

蜡样芽孢杆菌在营养肉汤和维也纳香肠中的预测模型及其在生产中的应用

仪淑敏¹, 李远钊², 张培正¹, 卢晓凤³, 王巍⁴

(1. 云南农业大学 食品科技学院, 云南 昆明 650012) (2. 烟台出入境检验检疫局, 山东 烟台 264003)

(3. 山东农业大学 食品学院, 山东 泰安 271000) (4. 广西大学轻工与食品工程学院, 广西 南宁 530004)

摘要: 本文比较了蜡样芽孢杆菌在营养肉汤和维也纳香肠中的生长曲线, 发现它们具有很好的相关性, 可用芽孢杆菌在营养肉汤中的生长情况指导维也纳香肠的生产。然后根据蜡样芽孢杆菌在营养肉汤的生长情况, 提出维也纳香肠在生产中应注意的事项, 为维也纳香肠的生产提供参考。

关键词: 蜡样芽孢杆菌; 营养肉汤; 维也纳香肠; 预测模型

中图分类号: Q939.124; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)06-0011-04

Growth Models and Control Measures of *Bacillus cereus* in Nutritional Broth and Wienerwurst

YI Shu-min¹, LI Yuan-zhao², ZHANG Pei-zheng¹, LU Xiao-feng³, WANG Wei⁴

(1. College of Food Science and Technology, Yunan Agriculture University, Kunming 650201, China)

(2. Yantai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of P. R. China, Yantai 264000, China)

(3. College of Food Science and Technology, Shandong Agriculture University, Tai'an 271000, China)

(4. College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning, 530004, China)

Abstract: This article mainly developed the mathematic models of *Bacillus cereus* growth in nutritional broth and Wienerwurst at 25°C and 37°C. The growth characteristics of *Bacillus cereus* in the nutritional broth and its pollution in Wienerwurst production were also researched. In addition, some measures for controlling the *Bacillus cereus* in Wienerwurst were presented.

Key words: *bacillus cereus*; nutritional broth; wienerwurst; mathematic models

蜡样芽孢杆菌分布广泛, 常见于土壤、灰尘和污水中, 植物性食品和许多生熟食品中也常见。是一种好氧性、可以形成芽孢的、在厌氧情况下也可很好生长的革兰氏阳性杆菌^[1]。

早在 1973 年 Bulyba 等人就报道了污染蜡样芽孢杆菌的乳制品引起食物中毒^[2]。1994~2003 年 10 年内, 国内报道的蜡样芽孢杆菌食物中毒共 47 起, 其中 2541 人进食了被蜡样芽孢杆菌污染的食品, 中毒者 1758 人, 发病率 69.19%, 但是无人死亡^[3]。近几年又有蜡样芽孢杆菌引起食物中毒的报道。蜡样芽孢杆菌食物中毒有明显的季节性, 通常以夏秋季(6~10 月)最高, 污染 10⁶ 个/g 以上食物中毒发病率高于 60%。有报道

收稿日期: 2007-01-13

基金项目: 国家十五重大科技专项食品安全关键技术的综合示范(2001BA804A29); 通讯作者: 张培正

作者简介: 仪淑敏(1980-), 在读研究生, 研究方向为食品质量与安全

奶粉中 100 个/g 即可使以婴儿发病。其呕吐型、腹泻型的潜伏期分别为 0.5~5 h、8~16 h, 其毒素分别是小分子量、热稳定的多肽和大分子量蛋白, 一般的食物热处理时不能将其失活(耐热性的肠毒素需 100 °C 经 20 min 才能破坏)。

预测食品微生物学(Predictive Food Microbiology)^[5]是一个将微生物学、数学和统计学结合在一起的研究领域, 通过建立一些数学模型来预测微生物在一系列环境条件下的生长和死亡情况。

本试验研究了蜡样芽孢杆菌在营养肉汤和维也纳香肠中的生长特性。并根据其在营养肉汤的生长特性, 提出维也纳香肠生产中应注意的事项, 为维也纳香肠生产提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

