉机绞碎后,分别称取猪肉糜、牛肉糜和羊肉糜5.00 g装入顶空瓶中,使用硅胶塞封口,经高压蒸汽灭菌(121 $^{\circ}\text{C}$, 101 kPa, 15 min)后放入干燥箱中50 $^{\circ}\text{C}$ 下干燥20 h,至瓶内肉样品无汁液,得到无菌的熟肉样品。

1.2.2 样品的制备

1.2.2.1 基质本底样品 采集不同地点和部位的猪精瘦肉20份(6份里脊肉、4份前腿肉、4份后腿肉、3份前夹肉和3份腰柳肉)、牛精瘦肉20份(5份瓜条肉、3份牛肩肉、2份牛腩肉、3份后腿肉、1份筋肉、1份背柳肉、1份里脊肉、1份前夹肉、2份前腿肉和1份腰柳肉)、羊精瘦肉20份(3份羊背肉、7份羊腿肉、2份羊臂肉、2份羊脖肉、3份羊肩肉、1份羊腹肉和1份羊排肉),经预处理后作为基质本底样品。

1.2.2.2 金黄色葡萄球菌污染样品 吸取金黄色葡萄球菌冷冻保藏菌液50 μL 接种入5 mL TSB培养基中,于(37 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min条件下培养13 h。用接种环钩取一环金黄色葡萄球菌培养液在BP平板上划线,于(37 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养(24 \pm 1) h,直到平板上长出灰黑色并带有溶菌环的典型菌落。挑取具有金黄色葡萄球菌典型特征的单菌落接入5 mL TSB培养基中,于(37 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min条件下培养13 h。然后,将该新鲜培养物进行梯度稀释至 10^{-7} ,吸取 10^{-7} 菌悬液300 μL 分别接入5.00 g熟猪肉糜、牛肉糜和羊肉糜中,使初始接种量达到100~200 CFU/g,于(37 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$ 条件下静置培养24 h,每隔2 h取样测定挥发性标记物和金黄色葡萄球菌的生长数量,每个时间点做3个平行样品。以不接种金黄色葡萄球菌的肉样为空白样品,进行两次重复试验。

1.2.3 挥发性代谢产物的测定

1.2.3.1 萃取条件 采用50/30 μm DVB/CAR/PDMS

萃取头,在 80 °C 预孵化 10 min,萃取 30 min^[14]。

1.2.3.2 气相色谱分析条件 TR-FF AP 色谱柱 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm);不分流模式,不分流 1 min 之后分流比为 50 : 1;流速 1 mL/min;升温程序:40 °C 保持 3 min,以 7 °C/min 升温至 220 °C 并保持 2 min;载气为 99.999% 氦气;进样口温度 230 °C;解吸时间 2 min^[14]。

1.2.3.3 质谱分析条件 电子电离源,电子能量 70 eV;离子源温度 250 °C;传输线温度 220 °C;选择离子流扫描模式(SIM),参数见表 1。

表 1 选择离子流扫描参数

Table 1 Selective ion flow scan parameters

保留时间 (min)	扫描方式	扫描质量碎片 (amu)
0.00~14.99	SIM	86、71、41、43 ¹
15.00~30.71	SIM	60、87、45、43 ²

注:¹扫描物质是 3-甲基丁醛,²扫描物质是 3-甲基丁酸。

1.2.4 金黄色葡萄球菌生长数量测定 将 5.00 g 样品用 45 mL 生理盐水稀释,再经 10 倍梯度稀释至适宜的稀释度,采用平板菌落计数法进行金黄色葡萄球菌生长数量的测定。每个时间点做 3 个平行样品,进行两次重复试验。

1.3 数据处理

1.3.1 挥发性标记物响应强度 通过 Thermo Xcalibur 2.2SP1.48 软件报告标记物的峰面积,对于每个取样时间点,用金黄色葡萄球菌污染样品的峰面积值扣除肉样空白值后,再求平均值和标准偏差,用 Excel 2003 绘制挥发性标记物释放规律图。

1.3.2 金黄色葡萄球菌生长数量 对于每个取样时间点,金黄色葡萄球菌生长数量求平均值和标准偏差,用 Excel 2003 绘制细菌生长变化图。

1.3.3 金黄色葡萄球菌在不同熟畜肉中挥发性标记物释放与菌体生长相关性 采用 SPSS 18.0 对培养过程中金黄色葡萄球菌的生长数量与挥发性标记物响应强度之间做 Spearman 相关分析, $p < 0.01$ 表示差异极显著, $p < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 三种熟畜肉基质本底调查结果

