

研究报告

复合有机酸对鸡肉中单核细胞增生李斯特菌减菌的影响

钟丹[#], 张琴[#], 王也, 宁海波, 王小丁, 王泽港, 焦新安, 殷月兰^{*}

扬州大学生物科学与技术学院 江苏省人兽共患病学重点实验室 江苏省动物重要疫病和人兽共患病防控协同创新中心 农业农村部农产品质量安全生物性危害因子(动物源)控制重点实验室, 江苏 扬州 225009

钟丹, 张琴, 王也, 宁海波, 王小丁, 王泽港, 焦新安, 殷月兰. 复合有机酸对鸡肉中单核细胞增生李斯特菌减菌的影响[J]. 微生物学通报, 2024, 51(7): 2508-2520.

ZHONG Dan, ZHANG Qin, WANG Ye, NING Haibo, WANG Xiaoding, WANG Zegang, JIAO Xin'an, YIN Yuelan. Composite organic acids for decontamination of *Listeria monocytogenes* in chicken[J]. Microbiology China, 2024, 51(7): 2508-2520.

摘要: 【背景】单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, Lm)是重要的人畜共患致病菌, 家禽携带的 Lm 沿屠宰和销售产业链逐级放大传播, 给消费者的身体健康造成严重影响。【目的】建立和应用绿色高效的减菌技术, 用于控制肉鸡产业链中 Lm 污染。【方法】选用乳酸、柠檬酸作为复合有机酸消毒剂, 通过响应面法确定乳酸和柠檬酸联合使用的最佳杀菌条件, 在屠宰场中进行初步应用, 并对复合有机酸的杀菌机制进行探究。【结果】最佳杀菌条件为: 乳酸含量 0.98%, 柠檬酸含量 0.72%, 作用时间 3.6 min。使用该条件可有效减少鸡肉表面 99%以上的 Lm, 延长鸡肉货架期, 并能明显降低肉鸡屠宰场预冷环节、分割环节中刀具和肉鸡胴体表面 Lm 的分离率。复合有机酸能显著抑制 Lm 毒力相关基因表达, 降低 Lm 生物膜形成, 破坏细菌结构。【结论】经响应面法筛选得到的复合有机酸能在短时间内有效减少肉鸡表面 Lm 的污染, 在防控肉鸡屠宰环节中 Lm 污染方面具有良好的应用前景。

关键词: 单核细胞增生李斯特菌; 乳酸; 柠檬酸; 减菌; 生物膜

资助项目: 国家自然科学基金(32161133025, 32373012); 江苏省农业科技自主创新基金[CX(21)1004]

[#]对本文贡献相同

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32161133025, 32373012), and the Jiangsu Provincial Agricultural Science and Technology Independent Innovation Funds (CX(21)1004).

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author. E-mail: yylan@yzu.edu.cn

Received: 2023-10-11; Accepted: 2023-12-07; Published online: 2024-02-19

Composite organic acids for decontamination of *Listeria monocytogenes* in chicken

ZHONG Dan[#], ZHANG Qin[#], WANG Ye, NING Haibo, WANG Xiaoding, WANG Zegang, JIAO Xin'an, YIN Yuelan^{*}

College of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou University, Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis, Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Key Laboratory of Prevention and Control of Biological Hazard Factors (Animal Origin) for Agrifood Safety and Quality, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

Abstract: [Background] *Listeria monocytogenes* (Lm) is a major zoonotic pathogen. Lm carried by domesticated animals can spread along slaughter and sale chains, posing a threat to consumers' health. [Objective] To establish and apply a green efficient technology for the control of Lm contamination in the broiler industrial chain. [Methods] We prepared a composite organic acid disinfectant composed of lactic acid and citric acid, optimized the sterilization conditions by response surface methodology, conducted preliminary applications of the disinfectant in slaughterhouses, and explored the sterilization mechanism. [Results] The optimal sterilization conditions were as follows: lactic acid content of 0.98%, citric acid content of 0.72%, and treatment for 3.6 min. The treatment under these conditions reduced the Lm on the chicken surface by more than 99%, extended the shelf life of chicken, and decreased the isolation rate of Lm on the surface of knives and broiler carcasses in the pre-cooling and segmentation stages in broiler slaughterhouses. Moreover, the composite organic acid disinfectant significantly down-regulated the expression of genes associated with Lm virulence, inhibited the biofilm formation, and destroyed the cell structure of Lm. [Conclusion] The composite organic acid disinfectant prepared in this study can effectively reduce Lm on the broiler surface in a short time, demonstrating good application prospects in preventing and controlling Lm contamination in the slaughter process of broilers.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; lactic acid; citric acid; decontamination; biofilm

单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, Lm)是一类重要的食源性人畜共患病原菌, Lm能够在低温、低 pH、高盐等食品生产环境的胁迫条件下生存和繁殖^[1], 广泛存在于肉制品、乳制品、冷冻冷藏食品以及即食食品中。人类食用了被 Lm 污染的食物可引发李斯特菌病^[2], 临床症状主要表现为脑膜炎、流产、败血症, 死亡率高达 20%–30%^[3]。2008–2017 年, 中国 22 个省份共报告李斯特菌病 759 例, 总病死率达 18%, 新生儿患者的病死率更高(73%)^[4]。屠

宰场是肉类食品进入人们餐桌的重要环节, 研究显示, 屠宰前期肉鸡中 Lm 的检出率较低, 而在后期冷藏环节检出率可达 20%以上。因此, 屠宰场有必要提高 Lm 防控技术体系, 确保肉类及其产品的质量安全。

食品行业中常用的控制 Lm 污染的方法为巴氏杀菌、高温瞬时杀菌和微波杀菌法等热杀菌法, 然而过高的温度可能会对食品的营养、色泽和风味等造成一定的影响^[5], 因此寻找一种有效的非热杀菌技术对于食品中 Lm 污染的控制

十分必要。有机酸具有明显的体外抑菌活性, 乳酸、柠檬酸等有机酸是国内外食品添加剂标准中允许使用的食品添加剂, 也是普遍认为可用于屠宰环节的安全有效的消毒剂^[6-8]。高浓度有机酸对鸡肉的风味有负面影响, 而有机物会削弱单组分有机酸消毒剂的消毒效果, 因此可将两种或两种以上的消毒剂配伍使用, 在降低有机酸使用浓度的基础上提高消毒效果^[9]。本文旨在通过定量杀菌试验对复合有机酸进行最优条件筛选, 并将其用于肉鸡屠宰场预冷和分割包装环节。通过测定有机酸处理后的 Lm 生物膜的形成能力、细胞结构变化以及有机酸作用下细菌毒力基因表达水平变化, 初步探究有机酸减菌的机理, 以期有机酸用于控制鸡屠宰场中 Lm 的污染奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 样品

