

类号：  
学号：2012406021

密级：内部保密3年  
单位代码：10759

# 石河子大学

## 硕士学位论文



### 新疆熏马肠中高产生物胺肠杆菌预测 模型的建立

学位申请人	段丽娇
指导教师	李开雄 教授
申请学位类别	专业硕士
专业名称	农业推广硕士
研究领域	食品加工与安全
所在学院	食品学院

中国·新疆·石河子

2014年4月

**Construction of growth predictive model of *Enterobacteriaceae* which  
has high levels of biogenic amines in Xinjiang smoked  
horse sausages**

A Dissertation Submitted to

**Shihezi University**

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

**Master of Agriculture**

By

Duan Lijiao

**(Food Processing and Safety)**

Dissertation Supervisor: Prof. Li Kaixiong

April, 2014

# 石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

## 学位论文独创性声明

本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：

袁丽娟

时间：2014年6月8日

## 使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：

袁丽娟

时间：2014年6月8日

导师签名：

李开雄

时间：2014年6月8日

## 摘 要

熏马肠是一种颇受新疆消费者喜爱的传统民族发酵肉制品，随着新疆与内地的交流不断增多，与此同时人们对新疆的特色产品也有了更多的了解，对它的需求也日益增多，因此作为熏马肠安全性问题之一的生物胺也逐渐得到人们的重视。在熏马肠的生产中发酵温度一般为 20~40℃，而成熟温度为 10~15℃。发酵阶段是微生物活动最活跃，也是微生物产生的氨基酸脱羧酶活性最高，生物胺积累的最初阶段。本文选取由课题组前期分离出的高产生物胺阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌，建立其在不同发酵温度的营养肉汤和熏马肠中的预测模型，同时也对这两种菌在熏马肠中产生生物胺的动力学变化进行分析并建立了相应的生物胺模型，以为熏马肠生产过程中高产生物胺肠杆菌的控制及生物胺累积机理的探究提供研究基础和理论依据，从而提高熏马肠的食用安全性。具体研究内容和结果如下：

### 1. 营养肉汤中阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌预测模型的建立

以课题组分离出的高产生物胺菌（阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌）为研究对象，运用修正的 Gompertz 模型建立了其在 15℃、20℃、25℃、30℃、35℃、40℃、45℃ 营养肉汤中一级和二级生长模型，以为这两种菌在熏马肠中动力学模型的建立提供理论基础和为这两种菌在其他方面的科研分析提供参考依据。实验结果显示：营养肉汤中阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌的生长极易受到温度的影响，选用修正的 Gompertz 模型，得出 7 个不同温度下营养肉汤中阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌的一级生长模型和二级模型，最终得出的模型  $R^2$  都在 0.80 以上，说明此模型拟合阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌的生长有较好的效果。还得出在相同温度下阴沟肠杆菌生长的迟滞期都要小于气味沙雷氏菌，说明阴沟肠杆菌更能适应环境。

### 2. 不同发酵条件下熏马肠中高产生物胺肠杆菌预测模型的建立

本研究与前一章的研究方法一致，建立了混合阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌在熏马肠不同发酵条件（20℃、25℃、30℃、35℃）下的一级和二级生长模型，并对模型进行验证。结果表明：通过将 20~35℃ 发酵温度范围内肠杆菌的生长数据带入修正的 Gompertz 模型，构建出了高产生物胺肠杆菌在熏马肠上生长预测的一级模型和二级模型；通过  $A_f$  和  $B_f$  对一级模型进行验证，得出准确因子和偏差因子的值均在 1 左右，表明一级模型能很好预测熏马肠不同发酵温度下肠杆菌的生长，二级模型中温度与生长速率以及延滞期之间也存在良好的线性关系，模型验证的残差值绝对值小于 1，以上说明 Gompertz 模型能够很好的拟合 20~35℃ 发酵温度范围内熏马肠中肠杆菌的生长。

### 3. 肠杆菌对熏马肠成熟中生物胺的动力学变化的影响及模型的建立

用高效液相色谱检测熏马肠在不同发酵条件下的生物胺量，分析不同发酵条件对高产生物胺产生生物胺的动力学变化的影响。结果表明：发酵温度对发酵阶段的生物胺量影响较小，但对成熟阶段影响较大。在成熟阶段 6 种生物胺的含量随着成熟时间的增加呈现先升高后下降的趋势，并且是发酵温度越高，生物胺的累积量越大，成熟后期生物胺的减小量越小。在发酵成熟阶段，pH 值呈现先下降后上升的趋势，成熟结束后 pH 值在 5.6~6.0 之间，肠杆菌总数呈现先下降后上升又逐渐下降

的趋势。通过对生物胺积累量、pH 和菌落总数的相关性分析得出生物胺积累量与 pH 呈负相关，pH 和菌落总数以及生物胺积累量和菌落总数之间不相关。

关键词：预测模型；生物胺；熏马肠；肠杆菌

## Abstract

Smoked horse sausage is a kind of traditional ethnic fermented meat products, which is popular among consumers in Xinjiang, with the more communications between Mainland and Xinjiang gradually, while the demand of smoked horse sausage becomes increasing. Therefore, as one of the security issues in smoked horse sausages, biogenic amines gradually is paid people's attention. The temperature of fermentation is generally 20~40°C and mature temperature is 10~15°C in the production of Smoked horse. Fermentation stage is the most active, and during this stage, microorganisms products the highest activity of amino acid decarboxylase, and also is the initial stages of accumulation of biogenic amines. In this research, we chose *Enterobacter cloacae* and *Odor marcescens* of high biogenic amines, built their prediction models in different fermentation temperatures in nutrient broth and smoked horse sausage, and also analyzed the change of dynamics between two bacteria in biogenic amines produced in smoked horse sausage, and built a corresponding model of biogenic amines, in order to provide research and theoretical basis on control of *Enterobacter* in the process of smoked horse sausages production and the mechanism to accumulation of biogenic amines, thereby improving edibility safety of smoked horse sausage. The contents and results are as follows:

### **1. The predictive models of *Enterobacter cloacae* and *Odor marcescens* in nutrient broth**

As the high biogenic amines bacteria (*Enterobacter cloacae* and *Odor marcescens*) in research group for the study, we used modified Gompertz model to build the primary and secondary models in nutrient broth at 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C and 45°C, in order to provide the theoretical basis of building kinetic models smoked horse sausage and provide a reference for scientific analysis of these two bacteria strains in other areas. Experimental results showed that: The growth of *Enterobacter cloacae* and *Odor marcescens* in nutrient broth vulnerable was influenced by temperature, this study used the modified Gompertz model, obtaining the primary and secondary growth model of *Enterobacter* and *Odor marcescens* at 7 different kinds of temperature, ultimately derived model  $R^2$  was above 0.80, indicating that this model fitted the growth of *Enterobacter cloacae* and *Odor marcescens* has a good effect. Also at the same temperature, the growing hysteresis of *Enterobacter cloacae* should be less than the *Odor marcescens*, it described that *Enterobacter cloacae* can more adapt to the environment.

### **2. Construction of growth predictive model of *Enterobacteriaceae* which has high levels of biogenic amines in smoked horse sausages under different fermentation conditions**

The methodology of this study is consistent with the previous chapter, we established the primary and secondary growing model mixed bacterial of *Enterobacter cloacae* and *Odor marcescens* under different fermentation conditions (20°C, 25°C, 30°C, 35°C) in smoked horse sausages, and tested the model. Experimental results showed that: By making the data of *Enterobacter* within 20 ~ 35 °C fermentation temperature into modified Gompertz model, and then getting growth predicting primary and secondary model of high levels of biogenic amines in smoked horse sausages; by testing primary model using the  $A_f$  and  $B_f$ , we can get the value of accurate factor and deviation factor was average about 1, it indicated that the model can well predict the growth of *Enterobacter* at different fermentation temperature in smoke horse intestinal, and from the second model, we can get there existed a good linear relationship among the temperature, growth rate and the lag phase, and the absolute value of the residuals model validation was less than 1. In conclusion, Gompertz model is well predicted the growth of *Enterobacteriaceae* at 20°C to

35°C on smoked horse sausages.

### **3. The impact of dynamic changes of intestinal Enterobacteriaceae smoked horse maturation of biogenic amines and the establishment of its model**

Using HPLC to test the biogenic amines on smoked horse sausage under different fermentation conditions, and analyzing the affect of the physical dynamics of the high-yield amine biogenic amines under different fermentation conditions. The results showed that: On fermentation stage the influence of fermentation temperature was small, but the impact on the mature stage was larger. In the mature stage , with increasing maturation time, the contents of 6 biogenic amines were rising at the first rise and then downing, and the higher fermentation temperature, the greater the accumulation of biogenic amines, the harder to reduce the amount of the smaller biogenic amines on the late stage of mature. At the fermentation and mature stage, pH showed the first decline and then rising, after mature the pH was between 5.6 to 6.0, the total number of *Enterobacteriaceae* showed a rising and gradually decreased after the first downward trend. Through the analysis on correlation of accumulation of biological amines, pH and the total number of colonies, we concluded accumulation of biogenic amines and pH were negatively correlated, no correlation among the pH, the total number of colonies, the accumulation of biogenic amines and the total number of colonies.

Keywords: predictive model; biogenic amines; smoked horse sausage; *Enterobacteriaceae*

# 目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	III
第一章 文献综述.....	2
1.1 生物胺及其危害.....	2
1.1.1 生物胺简介.....	2
1.1.2 生物胺的危害.....	2
1.2 发酵香肠中影响生物胺含量的因素.....	4
1.2.1 原料肉的影响.....	4
1.2.2 发酵剂的影响.....	4
1.2.3 微生物种类及含量的影响.....	5
1.2.4 pH 的影响.....	5
1.2.5 工艺条件的影响.....	6
1.3 预测微生物学的发展概况.....	6
1.3.1 预测微生物学.....	6
1.3.2 预测微生物学的研究进展.....	7
1.3.3 预测微生物学的应用.....	7
1.4 本研究的意义和内容.....	9
1.4.1 研究意义.....	9
1.4.2 技术路线.....	10
1.4.3 主要研究内容.....	10
第二章 营养肉汤中阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌预测模型的建立.....	11
2.1 实验材料.....	11
2.2.1 实验菌株.....	11
2.2.2 实验仪器和设备.....	11
2.2.3 培养基和试剂.....	11
2.2 实验方法.....	12
2.2.1 原菌液的制备.....	12
2.2.2 营养肉汤中肠杆菌计数.....	12
2.2.3 一级模型的建立.....	12
2.2.4 二级模型的建立.....	12
2.2.5 数据处理.....	12
2.3 结果与分析.....	13
2.3.1 不同温度下阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌的一级模型.....	13
2.3.2 利用修正 Gompertz 方程拟合阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌生长曲线的比较.....	14
2.3.3 不同温度条件下阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌的二级模型.....	17
2.4 讨论.....	17
2.5 结论.....	18
第三章 不同发酵条件下熏马肠中高产生物胺肠杆菌预测模型的建立.....	19
3.1.材料与方法.....	19
3.1.1 材料与仪器.....	19
3.1.2 实验方法.....	19

3.2.结果与分析.....	21
3.2.1 动力学一级模型的建立.....	21
3.2.2 一级模型的验证.....	22
3.2.3 动力学二级模型的建立.....	23
3.3 讨论.....	25
3.4 结论.....	25
第四章 肠杆菌对熏马肠成熟中生物胺的动力学变化的影响及模型的建立.....	26
4.1 材料与方法.....	26
4.1.1 材料与仪器.....	26
4.1.2 实验方法.....	27
4.1.3 生物胺的检测.....	27
4.1.4 细菌计数.....	28
4.1.5 pH 值的测定: .....	28
4.1.6 数据处理方法.....	28
4.2 结果与分析.....	28
4.2.1 混标的分离与分析.....	28
4.2.2 不同发酵条件下 6 种生物胺在香肠成熟期间的动态变化.....	29
4.2.3 菌数的变化.....	34
4.2.4 pH 的变化.....	34
4.2.5 生物胺模型.....	35
4.2.6 各实验组相关性分析.....	36
4.3 结论.....	37
第五章 结论与展望.....	38
5.1 结论.....	38
5.2 创新点.....	38
5.3 展望.....	38
参考文献.....	39
致谢.....	43
作者简介.....	44

## 第一章 文献综述

### 1.1 生物胺及其危害

#### 1.1.1 生物胺简介

生物胺是一类具有生物活性含氮的低分子量有机化合物的总称<sup>[1]</sup>。食品中的生物胺是由微生物或者自身产生的蛋白酶作用于蛋白质生成不同种的氨基酸,后由微生物分泌的脱羧酶作用形成的<sup>[2]</sup>。生物胺有促进生长、增强新陈代谢活力、加强肠道免疫系统、控制血压等重要的生理功能,在清除自由基方面也有一定的作用。但是,在人体内积累到较高数量时就会产生毒害,带来一些不良反应,如引起外部血管膨胀导致高血压和头痛<sup>[3]</sup>,以及腹部痉挛、腹泻和呕吐等,严重的还会危及生命。在非发酵的食品的也存在少量的生物胺,例如:巧克力、水果、蔬菜、肉、酒和乳类等;在发酵食品中,高浓度的生物胺作为氨基酸脱羧的产物而存在<sup>[4]</sup>。在发酵食品中生物胺含量很高的原因是在加工和贮存过程中,蛋白质在各种蛋白质酶的作用下不断的分解消化生成游离氨基酸,在微生物产的氨基酸脱羧酶的不断作用下脱羧产生生物胺。由此得知,生物胺的形成必须具备三个基本条件:可利用的前体物质氨基酸、产氨基酸脱羧酶的微生物、适合酶合成和保持酶活的环境条件。

根据结构可将生物胺分为:(1)脂肪族,包括尸胺、腐胺(Putrescine)、精胺和亚精胺等;(2)芳香族,即酪胺和苯乙胺等;(3)杂环胺,包括组胺和色胺等。按氨基酸数量的不同,又可将生物胺分为单胺化合物和二胺化合物和多胺化合物这三类。前者主要包括组胺、酪胺、尸胺、腐胺、色胺、苯乙胺等,二胺化合物包括腐胺和尸胺,后者包括精胺和亚精胺。比较重要的生物胺如组胺、色胺、酪胺和腐胺的前体物质分别为组氨酸、色氨酸、酪氨酸和鸟氨酸。

#### 1.1.2 生物胺的危害

生物胺是生物活性细胞必不可少的组分之一,它在保持生物膜的稳定性和调节核酸与蛋白质的合成等方面起着举足轻重的作用<sup>[5]</sup>。按生物胺的结构来分类。不同种类的生物胺对人体有不同的调节作用,如单胺类化合物对血管和肌肉有明显的舒张和收缩作用,对精神活动和大脑皮层有重要的调节作用;多胺在生物体的生长过程中能促进DNA、RNA和蛋白质的合成,以及加速生物体的生长发育等。虽然生物胺对于人体来说内具有非常重要的生理功能,但是当人体摄入过多的生物胺时,就会引起如头痛、恶心、心悸、血压变化、呼吸紊乱等过敏反应,严重的还会危及生命。不同种类生物胺对人体健康的毒害作用如表 1-1 所示:

表 1-1 生物胺的毒副作用<sup>[6,7,8,9,10]</sup>Table 1-1 The side effects of biogenic amines<sup>[6,7,8,9,10]</sup>

生物胺	毒副作用	文献来源
组胺	精神萎顿、精神分裂症、过敏、皮疹、呕吐、 腹泻、癌症、发烧，高血压	[8]
酪胺	偏头痛，高血压 精神萎顿、精神分裂症、 早老性痴呆症、帕金森症	[7]
色胺	高血压、精神萎顿、精神分裂症、肝毒性	[6, 9]
腐胺、尸胺	引起血压升高，破伤风，四肢痉挛， 心脏衰竭或脑出血	[9, 11]
5-羟色胺	精神萎顿、精神分裂症、早老性痴呆症、 帕金森症、焦虑、心慌、偏头痛、肥胖、脑病	[9]
苯乙胺	消除神经系统中的去甲肾上腺素，增加血压， 引起偏头痛	[6, 10]
多巴胺	精神分裂症、早老性痴呆症、帕金森症	[10]

表 1-1 列举了 8 种生物胺食用过量后的毒副作用及存在的潜在危害性，目前已受到有关食品卫生和公共健康领域的高度重视。许多研究发现生物胺的含量可以作为食品卫生、新鲜程度和被污染程度的指标,它还是某些食品成熟程度预测和是否遵循加工过程良好操作规范的依据<sup>[11]</sup>。生物胺存在于各类食品中，特别是蛋白质含量丰富的食品中，现已成为世界范围内公认的食品安全问题。虽然目前各国规定其最高限量不太一致，但是 BAs 对人类健康的影响不可忽视。因为高浓度的生物胺会对人和动物的身体造成一定的危害，所以生物胺已作为食品安全评价的一个参数<sup>[12]</sup>。近几年来各类食品中生物胺的检测手段不断的在改进和提高，关于生物胺的产生和累积机理、影响因素的研究备受关注，各国更是对个别食品中生物胺的含量做了限量规定。

食品中总生物胺含量为 1000mg/kg 时被认为是危险的，Shalaby<sup>[13]</sup>建议生物胺水平可以作为生产企业生产规范（GMP）的实践评价参数：酪胺为 100~800mg/kg，组胺为 50-100mg/kg，苯乙基胺<30.0mg/kg，而 Eerola<sup>[14]</sup>等提出了将对人体有危害的生物胺（酪胺，组胺，色胺，苯乙胺）作为评价企业卫生条件和香肠生产规范（GMP）的指标，都不应超过 200mg/kg。目前在肉类行业的研究中有一个共同的目标是就是希望通过相应的控制技术将香肠中的生物胺降到最低水平。我国也在为着这一共同目标而努力着，目前我国的国家标准中也对生物胺做了限量规定，例如鲑鱼中组胺含量应低于 1000mg/kg，其他鱼类中组胺含量应低于 300mg/kg<sup>[15,16]</sup>。上海的食品药品监督管理局也已对肉制品中组胺的量做了限量规定，应不大于 200mg/kg<sup>[17]</sup>。

## 1.2 发酵香肠中影响生物胺含量的因素

在传统食品中,传统发酵香肠是一个重要的部分。它们的特点通常是在小规模的操作单元下通过手工制作,通过其内部的一些特定的菌群自发发酵而成。肉类和肉类产品已报道含有生物胺。一些生物胺(酪胺,腐胺,尸胺等)的浓度在肉类及其制品的储存过程中通常会增加,而其他(亚精胺和精胺)减少或保持不变<sup>[18]</sup>。

在肉制品中生物胺含量的监测有利于对它们的毒理学风险的分析,而且还可以通过它们的量和比例确定原料和或生产质量管理规范的卫生指标。随着生物胺检测技术和控制技术的发展,如何将肉制品中的生物胺含量降到最低已成为了肉类行业的一个挑战<sup>[19]</sup>。要想实现这一目标就必须从它的产生累积机理,影响因素等方面考虑。以下列举了影响生物胺含量的5个因素:

### 1.2.1 原料肉的影响

选择原料肉是产品生产的初始环节,要选择优质的鲜、冻肉为原料,这是因为鲜、冻肉中初始的污染菌数要少。产品在生产过程中,在一定的时期内是处于适合微生物生长的环境下,即使使用了发酵剂,也不会抑制原料肉中有害微生物的生长<sup>[20]</sup>。从而使产品失去风味甚至造成产品腐败变质。发酵香肠在生产过程中没有蒸煮工艺,也就是说对产品最终微生物含量不做控制,多数情况下,这种香肠在食用前不做加热处理,所以加工期间发生的任何微生物变化都将影响到最终消费者。发酵香肠由于发酵成熟温度一般都在15℃以上,温度相对较高,如果不将初始的微生物数量加以控制,将会使一些有害微生物大量繁殖,进而产生一些有毒有害物质,比如生物胺,肠毒素等。