试验所用猪肉、牛肉和羊肉样品均采自不同来源和不同部位,样品的挥发性标记物信号强度各不相同。猪肉样品的 3-甲基丁醛信号强度小于 5×10^6 counts × sec,3-甲基丁酸的信号强度与 3-甲基丁醛相近,小于 4×10^6 counts × sec(见表 2);牛肉样品的 3-甲基丁醛信号强度小于 2×10^7 counts × sec,3-甲基丁酸的信号强度小于 6×10^6 counts × sec(见表 3);羊肉样品的 3-甲基丁醛信号强度小于 3×10^7 counts × sec,3-甲基丁酸的信号强度明显低于 3-甲基丁醛,小于 4×10^6 counts × sec(见表 4)。另外,在检测的 20 个牛肉和羊肉样品中有少数几个样品的 3-甲基丁醛信号强度高于 10^7 counts × sec,而在检测的所有猪肉样品中 3-甲基丁醛信号强度均小于 10^7 counts × sec。

表 2 熟猪肉中标记物本底调查结果

Table 2 Survey results of the signal intensities of volatile markers from cooked pork

采样部位	采样地点	3-甲基丁醛 信号强度 (counts × sec)	3-甲基丁酸 信号强度 (counts × sec)
里脊	1 号零售肉摊	1.51×10^6	1.46×10^6
前腿	2 号零售肉摊	5.38×10^5	2.88×10^6
后腿	3 号零售肉摊	5.61×10^5	3.08×10^6
前腿	4 号零售肉摊	3.62×10^5	1.61×10^6
后腿	5 号零售肉摊	1.72×10^6	1.68×10^6
后腿	1 号超市	9.37×10^5	4.01×10^5
前腿	1 号超市	6.84×10^5	2.75×10^5
里脊 1	1 号超市	9.18×10^5	5.05×10^5
里脊 2	1 号超市	1.76×10^5	2.56×10^5
前夹	1 号超市	2.36×10^5	7.62×10^4
里脊 1	便利店	1.50×10^6	5.63×10^4
里脊 2	便利店	1.84×10^6	4.55×10^4
后腿	便利店	1.70×10^6	7.18×10^4
前夹	便利店	3.56×10^6	1.17×10^5
腰柳	便利店	4.93×10^6	1.01×10^5
前腿	便利店	4.09×10^6	5.48×10^5
腰柳	2 号超市	1.73×10^6	2.30×10^5
前夹	2 号超市	1.55×10^6	1.68×10^5
里脊	2 号超市	1.45×10^6	2.85×10^5
腰柳	2 号超市	5.30×10^5	1.46×10^5

表 3 熟牛肉中标记物本底调查结果

Table 3 Survey results of the signal intensities of volatile markers from cooked beef

采样部位	采样地点	3-甲基丁醛 信号强度 (counts × sec)	3-甲基丁酸 信号强度 (counts × sec)
瓜条 1	2 号超市	1.55×10^6	4.34×10^5
瓜条 2	2 号超市	2.57×10^6	7.94×10^5
牛肩	2 号超市	1.82×10^6	9.94×10^5
牛腩	2 号超市	1.19×10^6	1.77×10^6
牛腿	2 号超市	1.20×10^6	1.27×10^6
筋肉	2 号超市	1.12×10^6	8.14×10^5
牛肩	6 号零售肉摊	1.32×10^7	2.59×10^6
瓜条 1	6 号零售肉摊	2.83×10^6	9.88×10^5
瓜条 2	6 号零售肉摊	1.30×10^7	3.87×10^6
后腿	6 号零售肉摊	3.07×10^6	7.99×10^5
瓜条	1 号超市	2.75×10^6	2.95×10^5
背柳	1 号超市	1.39×10^7	2.73×10^6
后腿	1 号超市	1.51×10^6	4.29×10^5
牛肩	1 号超市	1.36×10^7	9.21×10^5
里脊	1 号超市	9.05×10^5	1.28×10^6
牛腩	7 号批零肉摊	5.45×10^5	8.32×10^5
前夹	7 号批零肉摊	2.80×10^6	4.88×10^6
前腿	7 号批零肉摊	2.01×10^6	1.14×10^6
前腿	8 号批零肉摊	2.47×10^6	5.55×10^6
腰柳	8 号批零肉摊	2.43×10^6	2.94×10^6

表4 熟羊肉中标记物本底值的调查结果

Table 4 Survey results of the signal intensities of volatile markers from cooked mutton