蜡样芽孢杆菌：本实验室提供；

维也纳香肠：根据如下工艺流程制备。

生猪屠宰→分割→制陷灌肠→干燥、烟熏、蒸煮→预冷→真空包装→Co⁶⁰辐照后，-18℃保存备用

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器设备

拍击式均质器、灭菌锅、恒温培养箱、生化培养箱、酸度计、电子天平、1 mL加样器。

1.2.2 试剂

多粘菌素B、营养肉汤、平板计数琼脂、营养琼脂、NGKG培养基（蜡样芽孢杆菌选择性培养基）：市售；胰酪胨大豆多粘菌素肉汤：自制；NaCl、HCl、KOH、KH₂PO₄：分析纯。

1.3 试验方法

1.3.1 试剂的配置

磷酸盐缓冲稀释液的配制：在500 mL蒸馏水中溶解KH₂PO₄ 34.0 g，用1 mol/L NaOH溶液调pH值至7.2，再用蒸馏水稀释至1000 mL，制成储备液于冰箱中储存。取原液1.25 mL，用蒸馏水稀释至1000 mL，分装9 mL/管，121℃灭菌15 min后备用。

胰酪胨大豆多粘菌素肉汤的配制：将胰酪胨大豆肉汤煮沸2 min，分装大试管，每管15 mL，121℃高压灭菌15 min。临用时每管加入0.5%多粘菌素B溶液0.1 mL混匀即可。

1.3.2 接种

以无菌操作取蜡样芽孢杆菌琼脂斜面18~24 h的培养物，在无菌磷酸盐缓冲液中制成菌悬液，80℃水浴5 min后（可以将蜡样芽孢杆菌菌体致死，而其芽孢依然存在活性）适当稀释后使其浓度达到10³~10⁴ cfu/mL，取1 mL接种。

1.3.3 倒平板计数法测菌数

以无菌操作取1 mL不同稀释梯度的培养液，置于培养皿中，每个梯度做两个平行，然后倒入15 mL左右46℃的平板计数琼脂培养基，等平板计数琼脂培养基凝固后，倒放置于37℃培养箱中培养12~20 h后计数，同时做空白对比。

2 蜡样芽孢杆菌的预测模型的建立

2.1 蜡样芽孢杆菌的生长曲线

配置9 mL/管的营养肉汤（NaCl浓度为0.5%）若干管，接种后放置于25℃和37℃下培养，每隔一定时间取2管，倒平板计数法测菌数。用curxpt软件拟合营养肉汤中蜡样芽孢杆菌的生长曲线，得出回归模型。其生长曲线如图1。

由图1可得25℃和37℃下蜡样芽孢杆菌在营养肉汤中生长的拟合曲线分别为：

$$25\text{℃}: y = 16.798765 / [1 + \exp(6.656 - 0.46762491x)]^{1/4.8553941};$$

$$37\text{℃}: y = (7.29 \times 44.3 + 17.29x^{3.153}) / (44.3 + x^{3.153})$$

注：其中y为对应时间时的菌数；x为培养时间。

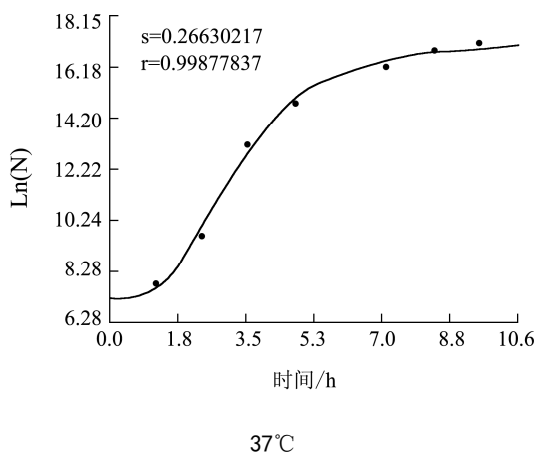
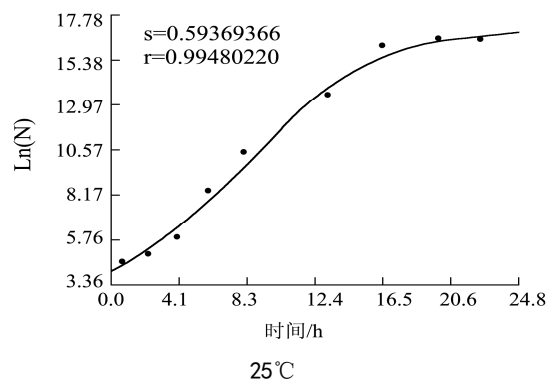