Russea<sup>[21]</sup>等研究发现,在严格的卫生加工条件下新鲜肉制作的香肠中只检测到了酪胺而且含量很低,而用冻肉在相同的加工条件下制成的香肠中也只检测到了酪胺,其最高水平达到约100mg/kg,而用在冷藏条件下放置的原料肉生产的香肠中检测到含有较高的肠球菌和肠杆菌数,在发酵过程中酪胺、尸胺和腐胺的量不断积累,其中尸胺的量高达340mg/kg。

### 1.2.2 发酵剂的影响

发酵剂对于改善产品品质和风味方面有很重要的研究意义,但发酵剂的广泛使用也影响了产品中生物胺的种类和含量。张海萍等在新疆熏马肠中加入了混合发酵剂(清酒乳杆菌和木糖葡萄球菌),以空白组为对照得出,混合发酵剂对不同的生物胺的抑制作用有所不同<sup>[22]</sup>。

T.Komprda<sup>[23]</sup>使用两种不同的发酵剂研究其在相同的制作工艺下产生物胺量的大小。结果发现:使用两种发酵剂,腐胺、酪胺的量都有升高,但组胺的量变化并非很大。但Bover-cid等与T.Komprda的研究结果不一致,他通过实验向香肠中添加不同的发酵剂来研究生物胺的变化情况,结果发现含有不同发酵剂的香肠中酪胺含量的变化差异性很大<sup>[24]</sup>。由此可见,发酵剂对产品中生物胺含量的影响并不简单,不同的发酵剂可能导致不同生物胺的累积。

### 1.2.3 微生物种类及含量的影响

食品的特性及其存在的微生物的种类对食品中生物胺的种类及含量的影响是不同的，与肉品中生物胺生成有关的主要微生物表 1-2 所示：

表 1-2 肉品中与生物胺生成有关的微生物

Table 1-2 The microorganisms connected to biogenic amines on meat products

细菌		酵母菌		霉菌	
肠杆菌科	微球菌球科	乳球菌属	链球菌属	法马塔假丝酵母	纳地青霉
柠檬酸杆菌	木糖葡萄球菌	乳杆菌	乳酸链球菌	汉逊氏德巴利酵母	产黄青霉
克雷伯氏菌	肉葡萄球菌	肠球菌	双乙酰乳链球菌		
埃希氏菌	变异微球菌	肉杆菌			
变形菌	乳微球菌	片球菌			
沙门氏菌		乳球菌			
志贺氏菌					

Latorre-Moratalla<sup>[25]</sup>在对香肠中的微生物对生物胺含量影响的研究中发现，肠杆菌具有较强的生物胺产生能力，在污染了肠杆菌的香肠中生物胺的含量远大于其他组的，还得出生物胺的含量最初是取决于原料肉中微生物的种类和数目，研究还发现在发酵成熟过程中精胺和亚精胺的含量处于相对稳定的状态，不会受到菌种的影响。某些微生物(如肠杆菌属、气味沙雷属、柠檬酸杆菌属等)其生长受发酵剂影响很小,原料肉如果污染了这些菌可能在未加工之前就已产生了大量的生物胺,在后续的加工中这些生物胺的含量会逐渐增加，给人体健康带来威胁。

### 1.2.4 pH 的影响

pH 值是影响氨基酸脱羧酶活动的一个关键因素。因此，pH 值是控制发酵肉制品中生物胺形成的一个重要的因素。在 80 多年前，koessler 指出,生物胺是由细菌的一个生理机制来抵消一个酸性环境形成的。Teodorovic (1994) 表明,氨基酸脱羧酶显示出 pH 值在 4.0 和 5.5 之间为最佳活动区域<sup>[26]</sup>。考虑到这些,降低 pH 值会增加脱羧酶活动,使细菌产生更多脱羧酶作为抵御外界环境所作出的反应。

Suzzi 和 Gardini<sup>[27]</sup> (2003)研究显示香肠 pH 值的降低是由乳酸发酵造成的，并且得出结论生物胺的产生和 pH 值呈相关性。然而，Yoshinaga 和 Frank(1982)<sup>[28]</sup>发现生物胺的形成取决于产脱羧酶细菌的生长,而不是本身的增长条件。Maijala<sup>[29]</sup>在 1995 年对干腌火腿的研究中发现 pH 值上升对具有脱羧酶活性微生物的生长具有促进作用。发酵剂可以很大程度上急剧以及快速的降低 pH 值来抑制产氨基酸脱羧酶活性微生物的活动（尤其是肠杆菌科）以此来减少生物胺的积累已众所周知。此外，乳酸菌可以在生产的发酵与成熟阶段储存起来而细菌则不行，这样就可以进一步控制过量生物胺产生，这也可以解释为什么低 pH 值没有导致高的生物胺量。

### 1.2.5 工艺条件的影响

赵中辉等<sup>[30]</sup>以 7 种生物胺为研究对象,研究了不同加工条件对生物胺含量变化的影响,得出实验所设定的超声、微波、加热的加工处理方法没有使生物胺含量减少。

Komprda<sup>[31]</sup>等报道称贮藏温度对发酵香肠中生物胺含量的影响差异很大,4℃贮藏结束时生物胺总量为室温贮藏时的四分之一。另外也有人研究证实发酵温度对发酵香肠中生物胺含量也有很大影响,发酵温度升高,会使发酵剂产酸速度加快,生物胺的积累量减少。Komprda<sup>[32]</sup>等研究了工艺条件对生物的影响,结果发现加入辣椒、直径小(4.5cm)和加入发酵剂戊糖片球菌的样品中酪胺和腐胺含量低于加入 hercules (一种香辛料)、直径大(7.0cm)和以弯曲乳杆菌+肉糖葡萄球菌为发酵剂的样品。

Fausto Gardini<sup>[33]</sup>等(2008)通过微生物学、化学、分子的方法对意大利北部的传统干发酵香肠在发酵和成熟过程中的粪肠球菌菌株 EF37 氨基酸脱羧酶活性的监测,得出影响它的酶活的因素有:发酵温度,氯化钠浓度,并添加葡萄糖的量的肉混合物。除了分析测定酪胺和苯乙胺积累和对肠球菌计数,还通过荧光定量 PCR 对酪氨酸脱羧酶基因(tdc)和它的 mRNA 转录物进行定性和定量。根据得到的数学模型,研究发现三个因素对早期肠球菌的生长有显著性和重要的作用,发酵温度对肠球菌活菌成熟的产品更具相关性的影响,氯化钠的浓度是最终酪胺和 2-苯乙胺的积累以及最终产品中酪氨酸脱羧酶水平的最重要的决定性因素,葡萄糖浓度对酪氨酸脱羧酶基因的表达影响是在最后的成熟阶段。

## 1.3 预测微生物学的发展概况

### 1.3.1 预测微生物学

#### 1.3.1.1 预测微生物学的定义

预测微生物学(predictive microbiology)是运用微生物学、统计学、数学和应用计算机学等方法,对食品中有害或有益微生物的生长、残存和死亡进行数量化,建立温度、酸碱度、水分活度、添加剂等外在环境因素与食品中微生物之间关系的数学模型<sup>[34]</sup>。它的主要目的是通过计算机和建立的相关配套软件,实现对产品质量和安全性的快速测定。近几年的研究也发现,将 HACCP 系统、栅栏技术和微生物预测学方法相结合,可以实现产品从生产到销售整个环节的智能化监控和管理。也就是说将从各个工序的关键控制点收集来的数据输入计算机,建立一个带有数据库的计算机软件,就可以利用计算机来设计新产品、新工艺,还可以为产品的设计、配方的调制、工艺流程和包装方式的设计提供合理化建议,以保证产品中微生物的稳定性,这样可以大大提高开发新产品的效率,保证产品品质的稳定性。

#### 1.3.1.2 预测微生物模型简介

预测模型的建立对于食品生产中的产品的设计、安全性评价和货架期的建立有很积极的意义<sup>[35]</sup>。目前, Buchanan 和 Whiting<sup>[36]</sup>提出的初级、次级和三级模型普遍受到研究者的认可。初级模型反应的是微生物数量随时间不断发生变化的函数关系,可以由模型计算出得出初始菌量、微生物生长延迟期、最大比生长速率、最大菌量等相关参数;

次级模型反映的是环境变量（如温度、氧气浓度、酸碱度、二氧化碳浓度、水分活度、防腐剂浓度和营养物质浓度等）与由初级模型得到各参数之间的函数关系<sup>[37]</sup>；三级模型也称为专家系统，是在初级模型和次级模型的基础上，通过计算机编程制作的微生物预测软件，同一种微生物的生长或失活情况可以根据环境因子的改变来预测<sup>[38]</sup>。这三类模型中分别含有多种不同的数学模型，这些预测模型可以描述特定情况下微生物生长和失活情况，表 1-3 为主要模型种类的统计结果：

表 1-3 预测模型的分类

Table1-3 The classification Prediction model

初级模型	二级模型	三级模型
Gompertz 模型	Belehradek 模型	ComBase 软件
Logistic 模型	Ratkowsky 模型	PMP 软件
Baranyi and Roberts 模型	Arrhenius 模型	Food Micro model 软件
Monod 模型	响应曲面/多项式模型	SSSP 软件
Richards 模型	修正的 Behlradek 模型	FSP 软件
修正的 Gomperts 模型	Williams-landel ferry 模型	FSLP 软件
Stannard 模型	概率模型	SymPrevious 软件
Schnute 模型	Gamma concept 模型	MKES 软件
Buchanan 模型	Cardinal Parameter 模型	Microbial Responses viewer

### 1.3.2 预测微生物学的研究进展

预测微生物学在近几年里有了突飞猛进的发展，世界各国根据本国的一些优势资源和技术已开发出了很多种预测微生物学软件，如美国农业部 ARS 东部地区研究中心（Pathogen Modeling Program (Ver 7.0)）：不仅可以预测病原菌的生长，还可以预测热死亡和放射线照射死亡等，Ver 7.0 以预测牛肉为对象，此软件的开发是预测微生物发展中的一次飞跃，使用时只需要输入微生物生长的影响因子（pH、温度、水分活度、添加剂等）和初始菌数，就可以得到微生物生长的迟滞期、代时和生长速率等生长数据；加拿大的微生物动态专家系统（Microbial Kinetics Expert System）：它要求输入的特征信息包括各环境因素参数、产品系统流程图和参数变化范围，该系统有一个缺陷就是未考虑化学危害对产品的影响；澳大利亚卓越食品安全中心（The Food Safety Toolkit）：是对食品工厂进行加强卫生管理体制教育和指导的教材；中国的东海水产研究所的（Fish Shelf Life-perdicyor）：主要用于罗非鱼品质控制和货架期的预测<sup>[39]</sup>。

### 1.3.3 预测微生物学的应用

#### 1.3.3.1 在预测货架期中的应用

预测微生物学在高蛋白食品（鱼类、乳类、红肉和禽类）货架期预测中应用比较广泛，主要为腐败菌对产品货架期的影响与预测。微生物是肉类产品腐败的主要因素，它的生长繁殖状况对产品的货架期有最直接的影响。建立微生物的生长模型，可以根据微

生物生长和失活的模型确定出影响微生物生长的最主要因素,通过模拟预测微生物的存活情况,设计出有应用价值的产品配方,选择出最佳的生产条件,减少产品开发的时间和成本。

食品货架期预测在食品领域的研究应用在近 20 年来有了显著的增加,目前,食品货架期的预测有以下两种方法:一是将食品放于特别恶劣的条件(如高温、高水分活度、低 pH 等)下贮藏,然后每隔一定时间进行品质检验(本实验是测定理化指标、感官评价和细菌总数),重复多次实验后得出结果。该方法一般会结合感官评定的方法检验食品的品质。最后将试验所得的结果外推,就可以得到产品在正常贮藏条件下的真实的货架期。二是依据动力学和化学的原理设计试验,得出温度与食品的品质指标(化学指标、物理指标、微生物指标等)之间的关系,从而实现了对食品保质期的预测<sup>[40]</sup>。

卢君逸等<sup>[41]</sup>以散装五香牛肉为研究对象,将其分别放在不同的温度下贮藏,测定样品中菌数的变化,运用 Gompertz 模型和平方根模型分别建立了一级模型和二级模型,最后用 Matlab7.0 对数据进行回归拟合,建立了散装五香牛肉货架期模型。

谢程炜等<sup>[42]</sup>为确定药膳型老鸭煲在常温(25℃)下的货架期,先是通过单因素实验确定出最优的杀菌温度,并对最优杀菌温度杀菌后药膳型老鸭煲采用加速货架期法,结合感官评定,以硫代巴比妥酸(TBA)值为测定指标建立了脂肪氧化的一级反应动力学方程,推测出药膳型老鸭煲在常温下的货架期为 213 天。

韩巍巍等<sup>[43]</sup>为了确定鲜切苹果中的微生物在不同贮藏温度下的生长模型及货架期模型,利用 Gompertz 模型建立了微生物在不同温度下的生长模型,结合贮藏过程中的感官评分和所建立的模型得出鲜切苹果在 20、10 和 4℃ 下的货架期分别为 1、3 和 7d。

### 1.3.3.2 在安全质量管理中的应用

危害分析与关键控制点(HACCP)是为了确保食品的安全而实行的一项预防性质量管理体系。它是通过对食品加工过程(食品原料、加工过程以及最终产品等)中各个步骤进行分析判定,确定对最终产品质量有影响的关键控制点并制定关键限值,并对整个生产过程进行监控,并采取相应控制措施,以确保食品的安全<sup>[44]</sup>。

在 HACCP 的建立过程中最常用到的就是栅栏技术,栅栏技术在建立过程中费时、费力,但将其与预测微生物学手段相结合,就可以快速的实现对产品在整个加工过程的智能化管理和控制<sup>[45]</sup>。如果要建立微生物预测信息库,需要考虑很多与食品质量相关的影响因子即栅栏因子(hurdle factor)。虽然全部的栅栏因子不能在一个预测模型中体现,但一般预测模型应该包括水分活度、添加剂、酸碱度、温度等几种主要的栅栏因子及其之间的相互作用。企业在生产时可以根据计算机数据库提供的作用信息为依据,来预测未成型产品的货架期以及在其中能生长繁殖的微生物的生长繁殖状况。

1990 年,以预测微生物学为依据,澳大利亚肉品工业制定出了肉制品从原料到成品再到运输、销售、零售以及储藏中的标准,此标准作为其 HACCP 体系的管理标准<sup>[46]</sup>。Sumner<sup>[47]</sup>在对大量冷却肉的调查研究中发现,在肉的冷却过程中,对于整箱的肉中心温度下降速度很慢,在此过程中随着冷却时间的延长有可能导致某些有害微生物的繁

殖，因此可以将此冷却过程作为一个关键控制点来对待。

### 1.3.3.3 在风险评估中的应用

风险管理的目的是将微生物控制在“可接受水平”，但究竟什么是“接受水平”，却是一个不确定的答案。例如由于一般成人具有完备的免疫系统，从而对微生物的感染具有一定的抵抗力。因此对不同产品、不同人群、不同微生物所进行的风险评估意义重大。将预测微生物学与风险评估相结合的研究方法在食品风险分析领域有这十分重要的意义，它可以通过对致腐或致病微生物在不同条件下生长、死亡变化的分析，得出致腐或致病微生物的暴露水平和浓度水平，从而进行风险定量分析和安全性评价<sup>[48]</sup>。

国内外对食品微生物风险评估方面做了很多的研究，也取得了很大的成效。美国政府已经完成了首例从农场到餐桌的食物微生物风险评估的模型,同时还对多种即食食品进行了单核李斯特菌的风险评估工作。

联合国粮食及农业组织（FAO）和世界卫生组织（WHO）在 2002 年对鸡肉、鸡蛋及其附属品中的沙门氏菌进行了风险分析和评估，以此来降低鸡肉中的沙门氏菌引起的疾病风险<sup>[49]</sup>。Oscar<sup>[50]</sup>在 2007 年建立了鸡肉中沙门氏菌在屠宰、加工、贮藏、运输、销售、蒸煮、供应和消费这几个过程中的风险评估。

朱英莲等<sup>[51]</sup>综述了国内外食品中微生物的生长预测模型和存活模型，以及与风险评估相结合的应用情况，得出目前国外在预测模型和风险评估方面的研究已有了一定的成果，我国对预测和风险评估结合应用的研究还处于刚刚起步阶段，应加大这方面的研究。

姬华<sup>[52]</sup>在 2010 年创建了创伤弧菌的定量风险评估的模型，该模型从风险评估的四个方面描述了对虾从零售到餐桌的消费中引起创伤弧菌感染的风险，并且还构建了食用对虾感染创伤弧菌导致食物中毒的风险评估报告。

黄驰云等<sup>[53]</sup>运用 Crystal Ball 2000 软件中的蒙特卡洛模拟来进行预测和风险分析。结合调查数据和一些假设，建立了在养殖（原料）、运输、加工、销售（货架期）和食用过程中大肠杆菌数和金黄色葡萄球菌的预测模型，并进行暴露性评估，确定出消费者最终的摄入量，构建了食用冻生虾仁感染两种菌导致食物中毒的风险评估报告。

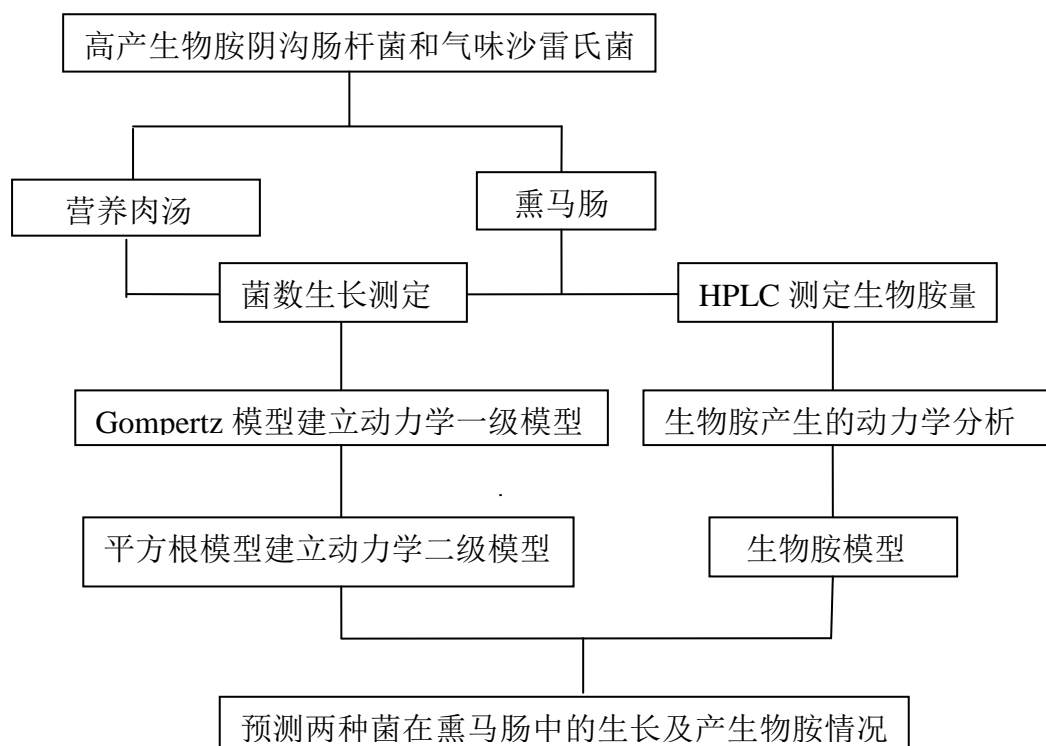
## 1.4 本研究的意义和内容

### 1.4.1 研究意义

新疆熏马肠是一种营养价值高、风味独特、颇受新疆消费者喜爱的传统民族发酵肉制品。随着新疆与内地交流的不断增多，人们对新疆的特色产品也有了更多的了解，对它的需求也日益增多，因此作为影响熏马肠安全性问题之一的生物胺也逐渐得到人们的重视。生物胺是人体的正常的生理组成成分，但生物胺也与一些影响健康的因子如一些高血压危象，头痛，恶心，血管活性，过敏反应相关，同时也关系到食品的腐败。生物胺含量影响着食品的安全和质量，肉和肉制品中的生物胺的水平可作为有害微生物的活性指标和良好的生产实践的评价指标。如今消费者需求的是高品质、便捷的、创新的、安全的具有天然风味肉类产品。所以说产品的风味和质量很重要，但安全同样重要。因此本课题在本实验室的研究基础上，选取高产生物胺阴沟肠杆菌与气味沙雷氏菌，将其