实验用单核细胞增生李斯特菌国际标准株 EGD-e、大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*) E526、肠炎沙门氏菌(*Salmonella enterica* serovar Enteritidis, SE) C50041 由江苏省人兽共患病学重点实验室保存。实验所使用的生鲜鸡肉购自江苏省扬州市的沃尔玛超市。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

LB 培养基, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 脑心浸出液培养基(brain heart infusion, BHI), BD 公司。L-乳酸, 上海麦克林生化科技公司; 95%乙醇和一水合柠檬酸, 中国医药集团有限公司; 细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; AceQ Universal SYBR qPCR Master Mix 和反转录试剂盒, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

恒温培养箱, 常州恒天科技有限公司; Milli-Q 纯水仪, 密理博公司; Qubit4 荧光定量

仪, Invitrogen 公司。

1.3 菌株 EGD-e 的培养

将菌株 EGD-e 接种于 BHI 培养基中, 37 °C、180 r/min 培养 16–18 h。用 BHI 液体培养基将细菌调整至 $OD_{600}=0.8$, 并稀释至 1×10^6 CFU/mL 备用。

1.4 有机酸配制

用无菌蒸馏水将 80% 的 L-乳酸和一水合柠檬酸固体分别配制为 10% L-乳酸原液和 10% 柠檬酸原液备用。

1.5 有机酸单因素试验

以乳酸浓度、柠檬酸浓度、作用时间为影响因素, 进行单因素试验。取 100 μ L 浓度为 10^6 CFU/mL 的菌液, 加入 900 μ L 的有机酸中分别反应 1、2、5 min 后各取 100 μ L 涂布至 BHI 固体培养基上, 置于 37 °C 恒温培养 24 h 后进行计数。同时设置空白对照, 根据使用消毒剂前后对照组和实验组的活菌数, 计算杀菌率, 每个样品进行 3 次重复。

1.6 复合有机酸响应面优化

基于前期有机酸单因素试验的基础, 利用 Design Expert 12 软件, 以乳酸浓度、柠檬酸浓度和作用时间为自变量, 以杀菌率作为响应值, 采用 Box-Behnken 响应面分析法在三因素三水平对处理条件进行响应面分析优化。

1.7 最优条件的验证

为检测所得结果的可靠性, 按照乳酸含量 0.98%, 柠檬酸含量 0.72%, 作用时间 3.6 min 的条件进行验证试验, 同时设置平行及空白组, 并进行 3 次独立试验。

1.8 复合有机酸处理对贮藏期间鸡肉表面菌落总数的影响

以 1×10^5 CFU 的菌量人工污染鸡肉样品, 静置 30 min 后分别放入 225 mL 蒸馏水和复合有机酸溶液中浸泡 3.6 min, 每组 3 个重复, 转移

至无菌培养皿中, 4 °C贮藏。从第 0 天开始, 每隔 2 d 检测鸡肉表面 Lm 的存活数, 连续检测 1 周。

1.9 复合有机酸在屠宰场的应用

预冷环节消毒: 随机抽取肉鸡屠宰加工线预冷环节前的整鸡 10 只, 浸泡于 10 L 含有 0.98%乳酸和 0.72%柠檬酸的复合有机酸溶液中处理 3.6 min 进行减菌, 使用无菌棉球均匀擦拭整鸡的内表面和外表面, 以正常预冷环节的胴体作为对照组。

分割环节消毒: 以进行肉鸡胴体分割的操作工人使用的刀具为对象, 使用无菌棉球擦拭刀具表面, 采集 10 份样品作为对照组; 采样后对工人使用的刀具进行复合有机酸浸泡消毒 3.6 min, 消毒后用棉球擦拭刀具和肉鸡胴体的切割面, 另采集 10 份样品作为实验组。将分割后的鸡肉浸泡在复合有机酸消毒剂中杀菌 3.6 min, 采集 10 份样品, 对照组为正常分割环节的鸡肉胴体。将擦拭样和鸡肉样品均置于无菌采样袋内, 低温保存下运送至实验室进行检测, 评估消毒效果。

1.10 有机酸应激下 Lm 相关基因的转录水平表达

采用荧光定量 PCR SYBR green 法进行检测, 相关引物序列见表 1。将标准菌株 EGD-e 分

别在 BHI 和含有机酸的培养基中过夜培养 16 h, 根据细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒说明书提取 mRNA, 使用宝生物反转录试剂盒将 mRNA 转录为 cDNA, 采用实时荧光定量 PCR 法(qRT-PCR)检测 *sigB*、*prfA*、*actA*、*hly*、*inlA* 的 mRNA 水平。选择 *gyrB* 基因作为内参以客观评价检测基因的表达差异, 结果分析采用相对定量分析方法, 根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值来确定基因的相对表达量。

1.11 生物膜形成能力测定

采用结晶紫法测定生物膜的形成能力。将标准菌株 EGD-e 接种至 BHI 液体培养基中, 37 °C过夜培养。将过夜培养的菌液分别用 BHI 培养基和含有 0.98%乳酸、0.76%柠檬酸的 BHI 培养基调整至 OD_{600} 为 1.0, 稀释 10 倍后向 96 孔板中加入 200 μ L 稀释液, 置于 37 °C恒温培养箱培养 48 h (每组 3 个重复)。然后倒出孔板中的培养物, 用双蒸水(double distilled water, SW)洗涤孔板 3 次, 每孔中加入 225 μ L 1 g/L 结晶紫溶液, 染色 15 min 后再用 SW 洗涤 3 次并烘干。最后加入 225 μ L 95%乙醇溶液溶解 15 min, 用酶标仪测量 OD_{595} 的吸光值。

1.12 有机酸对 Lm 表面的影响

通过扫描电镜对有机酸处理后的 EGD-e 表面进行观察。在 BHI 液体培养基中接种标准菌株 EGD-e, 37 °C过夜培养 12 h, 调整至 OD_{600}