采样部位	采样地点	3-甲基丁醛 信号强度 (counts × sec)	3-甲基丁酸 信号强度 (counts × sec)
羊背1	1号牧业有限公司	2.17×10^7	1.08×10^6
羊背2	1号牧业有限公司	1.18×10^7	4.87×10^5
羊背3	1号牧业有限公司	6.79×10^6	4.36×10^5
羊腿1	1号牧业有限公司	1.51×10^7	8.01×10^5
羊腿2	1号牧业有限公司	1.03×10^7	8.90×10^5
羊腿3	1号牧业有限公司	9.33×10^6	6.52×10^5
羊臂1	1号牧业有限公司	1.22×10^7	6.14×10^5
羊臂2	1号牧业有限公司	9.89×10^6	4.81×10^5
羊脖	9号批零肉摊	3.65×10^6	3.63×10^6
羊肩1	9号批零肉摊	1.87×10^6	1.85×10^6
羊肩2	9号批零肉摊	1.17×10^6	1.15×10^6
羊脖	9号批零肉摊	1.08×10^6	1.06×10^6
羊肚	9号批零肉摊	5.47×10^5	5.24×10^5
羊肩	9号批零肉摊	1.36×10^6	1.34×10^6
羊腿	9号批零肉摊	8.04×10^5	7.82×10^5
羊排	9号批零肉摊	4.27×10^5	4.04×10^5
羊腿1	10号零售肉摊	8.77×10^5	8.54×10^5
羊腿2	10号零售肉摊	7.52×10^5	7.29×10^5
羊腿3	10号零售肉摊	4.11×10^6	1.03×10^6
羊排	10号零售肉摊	3.85×10^6	6.74×10^5

2.2 金黄色葡萄球菌在不同畜肉基质中挥发性标记物释放与菌体生长情况

2.2.1 熟猪肉中金黄色葡萄球菌挥发性标记物释放与菌体生长情况 试验所用猪肉空白样品的3-甲基丁醛信号强度是 1.76×10^5 counts × sec, 3-甲基丁酸信号强度是 2.56×10^5 counts × sec, 在表2猪肉本底值范围以内。由图1可知,金黄色葡萄球菌在熟猪肉上生长时,37℃培养至12h时3-甲基丁醛出现首次显著增长($p < 0.05$),到18h时,3-甲基丁醛的累积强度达到最大值(2.22×10^7 counts × sec),18~24h,3-甲基丁醛的强度迅速降低至0。3-甲基丁酸信号培养至14h时出现首次显著增长($p < 0.05$),之后逐渐上升,直至24h达到 2.48×10^7 counts × sec。在整个培养过程中,3-甲基丁醛的信号检测时间略早于3-甲基丁酸,3-甲基丁醛的信号强度增至最大值后迅速下降至0,而3-甲基丁酸的信号强度呈持续增长趋势。由图2可知,在熟猪肉上,37℃下金黄色葡萄球菌的对数生长期约在2~14h之间,之后进入稳定期,最终菌体生长量可以达到 1.75×10^9 CFU/g。

2.2.2 熟牛肉中金黄色葡萄球菌挥发性标记物释放与菌体生长情况 试验所用牛肉空白样品的3-甲基丁醛信号强度是 2.75×10^6 counts × sec, 3-甲基丁酸信号强度是 2.95×10^5 counts × sec, 在表3牛肉本底值范围以内。由图3可知,金黄色葡萄球菌在熟牛肉上生长时,37℃培养至12h时,3-甲基丁醛出现首次显著增长($p < 0.05$),到18h时3-甲基丁醛的

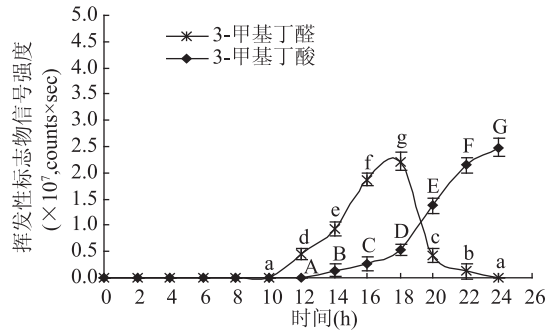


图1 熟猪肉中金黄色葡萄球菌挥发性标记物的释放规律

Fig.1 Release of volatile markers of *Staphylococcus aureus* growing on cooked pork