分别接种到营养肉汤与熏马肠中，建立其在不同发酵条件下的生长动力学模型及产生生物胺的动力学模型，以期为熏马肠生产过程中高产生物胺肠杆菌的控制及生物胺累积机理的探究提供研究基础和理论依据，从而提高熏马肠的食用安全性。

#### 1.4.2 技术路线



#### 1.4.3 主要研究内容

##### 1.4.3.1 阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌在营养肉汤中的生长动力学预测模型的建立

将菌接到营养肉汤中，达到初始菌数为  $10^1 \sim 10^3$  CFU/ml，然后置于  $15^\circ\text{C}$ 、 $20^\circ\text{C}$ 、 $30^\circ\text{C}$ 、 $40^\circ\text{C}$ 、 $45^\circ\text{C}$ 、 $50^\circ\text{C}$ 、生化培养箱中培养。每两小时取出样品进行菌落计数，用数据建立一级和二级预测模型，并对模型进行验证。

##### 1.4.3.2 阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌在熏马肠发酵成熟过程中的生长预测模型的建立

制备传统工艺熏马肠，接种后使熏马肠的初始菌数为  $10^3 \sim 10^4$  CFU/g，然后在分为以下五种条件下发酵成熟：a 发酵温度  $20^\circ\text{C}$  (36h)，成熟温度  $15^\circ\text{C}$ ；b 发酵温度  $25^\circ\text{C}$  (36h)，成熟温度  $15^\circ\text{C}$ ；c 发酵温度  $30^\circ\text{C}$  (24h)，成熟温度  $15^\circ\text{C}$ ；d 发酵温度  $35^\circ\text{C}$  (24h)，成熟温度  $15^\circ\text{C}$ ；e 发酵温度  $40^\circ\text{C}$  (12h)，成熟温度  $15^\circ\text{C}$ ；f 发酵温度  $45^\circ\text{C}$  (12h)，成熟温度  $15^\circ\text{C}$ 。然后每两小时取出样品进行菌落计数，用数据建立一级和二级预测模型，并对模型进行验证。

##### 1.4.3.3 阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌在熏马肠成熟与发酵中产生生物胺动力学模型的建立

用高效液相色谱检测熏马肠在不同发酵条件下的生物胺量，分析不同发酵条件对高产生物胺产生生物胺的动力学变化的影响，根据数据的变化规律选择合适的模型进行拟合，建立生物胺模型。

## 第二章 营养肉汤中阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌预测模型的建立

肠杆菌是目前很多研究者公认的产生物胺脱羧酶活性最高的菌，而阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌又是产腐胺和尸胺能力最强的两种菌，有研究表明阴沟肠杆菌产组胺的能力也很强<sup>[54]</sup>。一般在成熟的熏马肠中肠杆菌存活的数目很小，但如果在熏马肠生产的初期，所选取的马肉因为储存不当或者操作人员的失误被污染了肠杆菌，由于后期的发酵温度相对较高，肠杆菌的繁殖速度很快，会使肠杆菌在这一过程中大量繁殖，产生氨基酸脱羧酶催化相应的氨基酸产生生物胺，在成熟后期由于香肠的水分含量不断降低，肠杆菌的数量会逐渐降低，但是氨基酸脱羧酶的数量与肠杆菌的数量并不成正比，在肠杆菌细胞死亡后，这些脱羧酶仍然具有脱羧酶活性，使生物胺的含量仍然不断增加。

预测微生物学近几年在食品的安全性评价和货架期预测中有很广泛的应用，它主要是以一些食品中的腐败菌和对人体有毒害作用的致病菌为研究对象。目前研究者多是将微生物接种到一些食品介质如羊肉、猪肉、鸡肉、虾等来建立预测模型，虽然能更好的描述微生物在肉品介质中的生长状态，但相较于液体培养基中建立模型来说较复杂，不易控制实验的重复性，测定数据不精确等特点<sup>[55]</sup>，由营养肉汤建立的模型具有普遍性和代表性。所以本章选取高产生物胺阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌，建立其在不同温度的营养肉汤中的预测模型，以期为这两种菌在熏马肠中动力学模型的建立提供理论基础和为这两种菌在其他方面的科研分析提供参考依据。

### 2.1 实验材料

#### 2.2.1 实验菌株

本实验选取 2 株高产生物胺肠杆菌，分别为阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌，这两株菌是课题组于 2010~2012 年通过对新疆四个主产区（伊犁、昌吉、石河子、塔城）的熏马肠中分离得到的 200 余株产生物胺微生物中筛选而得到的，结合高效液相色谱检测发现其具有较高的产生物胺的能力。

#### 2.2.2 实验仪器和设备

拍击式均质器：上海苑胜仪器设备有限公司；电热恒温培养箱：上海精宏实验设备有限公司；超净工作台：上海巨哥电子科技有限公司；压力蒸汽灭菌锅：上海申安医疗器械厂；电子天平：上海民桥精密科学仪器有限公司。

#### 2.2.3 培养基和试剂

营养肉汤：蛋白胨 10.0g、牛肉膏 3.0g、氯化钠 5.0g、蒸馏水 1000ml、pH7.2±0.2。

VRBA 培养基：蛋白胨 7.0g、酵母膏 3.0g、氯化钠 5.0g、乳糖 10.0g、胆盐 1.5g、结晶紫 0.002g、中性红 0.03、琼脂 15.0g、蒸馏水 1000ml、pH7.4±0.1。

生理盐水：0.85gNaCl 加入到 1000ml 的蒸馏水中。

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 原菌液的制备

两株菌均保藏在 $-20^{\circ}\text{C}$ 的甘油管中(甘油与菌以1:1的比例保存),分别取出 $500\mu\text{L}$ 解冻,在无菌操作室中将2株菌分别接种到营养肉汤中, $37^{\circ}\text{C}$ 下培养,活化3代,再取出 $10\text{ml}$ 菌液加入到 $90\text{ml}$ 生理盐水中。依次进行梯度稀释,选择合适的稀释度,使得菌液的浓度在 $10^4\sim 10^5\text{cfu ml}^{-1}$ ,即为原菌液。

### 2.2.2 营养肉汤中肠杆菌计数

以无菌操作在无菌室中将制的的原菌液充分摇匀,分别取出 $1\text{ml}$ 加入到若干只 $9\text{ml}$ 的无菌营养肉汤试管中,使得菌液浓度为 $10^3\sim 10^4\text{cfu ml}^{-1}$ 。分别把这些试管放在 $15^{\circ}\text{C}$ 、 $20^{\circ}\text{C}$ 、 $25^{\circ}\text{C}$ 、 $30^{\circ}\text{C}$ 、 $35^{\circ}\text{C}$ 、 $40^{\circ}\text{C}$ 、 $45^{\circ}\text{C}$ 生化培养箱中培养。根据营养肉汤的培养温度在选定的时间内取出 $1\text{ml}$ ,加入到 $9\text{ml}$ 灭菌的生理盐水试管中,按10倍递增稀释,选取三个合适的稀释度,采用平板涂布计数法测菌数(每个稀释度3个重复), $37^{\circ}\text{C}$ 培养24h。

### 2.2.3 一级模型的建立

研究表明,修正的 Gompertz 方程可以很好的应用于描述食品中微生物的生长状况,进而预测微生物的生长动态变化。将不同温度下获得的阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌菌落对数值,用修正的 Gompertz 模型拟合其生长动态<sup>[56,57]</sup>。修正的 Gompertz 模型的公式及式中参数所代表的意义如下:

$$\log(N_t) = N_0 + C \exp(-\exp(-B(t - M))) \quad \text{式(1)}$$

式中  $\log(N_t)$  是  $t$  时间所对应的菌落数的对数值;  $N_0$  是初始菌落数,  $\lg(\text{cfu g}^{-1})$ ;  $C$  是初始菌落数与达到稳定期时的最大菌落数的差值,  $\lg(\text{cfu g}^{-1})$ ;  $B$  表示的意思是在  $M$  的时间点时的相对最大比生长速率,  $\text{h}^{-1}$ ;  $M$  是生长达到到最大生长速率所需要的时间,  $\text{h}$ 。以上参数都可以直接通过模型得到,在一级模型中比较重要的两个变量最大比生长速率  $U$  和延滞时间  $LPD$  是通过以下公式求出:

$$\text{最大比生长速率 } U = BC/e \quad (\text{单位是 } \text{h}^{-1}) \quad \text{式(2)}$$

$$\text{延滞时间 } LPD = M - (1/B) \quad (\text{单位是 } \text{h}) \quad \text{式(3)}$$

### 2.2.4 二级模型的建立

二级模型反映的是一级模型中的参数值( $U$ 、 $LPD$ 、 $M$ 等)与环境变量( $\text{pH}$ 、 $A_w$ 、温度和添加物浓度)之间的函数关系。常见的有反应表面方程、Arrhenium 模型、平方根模型<sup>[58]</sup>。本文采用平方根模型建立二级模型,平方根模型表述的是温度与生长速率或延滞时间倒数的平方根之间的相关性<sup>[59]</sup>。

$$U^{1/2} = b_U \times (T - T_{\min U}) \quad \text{式(6)}$$

$$LPD^{-1/2} = b_L \times (T - T_{\min L}) \quad \text{式(7)}$$

式中:  $T$  是不同一级模型所对应的温度,  $T_{\min U}$ 、 $T_{\min L}$  是细菌生长的理论最低温度,指的是微生物没有代谢活动时的温度,即最大比生长速率为0时的温度;  $b$  是方程常数。

### 2.2.5 数据处理

应用 Origin8.0 统计软件,对所得数据进行拟合和回归,获得不同发酵条件下肠杆

菌生长曲线、生长动力学参数以及得到二级模型中最大比生长速率和延滞时间与温度之间的关系。

## 2.3 结果与分析

### 2.3.1 不同温度下阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌的一级模型

从熏马肠中分离出的阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌，在 15~45℃ 下均能生长。参考相关文献得知，compertz 模型是一级模型中应用比较广泛，使用简便且有效的模型<sup>[60]</sup>。实验获得这两种菌在这 7 个温度下的生长数据，将拟合所得的  $N_0$ 、C、B 和 M 值，分别代入 compertz 方程进行拟合，得出的方程表达式如表 2-1。从表可以看出  $R^2$  均 0.98 以上，说明所拟合的 compertz 方程效果较好，可以建立二级模型。

表 2-1 营养肉汤中阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌的一级模型

Table 2-1 Primary growth model of *Enterobacter cloacae* and *Odor marcescens* in nutrient broth

菌名称	T/°C	高产生物胺肠杆菌动力学模型	$R^2$
阴沟肠杆菌	15	$\log(N_t) = 3.11 + 6.50 \exp(-\exp(-0.07(t - 24.42)))$	0.9914
	20	$\log(N_t) = 2.47 + 8.14 \exp(-\exp(-0.14(t - 11.90)))$	0.9899
	25	$\log(N_t) = 3.54 + 7.80 \exp(-\exp(-0.19(t - 9.27)))$	0.9877
	30	$\log(N_t) = 3.13 + 8.72 \exp(-\exp(-0.21(t - 7.72)))$	0.9877
	35	$\log(N_t) = 3.52 + 7.77 \exp(-\exp(-0.26(t - 5.96)))$	0.9832
	40	$\log(N_t) = 3.03 + 8.65 \exp(-\exp(-0.21(t - 7.72)))$	0.9891
	45	$\log(N_t) = 3.66 + 8.02 \exp(-\exp(-0.21(t - 9.05)))$	0.9844
气味沙雷氏菌	15	$\log(N_t) = 3.92 + 6.77 \exp(-\exp(-0.09(t - 24.76)))$	0.9701
	20	$\log(N_t) = 2.64 + 9.22 \exp(-\exp(-0.14(t - 14.17)))$	0.9899
	25	$\log(N_t) = 2.75 + 8.45 \exp(-\exp(-0.18(t - 11.15)))$	0.9896
	30	$\log(N_t) = 3.72 + 7.65 \exp(-\exp(-0.23(t - 8.92)))$	0.9896
	35	$\log(N_t) = 3.45 + 8.03 \exp(-\exp(-0.25(t - 7.90)))$	0.9890
	40	$\log(N_t) = 3.01 + 7.97 \exp(-\exp(-0.23(t - 8.21)))$	0.9914
	45	$\log(N_t) = 3.60 + 7.78 \exp(-\exp(-0.22(t - 6.87)))$	0.9902

将 Compertz 模型所得到的各参数值按照 U、LPD、 $N_{max}$  的换算公式计算后得到不同温度下阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌生长动力学参数表。由表 2-2、表 2-3 显示：在这 7 个温度条件下，在 15~35℃ 范围内两种菌的生长速率均随着温度的升高不断增加，35℃ 时达到最大值 0.732 和 0.730  $h^{-1}$ ，迟滞期随着生长速率的不断增加不断减少，分别由最初的 10.84 和 13.14h 减少到 2.07 和 3.85h，这与肠杆菌生长规律相符。对比阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌的生长参数得出在相同的生长温度下，阴沟肠杆菌生长的迟滞期都要小于气味沙雷氏菌，说明阴沟肠杆菌更能适应环境。

表 2-2 由修正 Gompertz 方程计算营养肉汤中阴沟肠杆菌生长参数

Table 2-2 The growth parameters of *Enterobacter cloacae* and *Odor marcescens* in nutrient broth calculated from modified Gompertz equation modified

T/°C	$N_0(\text{Log}_{10}\text{cfu/g})$	$U/\text{h}^{-1}$	LPD/h	$N_{\max}(\text{Log}_{10}\text{cfu/g})$
15	3.11	0.176	10.84	9.61
20	2.47	0.406	4.53	10.61
25	3.54	0.543	3.98	11.33
30	3.13	0.689	3.07	10.15
35	3.52	0.732	2.06	11.29
40	3.03	0.658	2.65	11.68
45	3.60	0.639	2.38	11.39

表 2-3 由修正 Gompertz 方程计算营养肉汤中气味沙雷氏菌生长参数

Table 2-3 The growth parameters of *Enterobacter cloacae* and *Odor marcescens* in nutrient broth calculated from modified Gompertz equation modified

T/°C	$N_0(\text{Log}_{10}\text{cfu/g})$	$U/\text{h}^{-1}$	LPD/h	$N_{\max}(\text{Log}_{10}\text{cfu/g})$
15	3.92	0.214	13.13	10.68
20	2.63	0.466	6.88	11.85
25	2.75	0.546	5.47	11.21
30	3.72	0.634	4.48	11.37
35	3.45	0.730	3.85	11.48
40	3.01	0.676	3.86	10.98
45	3.66	0.608	4.19	11.68

## 2.3.2 利用修正 Gompertz 方程拟合阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌生长曲线的比较

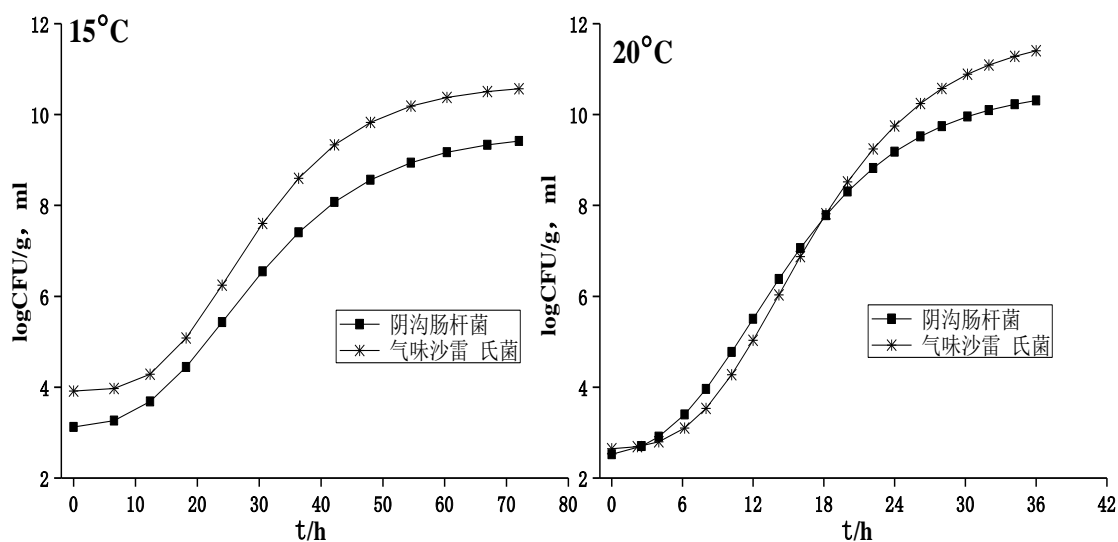


图 2-1 15°C、20°C营养肉汤中阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌的一级生长模型

Figure 2-1 The primary growth model for *Enterobacter cloacae* and *Odor marcescens* in nutrient broth at 15°C and 20°C

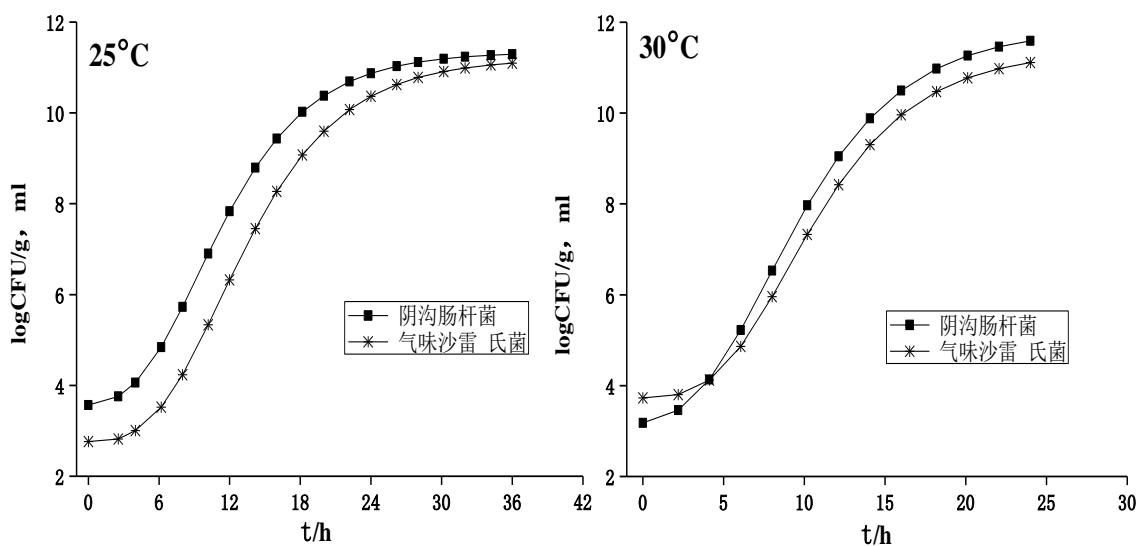


图 2-2 25°C、30°C营养肉汤中阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌的一级生长模型