表 1 荧光定量引物

Table 1 Primers for fluorescent quantitative

基因 Gene	正向引物 Forward primer (5'→3')	反向引物 Reverse primer (5'→3')
<i>gyrB</i>	AGACGCTATTGATGCCGATGA	GTATTGCGCGTTGTCTTCGA
<i>sigB</i>	TCGGATGGAAGTACGATTAC	TCTTCTGTTCTCGCTCATCT
<i>prfA</i>	AGCCAACCGATGTTTCTGT	TATTAGCGAGAACGGGACC
<i>actA</i>	TATGCGTGCGATGATGGT	ACCTCGCTTGACTGCTCT
<i>hly</i>	AAATGCCACTAAATCAAACG	CACTGTAAGCCATTTCTGTC
<i>inlA</i>	AAGATGCTTCACTCCCAACA	GCCATTGCGGTTCTACT

为 1.0 后用 BHI 液体培养基稀释 100 倍, 将爬片加至 24 孔细胞培养板中, 每孔加入 100 μL 菌液和 900 μL 含有机酸消毒剂的 BHI 液体培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h。用 SW 清洗 3 次后加入 1 mL 2.5% 戊二醛, 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 24 h。用 PBS 清洗 3 次后分别使用 30%、50%、70%、80%、90%、95%、100% 浓度梯度的乙醇分别脱水 10–15 min, 加入含有无水 Na_2SO_4 的无水乙醇静置, 在临界点干燥仪中干燥 2 h 后镀膜, 最后贴样、导电上机观察。

1.13 统计学方法

本实验的数据分析采用 Prism 8 中的 *t* 检验方法, $P < 0.05$ 表示结果显著, $P < 0.01$ 表示结果极显著。

2 结果与分析

2.1 有机酸单因素试验结果

对符合食品添加剂国家标准的乳酸、柠檬酸进行初步试验。结果表明, 同一有机酸在相同处理时间下随着浓度的升高杀菌作用逐渐增强。乳酸最低浓度为 2% (图 1A) 或柠檬酸最低浓度为 5% (图 1B) 时在 1–5 min 内达到高效杀菌效果, 杀菌率可达 50%–100%。

2.2 复合有机酸响应面优化结果

2.2.1 响应面优化结果

结合单因素试验结果, 进一步缩小各因素的最佳范围, 确定在乳酸浓度 0.50%–1.00%, 柠檬酸浓度 0.50%–1.00%, 作用时间 1–5 min 进行响应面优化试验。利用软件 Design Expert 12 以 L-乳酸浓度(A) 0.50%–1.00%, 柠檬酸浓度(B) 0.50%–1.00%, 作用时间(C) 1–5 min 为自变量, 杀菌率(R)为响应值的三因素三水平来进行响应面优化试验。根据表 2, 进行 17 次独立的杀菌试验。

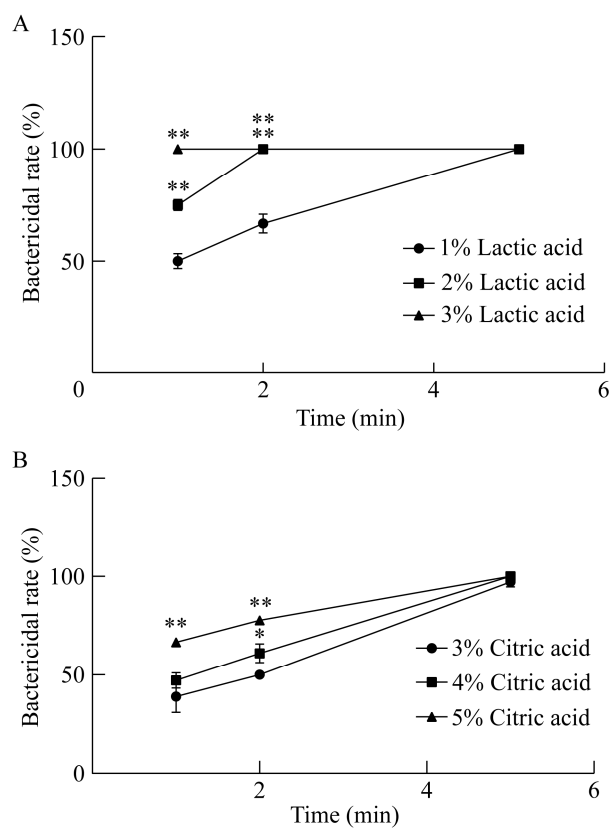


图 1 不同浓度乳酸(A)和柠檬酸(B)对 Lm 的杀菌效果

Figure 1 Bactericidal effect of lactic acid (A) and citric acid (B) against Lm at different concentrations. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

2.2.2 模型建立及显著性分析

利用响应面分析法对复合有机酸的杀菌效果进行回归拟合, 得到二次多项回归模型方程为: $R1 = 0.953 + 0.105 6A + 0.067 0B + 0.098 3C - 0.089 6AB - 0.063 2AC + 0.000 14BC - 0.017 9A^2 - 0.068 6B^2 - 0.039 4C^2$, 采用 *F* 检验对试验数据进行方差分析(表 3), 评价模型的统计学意义。

根据模型方差分析(表 3)可知, 模型方程不同处理组间的差异显著($P < 0.05$), 说明此方法具有可靠性。由图 2 所示, 乳酸和柠檬酸的浓度对杀菌率的影响最大, 交互作用最明显。随着乳酸和柠檬酸浓度的增加, 杀菌率逐渐增加。

表 2 响应面试验设计及结果

Table 2 Response surface experimental design and results

Number	A (%)	B (%)	C (min)	R (%)
1	0.75	0.50	5	93.89
2	0.50	0.75	1	66.67
3	0.75	0.75	3	94.44
4	0.75	1.00	1	75.00
5	1.00	0.75	1	98.06
6	0.50	0.75	5	93.89
7	0.75	0.75	3	97.22
8	0.75	0.75	3	95.00
9	1.00	1.00	3	100.00
10	0.75	0.75	3	93.89
11	0.75	0.50	1	69.44
12	0.50	0.50	3	55.56
13	0.75	0.75	3	96.39
14	0.50	1.00	3	94.44
15	1.00	0.75	5	100.00
16	1.00	0.50	3	96.94
17	0.75	1.00	5	100.00

表 3 回归方程的方差分析

Table 3 Variance analysis of regression equation

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
Source	Sum of squares	DF	Mean square	F value	P value
模型	0.280 5	9	0.031 2	11.80	0.001 8
Model					
失拟项	0.017 7	3	0.005 9	30.86	0.003 2
Lack of fit					
误差项	0.000 8	4	0.000 2		
Error term					
总和 Total	0.298 9	16			