图1 25℃和37℃下蜡样芽孢杆菌在营养肉汤中的生长曲线

注：（1）r为相关系数；（2）Ln(N)以e为底数的细菌数的对数值，以下同。

2.2 维也纳香肠中蜡样芽孢杆菌的生长曲线

按无菌操作，取维也纳香肠500 g，切成1 g左右的肉丁后放入菌悬液中浸泡1 min，沥水1 min后（使接种水平保持在10²~10⁴ cfu/mL）放入若干个无菌的培养皿中，在25℃和37℃下厌氧培养。每隔一段时间，取1份，加9倍无菌磷酸盐缓冲液，均质后取均质液1 mL，用稀释倒平板法测菌数（每次做2个平行）。用curxpt软件拟合维也纳香肠中蜡样芽孢杆菌的生长曲线，得出回归模型。其生长曲线见图2。

由图2可以得到25℃和37℃下蜡样芽孢杆菌在香肠样品中生长的MMF Model:方程拟合曲线为：

$$25\text{℃}: y = (7 \times 5154 + 19.4 \times x^{2.48}) / (5154 + x^{2.48});$$

$$37\text{℃}: y = (6.53 \times 3163.7 + 17.7 \times x^{3.46}) / (3163.7 + x^{3.46})$$

注：其中y为对应时间时的菌数；x为培养时间。

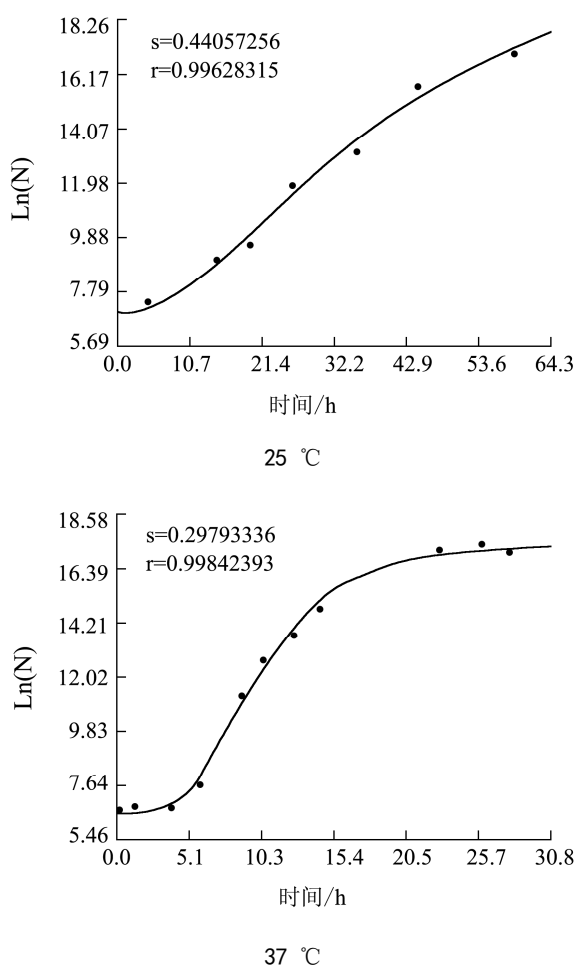


图2 25 °C和37 °C下蜡样芽孢杆菌在香肠样品中的生长曲线
2.3 分析

从图1、图2知,在25 °C、37 °C下建立蜡样芽孢杆菌在营养肉汤和维也纳香肠中的生长模型的相关指数较高,分别为0.99710338、0.99877837、0.99831090和0.99877973。虽然蜡样芽孢杆菌在营养肉汤和维也纳香肠中生长情况有差别,但是都在经历了一定时间的延迟期后,进入快速生长的对数生长期,进入对数生长期,蜡样芽孢杆菌增长的幅度较快,用蜡样芽孢杆菌在营养肉汤的生长环境可预测其在维也纳香肠中的生长情况。