Figure 2-2 The primary growth model for *Enterobacter cloacae* and *Odor marcescens* in nutrient broth at 25°C and 30°C

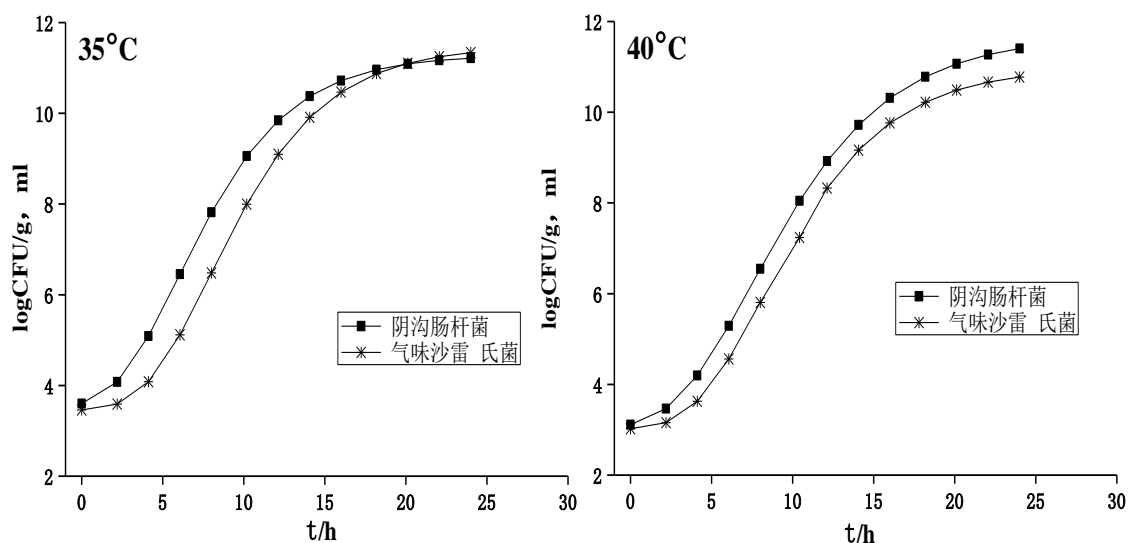


图 2-4 35℃、40℃营养肉汤中阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌的一级生长模型  
Figure 2-4 The primary growth model for *Enterobacter cloacae* and *Odor marcescens* in nutrient broth at 35℃ and 40℃

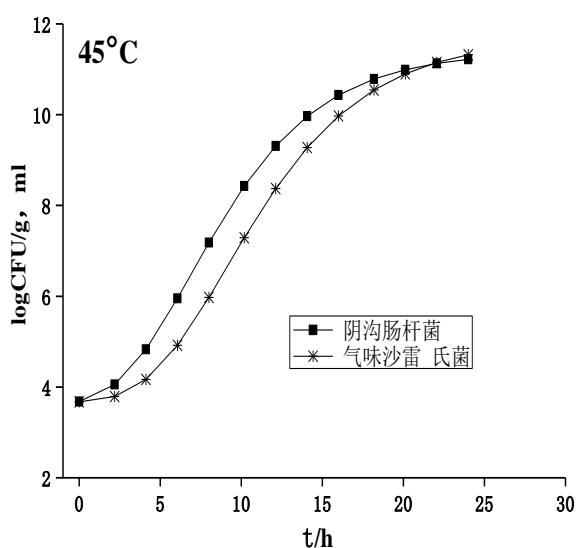


图 2-4 45℃营养肉汤中阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌的一级生长模型  
Figure 2-4 The primary growth model for *Enterobacter cloacae* and *Odor marcescens* in nutrient broth at 45℃

从图 2-1~2-4 可知, 利用修正 Gompertz 方程拟合本试验中肠杆菌生长情况得到的曲线呈现 S 形曲线。在 15、20℃条件下, 营养肉汤中气味沙雷氏菌比阴沟肠杆菌生长的快。在 25~45℃之间, 阴沟肠杆菌的比气味沙雷氏菌生长的快。比较阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌的最大比生长速率和迟滞期得出, 最大比生长速率大的, 延滞期不一定短, 由表 2-2 和表 2-3 可以看出气味沙雷氏菌的最大比生长速率大于阴沟肠杆菌的部分, 迟

滞期却比阴沟肠杆菌的长,甚至同一温度下相差 1-2h,说明阴沟肠杆菌适应环境的能力要显著强于气味沙雷氏菌。

### 2.3.3 不同温度条件下阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌的二级模型

虽然我们建立了一级模型,但还是存在着一些不足,就像其中的一些极小值,这意味着参数的估计有一定的问题,存在一个确定的极差或是相关参数,这一相关参数的确定必须建立二级模型。二级模型包括很多种,有 Belehraddek 模型(平方根模型)、Arrhenius 方程、响应面模型。当涉及到更多因子时,描述多个因子的影响以及各个因子之间的相互作用时,采用反应表面模型<sup>[61]</sup>。本文主要考虑的是温度对生长参数的影响,故选用平方根模型来建立二级模型,由于 40、45℃条件下两种菌的生长速率不随着温度的升高而增加,故选取 15~35℃的生长参数来建立二级模型并对二级生长模型的参数进行了评价。

表 2-4 营养肉汤中阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌生长速率和迟滞期二级模型的统计汇总

Table 2-4 Statistical summary of the secondary modeling for growth rate and lag time of *Enterobacter cloacae* and *Odor marcescens* in nutrient broth

菌名称	生长参数	二级模型	R <sup>2</sup>	RSS
阴沟肠杆菌	U	$U^{1/2} = 0.0213 \times (T - (-7.68))$	0.8775	0.13217
	LPD	$LPD^{-1/2} = 0.0112 \times (T - (-12.05))$	0.9353	0.05371
气味沙雷氏菌	U	$U^{1/2} = 0.0179 \times (T - (-14.50))$	0.8447	0.0421
	LPD	$LPD^{-1/2} = 0.0177 \times (T - (-3.79))$	0.9328	0.00756

由表 2-4 所得出的实验结果可以看出,本实验所建立的二级模型的 R<sup>2</sup> 值较高、RSS 值较低,表明平方根模型对于迟滞期和生长速率的拟合效果较好。总的来说,本文所建立的不同温度下高产生物胺阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌在营养肉汤中的一级和二级动力学模型具有较好的预测效果,可以为这两种菌在熏马肠中动力学模型的建立提供理论基础和为这两种菌在其他方面的科研分析提供参考依据。

## 2.4 讨论

目前,预测微生物学的数据收集方式有三种: a 测定肉汤中菌数的变化来建立模型; b 测定原始原料的菌数变化来建立模型; c 向原料食品上接种特定微生物来获得数据从而建立模型<sup>[62]</sup>。三种方式各有各的优缺点。但以目前的研究成果来看,以液体培养基来建立模型的居多,例如美国的 PMP 中所有的模型都是利用液体培养基中菌数的变化来建立的模型。液体培养基收集数据的方法相较于其他两种方法没有考虑不同原料组织对微生物生长的影响,但其具有普遍性,容易控制一些复杂的环境因素,数据较为准确<sup>[63]</sup>。本文建立高产生物胺阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌在液体培养基中的预测模型,一方面为这两种菌在熏马肠中预测模型的建立提供参考依据,例如接种量的确定、取样时间的确定等,另一方面是为有关这两种菌的其他科研分析及对其的安全性评价提供理论基础。

## 2.5 结论

(1) 营养肉汤中阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌的生长极易受到温度的影响。本研究选用修正的 Gompertz 模型，建立了 15~45℃ 营养肉汤中阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌的一级生长模型，最终得出的模型  $R^2$  都在 0.98 以上，说明此模型可以拟合阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌的生长。还得出在相同温度下阴沟肠杆菌生长的迟滞期都要小于气味沙雷氏菌，说明阴沟肠杆菌更能适应环境。

(2) 利用修正的 Gompertz 模型、平方根模型，建立了阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌随温度变化的迟滞期和生长速率模型，揭示了由一级模型得出的生长参数与温度之间的关系。分析最终的结果得出，在 15℃~35℃ 范围内两种菌的生长速率均随着温度的升高不断增加，而迟滞期则是逐渐减小，尤其以阴沟肠杆菌减少的快，说明二级模型可以较好的描述 15℃~35℃ 温度范围内菌的迟滞期与生长速率与温度之间的关系。

## 第三章 不同发酵条件下熏马肠中高产生物胺肠杆菌预测模型的建立

熏马肠是一种颇受新疆消费者喜爱的传统民族发酵肉制品，随着新疆与内地的交流不断增多，与此同时人们对新疆的特色产品也有了更多的了解，对它的需求也日益增多，因此作为熏马肠安全性问题之一的生物胺也逐渐得到人们的重视。生物胺是由微生物产生的氨基酸脱羧酶对相应的氨基酸脱羧而形成的，大量的生物胺被人体摄入后会使机体产生诸多不良反应<sup>[64]</sup>。在熏马肠的生产中发酵温度一般为 20~40℃，而成熟温度为 10~15℃。发酵阶段是微生物活动最活跃，也是微生物产生的氨基酸脱羧酶活性最高，生物胺积累的最初阶段<sup>[65,66]</sup>。因此对高产生物胺菌在熏马肠发酵过程中的动态变化过程进行研究对于控制和探究生物胺的形成机理具有非常重要的意义。

预测微生物学的优点是可以运用已获得的数据去预测未来的发展趋势，可以实现对实际生产和流通的监控<sup>[67]</sup>，它可以解决传统检测所带来的费时、费力，以及因环境等各方面因素改变而不能准确评估产品安全性所带来的弊端<sup>[68]</sup>。目前国内外在预测微生物方面的研究范围很广，有冷鲜肉<sup>[69]</sup>、海产品<sup>[70]</sup>、蛋类产品<sup>[71]</sup>、卤制品<sup>[72]</sup>、豆制品<sup>[73]</sup>等方面，研究对象一般都是引起食品腐败变质或给人体带来毒害作用的腐败菌和致病菌。本实验是以课题组初期从熏马肠中分离鉴定出的高产生物胺肠杆菌（阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌）为研究对象，采用无菌操作将活化的肠杆菌接种到内部无污染的马肉中制作成熏马肠，并在不同的发酵条件下测定菌数，由此建立肠杆菌在熏马肠不同发酵条件下的一级模型和二级模型，并对所建立的模型进行验证，以期对熏马肠生产过程中高产生物胺肠杆菌的控制及生物胺累积机理的探究提供研究基础和理论依据，从而提高熏马肠的食用安全性。

### 3.1.材料与方法

#### 3.1.1 材料与仪器

新鲜马肉：购于石河子农贸市场；蛋白肠衣：购自北京新田胶原肠衣有限公司；阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌：是课题组于 2010~2012 年通过对新疆四个主产区（伊犁、昌吉、石河子、塔城）的熏马肠中分离得到的 200 余株产生物胺微生物中筛选而得到的，菌种的鉴定由北京三博远志生物技术有限责任公司完成。

拍击式均质器；电热恒温培养箱；超净工作台；压力蒸汽灭菌锅；电子天平。

#### 3.1.2 实验方法

##### 3.1.2.1 肉样处理与菌悬液制备

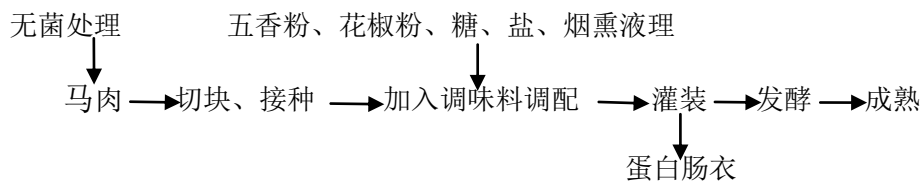
将新鲜的马肉置于无菌操作室内，表面涂抹 95% 的酒精进行灼烧，灼烧完后用无菌刀将表层肉剔除，取内部无污染马肉，将其切碎。

由本课题组前期对新疆四个地区的马肉的调查研究得出，马肉中肠杆菌的初始污染

量为  $10^2 \sim 10^4 \text{cfu ml}^{-1}$ 。为保证与实际生产情况相一致，故使马肉中阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌的初始接种量应为  $10^2 \sim 10^4 \text{cfu ml}^{-1}$ 。具体方法为将保藏于  $-20^\circ\text{C}$  甘油管中的阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌分别接种到装有营养肉汤的试管中，置于  $37^\circ\text{C}$  恒温培养箱培养 18h，活化三次得到菌种原液，将得到的阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌菌种原液以 1:1 的比例混合，然后加生理盐水并梯度稀释得到菌量为  $10^2 \sim 10^4 \text{cfu ml}^{-1}$  菌悬液；再将处理过的马肉放入菌悬液中接种 30s，后放到无菌铁丝网上将水沥干，使得马肉的初始菌数为  $10^2 \sim 10^4 \text{cfu cm}^{-2}$ 。以上过程都在无菌操作台中进行。

### 3.1.2.2 熏马肠的制备

加工工艺：



马肉从调配料到灌装工序在 20 分钟完成，根据熏马肠实际的生产发酵条件，将制作好的样品放在以下四个条件下进行发酵：a 发酵温度  $20^\circ\text{C}$ ，发酵时间 32h；b 发酵温度  $25^\circ\text{C}$ ，发酵时间 32h；c 发酵温度  $30^\circ\text{C}$ ，发酵时间 24h；d 发酵温度  $35^\circ\text{C}$ ，发酵时间 24h；e 发酵温度  $35^\circ\text{C}$ ，发酵时间 24h；f 发酵温度  $35^\circ\text{C}$ ，发酵时间 24h。根据发酵温度确定取样时间，因为发酵温度在  $20\sim 45^\circ\text{C}$  范围，相对较高，故选择每两个小时测定一次，每个温度样品做两个平行进行菌落总数测定，菌落总数的测定参照国标 GB4789.2—2010《食品卫生微生物学检验菌落总数测定》进行<sup>[74]</sup>。

### 3.1.2.3 菌落总数测定

按照上文所确定的取样点，每 2 小时称量两份 20g 的熏马肠，将取出的样品与 180 mL 的 0.85% 灭菌生理盐水分别放入无菌均质袋中，用拍击式均质器拍打 2 min 制成稀释度为  $10^{-1}$  的样品匀液。按 10 倍递增稀释，选取三个合适的稀释度，平板涂布计数法测菌数(每个稀释度 3 个重复)， $37^\circ\text{C}$  培养 24 h，选择菌落数在 30~300 之间的平板计数。

### 3.1.2.4 高产生物胺肠杆菌生长动力学模型初步建立及验证

#### 3.1.2.4.1 动力学一级模型的建立

同第二章的 2.2.3

#### 3.1.2.4.2 一级模型的验证

对于一级模型的验证方法有很多种，例如偏差度、准确度、残差平方和以及均方根误差。本文是采用准确因子和偏差因子，准确因子  $A_f$  和偏差因子  $B_f$  的计算公式如式(4)和式(5)所示<sup>[75,76]</sup>：

$$A_f = 10^{(\sum (N_{pre} - N_{obe})) / n} \quad \text{式(4)}$$

$$B_f = 10^{(\sum (N_{obe} - N_{pre})) / n} \quad \text{式(5)}$$

式中:  $N_{obe}$  是试验实际测得的肠杆菌菌数对数值;  $N_{pre}$  是由所建立的肠杆菌的预测模型得到的与实际测得的同一时间的菌数对数值;  $n$  是实验次数。

### 3.1.2.4.3 动力学二级模型的建立

同第二章的 2.2.4

### 3.1.2.5 数据处理

同第二章的 2.2.5

## 3.2.结果与分析

### 3.2.1 动力学一级模型的建立

通过试验得到肠杆菌在熏马肠 20、25、30、35、40 和 45 °C 发酵条件下的生长试验值, 应用 Origin 8.0 统计软件选择修正 Gompertz 方程拟合数据。由于 40、45 °C 的发酵时间较短, 无法拟合生长曲线, 由其它发酵条件得到的肠杆菌生长的实测值和拟合曲线如图 3-1 所示。由图中可直观地看出, 利用修正 Gompertz 方程拟合本试验中肠杆菌生长情况得到的曲线呈现 S 形曲线。

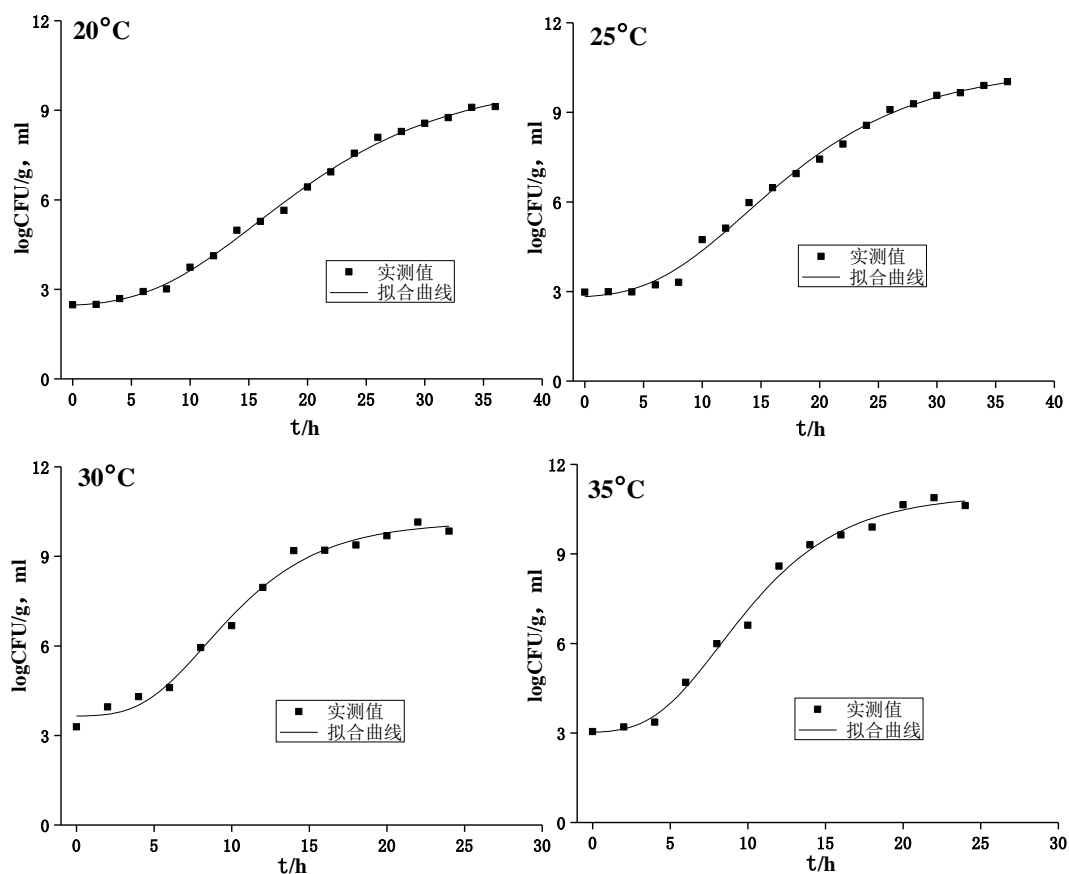


图 3-1 修正 compertz 模型拟合的 20 °C、25 °C、30 °C、35 °C 发酵条件下肠杆菌生长曲线

Fig3-1 Modified compertz model fitted growth curves of *Enterobacteriaceae* under the fermentation conditions at 20, 25, 30 and 35 °C