通过软件模拟得到的最佳杀菌条件为：乳酸含量 0.98%，柠檬酸含量 0.72%，作用时间 3.6 min。

2.3 最优条件的验证结果

利用回归模型通过响应面法可拟合得到最佳杀菌条件：乳酸含量 0.98%，柠檬酸含量 0.72%，作用时间 3.6 min。采用上述最优杀菌条件进行验证试验，结果如图 3A 所示，经复

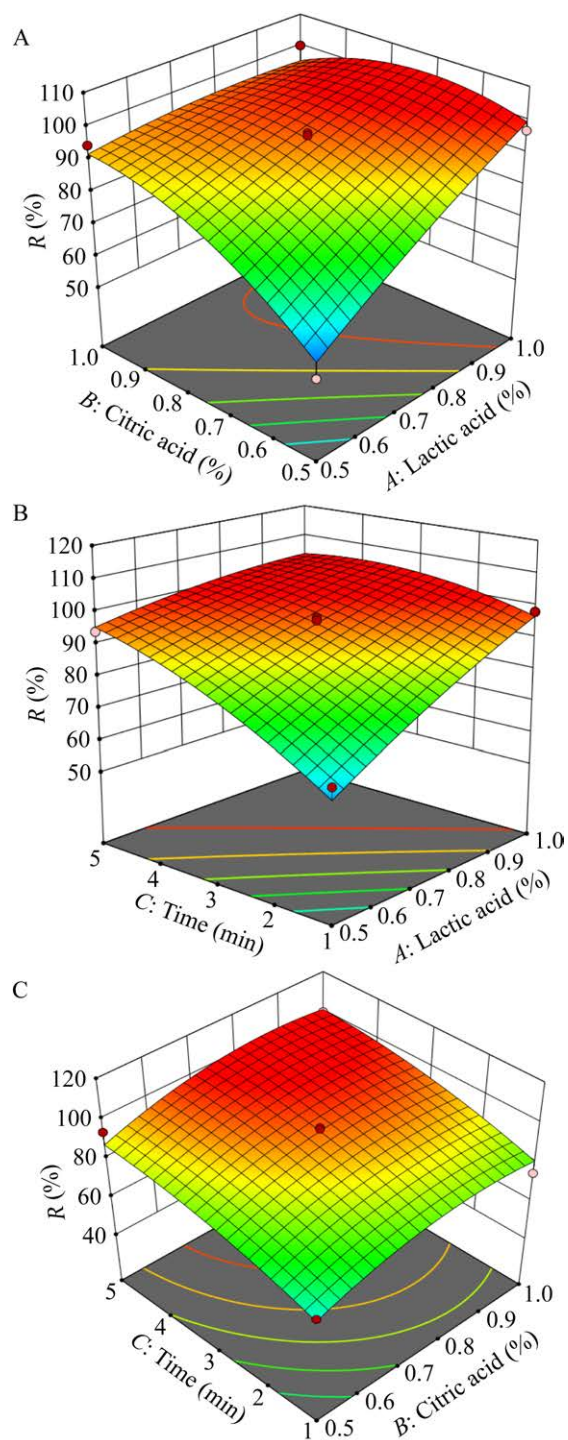


图 2 响应面分析 A: 乳酸浓度和柠檬酸浓度. B: 时间和乳酸浓度. C: 时间和柠檬酸浓度
Figure 2 Response surface analysis. A: Lactate concentration and citrate concentration. B: Time and lactate concentration. C: Time and citrate concentration.

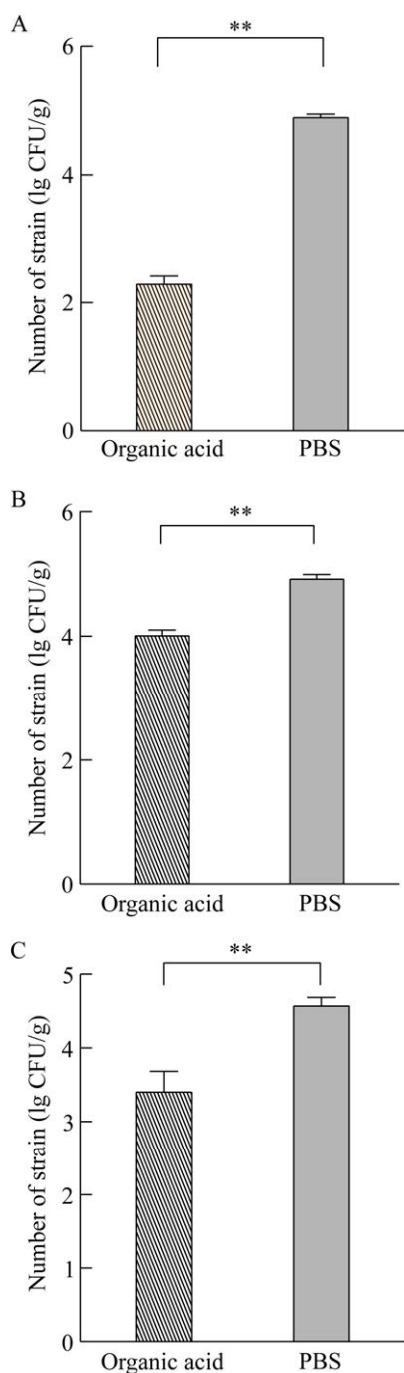


图 3 最优条件下复合有机酸对鸡肉表面常见肉类细菌的杀菌效果 A: 菌株 EGD-e. B: 菌株 E526. C: 菌株 C50041.

Figure 3 Bactericidal effect of compound organic acid to common meat bacteria on chicken surface under optimal conditions. A: Strain EGD-e. B: Strain E526. C: Strain C50041. **: $P < 0.01$.