3 预测模型的应用

3.1 香肠的NaCl添加量的确定

分别配制 NaCl 浓度为 0%、3.5%、5%、6.5%、9.5%、12.5%、15.5%、18.5% 营养肉汤 (pH=6.8~7.4), 加热溶解后分装 9 mL/管, 每个浓度分装 2 管, 121 °C 灭菌 15 min。接种, 摇匀, 置于 37 °C 培养箱中培养 8 h (接种量 2040 cfu/mL)。倒平板计数法测菌数, 结果如图 3。

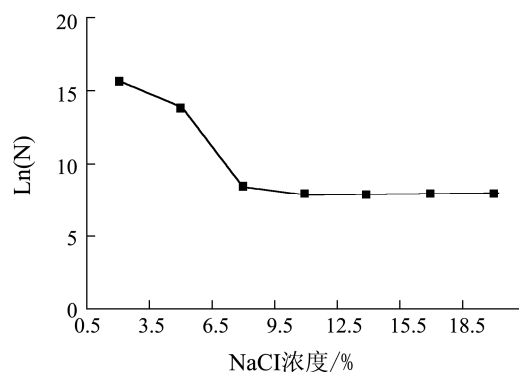


图3 NaCl 浓度对蜡样芽孢杆菌的影响

由图3可以看出蜡样芽孢杆菌可以在 NaCl 浓度为 0.5%~3.5% 之间可以较好的生长, 但是 NaCl 浓度的升高对蜡样芽孢杆菌的生长有一定的抑制作用, 在 3.5%~6.5% 之间明显受到抑制, 6.5%~18.5% 之间生长情况变化不大, 即菌体不生长或生长缓慢, 但不死去。

所以可以在人的口感可以接受的范围内, 向维也纳香肠增加 NaCl 的添加量, 这样有利于控制蜡样芽孢杆菌的生长。

3.2 加工环境温度的确定

配置 9 mL/管的营养肉汤 (NaCl 浓度为 0.5%) 24 管, 接种后放置到 10 °C、15 °C、20 °C、25 °C、30 °C、32 °C、34 °C、37 °C、39 °C、44 °C、50 °C、55 °C 培养箱中每个温度放 2 管。培养 12 h (接种水平 4450 cfu/mL)。倒平板计数法测菌数, 结果见图 4。

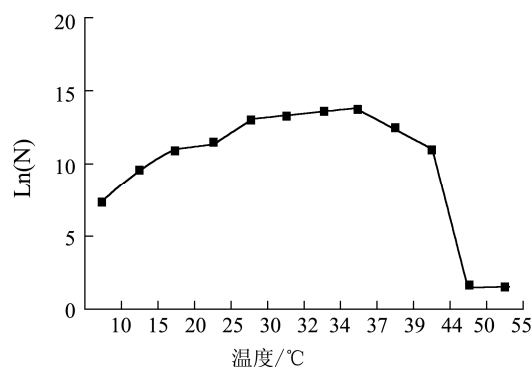


图4 温度对蜡样芽孢杆菌的影响

由图4可看出蜡样芽孢杆菌在15 °C以下生长缓慢甚至死亡, 25~30 °C生长良好, 最适温度在30~39 °C之间, 39~44 °C生长良好, 44 °C以上生长缓甚至死亡, 50 °C以上12 h以后菌体99%已经死亡。

由图4还可以看出 15~25 °C 之间蜡样芽孢杆菌可以缓慢生长, 车间生产加工环境一般都在 15 °C 以上, 所以应该更进一步控制环境卫生和原料肉中的微生物污染。

因此在维也纳香肠加工过程中,应该尽量降低加工环境的温度,以减缓微生物的生长繁殖。熏蒸以后(不能使蜡样芽孢杆菌的芽孢死掉)刚出炉的维也纳香肠温度一般在 55 °C 以上,这时一般没有蜡样芽孢杆菌菌体存在,但是如果预冷时处理措施不当很容易孳生微生物,故应该快速使维也纳香肠的温度降下来,缩短加工时间,降低加工环境温度。