利用修正的 Gompertz 方程拟合本试验中 20、25、30 和 35 °C 发酵条件下肠杆菌的生长变化情况, 将拟合所得的  $N_0$ 、C、B 和 M 值, 分别代入 (1) 式中, 得到了这四个温度下的方程及决定系数如表 1 所示。由表 1 可知, Gompertz 模型拟合这 4 个温度得到的决定系数均较高, 分别为 0.9917、0.9939、0.9871 和 0.9914, 由此可以说明方程拟合效果很好, 可以进行二级模型的建立。

表 3-1 20°C~35°C 发酵条件下肠杆菌动力学生长模型

Table3-1 Growth kinetics model of *Enterobacteriaceae* under the fermentation condition at 20~35°C

T/°C	高产生物胺肠杆菌动力学模型	R <sup>2</sup>
20	$\log(N_t) = 2.44 + 7.57 \exp(-\exp(-0.11(t - 15.69)))$	0.9971
25	$\log(N_t) = 2.79 + 7.68 \exp(-\exp(-0.12(t - 13.73)))$	0.9939
30	$\log(N_t) = 3.65 + 6.51 \exp(-\exp(-0.24(t - 8.32)))$	0.9871
35	$\log(N_t) = 3.01 + 7.97 \exp(-\exp(-0.23(t - 8.21)))$	0.9914

将 Compertz 模型所得到的各参数值按照 U、LPD、 $N_{\max}$  的换算公式进行计算, 得到的不同发酵条件下肠杆菌生长动力学参数(表 3.2) 显示: 在这四个发酵温度条件下, 肠杆菌的生长速率明显升高, 由 20°C 的  $0.302\text{h}^{-1}$  增加到了 35°C 的  $0.676\text{h}^{-1}$ , 这主要是由于熏马肠的发酵温度范围均在肠杆菌适宜生长的范围内, 随着发酵温度的升高, 细胞内的酶反应和代谢速率加快, 使其生长速率加快。因为肠杆菌的最适生长范围在 30~37°C 范围内, 故延滞时间是随着发酵温度的升高而呈逐渐缩短的趋势, 当发酵温度为 35°C 时, 延滞时间已经缩短到 3.86h, 这与肠杆菌生长规律相符。

表 3-2 在 20°C~35°C 发酵温度下肠杆菌生长动力学参数

Table3-2 Kinetic parameters of *Enterobacteriaceae* under the fermentation temperature at 20~35°C

T/°C	$N_0(\text{Log}_{10}\text{cfu/g})$	U/h <sup>-1</sup>	LPD/h	$N_{\max}(\text{Log}_{10}\text{cfu/g})$
20	2.44	0.302	6.46	10.01
25	2.79	0.348	5.60	10.48
30	3.65	0.582	4.21	10.15
35	3.01	0.676	3.87	10.98

注:  $N_0$  为肠杆菌生长的初始菌数;  $N_{\max}$  为肠杆菌生长的最大菌数; U 为肠杆菌生长的最大比生长速率; LPD 为肠杆菌生长的延滞时间。

### 3.2.2 一级模型的验证

本实验的一级模型的准确度和真实值差异程度的评价指标是准确因子和偏差因子。准确因子和偏差因子的值越接近于 1, 表明结果越理想<sup>[77]</sup>。本实验得出的值如表 3-3 所示:

表 3-3 预测模型的验证

Table3-3 Evaluation of predict model using the bias factors and accuracy factors

T/°C	试验次数	准确因子 (A <sub>f</sub> )	偏差因子 (B <sub>f</sub> )
20	19	1.023	0.9773
25	19	0.9490	1.054
30	13	0.9974	1.003
35	13	0.9898	1.011

从表 3-3 可以看出模型的准确因子和偏差因子接近于 1，说明预测值和实测值之间偏差较小，模型的预测效果较好。

### 3.2.3 动力学二级模型的建立

许多研究表明<sup>[78,79]</sup>，平方根模型是描述不同恒定温度对微生物生长速率和迟滞期影响的效果最好、最简单有效的模型。为此，我们采用平方根模型来描述温度对肠杆菌生长速率和迟滞期的影响，并选用残差分析对所得模型的可信度进行检验，能够更直观的评判模型预测效果。

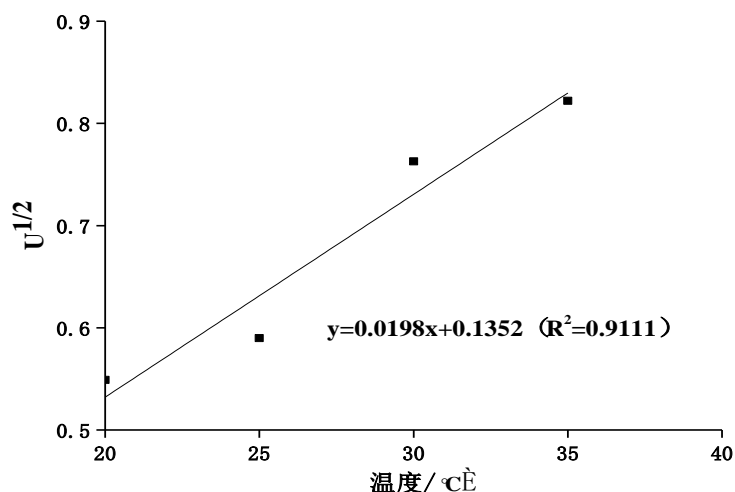


图 3-2 温度与最大比生长速率的关系

Fig3-2 Relationship between temperature and maximum specific growth rate

平方根模型拟合温度与最大比生长速率的关系如图 3 所示，其模型方程为 (8)，该模型的  $R^2$  为 0.9111。从图可以看出，20~35°C 发酵温度范围内，温度与最大比生长速率的线性关系良好，并且是随着发酵温度的升高而不断增加。

$$U^{1/2} = 0.0198 \times (T - (-6.38)) \quad \text{式 (8)}$$

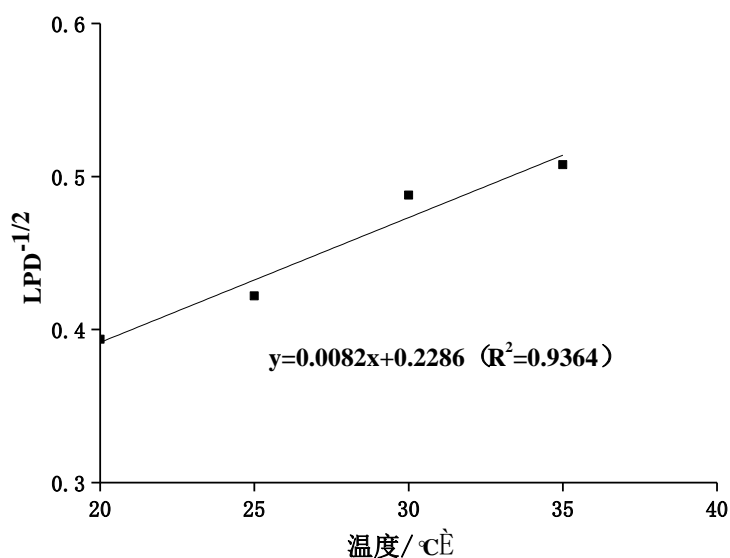


图 3-3 温度与延滞期的关系

Fig3-3 Relationship between temperature and lag phase

平方根模型拟合温度与延滞时间的关系如图 3 所示,可以看出温度与延滞时间也具有有良好的线性关系,其模型为方程 (9),  $R^2$  为 0.9364。

$$LPD^{-1/2} = 0.0082 \times (T - (-27.89)) \quad \text{式 (9)}$$

表3-4 温度与比生长速率平方根模型的残差值

Table3-4 Residuals of temperature and square root of specific growth rate  $U^{1/2}$ 

T/°C	实测观察值	预测值	残差值
20	0.5490	0.5312	0.0178
25	0.5899	0.6302	-0.0403
30	0.7628	0.7292	0.0336
35	0.8221	0.8282	-0.0061

表3-5 温度与延滞时间平方根模型的残差值

Table 3-5 Residuals of temperature and square root of lag phase  $LPD^{-1/2}$ 

T/°C	实测观察值	预测值	残差值
20	0.3937	0.3926	0.0011
25	0.4219	0.4336	-0.0117
30	0.4878	0.4746	0.0132
35	0.5076	0.5156	-0.0080

由表 3-4、3-5 可知,在 4 个发酵温度条件下延滞时间  $LPD$ 、最大比生长速率  $U$  的残差值的绝对值均小于 0.1,说明其预测模型描述的温度与  $LPD$ 、 $U$  之间的关系完全可信。表明用平方根模型可以很好的描述发酵温度与熏马肠中高产生物胺菌的关系,建立的二级模型可被接受。

### 3.3 讨论

发酵过程对熏马肠整个生产工艺、产品的最终品质以及生物胺的累积都有很大的影响。在熏马肠的生产过程中，若是肉的屠宰环境差，肉的切块、调配料、灌装过程处理不当，都会造成肉的污染。在熏马肠的发酵阶段微生物的生长速度很快，本章针对熏马肠不同的发酵条件建立了 20~35℃ 发酵温度下熏马肠中高产生物胺肠杆菌的生长预测模型，同时也得出了不同发酵条件下肠杆菌的生长速率和延滞期，为发酵过程中微生物的控制及生物胺产生机理的探究提供了理论依据。前一章建立了阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌在液体培养基中的预测模型，虽然说在液体培养基中测得的数据准确性好，但它与肉品中的真实状态还有一定差距，为了更多的与熏马肠的实际生产相联系，本章采用向马肉中接种高产生物胺肠杆菌再制作成熏马肠研究其在不同的发酵温度下的生长繁殖情况及熏马肠中各原料组织在发酵、成熟过程中对肠杆菌生长的影响，最后通过试验验证，表明所建立的熏马肠中的一级、二级模型具有较好的应用价值。

### 3.4 结论

(1) 用修正的 Gompertz 方程建立的不同发酵条件下熏马肠中高产生物胺肠杆菌动力学模型：

$$20^{\circ}\text{C}: \log(N_t) = 2.44 + 7.57 \exp(-\exp(-0.11(t - 15.69)))$$

$$25^{\circ}\text{C}: \log(N_t) = 2.79 + 7.68 \exp(-\exp(-0.12(t - 13.73)))$$

$$30^{\circ}\text{C}: \log(N_t) = 3.65 + 6.51 \exp(-\exp(-0.24(t - 8.32)))$$

$$35^{\circ}\text{C}: \log(N_t) = 3.01 + 7.97 \exp(-\exp(-0.23(t - 8.21)))$$

通过计算其相关系数  $R^2$ ，其值均在 0.980 以上，通过对其预测值及实测值的偏差因子和准确因子的计算，其值都在 1 左右，因此建立的一级模型具有可靠性。

(2) 应用平方根方程建立的温度与熏马肠中高产生物胺肠杆菌的生长延滞时间 LPD、最大比生长速率  $U$  之间关系关系的方程：

$$\text{温度与最大比生长速率: } U^{1/2} = 0.0198 \times (T - (-6.38))$$

$$\text{温度与延滞时间: } \text{LPD}^{-1/2} = 0.0082 \times (T - (-27.89))$$

通过计算其相关系数  $R^2$ ，其值均在 0.9111 以上，通过对其预测值及实测值的残差的计算，其绝对值均小于 0.1，因此建立的二级模型具有可靠性。

## 第四章 肠杆菌对熏马肠成熟中生物胺的动力学变化的影响及模型的建立

食品中的生物胺尤其是肉制品中的生物胺已经成为对人体健康有潜在危害的有毒有害物质。生物胺的安全问题已经成为了一个国际性的安全问题,不仅是有报道指出了中国的肉制品,例如发酵香肠,风干肉、腊肉、烟熏肉等由于加工不当或储存不当致使其中生物胺的含量超过了相关的标准,很早以前国外研究者指出在他们国家的肉制品中也存在这样的问题,因为他们的研究起步较早,目前在生物胺控制方面的研究也取得了很大的进展。国内对生物胺的研究目前集中于它的来源、产生机理、代谢、检测方法和对人体健康的影响等方面的研究。从大量的文献中得知生物胺含量以发酵香肠中的最高<sup>[80,81,82,83]</sup>,并且不同原料制作的香肠生物胺的种类和含量差异也很大。根据张海萍等<sup>[71]</sup>对新疆四个地区(伊犁、昌吉、石河子、塔城)生产的44种熏马肠样品的调查研究发现4.6%新疆熏马肠样品中生物胺总量超过了美国食品药品监督管理局规定的标准(1000 mg/kg),一部分产品中的组胺、酪胺、尸胺和腐胺的含量也很高。因此对新疆熏马肠中生物胺的研究不可忽视。对熏马肠中生物胺的产生原理及其影响因素的研究,对于控制生物胺的生成保证消费者的身体健康具有十分积极的意义。

国内外很多研究<sup>[84,85]</sup>表明原料肉中影响生物胺种类和含量的主要原因是产胺菌的种类和数量。研究还表明在很多产胺菌中肠杆菌是产生物胺能力最强,繁殖最快的菌,尤其产腐胺,组胺和尸胺的能力最强<sup>[86,87]</sup>。这些产胺菌在香肠发酵过程中大量繁殖产生氨基酸脱羧酶,并在后期的成熟过程中大量生成生物胺,对人体健康带来威胁<sup>[88]</sup>。本章主要研究在熏马肠的生产过程中,不同发酵条件对高产生物胺肠杆菌产生物胺的动力学变化的影响,从而阐明发酵条件对生物胺产生的影响。

### 4.1 材料与方法

#### 4.1.1 材料与仪器

##### 4.1.1.1 材料

新鲜马肉:购于石河子农贸市场;蛋白肠衣:购自北京新田胶原肠衣有限公司;阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌:是课题组于2010~2012年通过对新疆四个主产区(伊犁、昌吉、石河子、塔城)的熏马肠中分离得到的200余株产生物胺微生物中筛选而得到的,菌种的鉴定由北京三博远志生物技术有限责任公司完成。

##### 4.1.1.2 仪器与试剂

分析天平(EL204);超净工作台(SW-cg-2F.100级);超声波清洗器(KQ-250B型);冷冻离心机(5417R);数显恒温水浴锅(DK-8D)立式自动电热压力蒸汽灭菌锅(LDZX-40型);pH计;恒温培养箱(DNP-9272型);高效液相色谱仪(Agilent Technologies 1200 series,日本岛津);色谱柱(Eclipse XDB-C18 4.6mm×250mm, 5 $\mu$ m);

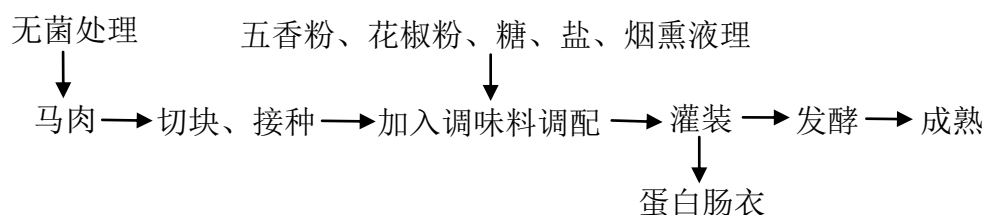
0.22 $\mu$ m 有机滤膜；以及其它微生物实验常用培养皿、试管、移液枪、量筒、三角瓶、涂布棒。

VRBA 培养基：蛋白胨 7.0g、酵母膏 3.0g、氯化钠 5.0g、乳糖 10.0g、胆盐 1.5g、结晶紫 0.002g、中性红 0.03、琼脂 15.0g、蒸馏水 1000ml、pH7.4±0.1。

8 种生物胺标品（尸胺、腐胺、酪胺、苯乙胺、组胺、色胺、精胺、亚精胺，Sigma）；甲醇（色谱纯）；乙腈（色谱纯）；丹磺酰氯（Sigma）；浓氨水；高氯酸；超纯水。

#### 4.1.2 实验方法

##### 4.1.2.1 熏马肠基本工艺流程



##### 4.1.2.2 实验设计

本实验按照传统熏马肠的加工工艺，利用筛选出的高产生物胺肠杆菌（阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌）将其以 1:1 的比例接种到无菌的马肉中，使得马肉的初始菌数为  $10^2 \sim 10^4$  cfu  $\text{cm}^{-2}$ ，制作六组不同发酵成熟条件的熏马肠：A 发酵温度 20 $^{\circ}\text{C}$ ，发酵时间 36h；B 发酵温度 25 $^{\circ}\text{C}$ ，发酵时间 36h；C 发酵温度 30 $^{\circ}\text{C}$ ，发酵时间 24h；D 发酵温度 35 $^{\circ}\text{C}$ ，发酵时间 24h；E 发酵温度 40 $^{\circ}\text{C}$ ，发酵时间 12h；F 发酵温度 45 $^{\circ}\text{C}$ ，发酵时间 12h。成熟温度都为 15 $^{\circ}\text{C}$ ，成熟期间每天取样一次，直至成熟结束。

#### 4.1.3 生物胺的检测

##### 4.1.3.1 标准溶液配制与柱前衍生

准确称取酪胺、腐胺、苯乙胺、尸胺、色胺、组胺、精胺、亚精胺各 50mg，用 0.4mol/L 的高氯酸(HClO<sub>4</sub>)定容至 50mL，并分别稀释制成终浓度分别为：0.5、1.0、2.5、5.0、10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的混合标准溶液。取 1mL 的标准品混合溶液，向其中加入 200 $\mu\text{L}$  的 2mol/L NaOH 使之呈碱性，再加入 300 $\mu\text{L}$  饱和的 NaHCO<sub>3</sub> 溶液进行缓冲，然后再加入 2mL 的 Dns-Cl 溶液(10mg/mL 溶于丙酮)，在 40 $^{\circ}\text{C}$  下处于避光反应 45min，最后后加入 100 $\mu\text{L}$  的氨水终止反应，去除残留的 Dns-Cl 溶液，用乙腈定容至 5mL。衍生处理后用 0.22 $\mu\text{m}$  滤膜过滤，用于分析检测。

##### 4.1.3.2 样品处理

取 5g 肉样，加入 20mL 的 0.4mol/L 的高氯酸，匀浆机上彻底匀浆，转入冷冻离心机（10 $^{\circ}\text{C}$ ，2500rpm）离心 10min，沉淀部分如前述的方法再重新提取。取两次的上清液用 0.4mol/L 的高氯酸定容至 50mL。取 1mL 的样液如标准溶液一样进行柱前衍生。

##### 4.1.3.3 色谱条件

色谱柱为 Agilent C<sub>18</sub>(4.6 $\times$ 250mm)，流速 0.8mL/min，流动相 A 为超纯水，流动相 B 为乙腈，用 0.22 $\mu\text{m}$  滤膜过滤后备用，紫外检测波长为 254nm，进样量 20 $\mu\text{L}$ ，柱温

30℃，采用梯度洗脱，洗脱程序见表 4-1。

表4-1 梯度洗脱程序

Table4-1 Gradient elution program

洗脱时间/min Elution time	流动相 A/% Mobile phase A	流动相 B/% Mobile phase B
0.0	35.0	65.0
5.0	30.0	70.0
20.0	0.0	100.0
24.0	0.0	100.0
25.0	35.0	65.0
30.0	35.0	65.0