合有机酸减菌剂处理后, 冷鲜鸡肉中的菌株 EGD-e 降低了 2.6 lg CFU/g, 即使用该杀菌条件可以有效杀灭 99% 以上的 Lm, 与对照组相比差异极显著 ($P < 0.01$)。同时, 由图 3B、3C 可知, 该杀菌条件对另外两种肉与肉制品中常见的食源性致病菌大肠杆菌^[10]和肠炎沙门氏菌^[11]也具有显著杀菌效果, 经复合有机酸减菌剂处理后, 冷鲜鸡肉中的菌株 E526 和菌株 C50041 分别降低了 1.1 lg CFU/g 和 0.9 lg CFU/g, 即分别可杀灭鸡肉表面 92% 和 87% 的细菌。综上, 经模型拟合得到的最优杀菌条件对常见肉类表面菌尤其是 Lm 具有较好杀菌效果, 该减菌工艺条件具有可靠性。

2.4 复合有机酸处理对贮藏期间鸡肉表面菌落总数的影响结果

复合有机酸减菌剂对冷鲜鸡肉 Lm 总数的影响如图 4 所示, 随着贮藏时间的延长, 对照组与实验组菌落总数都呈上升趋势, 而对照组样品的菌落总数上升速度明显快于处理组。第 2 天对照组的菌落总数达到 4.84 lg CFU/g, 而有机酸处理株菌落总数为 3.60 lg CFU/g, 减少了 1.24 个 lg 值。第 4 天实验组较对照组减少了 0.81 个 lg 值。在第 6 天时, 对照组 Lm 数量已超过 10^6 CFU/g, 表明鸡肉表面已发生变质, 而复合有机酸处理组细菌量为 10^5 CFU/g, 还未变

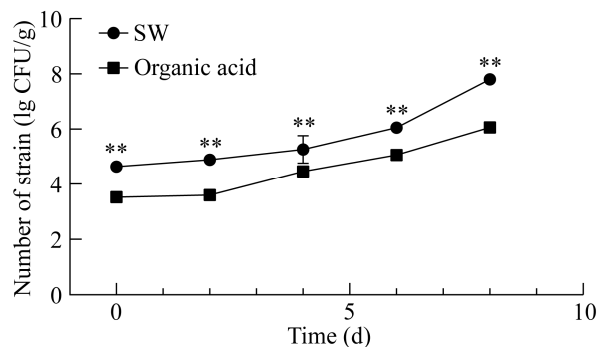


图 4 贮藏期间鸡肉表面 Lm 数量变化

Figure 4 The changes in Lm numbers on chicken surface during storage. **: $P < 0.01$.

质。说明复合有机酸减菌剂对冷鲜鸡肉贮藏过程中 Lm 生长繁殖起到较好的抑制作用。

2.5 复合有机酸在屠宰场的应用结果

选用复合有机酸消毒剂对预冷环节和分割环节的鸡胴体和刀具进行消毒, 经过有机酸消毒后物体表面的 Lm 分离情况如表 4 所示, 在消毒前, 预冷环节和分割环节的总分离率为 20%, 经复合有机酸处理后, 未分离到 Lm, 表明本试验中的复合有机酸消毒效果良好。

2.6 生物膜形成能力测定结果

生物膜是由黏附在生物或非生物表面的细菌分泌的胞外多糖基质、纤维蛋白和脂质蛋白组成的三维多层结构^[12], 能有效阻挡抗菌剂或消毒剂进入生物膜内层, 使细菌在食品加工环境中具有较强的生存能力, 因此生物膜的存在可能导致食源性疾病暴发风险上升^[13]。本试验通过结晶紫染色法测定了复合有机酸处理条件下 Lm 的生物膜形成情况。如图 5 所示, 在复合有机酸的作用下生物膜的形成量显著下降($P<0.01$)。

2.7 有机酸应激下 Lm 毒力基因的转录水平影响

通过荧光定量 PCR 探究在有机酸应激条件下 Lm 的 *sigB*、*actA*、*hly*、*prfA*、*inlA* 等毒力基因的表达情况, 结果表明, *sigB* 在酸性条件下的表达显著上调($P<0.01$), 即 *sigB* 参与 Lm 的

抗酸应激调控。而其他与毒力相关的基因 *prfA*、*actA*、*hly*、*inlA* 表达均显著下调($P<0.01$, 图 6), 表明在有机酸胁迫条件下这 4 个毒力基因表达受到抑制。

2.8 复合有机酸对 Lm 表面的影响结果

为进一步探究有机酸作用于 Lm 的能力, 使用扫描电镜观察有机酸处理后 Lm 的细胞形态变化。结果如图 7 所示, BHI 培养基中的 EGD-e 在爬片上均匀分布, 细菌表面光滑, 结构完整, 呈细长棒状。经过复合有机酸处理的 Lm 细菌表面不规则, 出现明显褶皱。表明 Lm 在有机酸作用下细菌结构发生变化, 细菌抗性减弱。

3 讨论与结论

Lm 对环境具有较强的抵抗力, 它可在食品加工厂环境中生存, 通过污染食品进而引起人类李斯特菌病的发生。由 Lm 引起的暴发性李斯特菌病时有报道, 2014 年丹麦暴发了由即食肉制品引发的人李斯特菌病, 造成 41 人感染, 其中 17 人死亡^[14]。2017 年南非暴发了历史上规模最大的李斯特菌病疫情, 其中 937 人食用李斯特菌污染的猪肉香肠而被感染, 193 人被夺去生命^[14]。因此, 应用绿色安全的减菌剂减少食物中 Lm 污染显得尤为必要。有机酸是由某些微生物产生的存在于各种食品中的天然化

表 4 复合有机酸在屠宰场的应用效果

Table 4 The application effect of compound organic acid in slaughterhouse

取样点 Sampling point	消毒方式 Disinfection method	消毒前阳性率 Positive rate before disinfection (%)	消毒后阳性率 Positive rate after disinfection (%)
预冷前肉鸡胴体 Chicken carcass before pre-cooling link	浸泡消毒 Immersion disinfection	10 (1/10)	0 (0/10)
分割环节肉鸡胴体 Chicken carcass in segmentation link	浸泡消毒 Immersion disinfection	20 (2/10)	0 (0/10)
分割环节刀具 Knives in segmentation link	浸泡消毒 Immersion disinfection	30 (3/10)	0 (0/10)
合计 Total		20 (6/30)	0 (0/30)

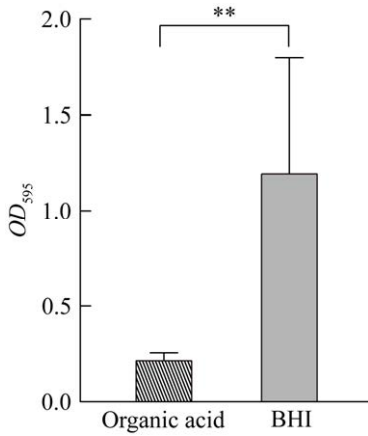


图5 Lm的生物膜形成能力

Figure 5 The biofilm formation ability of Lm. **: $P < 0.01$.