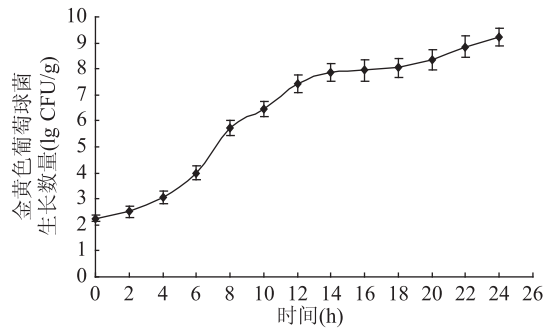


图2 熟猪肉中金黄色葡萄球菌的生长情况

Fig.2 Growth of *Staphylococcus aureus* growing on cooked pork

累积强度达到最大值(4.48×10^7 counts × sec),从18h到24h,3-甲基丁醛的强度迅速降低至0。3-甲基丁酸的信号培养至14h时出现首次显著增长($p < 0.05$),之后逐渐上升,直至24h达到 3.27×10^7 counts × sec。在整个培养过程中,3-甲基丁醛的信号检测时间略早于3-甲基丁酸,3-甲基丁醛的信号强度增至最大值后迅速下降至0,而3-甲基丁酸的信号强度呈持续增长趋势。由图4可知,在熟牛肉上,金黄色葡萄球菌的对数生长期约在2~16h之间,之后进入稳定期,最终菌体生长量可以达到 1.96×10^9 CFU/g。

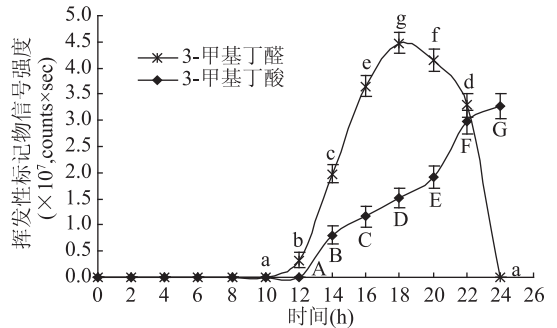


图3 熟牛肉中金黄色葡萄球菌挥发性标记物的释放规律

Fig.3 Release of volatile markers of *Staphylococcus aureus* on cooked beef

2.2.3 熟羊肉中金黄色葡萄球菌挥发性标记物释放与菌体生长情况 试验所用羊肉空白样品的3-甲基丁醛信号强度是 3.85×10^6 counts × sec, 3-甲基丁酸信号强度是 6.74×10^5 counts × sec, 在表4羊肉本底

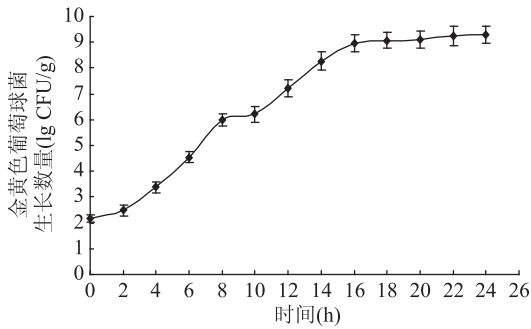


图4 熟牛肉中金黄色葡萄球菌的菌体生长情况

Fig.4 Growth of *Staphylococcus aureus* on cooked beef

值范围以内。由图5可知,金黄色葡萄球菌在熟羊肉上生长时,37℃培养至12h时,3-甲基丁醛出现首次显著增长($p < 0.05$),到18h时,3-甲基丁醛的累积强度达到最大值($8.05 \times 10^7 \text{ counts} \times \text{sec}$),从18h到24h,3-甲基丁醛的强度迅速降低至0。3-甲基丁酸的信号培养至14h时,出现首次显著增长($p < 0.05$),之后逐渐上升,直至24h达到 $6.33 \times 10^7 \text{ counts} \times \text{sec}$ 。在培养过程中,3-甲基丁醛的信号检测时间早于3-甲基丁酸,3-甲基丁醛的信号强度增至最大值后迅速下降至0,而3-甲基丁酸的信号强度在24h内持续增长。由图6可知,在熟羊肉上,金黄色葡萄球菌的对数生长期约在2~14h之间,之后进入稳定期,最终菌体生长量可以达到 $2.84 \times 10^9 \text{ CFU/g}$ 。