#### 4.1.4 细菌计数

在规定的取样时间点，在无菌条件下称量两份 20g 的熏马肠，将取出的样品与 180 mL 的 0.85% 灭菌生理盐水分别放入无菌均质袋中，拍打 2 min，制成稀释度为  $10^{-1}$  的样品匀液。按 10 倍递增稀释，选取三个合适的稀释度，平板涂布计数法测菌数(每个稀释度 3 个重复)，37℃ 培养 24 h，选择菌落数在 30~300 之间的平板计数<sup>[89]</sup>。

4.1.5 pH 值的测定：pH 计。

#### 4.1.6 数据处理方法

在 Excel 中建立数据库，应用 Origin8.0 进行数据分析。

## 4.2 结果与分析

### 4.2.1 混标的分离与分析

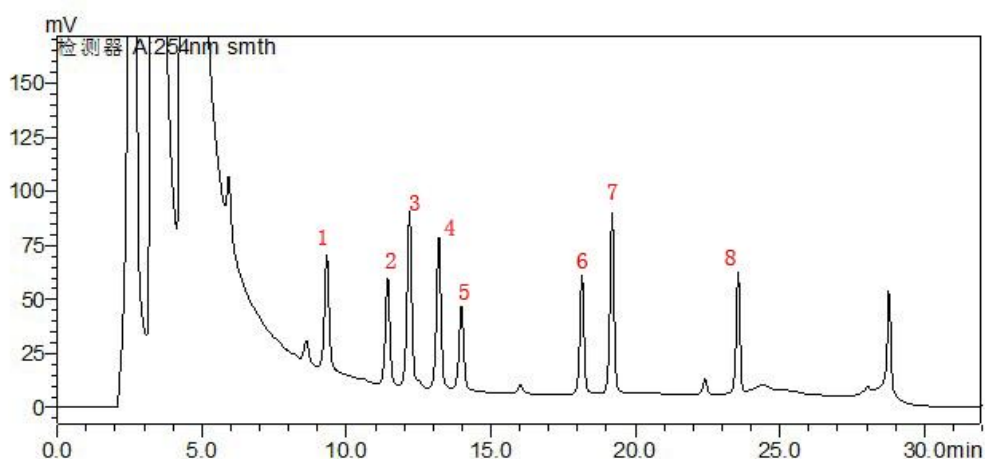


图4-1 八种生物胺混合标准溶液HPLC图谱(1.色胺、2.苯乙胺、3.腐胺、4.尸胺、5.组胺6.酪胺、7.亚精胺、8.精胺)

Fig.4-1 Chromatographic profiles of standard solution of eight biogenic amines (1.TRY、2.PHE、3.PUT、4.CAD、5. HIS、6.TYR、7. SPD、8.SPM)

由图 4-1 可知, 八种生物胺的色谱分离在 30 分钟内完成, 没有拖尾和重叠等不正常现象, 溶剂峰及杂质峰也都能在前 9 分钟内全部洗脱出, 说明本实验所设定的液相检测条件对于生物胺进行了很好的分离。

表4-2 八种生物胺回归方程及相关系数

Table 4-2 Regression equations and Correlation coefficients of eight biogenic amines

测试组分	回归方程 ( $y=ax+b$ )	相关系数 ( $R^2$ )
色胺	$y=45.203x-38.834$	0.9944
苯乙胺	$y=38.888x-5.9863$	0.9962
腐胺	$y=92.481x-36.792$	0.9935
尸胺	$y=59.053+4.7575$	0.9972
组胺	$y=68.809x-7.0071$	0.9988
酪胺	$y=51.092x-7.4321$	0.9981
亚精胺	$y=85.656x-11.766$	0.9961
精胺	$y=76.648x-13.263$	0.9968

从表 4-2 可以看出, 建立的 8 种生物胺的峰面积与其相应浓度的方程的相关系数均大于 0.99, 说明峰面积与其相应的浓度呈良好的线性关系, 通过此方程可准确测定出生物胺的含量。

#### 4.2.2 不同发酵条件下 6 种生物胺在香肠成熟期间的动态变化

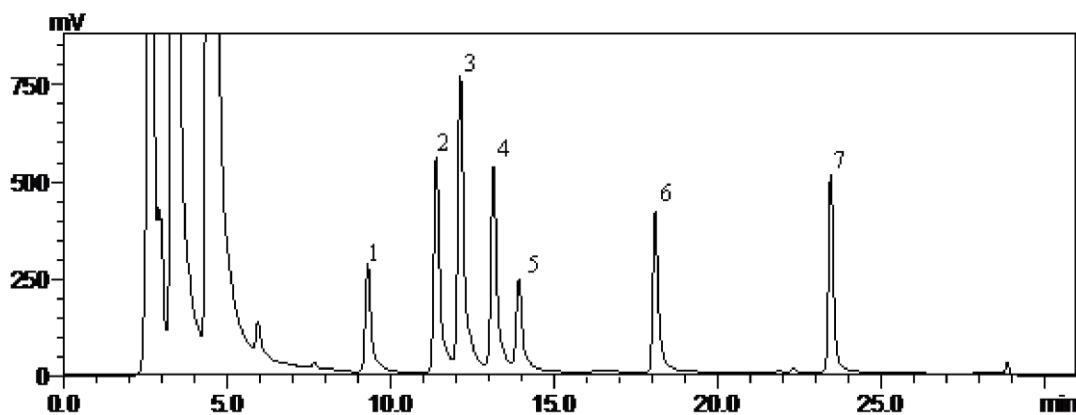


图 4-2 45℃ 发酵条件下第 10 天的 HPLC 图谱: 1.苯乙胺; 2.腐胺; 3.尸胺; 4.组胺; 5.酪胺; 6.亚精胺; 7.精胺

Fig.4-2 Chromatographic profiles of the fermentation conditions at 45℃ on 10 days: 1.TRY; 2. PHE; 3.PUT; 4.CAD; 5. HIS; 6.TYR; 7.SPD; 8.SPM

##### 4.2.2.1 不同发酵条件下熏马肠中色胺的变化

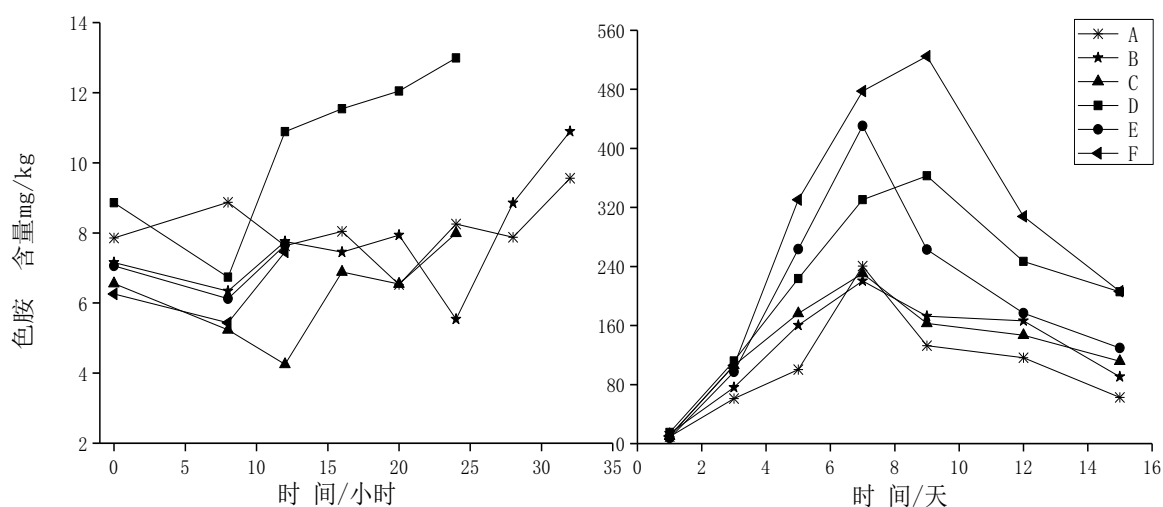


图 4-3 不同发酵条件下熏马肠成熟过程中色胺含量的变化

Fig.4-3 Changes of tryptamine content in smoked horsemeat sausages at different fermentation conditions during ripening

由图 4-3 可以看出, 在发酵过程中各温度下色胺的变化量在  $0.5\sim 2.0\text{mg/kg}$  之间, 相较于成熟阶段差异不显著 ( $P>0.05$ ), 在发酵结束后  $35^{\circ}\text{C}$  发酵条件下色胺含量最高, 为  $12.98\text{mg/kg}$ 。在成熟过程中色胺含量呈现先升高后下降的变化趋势, 在  $45^{\circ}\text{C}$  的发酵温度下色胺含量随时间的累积量显著高于其他五组 ( $P<0.01$ ), 在成熟第 9 天时达到最大  $524.65\text{mg/kg}$ , 其他发酵温度下色胺的含量都是在成熟第 7 天达到最大, 并且是都是随着发酵温度的升高, 色胺的累积量呈增加趋势。在第 9 天后色胺的含量均呈下降趋势, 在成熟结束时,  $20^{\circ}\text{C}$  发酵条件下色胺的累积量最小为  $62.65\text{mg/kg}$ ,  $45^{\circ}\text{C}$  发酵条件下色胺的累积量最大为  $206.15\text{mg/kg}$ 。

#### 4.2.2.2 不同发酵条件下熏马肠中苯乙胺的变化

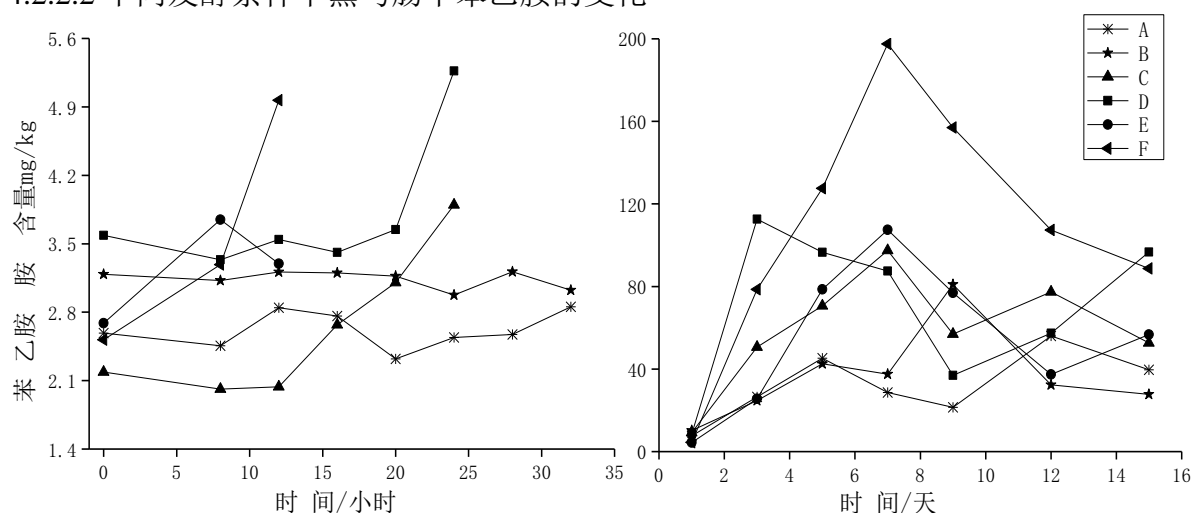


图 4-4 不同发酵条件下熏马肠成熟过程中苯乙胺含量的变化

Fig.4-4 Changes of phenylethylamine content in smoked horsemeat sausages at different fermentation conditions during ripening

由图 4-4 可知,在发酵 10 小时后各发酵条件下苯乙胺的含量呈现增加的趋势,25℃ 发酵条件下苯乙胺含量较其他组差异不显著 ( $P > 0.05$ )。在成熟过程中苯乙胺含量的变化量较发酵阶段差异显著 ( $P < 0.05$ ),并且都是随着成熟时间和发酵温度的增加呈现先升高后下降的趋势,在发酵的第 7 天苯乙胺的累积量达到最大,其中 45℃ 发酵条件下苯乙胺量显著高于其他组 ( $P < 0.01$ ),为 197.48 mg/kg。在成熟结束后,20℃ 发酵温度下苯乙胺含量最低为 39.67 mg/kg,45℃ 条件下最高为 66.71 mg/kg。

#### 4.2.2.3 不同发酵条件下熏马肠中腐胺的变化

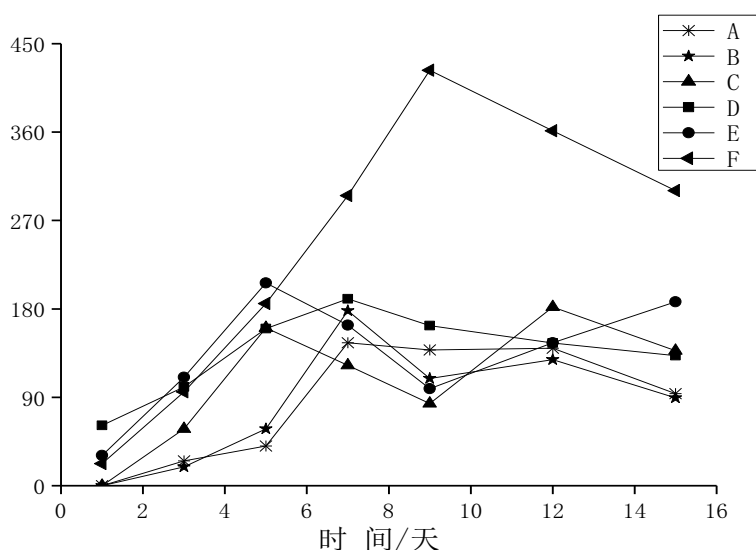


图 4-5 不同发酵条件下熏马肠发酵成熟过程中腐胺含量的变化

Fig.4-5 Changes of putrescine content in smoked horsemeat sausages at different fermentation conditions during ripening

腐胺在整个发酵阶段都未检测到,如图 4-5 在成熟第 1 到 3 天才相继产生,在成熟第 1 到 3 天才相继产生,并且是随着成熟时间的增加呈现先上升再下降趋势,在这六个发酵条件下,腐胺的累积量分别在第 7、12、5、9 天最大,其中 45℃ 的发酵条件下腐胺的含量显著高于其他组 ( $P < 0.01$ )。在成熟结束后,在 45℃ 发酵条件下腐胺量下降为 300.32 mg/kg,在 25℃ 发酵条件下腐胺的累积量最小为 89.7799 mg/kg。

#### 4.2.2.4 不同发酵条件下熏马肠中尸胺的变化

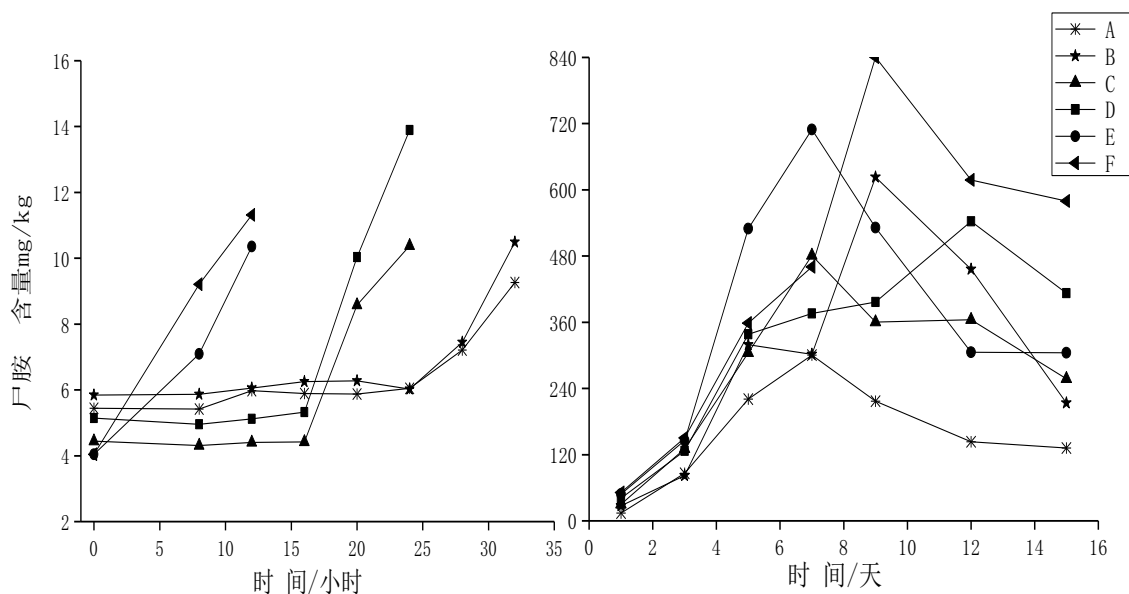


图 4-6 不同发酵条件下熏马肠成熟过程中尸胺含量的变化

Fig.4-6 Changes of cadaverine content in smoked horsemeat sausages at different fermentation conditions during ripening

由图 4-6 可以看出，在发酵过程中 40℃ 和 45℃ 发酵条件下尸胺的含量随着时间的增加呈上升趋势，在发酵 15 小时之前，其余的四个发酵条件下尸胺含量差异不显著 ( $P > 0.05$ )，在发酵 15 小时之后，这四个发酵条件下尸胺的含量均呈现增加的趋势。在成熟阶段，不同发酵条件下尸胺的含量都很高而且差异显著 ( $P < 0.01$ )，从图也可以看出随着发酵温度的增加，尸胺的累积量是不断增加的，在第 9 天时最大的尸胺量为 840.53 mg/kg，是在 45℃ 发酵条件下产生的，第 9 天后不同发酵条件下的尸胺含量呈下降趋势，成熟结束后尸胺的含量在 132.15~579.80 mg/kg 之间。

#### 4.2.2.5 不同发酵条件下熏马肠中组胺的变化

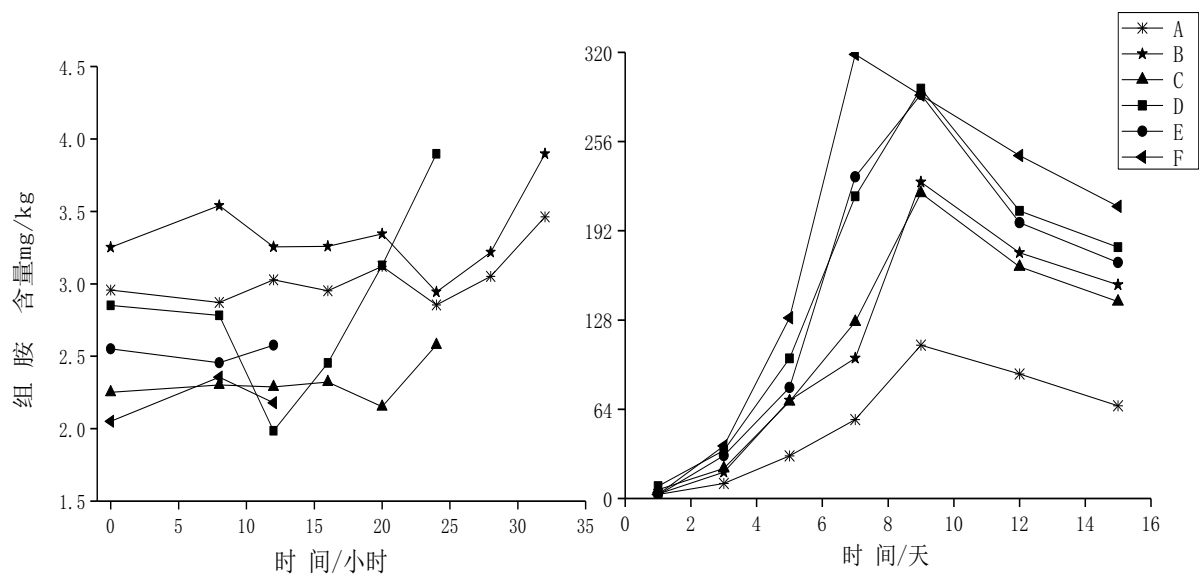


图 4-7 不同发酵条件下熏马肠成熟过程中组胺含量的变化

Fig.4-7 Changes of histamine content in smoked horsemeat sausages at different fermentation conditions during ripening