合物,通常被认为是安全的化合物^[15],已被欧盟委员会、粮农组织/世卫组织以及食品和药物管理局批准为食品添加剂,1992年美国农业部食品安全和检查局批准在商业屠宰场使用有机酸作为消毒剂,以增强产品安全性和延长肉制品货架期。在我国,《GB 2760—2014 食品安全国家标准食品添加剂使用标准》中规定乳酸、柠檬酸、冰醋酸等有机酸可作为食品添加剂^[16]。

目前,国内外已有研究报道,使用有机酸

处理猪肉和禽肉产品表面可显著减少 Lm 的数量。El-Khateib 等^[17]发现,牛肉在冷藏 48 h 后,表面喷洒 0.22 mol/L 的乳酸具有杀灭 Lm 的作用。Gonzalez-Fandos 等^[18]用 2%丙酸或 2%冰醋酸处理鸡肉可以减少包装鸡肉中 Lm 总数约 2.14 个 lg 值。Snijders 等^[19]发现屠宰过程中的猪胴体经乳酸处理后,表面菌落总数能降低 1.5 个 lg 值。总之,采用不同的有机酸对肉类产品进行喷淋可有效地降低食品表面的 Lm 数量。但目前大多数抑菌研究主要针对单一有机酸杀菌,围绕复合抑菌剂筛选的研究较少^[20]。马汉军等^[21]研究了乳酸和冰醋酸复合处理对猪肉贮藏影响,结果表明 2%乳酸和 3%冰醋酸的混合液可有效降低猪肉的初始菌落总数。本研究以乳酸和柠檬酸为原料,利用 Box-Behnken 软件进行回归分析和优化,得到绿色减菌最佳工艺参数为:乳酸含量 0.98%,柠檬酸含量 0.72%,作用时间 3.6 min。在最优条件下对鸡肉表面进行杀菌试验,能够降低冷鲜鸡肉表面细菌 0.9–2.6 lg CFU/g;复合有机酸处理对冷鲜鸡肉在 4 °C 条件贮藏过程中的 Lm 繁殖起到较好的抑制作用。Zeitoun 等^[22]在家禽腿上接种约

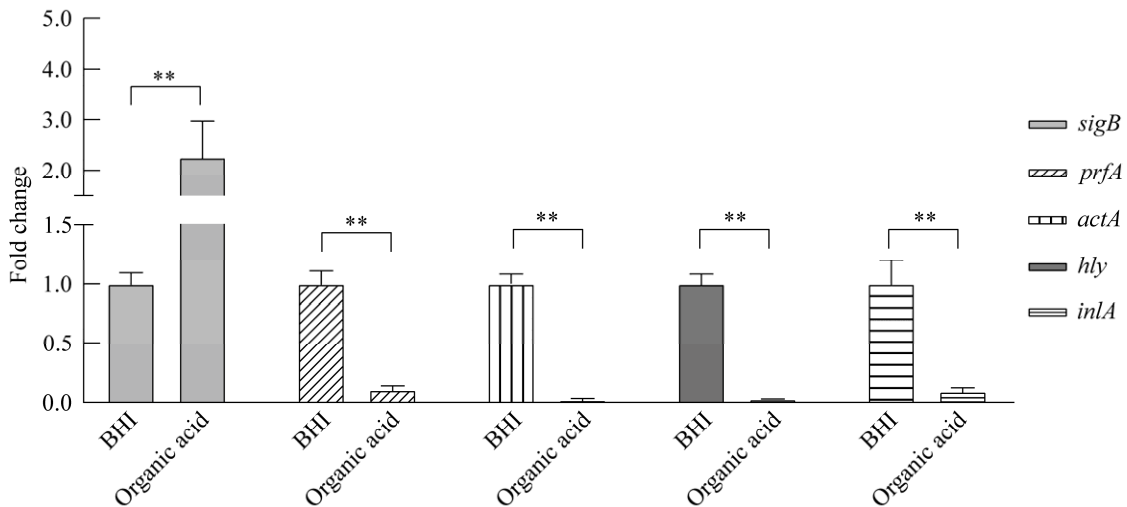


图6 有机酸应激下 Lm 毒力基因的转录分析

Figure 6 Transcriptional analyses of genes related to virulence of Lm under organic acid stress. **: $P < 0.01$.

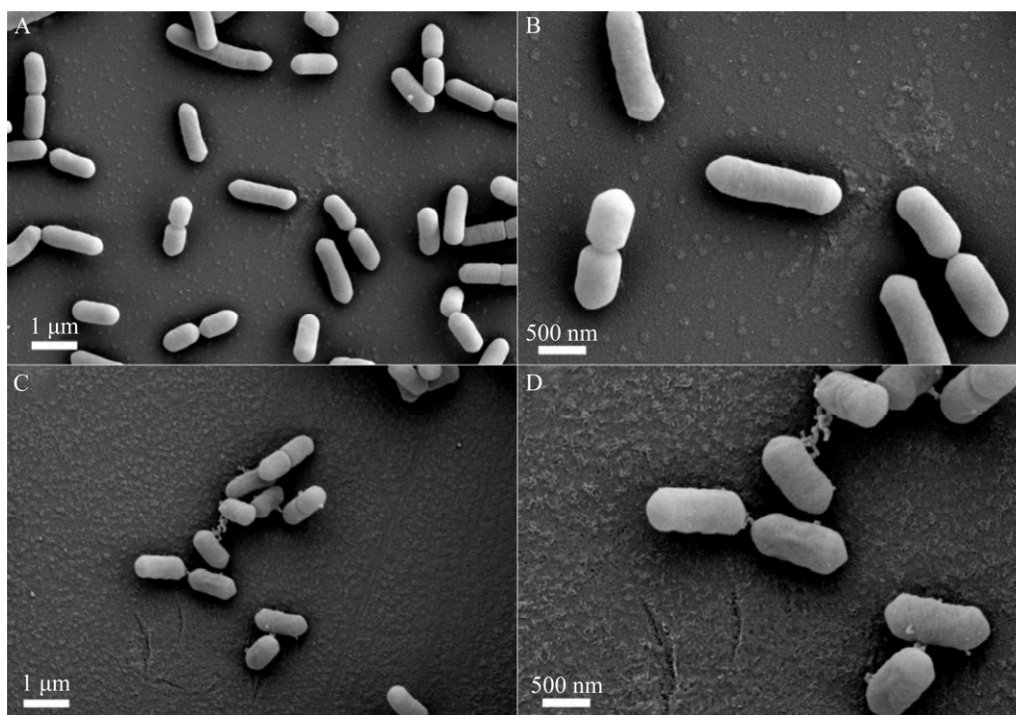


图 7 扫描电镜下细菌形态 A: EGD-e 在 BHI 培养基中的形态(5 000×). B: EGD-e 在 BHI 培养基中的形态(10 000×). C: EGD-e 在含有机酸的 BHI 培养基中的形态(5 000×). D: EGD-e 在含有机酸的 BHI 培养基中的形态(10 000×)

Figure 7 Morphology of bacteria under the scanning electron microscope. A: EGD-e in BHI medium (5 000×). B: EGD-e in BHI medium (10 000×). C: EGD-e in BHI medium containing organic acid (5 000×). D: EGD-e in BHI medium containing organic acid (10 000×).