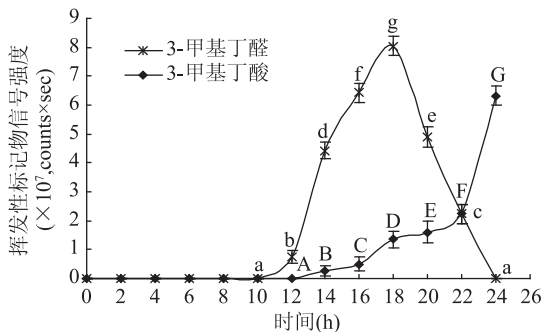


图5 熟羊肉中金黄色葡萄球菌挥发性标记物的释放规律

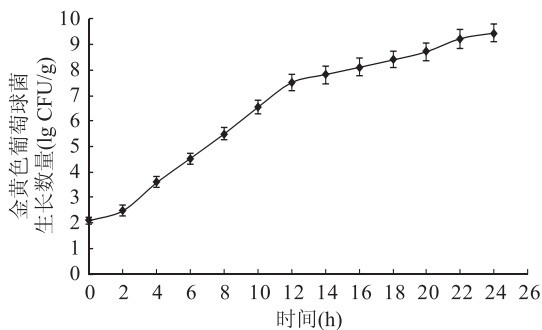
Fig.5 Release of volatile markers of *Staphylococcus aureus* on cooked mutton

图6 熟羊肉中金黄色葡萄球菌生长情况

Fig.6 Growth of *Staphylococcus aureus* growing on cooked mutton

2.2.4 挥发性标记物出现首次显著增长对应的金黄色葡萄球菌生长水平分析 由图1~图6可知,在熟

猪肉中,3-甲基丁醛首次显著($p < 0.05$)增长对应的金黄色葡萄球菌生长数量为 $2.68 \times 10^7 \text{ CFU/g}$,3-甲基丁酸首次显著增长对应的金黄色葡萄球菌生长数量为 $7.35 \times 10^7 \text{ CFU/g}$ 。在熟牛肉中,金黄色葡萄球菌生长至 $1.67 \times 10^7 \text{ CFU/g}$ 时,3-甲基丁醛出现首次增长,金黄色葡萄球菌菌体达到 $1.85 \times 10^8 \text{ CFU/g}$ 时,3-甲基丁酸出现首次增长。在熟羊肉中,3-甲基丁醛首次显著增长对应的金黄色葡萄球菌生长数量为 $1.25 \times 10^7 \text{ CFU/g}$,3-甲基丁酸首次显著($p < 0.05$)增长对应的金黄色葡萄球菌生长数量为 $8.65 \times 10^7 \text{ CFU/g}$ 。可见,当金黄色葡萄球菌生长达到 10^7 CFU/g 时3-甲基丁醛信号可被明显检出,而3-甲基丁酸信号则需要金黄色葡萄球菌生长量接近 10^8 CFU/g 时才可被明显检测到。

2.3 金黄色葡萄球菌在不同熟畜肉中挥发性标记物释放与菌体生长相关分析

鉴于金黄色葡萄球菌在熟猪肉、熟牛肉和熟羊肉中培养18h之后,3-甲基丁醛的信号强度均显著降低($p < 0.05$),针对0~18h培养过程,检测到3-甲基丁醛的信号强度与细菌菌体生长数量之间均呈极显著相关($p < 0.01$,见表5)。在0~24h整个培养过程中,检测到3-甲基丁酸的信号强度与细菌菌体生长数量之间均呈极显著相关($p < 0.01$,见表5)。

表5 三种熟肉中金黄色葡萄球菌挥发性标记物与菌体生长的 Spearman 相关系数

Table 5 Spearman correlation coefficients of

volatile markers and bacterial growth on three cooked meats

	熟猪肉	熟牛肉	熟羊肉
3-甲基丁醛	0.888 **	0.813 **	0.888 **
3-甲基丁酸	0.920 **	0.920 **	0.920 **

注:**表示差异极显著, $p < 0.01$ 。

3 讨论

徐薇薇等^[15]报道了3-甲基丁醛是宁夏滩羊后腿肉的关键风味成分之一。Takakura等^[16]采用二乙醚萃取结合气相色谱质谱分析牛肉的风味物质,得到3-甲基丁酸是对牛肉风味有积极贡献的香味活性化合物。Inagaki等^[17]分析了日本神户牛肉和澳洲牛肉的风味特征,从两种牛肉样品中均检出3-甲基丁酸。再者,不同的烹饪条件包括加热温度和加热时间等都会影响到肉质化学反应的类型和程度,进而直接影响风味物质的形成。Pulgar等^[18]发现,在真空低温烹调猪肉时,与60℃相比,80℃烹饪的猪肉样品被检出更高含量的3-甲基丁醛,进而推测加热温度越高越利于氨基酸的降解反应产生更高含量的3-甲基丁醛。张迪雅等^[19]也得出,与60℃加热相比,120℃加热的牛肉中3-甲基丁醛明显增多。3-甲基丁醛是亮氨酸的Strecker降解产物,3-甲基丁醛进一步氧化则形成3-甲基丁酸。本实验中采用的猪肉、牛肉和羊肉样品都是经过高压灭菌处理(121℃,101kPa,15min),从三种肉样中检出一定强度的3-甲基丁醛和3-甲基丁酸,提示在建立基于挥发性标记物检测肉中金黄色葡萄球菌方法时首先