组胺是发酵香肠中比较重要的生物胺<sup>[90]</sup>，由图 4-7 可以看出，在发酵阶段不同发酵条件下组胺的含量在发酵后期有略微增加，并且变化量在 0.5~1.0 mg/kg 之间较成熟阶段差异不显著 ( $P > 0.05$ )。在成熟阶段，组胺含量呈现先上升后略微减少的趋势，在发酵后期，45℃ 发酵条件下组胺的含量显著高于其他发酵组 ( $P < 0.01$ )，并在成熟第 7 天达到最大值 289.23 mg/kg，在成熟结束后含量也高达 209.56 mg/kg，由图也可以得出高的发酵温度在成熟过程中会加快生物胺的累积。

#### 4.2.2.6 不同发酵条件下熏马肠中酪胺的变化

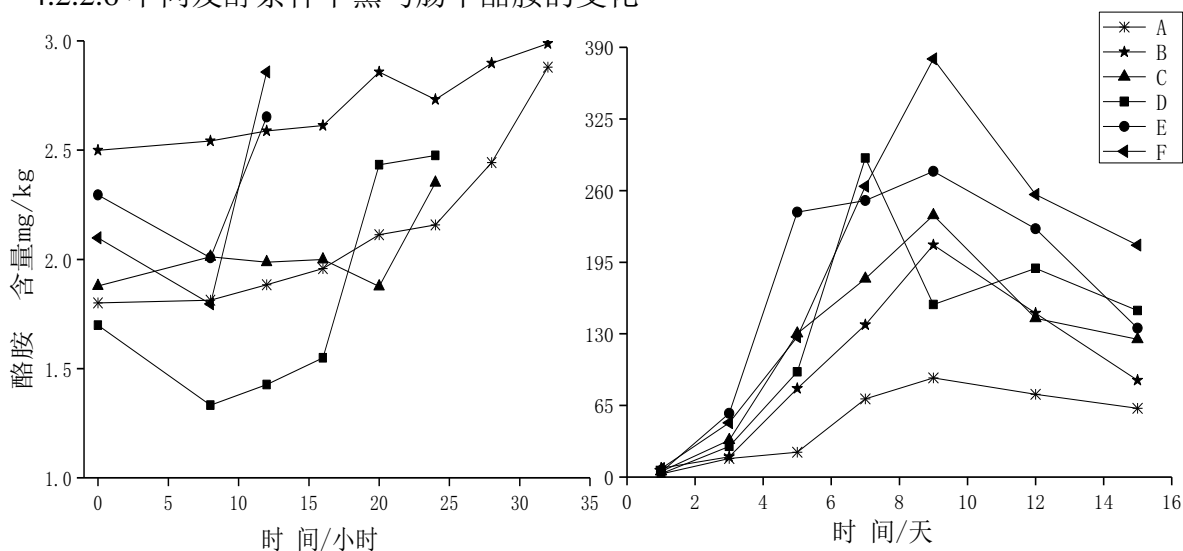


图 4-8 不同发酵条件下熏马肠成熟过程中酪胺含量的变化

Fig.4-8 Changes of tyramine content in smoked horsemeat sausages at different fermentation conditions during ripening

由图 4-8 可以看出, 发酵阶段酪胺与组胺的变化趋势一样, 在前 8 小时各发酵条件下酪胺呈略微下降变化差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 在发酵后期有略微增加。在成熟阶段, 第 5 天后各发酵温度下酪胺含量均有大幅度的增加且差异显著 ( $P < 0.05$ ), 并且在第 5、7、9 天累积量最大, 酪胺在 45℃ 发酵条件下累积量达到最大为 379.47 mg/kg, 在成熟后期降低为 210.53 mg/kg, 其他条件下酪胺的含量也在 62.32 mg/kg 以上。

综合图 4-3~4-8 可以看出, 在不同的发酵条件下每种生物胺的生成情况都是不一样的。不同发酵条件下各种生物胺的产生情况, 对于探究熏马肠中生物胺的产生及累积机理有很大的指导意义。发酵温度相较于成熟阶段较高, 发酵时间较短, 在这期间微生物增值很快, 但各种生物胺的增加量较小。在成熟阶段这 6 种生物胺的含量随着成熟时间的增加呈现先升高后下降的趋势, 并且是发酵温度越高, 生物胺的累积量越大。发酵后期生物胺含量下降的原因可能为发酵后期熏马肠的水分含量较低, 微生物数量不断减少, 氨基酸脱羧酶活性降低, 某些胺被熏马肠中自身存在的一些物质所分解代谢所引起引起的, 但成熟结束后各种生物胺的含量仍然很高, 并且很难减少, 由此说明在熏马肠的生产中原料肉的无污染和发酵温度的选择很重要。

#### 4.2.3 菌数的变化

表 4-3 不同发酵成熟条件下菌数随时间变化的对数值(Log<sub>10</sub>cfu/g)

Table 4-3 Logarithm of the number of bacteria under different fermentation and ripening conditions for change over time

时间/天	A	B	C	D	E	F
1	8.02±0.16	9.1±0.24	8.69±0.07	8.72±0.04	8.85±0.02	9.03±0.10
3	9.27±0.08	9.6±0.68	9.02±0.50	8.95±0.78	9.35±0.20	9.74±0.26
5	9.22±0.32	9.04±0.39	9.39±0.42	8.23±0.09	9.34±0.44	9.86±0.09
7	9.00±0.16	8.71±0.11	9.28±0.04	8.67±0.06	8.91±0.02	9.29±0.24
9	8.86±0.50	7.69±0.96	8.92±0.72	7.88±0.10	8.70±0.01	8.89±0.62
12	7.36±0.40	7.36±0.20	7.30±0.20	7.43±0.07	7.63±0.01	8.25±0.17
15	6.98±0.20	7.13±0.18	6.89±0.1	7.24±0.07	7.08±0.02	7.76±0.30

如表 4-3 所示, 在成熟阶段, 各发酵条件下肠杆菌的菌数随着成熟时间的延长呈现先升高后下降的趋势, 在成熟阶段的温度相对较低, 微生物的生长没有发酵阶段活跃, 在从高温的发酵温度转入低温成熟时, 菌数的减少与发酵阶段相比差异显著 ( $P < 0.05$ ), 这是因为肠杆菌在从高温转向低温时, 由于环境的改变使细胞的增值受到影响, 导致菌数有所下降, 当适应了环境后又开始增值生长, 菌数上升, 在成熟后期熏马肠中的水分不断减少, 使菌数呈现逐渐下降的趋势。

#### 4.2.4 pH 的变化

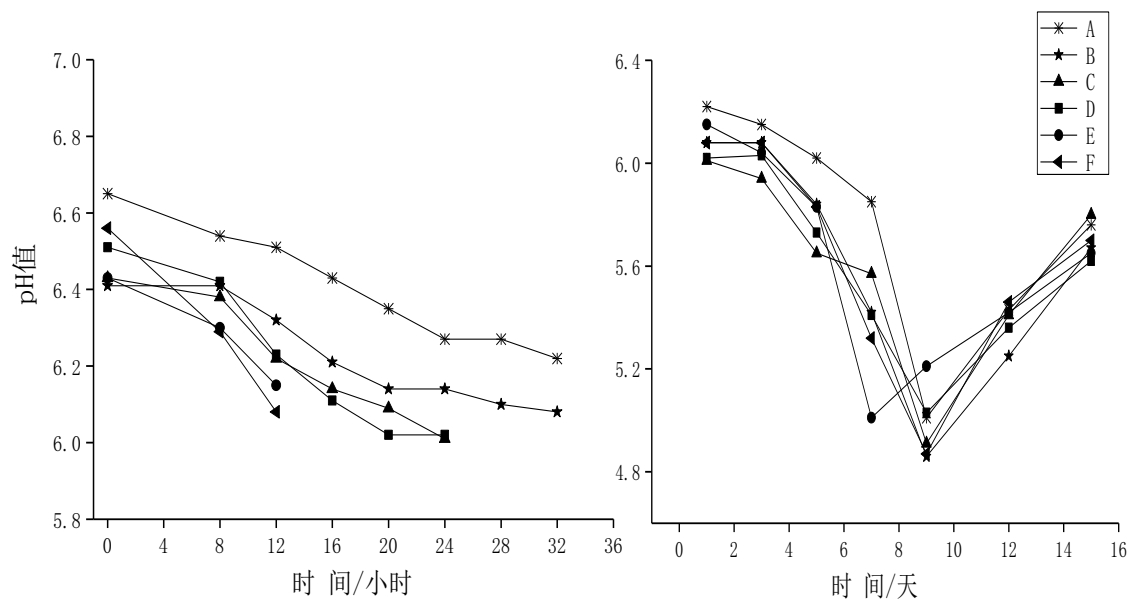


图 4-9 不同发酵条件下熏马肠成熟过程中 pH 值的变化

Fig.4-9 Changes of pH in smoked horsemeat sausages at different fermentation conditions during ripening

由图 4-9 可以看出,在发酵初期熏马肠的 pH 值都在 6.4~6.8 之间,随着发酵时间的延长呈逐渐下降的趋势,但发酵结束后不同发酵温度条件下的 pH 值都在 6.0 以上。成熟前期 pH 的变化仍然呈下降趋势,主要原因可能是肉品中的内源微生物发酵产酸。在成熟的第 8 天其 pH 值降至 4.9,后又呈现上升趋势,主要原因是在成熟后期蛋白质不断分解产生一些胺类物质使 pH 值升高<sup>[91]</sup>,成熟结束后 pH 值在 5.6~6.0 之间。

#### 4.2.5 生物胺模型

建立熏马肠中生物胺的模型目的是通过生物胺的预测方程对熏马肠中生物胺含量进行计算和预测,从而实现对生物胺的有效控制。

为了掌握生物胺的产生情况,本文以 20、25、30、35、40、45℃ 发酵条件下生物胺的变化数据为研究对象,通过 Origin 8.0 软件对熏马肠不同发酵成熟条件下生物胺变化数据进行分析、拟合,以成熟时间(d)为变量 x,生物胺含量(mg/kg)为变量 y,得出了生物胺变化的拟合,具体结果如表 4.4 所示。

表 4-4 中的计算公式可以作为熏马肠在这几个发酵温度下成熟时生物胺含量的参考公式,是对熏马肠中生物胺变化的全面总结,不仅可以预测生物胺的含量,也可以作为生物胺变化科研分析的参考依据。

表 4-4 熏马肠在不同发酵成熟条件下的生物胺含量参考公式

Table 4-4 Formulas for concentrations of biogenic amines of smoked horsemeat sausages at different fermentation ripening conditions

T/°C	腐胺	尸胺	酪胺	组胺
20	$y = 137.2516 - \frac{145.4195}{1+e^{-\frac{x-1.66397}{0.16758}}}$	$y = 278.3241 - \frac{300.5695}{1+e^{-\frac{x-3.2711}{0.7021}}}$	$y = 89.9119 - \frac{89.2576}{1+e^{-\frac{x-4.1708}{1.2837}}}$	$y = 92.7421 - \frac{109.9862}{1+e^{-\frac{x-2.3219}{0.4635}}}$
25	0	0	$y = 200.7416 - \frac{210.1526}{1+e^{-\frac{x-3.2019}{0.5231}}}$	$y = 226.3216 - \frac{226.9862}{1+e^{-\frac{x-3.1564}{0.2312}}}$
30	0	0	$y = 197.1621 - \frac{237.5271}{1+e^{-\frac{x-1.6721}{0.1851}}}$	$y = 187.5632 - \frac{218.9862}{1+e^{-\frac{x-4.3516}{1.2759}}}$
35	$y = 157.3816 - \frac{190.2651}{1+e^{-\frac{x-2.2551}{1.2773}}}$	$y = 500.3216 - \frac{542.7624}{1+e^{-\frac{x-3.2516}{0.1827}}}$	0	$y = 293.7634 - \frac{293.9862}{1+e^{-\frac{x-1.1571}{0.2314}}}$
40	0	$y = 684.5163 - \frac{709.1193}{1+e^{-\frac{x-2.5126}{1.0715}}}$	$y = 244.3217 - \frac{277.4789}{1+e^{-\frac{x-3.1952}{0.8732}}}$	$y = 260.2517 - \frac{289.7718}{1+e^{-\frac{x-2.6512}{1.7345}}}$
45	$y = 400.2137 - \frac{422.9098}{1+e^{-\frac{x-2.7513}{1.5735}}}$	$y = 820.7463 - \frac{840.5399}{1+e^{-\frac{x-4.2752}{2.1356}}}$	$y = 345.7210 - \frac{379.4789}{1+e^{-\frac{x-3.1623}{1.0331}}}$	$y = 296.3516 - \frac{318.5641}{1+e^{-\frac{x-2.2713}{0.8312}}}$

4.2.6 各实验组相关性分析

采用 SPSS17.0 对各实验组的 pH 值、菌落总数变化、生物胺含量变化做相关性分析。

4.2.6.1 各组实验组各自相关性分析

表 4-5 20°C 发酵条件下各指标相关性分析

Table 4-5 Relativity analyzing indexes of A

	a	b	c
a	1		
b	0.181	1	
c	-0.687	0.089	1

表 4-7 30°C 发酵条件下各指标相关性分析

Table 4-7 Relativity analyzing indexes of C

	a	b	c
a	1		
b	0.049	1	
c	-0.748*	-0.061	1

表 4-6 25°C 发酵条件下各指标相关性分析

Table 4-6 Relativity analyzing indexes of B

	a	b	c
a	1		
b	0.697	1	
c	-0.963**	-0.651	1

表 4-8 35°C 发酵条件下各指标相关性分析

Table 4-8 Relativity analyzing indexes of D

	a	b	c
a	1		
b	0.549	1	
c	-0.881**	-0.572	1

表 4-9 40℃ 发酵条件下各指标相关性分析

Table 4-9 Relativity analyzing indexes of E

	a	b	c
A	1		.
b	0.238	1	
c	-0.883**	-0.014	1

表 4-10 45℃ 发酵条件下各指标相关性分析

Table 4-10 Relativity analyzing indexes of F

	a	b	c
a	1		
b	0.276	1	
c	-0.952**	-0.346	1

注: \*\*表示相关性分析  $P < 0.01$  \*表示相关性分析  $P < 0.05$ , 另 a 为 pH, b 为菌落总数值, c 为生物胺积累量。

从以上 6 个相关性分析表可以看出, 不同发酵条件下生物胺积累量与 pH 值大小呈负相关, 相关性系数在 0.687-0.963 之间, 其中 A 组相关性不显著 ( $p > 0.05$ ), C 组相关性显著 ( $P < 0.05$ ), B、D、E、F 组相关性极显著 ( $P < 0.01$ ); pH 值与菌落总数在 B 组与 D 组中均为正相关, 相关性不显著 ( $p > 0.05$ ) 其余各组相关性系数小于 0.3, 说明不相关。生物胺积累量与菌落总数在 B、D 组中均为负相关, 相关性不显著 ( $p > 0.05$ ), 其余各组相关性系数小于 0.3, 说明不相关。由此可以得出在熏马肠的发酵成熟阶段, pH 值越小, 生物胺的累积量越大。许多研究结果表明, 当 pH 较低时, 产生物胺菌为了平衡生理反应, 会加速生物胺的形成<sup>[92-93]</sup>, 本实验与此结果一致。

### 4.3 结论

(1) 对不同发酵成熟条件下熏马肠中生物胺含量分析, 得出发酵温度对发酵阶段的生物胺含量影响较小, 但对成熟阶段生物胺的影响较大, 在成熟阶段 6 种生物胺的含量随着成熟时间的增加呈现先升高后下降的趋势, 并且是发酵温度越高, 生物胺的累积量越大, 成熟后期生物胺的减小量越小。在发酵结束后, 20℃~45℃ 发酵条件下生物胺的总量在 456.99 mg/kg~1573.04 mg/kg 之间, 相关文献表明当生物胺总量超过 1000 mg/kg 时, 会出现食物中毒。因此, 在熏马肠的安全生产过程中, 发酵温度的选择以及原材料的无污染尤为重要。

(2) 在成熟阶段, pH 呈现先下降后上升的趋势, 成熟结束后 pH 值在 5.6~6.0 之间, 肠杆菌总数呈现先下降后上升又逐渐下降的趋势。

(3) 利用 6 个发酵温度条件下生物胺的变化数据, 通过 Origin8.0 软件对数据进行分析、拟合, 得出了生物胺变化的公式, 对熏马肠不同发酵温度下生物胺含量的计算及预测具有非常重要的意义。

(4) 相关性显示: 不同发酵条件下生物胺积累量与 pH 值大小呈负相关, 相关性系数在 0.687~0.963 之间。pH 值与菌落总数在 B 组与 D 组中为正相关、生物胺积累量与菌落总数在 B 组与 D 组中为负相关, 相关性不显著 ( $P > 0.05$ )。说明熏马肠的发酵成熟阶段, pH 值越小, 生物胺的累积量越大。

## 第五章 结论与展望

### 5.1 结论

(1) 运用修正的 Gompertz 模型建立了阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌在 15~45℃ 营养肉汤中的一级和二级生长模型, 得出的 7 个不同温度下阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌的一级模型和二级生长模型的  $R^2$  都在 0.80 以上, 说明此模型可以拟合阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌的生长。还得出在相同温度下阴沟肠杆菌生长的迟滞期都要小于气味沙雷氏菌, 说明阴沟肠杆菌更能适应环境。

(2) 利用修正的 Gompertz 模型对 20~35℃ 发酵温度范围内肠杆菌的生长数据进行拟合, 构建出其在熏马肠上生长的一级模型和二级模型; 通过  $A_f$  和  $B_f$  对一级模型进行验证, 得出准确因子和偏差因子的值均在 1 左右, 表明一级模型能很好预测熏马肠不同发酵温度下肠杆菌的生长, 二级模型中温度与生长速率以及延滞期之间也存在良好的线性关系, 模型验证的残差值绝对值小于 1, 以上说明 Gompertz 模型能够很好的拟合 20~35℃ 发酵温度范围内熏马肠中肠杆菌的生长。

(3) 用高效液相色谱检测熏马肠在不同发酵条件下的生物胺量, 分析不同发酵条件对高产生物胺产生生物胺的动力学变化的影响。得出发酵温度对发酵阶段的生物胺量影响较小, 但对成熟阶段影响较大。在成熟阶段 6 种生物胺的含量随着成熟时间的增加呈现先升高后下降的趋势, 并且是发酵温度越高, 生物胺的累积量越大, 成熟后期生物胺的减小量越小。在发酵成熟阶段, pH 值呈现先下降后上升的趋势, 肠杆菌总数呈现先下降后上升又逐渐下降的趋势。通过对生物胺积累量、pH 和菌落总数的相关性分析得出生物胺积累量与 pH 呈负相关, pH 和菌落总数以及生物胺积累量和菌落总数之间不相关。

### 5.2 创新点

结合预测微生物学手段研究了在不同发酵条件下高产生物胺菌肠杆菌在熏马肠中的生长繁殖情况, 并从发酵的角度分析了高产生物胺菌在发酵成熟过程中产生生物胺的动力学变化情况, 为生物胺的产生及累积机理的研究提供研究基础。