2.92 lg CFU/cm² 的 Lm 后用乳酸处理, 与未处理的样品相比, 在 6 °C 储存 2 d 和 6 d 后, Lm 的数量分别减少 0.90 lg CFU/cm² 和 1.39 lg CFU/cm²。本研究中使用的温度是 4 °C, 观察到有机酸处理组在储存 2 d 和 6 d 后分别比对照组减少 0.99 lg CFU/g 和 1.29 lg CFU/g, 与上述报道效果相近。

本研究将响应面法筛选得到的最佳杀菌条件实际应用于肉鸡屠宰场的鸡胴体和刀具消毒, 可将 Lm 总分离率由消毒前的 20% 降至 0, 明显降低初始菌数。本研究结果表明, 该杀菌条件不仅能有效减少鸡肉表面 Lm 数量, 同时也能对大肠杆菌和肠炎沙门氏菌产生较好的抑

菌效果。牛淑慧等^[23]使用乳酸和醋酸对牛肉进行喷雾减菌的结果表明有机酸处理对冷鲜肉表面多种细菌均有抑菌作用, 这与本研究结果一致。残留的少量微生物在后续的加工、储运过程中更容易被抑制, 并且能减少后期销售过程中的微生物, 提高了产品的安全性, 从而延长鸡肉的货架期。有机酸作为广谱抑菌剂, 对产品的感官品质影响较小, 具有绿色高效环保的优点^[20], 且乳酸和柠檬酸价格低廉, 易于购买。本研究中的复合有机酸含量更低^[24]、容易配制、无需价格高昂的材料和设备, 可操作性强, 便于应用在肉鸡屠宰场, 具有较好的应用价值和前景。

Lm 在食品生产环境中的生存机制已有较多的研究,其中生物膜的形成是 Lm 在食品工业环境中生存的关键能力^[25]。细菌生物膜的形成能力会因附着表面、温度和 pH 等因素而变化。研究表明有机酸可通过抑制细菌运动能力或细菌活力,影响初期细菌附着表面,降低其生物膜形成能力^[26]。本研究通过对有机酸处理的细菌爬片进行扫描电镜观察发现,实验组细菌表面呈现明显褶皱,表明有机酸能对 Lm 的细菌结构产生影响。结晶紫法检测 Lm 生物膜形成能力发现,经过有机酸处理后 Lm 的生物膜形成能力显著降低,表明有机酸能通过减少生物膜形成达到抑菌作用。转录调控因子 PrfA 和 SigB 均在 Lm 生物膜形成中发挥重要作用。PrfA 是调节大多数已知李斯特菌毒力基因表达的关键转录激活因子,已被证明可促进 Lm 的生物膜形成和聚集^[27]。SigB 在 Lm 中起着应激反应的中枢调节作用,使其能在高渗透压、低 pH 和高胆汁酸盐等恶劣环境中生存^[28]。本研究中,在复合有机酸的作用下 Lm 形成生物膜的能力降低,prfA 基因的转录表达水平显著降低,而 sigB 基因的转录表达水平显著上升,由此提示在有机酸作用条件下 sigB 基因表达上调来抵御低 pH 条件的胁迫。Raengpradub 等^[29]证明,在对数生长的 Lm 菌株 10403S 中, sigB 基因有助于耐酸胁迫, sigB 的激活对 Lm 具有保护作用。van Schaik 等^[30]建议将抑制 sigB 作为保存食品和改善食品安全的一种手段,设计阻止 sigB 激活的抑制剂可有效防止 Lm 对应激条件产生耐受性。总之,解析 Lm 在酸性条件下的胁迫机制不仅有助于避免食品在加工过程中被污染,也有助于制定更加有效的食品安全措施。

综上所述,本研究通过筛选复合有机酸的最优使用条件,能有效减少 Lm 的数量,延长鸡肉货架期,并能应用于肉鸡屠宰场的预冷环

节、分割环节中刀具和肉鸡胴体等消毒,明显降低 Lm 的分离率。此外,复合有机酸能降低毒力相关基因表达,减少 Lm 生物膜形成,破坏该菌细胞结构,初步阐明了复合有机酸乳酸和柠檬酸减菌的机制,为复合有机酸消毒剂在 Lm 防控方面提供理论基础。

REFERENCES

- [1] KRAGH ML, TRUDELSTRUP HANSEN L. Initial transcriptomic response and adaptation of *Listeria monocytogenes* to desiccation on food grade stainless steel[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 3132.
- [2] 刘慧, 曾祥权, 谢文东, 蒋世卫, 杜洪森, 周玉春, 黄华. 食源性单增李斯特菌检测技术研究进展[J]. *现代食品科技*, 2021, 37(6): 333-344.
LIU H, ZENG XQ, XIE WD, JIANG SW, DU HM, ZHOU YC, HUANG H. Advances on detection techniques for foodborne *Listeria monocytogenes*[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2021, 37(6): 333-344 (in Chinese).
- [3] 孙琳珺, 张红芝, 方太松, 王园, 刘阳泰, 王翔, 李红梅, 李代禧, 董庆利. 食品环境中单核细胞增生李斯特菌菌膜形成、转移及防控措施研究进展[J]. *食品科学*, 2021, 42(13): 289-299.
SUN LJ, ZHANG HZ, FANG TS, WANG Y, LIU YT, WANG X, LI HM, LI DX, DONG QL. A review of the biofilm formation and transfer of *Listeria monocytogenes* in the food environment and prevention and control measures for it[J]. *Food Science*, 2021, 42(13): 289-299 (in Chinese).
- [4] CHEN SS, MENG FZ, SUN XW, YAO H, WANG YT, PAN ZM, YIN YL, JIAO XA. Epidemiology of human listeriosis in China during 2008-2017[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2020, 17(2): 119-125.
- [5] 窦勇, 姚妙爱, 闫怀中, 胡佩红, 董静. 冷等离子体对单核增生李斯特菌的杀菌机理[J]. *中国农业科学*, 2020, 53(24): 5104-5114.
DOU Y, YAO MA, LÜ HZ, HU PH, DONG J. Antibacterial mechanism of cold plasma against *Listeria monocytogenes*[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2020, 53(24): 5104-5114 (in Chinese).
- [6] DINÇER AH, BAYSAL T. Decontamination techniques of pathogen bacteria in meat and poultry[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2004, 30(3): 197-204.
- [7] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安