要考虑肉的本底值情况。

本研究结果得出,3-甲基丁醛和3-甲基丁酸出现首次显著($p < 0.05$)增长对应的金黄色葡萄球菌生长量分别约为 10^7 和 10^8 CFU/g。同样,在 Filipiak 等^[11]的研究中也指出,金黄色葡萄球菌在 TSB 中培养时,菌体生长量分别达到 7×10^6 和 5×10^7 CFU/mL 时 3-甲基丁醛和 3-甲基丁酸才出现首次显著增长。Hettinga 等^[20]研究也表明,在牛乳中,金黄色葡萄球菌的生长达到 10^7 CFU/mL 时其典型的挥发性代谢产物才会积累达到可检测水平。这说明,只有当金黄色葡萄球菌的生长水平达到某个阈值时,挥发性代谢产物才会出现明显增长。对于其他微生物而言,挥发性代谢产物释放特征也有相似报道^[21]。研究已证实,食物中金黄色葡萄球菌数量高于 10^5 CFU/(g 或 mL)是肠毒素产生的必要条件,肠毒素是引发葡萄球菌食物中毒的主要原因^[22]。因此,推测 3-甲基丁醛和 3-甲基丁酸在作为金黄色葡萄球菌污染食物的标记物的同时,该两个标记物的检出还可以指示食物的不安全状态。

随着当前检测技术手段和统计分析方法的不断完善,气味指纹技术和气味标记物技术在肉品品质及安全检测中具有广阔的应用前景^[23]。该技术具有敏感、快速、样品用量少、操作简单、不采用溶剂等优势,满足肉品安全的在线检测需要。金伟平等^[24]采用顶空固相微萃取-气质联用法分析了单核细胞增生李斯特菌污染冷藏牛肉的挥发性物质,找出了可以表征冷藏牛肉被单增李斯特菌污染的特征性气味物质。Xu 等^[25-26]对自然污染和人工污染鼠伤寒沙门氏杆菌的猪肉进行了挥发性和非挥发性代谢物质分析,不仅采用多元统计分析能将两类样品区分开,还鉴定出了准确区分两类样品的 17 个非挥发性代谢产物和 16 个挥发性代谢产物。这些研究报道说明,肉品营养丰富,易受微生物污染,其次级代谢产物会产生特定的挥发性气味物质,基于这点可以利用气味技术检测肉中的微生物。然而,目前未见金黄色葡萄球菌污染肉的气味检测技术报道。在前期研究基础上,本研究以 3-甲基丁醛和 3-甲基丁酸为金黄色葡萄球菌的挥发性标记物,发现在不同类型的畜肉中金黄色葡萄球菌标记物释放与细菌生长均呈现良好的相关性,说明畜肉的类型不会影响标记物释放与菌体生长的关联,为建立基于挥发性标记物的金黄色葡萄球菌生长预测模型提供基础数据。

4 结论

从熟猪肉、牛肉和羊肉基质中均检出一定强度的挥发性标记物(3-甲基丁醛和 3-甲基丁酸),检测值只有明显高于此本底值时,才可判定肉中存在金黄色葡萄球菌污染。金黄色葡萄球菌在畜肉中生长时,菌体生长量分别达到 10^7 、 10^8 CFU/g 时才能明显检测到 3-甲基丁醛和 3-甲基丁酸信号的增长,分别在 0~18 h 和 0~24 h 培养期间,3-甲基丁醛和 3-甲基丁酸释放与菌体生长极显著相关($p < 0.01$)。