3.3 原料pH值的确定

配置 9 mL/管的营养肉汤(NaCl 浓度为 0.5%),用 0.1 mol/L HCl 和 0.1 mol/L NaOH 溶液调 pH 值分别为 2、3、4、5、6、7、8、9 和 10、11,每个水平分装 2 管,121 °C 灭菌 15 min。接种,摇匀,置于 37 °C 培养箱中培养 8 h(接种水平 280 个/mL)。倒平板计数法测菌数,结果如图 5。

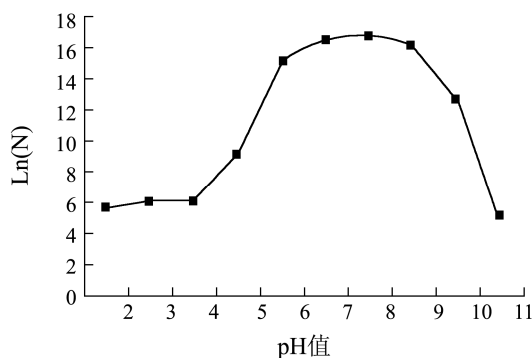


图 5 pH 对蜡样芽孢杆菌的影响

由图 5 可以看出蜡样芽孢杆菌在 pH 值在 2~4 之间基本不生长, pH 值在 4~6 之间生长缓慢, pH 值在

6~9 之间生长良好, pH 值 9 以上生长受到抑制,甚至死亡。

一般活体猪肌肉的 pH 值保持中性(7.0~7.2),如果宰前给予充分休息和良好的饲养,死后由于糖原酵解生成乳酸,肉的 pH 值逐渐下降。但是如果宰前没有给予生猪充分休息和良好的饲养,宰前生猪处于应激和兴奋状态,宰后动物组织的 pH 值接近 7.0,这非常有利于蜡样芽孢杆菌的生长繁殖,因而生猪在屠宰前应给予充分休息和良好的饲养,屠宰最好使用电击的方法。

参考文献

- [1] Bulyba, M. S., Kul'chskaya, I. I. and Domanskaya, E. D. Bacillus cereus food poisoning[J]. Voprosy Pitaniya, 1997, (1): 86-87
- [2] 吕荣.食物中毒研究近况[J].中国乡村医药杂志,2003,(10):51
- [3] Beate Fricke, Katharina Drmler, Ingo Willhardt a, et al. The cell envelope-bound metalloprotease (camelysin) from Bacillus cereus is a possible pathogenic factor [J]. Biochimica et Biophysica Acta,2001,1537:132-146
- [4] Finlay, W. J. J., Logan, N. A., Sutherland, A. D. Bacillus cereus produces most emetic toxin at lower temperatures [J]. Letters in Applied Microbiology,2000(31):385-389
- [5] Coleman M., Marks H..Topics in dose response modeling [J]. Journal of Food Protection, 1998,61:1550-1559

(上接第 16 页)

物质相当,对供试霉菌起抑制作用的物质可能是既能溶于水,也能溶于醇。相同菌悬液浓度条件下,要达到与蒲公英粗提液相当的抑菌效果,山梨酸钾的相对用量虽然比蒲公英粗提液低,但相差不是太大。可见,蒲公英的抑菌活性非常高。因此,蒲公英作为天然食品防腐剂是具有相当大的潜力。

蒲公英来源广泛,价格低廉,毒副作用小,具有广谱抗菌的作用,因此,蒲公英是理想的天然食品防腐剂,其深加工提取有关活性成分有待进一步的研究。

参考文献

- [1] 纪丽莲,张华强.八种菊科中草药抗霉菌及饲料霉变的研究[J].生命科学研究,2003,7(4):350-354
- [2] 周柏玲,杨丽莉,李蕾,等.丁香和桂皮提取物对果蔬抑菌效果的影响[J].保鲜与加工,2003,3(6):19-21
- [3] 向智男,宁正详.植物性天然防腐剂及其在食品中的应用[J].中国食品添加剂,2004,(3):79-82
- [4] 刘平,叶惠芬,陈惠玲,等.五种中药对产酶菌的抑菌作用[J].中国微生态学杂志,2006,18(1),39-40
- [5] 马振亚.中药抗病毒抗菌作用研究[M].中国医药科技出版社,2005,18-32