### 5.3 展望

(1) 在熏马肠的生产流通中, 温度是呈波动型的, 为了提高预测模型的准确性和实用性, 可以建立波动条件下肠杆菌的预测模型, 并结合货架期建立其货架期模型。

(2) 可以进一步研究高产生物胺菌在熏马肠的工业化生产中产生生物胺情况以及对产品品质的影响, 建立生物胺与产品品质之间的关系, 以期通过生物胺的量来评价产品的品质及货架期。

## 参考文献

- [1]Aro J M, Nyam-Osor P,Tsujii K,Shimada K,Fukushima M,& Sekikawa M.The effect of starter cultures on proteolytic changes and amino acid content in fermented sausages. Food Chemistry, 2010,119(1), 279–285.
- [2]Armağan Önal, A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. [J]. Food Chemistry, 2007, 103(04): 1475-1486.
- [3] Joostern, H. M. L. J.The biogenic amine contents of Dutch cheese and their toxicological significance. Netherlands Milk and Dairy Journal, 1988, 42, 25-42.
- [4]Silla Santos, M. H.Biogenic amines: their importance in foods. International Journal Food Microbiology, 1996, 29(2-3): 213–231.
- [5]李志军, 吴永宁, 薛长湖. 生物胺与食品安全[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(10): 84-91.
- [6]Medina M A, Urdiales J L, Rodriguez-caso C, et al.Biogenic amines and polyamines: similar biochemistry for different physiological missions and biomedical applications[J].Crit RevBiochem Mol, 2003, 38(01) : 23-59.
- [7]Premont R T, Gainetdinov R R, Caron M G. Following the trace of elusive amines [J].P Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 9474-9475.
- [8]Hellstrand K. Histamine in cancer immunotherapy: a preclinical background [J]. Semin Oncol, 2002, 29: 35-40.
- [9]Vanveelen N M, Kahn R S. Dopamine, serotonin, and schizophrenia [J].Adv Neurol, 1999, 80: 425-429.
- [10]Southwick S M, Bremner J D,Rasmusson A,et al.Role of norepinephrine in the pathophysiology and treatment of posttraumatic stress disorder[J].BiolPsychiat,1999,46: 1192-1204.
- [11]Ansorena D, Montel M C,Rokka M,et al.Analysis of biogenic amines in northern and southern European sausages and role of flora in amine production[J]. Meat Science,2002,61(2):141-147.
- [12]Aleida S. Hernández-C ázares, M-Concepción Aristoy, Fidel Toldrá An enzyme sensor for the determination of total amines in dry-fermented sausage[J]. Journal of Food Engineering, 2011, 106(02): 166–169.
- [13] Shalaby A R. Significance of biogenic amines to food safety and human health . Food Research International, 29, 675-690.
- [14] Eerola S, Hinkkanen R, Lindfors E. & Hirvi T. Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages. Journal of AOAC International, 76, 575-577.
- [15]NY 5073—2001 无公害食品 水产品中有毒有害物质限量[S]. 北京: 中华人民共和国农业部, 2001.
- [16]GB 2733—2005 鲜、冻动物性水产品卫生标准[S]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会, 2005.
- [17]上海市食品药品监督管理局. 食品安全地方标准 发酵肉制品(征求意见稿)[EB/OL]. (2011-08-18)[2011-12-20]. <http://www.shfda.gov.cn>.
- [18]Suzzi G, Gardini F. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review [J]. International Journal of Food Microbiology,2003,88(01):41-54.
- [19]Bover-Cid S, Miguelez-Arrizado M J, Luz Latorre Moratalla L,et al. Freezing of meat raw materials affects tyramine and diamine accumulation in spontaneously fermented sausages [J]. Meat Science,2006,72( 01) : 62–68.
- [20]Maijala R, Nurmi E, Fischer A. Influence of processing temperature on the formation of biogenic amines in dry sausages [J]. Meat Science, 1995, 39 (01): 9-22.
- [21] Ruiz-capillas C,Jim énez-colmenero F. Biogenic amines in meat and meat products[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition,2004,44(7/8):489-499.
- [22]张海萍,李开雄. 新疆熏马肠中生物胺含量的调查.食品与发酵工业, 2012 38(11) :152-156.
- [23]komprda T, neznalora J, Standarn S, Bover-cid S. Effect of starter cultureand storage temperature on the content biogenic amines in dry fermented sausagepolican.Meat Science 2001, 59(02): 267~276.
- [24]Bover-cid S, Izquierdo-Pulido M ,Vidal-Carou M C. Effect of proteolytic starter cultures of

- Staphylococcus spp. On biogenic amine formation during the ripening of dry fermented. *International Journal of Food Microbiology*, 1999, 46:95-104.
- [25]Latorre-Moratalla M L, Bover-Cid S, Talon R, Garriga M , Zanardi E, Ianieri A, et al. Strategies to reduce biogenic amine accumulation in traditional sausage manufacturing. *LWT- Food Science and Technology*, 2010, 43(1), 20–25.
- [26]Koessler, K. K., Hanke, M. T., & Sheppard, M. S. Production of histamine, tyramine, brochospartic and arteriospartic substance in blood broth by pure cultures of microorganisms. *The Journal of Infectious Diseases*, 1928, 43(5), 363–377.
- [27]Suzzi G & Gardini F. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 88(1), 41–54.
- [28]Yoshinaga, D. H., & Frank, H. A. Histamine-producing bacteria in decomposing skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Applied and Environmental Microbiology*, 1982, 44(2), 447–452.
- [29]Maijala R, Nurmi E & Fischer A. Influence of processing temperature on the formation of biogenic amines in dry sausages. *Meat Science*, 1995, 39(1), 9–22.
- [30]赵中辉, 林洪, 李振兴. 不同加工对生物胺影响的研究[J]. *食品工业科技*, 2011, 30(07) :88-90.
- [31]Komprda T, Smelák D, Pechovák P, et al. Effect of starter culture, spice mix and storage time and temperature on biogenic amine content of dry fermented sausages [J]. *Meat Science*, 2004, 67 (04): 607-616.
- [32]Komprda T, Slávková P, Dohnal V. Biogenic amine content in dry fermented sausages as influenced by a producer, spice mix, starter culture, sausage diameter and time of ripening [J]. *Meat Science*, 2009, 83 (03): 534-542.
- [33]Fausto Gardini, Sara Bover-Cid, et al. Modeling the Aminogenic Potential of *Enterococcus faecalis* EF37 in Dry Fermented Sausages through Chemical and Molecular Approaches. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008, 74(09):2740.
- [34]Membr J M, Lambert R J W. Application of predictive modelling techniques in industry: from food design up to risk assessment[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 128(01): 10-15.
- [35]Adair, C. and Briggs, P.A. (1993). The concept and application of expert systems in the field of microbiological safety. *J. Ind. Microbiol.* 12: 263–267.
- [36]Baranyi J, Roberts T A. Mathematics of Predictive Food Microbiology [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1995, 26:199- 218.
- [37]唐佳妮, 张爱萍, 刘东红. 预测微生物学的研究进展及其在食品中的应用[J]. *中国食品学报*, 2012, 10(06):162-166.
- [38]李苗云, 朱应举, 赵改名. 微生物预测模型研究及其在肉品工业中的应用[J]. *食品科技*, 2008, No.2:57-60.
- [39]袁永辉. 即食冷冻水产品加工过程卫生质量控制的研究[J]. *农产品加工(学刊)*, 2009, 12(09): 39-43.
- [40]Dominguez S A, Schaffner D W. Development and validation of a mathematical model to describe the growth of *Pseudomonas* spp. In raw poultry stored under aerobic conditions [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 120(03): 287-295.
- [41]卢君逸, 罗瑞明, 刘莹莹, 等. 市售五香牛肉货架期预测模型的建立[J]. *肉类研究*, 2013, 27(06): 25-28.
- [42]谢程炜, 诸永志, 王道营, 等. 动力学模型预测药膳型老鸭煲货架期[J]. *食品科学*, 2013, 31(08): 142-145.
- [43]韩巍巍, 刘程慧, 胡文忠, 等. 鲜切苹果微生物生长模型研究及货架期预测[J]. *食品工业科技*, 2011, 31(12) :104-107.
- [44]Cayre M E, Vignolo G. Modeling lactic acid bacteria growth in vacuum-packaged cooked meat emulsions stored at three temperatures[J]. 2003, 561-566.
- [45]张秋勤, 徐幸莲. 预测微生物学在禽肉质量安全控制中的应用[J]. *食品科学*, 2010, 31(13): 292-296.
- [46]胡洁云, 欧杰, 李柏林. 预报微生物学在食品安全风险评估中的作用[J]. *微生物学通报*, 2009, 09:1397-1403.
- [47]Sumner J, Krist k. The use of predictive microbiology by the Australian meat industry [J]. *Int J Food Microbiol*, 2002, 73: 363-366.
- [48]赵瑞兰, 李远钊, 张培正. 预测食品微生物学概述及应用 [J]. *中国食品卫生杂志*. 2006, 18:464-468.

- [49]宋华,江晓路.预测微生物学发展与水产品的安全控制[J].中国食物与营养,2011,17(7):11-14.
- [50]Oscar T P. A quantitative risk assessment model for Salmonella and whole chickens [J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 93(02): 231-247.
- [51]朱英莲,李远钊,张培正,等.温度生长模型在大肠杆菌 O157:H7 控制中的应用[J].食品科学,2007,28(03): 183-186.
- [52]姬华.对虾中食源性弧菌预测模型建立及风险评估[D]. 江南大学,2012
- [53]黄驰云.冻生虾仁中大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的分先评估及对产品货架期的预测[D]. 广东海洋大学,2010.
- [54]闫少辉,李红伟.发酵香肠中生物胺生成量的菌株效应分析[J]. 2007,28(1):82-84.
- [55]李柏林,郭剑飞,欧杰.预测微生物学数学建模的方法构建[J].食品科学,2004,25(11) :52-57.
- [56]Zwietering M H, Jongenburger I, rombouts F M, et al. Modeling of the *bacterial* growth curve [J]. Journal of Application Environment Microbiology, 1990, 56( 06) : 1875—1881.
- [57] Buchanan R L, Whiting R C, Damert W C. When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi and three phase linear models for fitting bacterial growth curves[J]. Food Microbiology, 1997, 14: 313—326.
- [58]韩北忠,李敏,张琳,等.预测微生物学与食品质量安全[J].中国酿造,2005,(09) :5-7
- [59]Ratkowsky D A, Olley J, McMeekin T A, et al. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures[J]. Journal of Bacteriology, 1982, 149(01): 1-5.
- [60]徐天宇.食品微生物生长预测模型[J].食品科学,2003,16(1):17- 23.
- [61]Walls I, Scott V N. Use of predictive microbiology in microbial food safety risk assessment[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007:697- 102.
- [62]翁丽华,徐幸莲.肠杆菌科细菌在热鲜肉上生长预测模型的建立与验证[J].南京农业大学学报,2013,36( 1) :125—130.
- [63]Huang L H. Dynamic computer simulation of clostridium perfringens growth in cooked ground beef [J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 87( 3) :217-227.
- [64]Maijala R, Eerola S. Biogenic amines [M]. Encyclopedia of dairy Science, 2002,12(3):156-162.
- [65]艾迦.传统发酵食品一览[J].食品与健康,2010(10):20-21.
- [66]王艳梅.发酵肉制品研究现状[J].肉类工业,2004(06) :41-42.
- [67]李文茹,谢小保,施庆珊,等.预测微生物学及其在食品科学中的应用[J].食品与发酵工业,2009,(04) :140-144.
- [68]Baranyi J, Roberts T A. Mathematics of predictive food microbiology[J]. International Journal of Food Microbiology, 1995, 26(02): 199-218.
- [69] Gonzalez M, skandamis P, nhanninen M L. A modified Weibull model for describing the survival of Campylobacter jejuni in minced chicken meat[J]. International Journal of Food Microbiology, 2009,136(01): 52-58.
- [70] Soon K S, Min K J, Jung Y J, et al. A model of the effect of temperature on the growth of pathogenic and nonpathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters in Korea [J]. Food microbiol, 2008, 25(05): 635-641.
- [71]李昱姐.杀菌液全蛋中沙门氏菌预测模型的建立[D].哈尔滨:东北农业大学,2010.
- [72]林睿,王宏勋,陈振青,等.裸装卤制全鸭中肠杆菌生长预测模型研究[J].食品科学,2012 ,(15):196-198.
- [73] Found K E, hegean G D. Microbial spoilage of Tofu (soybean curd) [J]. Journal of Food Protection, 1993, 56(0 2) : 157-164.
- [74]国家质量技术监督局. GB 4789. 2—2010 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, 2010.
- [75] Ross T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology[J]. Journal of Application Bacteriology, 1996, 81: 501—508.
- [76]Baranyi J, Pin C, Ross T. Validating and comparing predictive models[J]. International Journal of Food Microbiology, 1999, 48: 159—166.

- [77]王军,董庆利,丁甜.预测微生物模型的评价方法[J].食品科学, 2011, 32(21): 268-272.
- [78]许钟, 杨宪时, 郭全友. 鱼类腐败菌不同生长动力学温度模型的可靠性评价和比较 [J]. 海洋水产研究, 2005,(0 5) : 47-53.
- [79] Davey K R. Applicability of Davey(linear Arrhenius) predictive model to the lag phase to microbial growth[J].Journal of Applied Microbiology,1991,70( 03) : 253—257.
- [80] Latorre-Moratalla M L, veciana-Nogués T, Bober-Cid S, et al. Biogenic amines in traditional fermented sausages produced in selected European countries [J]. Food Chemistry, 2008, 107 (2): 912-921.
- [81]谭李红,夏文水,张春晖.一种混合发酵剂对干发酵香肠中生物胺含量的影响[J].食品工业科技,2005,21(04):429-431.
- [82] Kung H F, Tsai Y H, Wei C I. Histamine and other biogenic amines and histamine-forming bacteria in miso products [J]. Food Chemistry, 2007, 101(1): 351-356.
- [83] Bober-Cid S, Izquierdo-Pulido M, Vidal-Carou M C. Influence of hygienic quality of raw materials on biogenic amine production during ripening and storage of dry fermented sausages [J]. Journal of Food Production, 2000, 63(11): 1544-1550
- [84]Halasz A, Barath A, Simon-Sarkadi L, et al. Biogenic amines and their production by microorganisms in food [J]. Trends in Food Science and Technology, 1994, 5(2): 42-49
- [85]Durlu-Ozkaya F, Ayhan K , & Vural N. Biogenic amines produced by Enterobacteriaceae isolated from meat products. Meat Science, 2001, 58(2): 163-166.
- [86] Bauer F, Potzelberger D , Hellwig E. & Paulsen P. Formation of biogenic amines in fresh meat packed in oxygen permeable foil. In Proceedings of the 42nd International Congress of Meat Science and Technology, 1-6 September 1996, 552-553, Lillehammer, Norway.
- [87] Masson F, Eclache L, Compte T, Talon C, & Montel C. Screening of microbial strains producing amines and isolated from meat products. In Proceedings of the 42nd International Congress of Meat Science and Technology. 1996, 6(1)546-547, Lillehammer, Norway.
- [88] Bover-Cid S, Izquierdo-Pulido M, Vidal-Carou M C. Effect of the interaction between a low tyramine-producing Lactobacillus and proteolytic staphylococci on biogenic amine production during ripening and storage of dry sausages [J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 65(1-2): 113-123.
- [89]李飞燕,张一敏等.贮藏过程中冷却牛肉微生物模型的建立[J].食品与发酵工业, 2011, 37(07) :220-224.
- [90]王颖,邱璠.食品中的生物胺及其检测方法[J].中国酿造,2011, 12(10) :1-4.
- [91]卢士玲,传统中式香肠中生物胺产生及其控制技术的研究[D].南京农业大学, 2010.
- [92] Maijala R, Nurmi E, Fischer A. Influence of processing temperature on the formation of biogenic amines in dry sausages [J]. Meat Science, 1995, 39 (1): 9-22.
- [93] Sagues A X R, Herrero M M H, Jerez J J R, et al. Biogenic amines in cheeses: Toxicity and factors influencing their formation [J]. Coden Almec, 1998, 294 (pp): 59-66.

## 致 谢

两年的研究生生活转眼已进入了尾声，在兴奋、激动、迷茫、焦虑、期盼中走过了这不寻常的两年，走上工作的征程。这两年的学习生活有喜有忧，使我学到了很多知识，得到了很多方面的锻炼，随着这篇论文的完成，也为我的研究生学习画上了一个句号。在即将离校之际，我要由衷的感谢在这段历程中推动和帮助我前行的每一位师长和亲朋。

首先向我的导师李开雄老师，卢士玲老师致以最诚挚的谢意。感谢李开雄老师为我提供了宝贵的学习机会，感谢卢老师对我论文的悉心指导，从选题、构思到定稿无不渗透着老师的心血和汗水。两位老师为我树立了很好的榜样，教会我们无论做什么事情，都应先学会做人、再做事。本着认真、务实的态度对待一切。

感谢姬华老师、李宝坤老师对我实验过程中的悉心指导，感谢杨艳彬老师、许程剑老师对我实验的大力支持。

感谢李蕊婷师姐的细心讲解，感谢我的同学马宇霞、牛博楠、李瑶、裴龙英、马艳梅等三年来在学习和生活上对我的关心和帮助。

感谢师妹刘玉晗、魏哲文、师弟黄伟华、周晶在实验过程中给予的热心帮助。

还要感谢百忙之中评阅本论文的专家、教授，感谢你们提出的宝贵意见。

在此特别感谢我的父母，你们是我生命中永远的依靠，你们的支持和关怀是我前进的动力。

最后感谢在这两年中所有给过我帮助和支持的人，衷心的感谢你们为我做的一切。

段丽娇

二零一四年 五月 石河子

## 作者简介

段丽娇，汉族，1989年9月出生，籍贯新疆。2012年毕业于石河子大学食品学院食品科学与工程专业，获工学学士学位。2012年9月在石河子大学食品学院食品加工与安全专业攻读硕士学位。

### 在校期间主要参与的研究项目

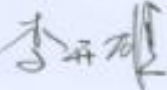
参与了国家自然科学基金项目《熏马肠中生物胺产生和累积机理的研究》(31160329)的部分研究工作。

参与了石河子大学自然科学重点项目：新疆熏马肠中生物胺累积机理研究（项目编号：ZRKX2010ZD04-3）的部分研究工作。

### 在校期间发表的文章：

1 段丽娇, 卢士玲, 李开雄, 姬华. 不同发酵条件下高产生物胺肠杆菌预测模型的建立[J]. 中国食物与营养, 2014, 12(4): 152-156.

石河子大学硕士研究生学位论文  
导师评阅表

研究生姓名	段丽娇	学 制	两 年
专 业	食品加工与安全	研究方向	食品加工过程中质量控制
<p>学术评语:</p> <p>该研究以从熏马肠中分离得到的高产生物胶阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌为研究对象,通过 Gompertz 模型和平方根模型建立了两种菌在熏马肠和营养肉汤中生长的一级和二级模型,揭示出了不同温度下阴沟肠杆菌和气味沙雷氏菌在营养肉汤和熏马肠中的生长繁殖情况,最后分析了肠杆菌在熏马肠不同发酵条件下产生生物胶的动力学变化情况并建立了相应的生物胶模型。</p> <p>该论文试验设计合理,层次分明,技术路线可行,实验方法正确,数据真实可靠,分析准确,结论客观明确。该生掌握了科学研究的技术方法和手段,具备了独立从事科研工作的能力。</p> <p>论文工作量饱满,观点明确,论据充分,结构严谨,观点明确,重点突出,写作文字流畅,结构合理,层次分明、条理清晰,符合科技论文写作规范。同意答辩申请。</p> <div style="text-align: right; margin-top: 20px;"> <p>指导教师签字: </p> <p>2016年6月8日</p> </div>			