参考文献

- [1] 容冬丽,吴清平,吴诗,等.我国部分地区即食食品和蔬菜中金黄色葡萄球菌污染分布及耐药和基因分型情况[J].微生物学报,2018,58(2):314-323.
- [2] 鲁延迅,肖甜甜,宋军,等.凉菜与熟肉中金黄色葡萄球菌与大肠菌群的分离鉴定及污染分析[J].中国卫生检验杂志,2015,25(2):184-186.
- [3] Young C P, O' Donoghue M M, Ho J, et al. High levels of *Staphylococcus aureus* contamination in Chinese style roast pork [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2014, 11(7): 552-554.
- [4] 许振伟,韩奕奕,孟瑾,等.熟食肉制品中金黄色葡萄球菌风险评估基础研究[J].包装与食品机械,2012,30(5):40-43.
- [5] Tait E, Perry J D, Stanforth S P, et al. Use of volatile compounds as a diagnostic tool for the detection of pathogenic bacteria[J]. Trends in Analytical Chemistry, 2014, 53: 117-125.
- [6] 吴清平,李玉冬,张菊梅.常见食源性致病菌代谢组学研究进展[J].微生物学通报,2016,43(3):609-618.
- [7] Lemfack M C, Gohlke B O, Toguem S M T, et al. A database of microbial volatiles [J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(1): D1261-D1265.
- [8] 陈娟,史辉,王琼,等.细菌挥发性代谢产物的类型、检测技术及应用[J].微生物学杂志,2015,35(1):89-94.
- [9] Boots A W, Smolinska A, Van Berkel J J, et al. Identification of microorganisms based on headspace analysis of volatile organic compounds by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Journal of Breath Research, 2014, 8(2): 27106.
- [10] Ratiu I A, Bocos-Bintintan V, Patrut A, et al. Discrimination of bacteria by rapid sensing their metabolic volatiles using an aspiration-type ion mobility spectrometer (a-IMS) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) [J]. Analytica Chimica Acta, 2017, 982: 209-217.
- [11] Filipiak W, Sponring A, Baur M M, et al. Molecular analysis of volatile metabolites released specifically by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* [J]. BMC Microbiology, 2012, 12(1): 113.
- [12] Bos L D, Sterk P J, Schultz M J. Volatile metabolites of pathogens: A systematic review [J]. Plos Pathogens, 2013, 9(5): 210-216.
- [13] Chen J, Tang J, Shi H, et al. Characteristics of volatile organic compounds produced from five pathogenic bacteria by headspace-solid phase micro-extraction-gas chromatography/mass spectrometry [J]. Journal of Basic Microbiology, 2017, 57(3): 228-237.
- [14] 史辉,唐俊妮,陈娟,等.顶空固相微萃取分析金黄色葡萄球菌挥发性代谢产物的条件优化[J].食品科学,2015,36(12):185-190.
- [15] 徐薇薇,姚瑞基,袁维新,等.宁夏滩羊后腿肉营养评价及挥发性风味物质分析[J].肉类研究,2017,31(10):41-45.
- [16] Takakura Y, Sakamoto T, Hirai S, et al. Characterization of the key aroma compounds in beef extract using aroma extract dilution analysis [J]. Meat Science, 2014, 97(1): 27-31.
- [17] Inagaki S, Amano Y, Kumazawa K. Identification and characterization of volatile components causing the characteristic

- [6]汪泰,顾文宏,何军,等.辣木新资源食品研究进展[J].食品工业科技,2017,38(8):363-368.
- [7]Zhou C L, Mi L, Hu X Y, et al.Evaluation of three pumpkin species: Correlation with physicochemical, antioxidant properties and classification using SPME-GC-MS and E-nose methods [J]. Journal Food Science and Technology, 2017, 54 (10): 3118-3131.
- [8]Tiloke C, Anand K M, Gengan R, et al.*Moringa oleifera* and their phytonanoparticles: Potential antiproliferative agents against cancer[J].Biomedicine & Pharmacotherapy,2018,108:457-466.
- [9]Bolaños X, Vega R C, Camacho R R, et al.*Moringa* infusion (*Moringa oleifera*) rich in phenolic compounds and high antioxidant capacity attenuate nitric oxide pro-inflammatory mediator *in vitro* [J].Industrial Crops and Products,2018,118:95-101.
- [10]Jayawardana B C, Liyanage R, Lalantha N, et al.Antioxidant and antimicrobial activity of drumstick (*Moringa oleifera*) leaves in herbal chicken sausages [J].LWT-Food Science and Technology, 2015, 64 (2): 1204-1208.
- [11]Yang F, Liu X, Ren X, et al.Swirling cavitation improves the emulsifying properties of commercial soy protein isolate [J]. Ultrasonics Sonochemistry,2018,42:471-481.
- [12]Falowo A B, Mukumbo F E, Idamokoro E M, et al.Multi-functional application of *Moringa oleifera* Lam.in nutrition and animal food products:A review [J].Food Research International, 2018, 106;317.
- [13]施娅楠,和丽菊,赵存朝,等.辣木叶渣中非水溶性蛋白及酶解效果研究[J].食品研究与开发,2018(2):103-108.
- [14]韩志萍,黄茂芳,静玮,等.超滤分离纯化菠萝蛋白酶的研究[J].食品工业科技,2013,34(8):282-286.
- [15]Paula P C, Sousa D O, Oliveira J T, et al.A Protein isolate from *Moringa oleifera* leaves has hypoglycemic and antioxidant effects in alloxan-induced diabetic mice [J].Molecules,2017,22 (2): 271.
- [16]Kaushik P, Dowling K, Mcknight S, et al.Preparation, characterization and functional properties of flax seed protein isolate [J].Food Chemistry,2016,197(A):212-220.
- [17]Jemil I, Abdelhedi O, Nasri R, et al.Novel bioactive peptides from enzymatic hydrolysate of *Sardinella* (*Sardinella aurita*) muscle proteins hydrolysed by *Bacillus subtilis* A26 proteases [J]. Food Research International,2017,100(1):121.
- [18]Kobbi S, Balti R, Bougateg A, et al.Antibacterial activity of novel peptides isolated from protein hydrolysates of RuBisCO purified from green juice alfalfa [J].Journal of Functional Foods, 2015,18:703-713.
- [19]Shakeri A, Khakdan F, Soheili V, et al. Chemical composition, antibacterial activity, and cytotoxicity of essential oil from *Nepeta ucrainica* L. spp. kopetdaghensis [J]. Industrial Crops & Products,2014,58(7):315-321.
- [20]熊瑶.辣木叶蛋白质提取及其饮品研制[D].福州:福建农林大学,2012.
- [21]吕晓亚,白新鹏,伍曾利,等.辣木叶水溶性蛋白的超声-微波萃取及其性质研究[J].食品工业科技,2016,37(5):212-216.
- [22]陈英娇.苦荞蛋白酶解物的制备及抗菌活性的研究[D].上海:上海师范大学,2015:30-40.
- [23]Zhang Y, Wu Y T, Zheng W, et al.The antibacterial activity and antibacterial mechanism of a polysaccharide from *Cordyceps cicadae* [J].Journal of Functional Foods,2017,38:273-279.
- [24]Wald M, Schwarz K, Rehbein H, et al. Detection of antibacterial activity of an enzymatic hydrolysate generated by processing rainbow trout by-products with trout pepsin [J].Food Chemistry,2016,205:221-228.
- [25]Sikorska E, Stachurski O, Neubauer D, et al.Short arginine-rich lipopeptides: From self-assembly to antimicrobial activity [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2018,1860:2242-2251.
- [26]施永清,王巧巧,吴丹丽,等.响应面试验优化双酶酶解法制备鱼鳞抗菌肽工艺及其抑菌性能分析[J].食品科学,2018,39(6):155-161.
- [27]宋风霞,酶解苦荞蛋白制备抗菌肽及其在牛肉保鲜的研究[D].昆明:昆明理工大学,2017.
- [28]孙宜君.螺旋藻抗菌肽的纯化鉴定及其抑菌机理的研究[D].北京林业大学,2016:37-47.
- (上接第113页)
- flavor of Wagyu beef (Japanese black cattle) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2017,65(39):8691-8695.
- [18]Pulgar Del J S, Roldan M, Ruiz - Carrascal J. Volatile compounds profile of sous-vide cooked pork cheeks as affected by cooking conditions (vacuum packaging, temperature and time) [J]. Molecules,2013,18(10):12538-12547.
- [19]张迪雅,谢丹婷,李晔.应用电子鼻和 GC-MS 比较牛肉不同部位的挥发性物质组成 [J]. 食品工业科技,2017,38 (21): 241-246.
- [20]Hettinga K A, Van Valenberg H J, Lam T J, et al. The influence of incubation on the formation of volatile bacterial metabolites in mastitis milk [J].Journal of Dairy Science,2009,92 (10): 4901-4905.
- [21]Silcock P, Alothman M, Zardin E, et al.Microbially induced changes in the volatile constituents of fresh chilled pasteurized milk during storage [J]. Food Packaging and Shelf Life,2014,2 (2): 81-90.
- [22]Hennekinne J A, De Buyser M L, Dragacci S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2012, 36 (4): 815-836.
- [23]侯巧娟,王锡昌,刘源,等.气味指纹技术在肉品品质及安全检测中的应用 [J]. 食品科学,2011,32(7):327-331.
- [24]金伟平,黄志强,刘群群,等.顶空固相微萃取-气质联用法分析单增李斯特菌污染冷藏牛肉的挥发性物质 [J]. 食品科学,2012,33(2):243-247.
- [25]Xu Y, Cheung W, Winder C L, et al.VOC-based metabolic profiling for food spoilage detection with the application to detecting *Salmonella typhimurium* contaminated pork [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010, 397 (6): 2439-2449.
- [26]Xu Y, Cheung W, Winder C L, et al. Metabolic profiling of meat: Assessment of pork hygiene and contamination with *Salmonella typhimurium* [J]. Analyst,2011,136(3):508-514.