- 国家标准 食品添加剂 乳酸: GB 1886.173—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. National food safety standard-food additive-lactic acid: GB 1886.173—2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017 (in Chinese).
- [8] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品添加剂 柠檬酸: GB 1886.235—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. National food safety standard-food additive-citric acid: GB 1886.235—2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017 (in Chinese).
- [9] BAI YH, DING XY, ZHAO Q, SUN HY, LI T, LI ZK, WANG HJ, ZHANG L, ZHANG CP, XU SX. Development of an organic acid compound disinfectant to control food-borne pathogens and its application in chicken slaughterhouses[J]. Poultry Science, 2022, 101(6): 101842.
- [10] 张雅伦, 陈晨, 王慧, 张同贺, 张双, 李献, 李永波. 肉类食品中大肠杆菌快速检验即用型质控样品研制[J]. 肉类研究, 2023, 37(3): 46-50.
- ZHANG YL, CHEN C, WANG H, ZHANG TH, ZHANG S, LI X, LI YB. Development of ready-to-use quality control samples for rapid detection of *Escherichia coli* in meat and meat products[J]. Meat Research, 2023, 37(3): 46-50 (in Chinese).
- [11] 叶朗光, 邓树轩. 肠炎沙门氏菌研究进展[J]. 畜牧与饲料科学, 2011, 32(2): 121-122.
- YE LG, DENG SX. Research progress of *Salmonella enteritidis*[J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2011, 32(2): 121-122 (in Chinese).
- [12] GOU HT, CAO QH, WANG ZJ, LIU YY, SUN YN, WEI HL, SONG C, TIAN CQ, WEI YQ, XUE HW. Transcriptomic analysis of *Listeria monocytogenes* biofilm formation at different times[J]. Canadian Journal of Veterinary Research, 2023, 87(1): 59-66.
- [13] 马悦, 吴梦洁, 李卓思, 刘阳泰, 董庆利. 食品接触表面生物被膜形成机制及防控方法研究进展[J]. 食品科学, 2023, 44(7): 276-285.
- MA Y, WU MJ, LI ZS, LIU YT, DONG QL. Formation mechanism and control strategies of biofilm on food contact surfaces[J]. Food Science, 2023, 44(7): 276-285 (in Chinese).
- [14] SMITH AM, TAU NP, SMOUSE SL, ALLAM M, ISMAIL A, RAMALWA NR, DISENYENG B, NGOMANE M, THOMAS J. Outbreak of *Listeria monocytogenes* in South Africa, 2017–2018: laboratory activities and experiences associated with whole-genome sequencing analysis of isolates[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2019, 16(7): 524-530.
- [15] KIM SA, RHEE MS. Marked synergistic bactericidal effects and mode of action of medium-chain fatty acids in combination with organic acids against *Escherichia coli* O157:H7[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(21): 6552-6560.
- [16] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准: GB 2760—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
- National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. National food safety standard-standards of using food additives: GB 2760—2014[S]. Beijing: Standards Press of China, 2014 (in Chinese).
- [17] EL-KHATEIB T, YOUSEF AE, OCKERMAN HW. Inactivation and attachment of *Listeria monocytogenes* on beef muscle treated with lactic acid and selected bacteriocins[J]. Journal of Food Protection, 1993, 56(1): 29-33.
- [18] GONZALEZ-FANDOS E, MARTINEZ-LAORDEN A, PEREZ-ARNEDO I. Combined effect of organic acids and modified atmosphere packaging on *Listeria monocytogenes* in chicken legs[J]. Animals: an Open Access Journal from MDPI, 2020, 10(10): 1818.
- [19] SNIJDERS JM, SCHOENMAKERS MJ, GERATS GE, de PIJPER FW. Decontamination of hot beef carcasses with organic acids (author's transl)[J]. Tijdschrift Voor Diergeneeskunde, 1979, 104(9): 359-368.
- [20] 赵圣明, 李宁宁, 尹帅, 马小童, 康壮丽, 朱明明, 王正荣, 何鸿举, 马汉军. 不同有机酸雾化喷淋处理对鸡胴体表面减菌效果的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(9): 54-60.
- ZHAO SM, LI NN, YIN S, MA XT, KANG ZL, ZHU MM, WANG ZR, HE HJ, MA HJ. Decontamination effect of atomization spraying with different organic acids on broiler carcass surface[J]. Food Science, 2019, 40(9): 54-60 (in Chinese).
- [21] 马汉军, 王彦杰, 潘润淑, 周光宏, 刘全党, 蒿瑞彬. 醋酸和乳酸结合处理对冷却猪肉贮藏性的影响[J]. 食品科技, 2007, 32(5): 262-264, 275.
- MA HJ, WANG YJ, PAN RS, ZHOU GH, LIU QD, HAO RB. Effect of acetic acid and lactic acid combinations on the preservation of cooled pork[J]. Food Science and Technology, 2007, 32(5): 262-264, 275 (in Chinese).
- [22] ZEITOUN AAM, DEBEVERE JM. Inhibition, survival

- and growth of *Listeria monocytogenes* on poultry as influenced by buffered lactic acid treatment and modified atmosphere packaging[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1991, 14(2): 161-169.
- [23] 牛淑慧, 王艺伦, 徐晔, 杨壹芳, 余沁芯, 肖子涵, 刘书亮, 杨勇. 乳酸和醋酸对冷却牛肉喷雾减菌效果的研究[J]. *食品科技*, 2020, 45(1): 167-173.
NIU SH, WANG YL, XU Y, YANG YF, YU QX, XIAO ZH, LIU SL, YANG Y. Effect of lactic acid and acetic acid spray on decontamination in cooling beef[J]. *Food Science and Technology*, 2020, 45(1): 167-173 (in Chinese).
- [24] 韩吉娜, 张佳, 罗欣, 朱立贤, 梁荣蓉, 张一敏, 杨振刚. 肉牛屠宰过程中的减菌技术研究进展[J]. *食品科学*, 2019, 40(15): 330-337.
HAN JN, ZHANG J, LUO X, ZHU LX, LIANG RR, ZHANG YM, YANG ZG. Recent progress in decontamination technologies for beef carcasses and chilled beef[J]. *Food Science*, 2019, 40(15): 330-337 (in Chinese).
- [25] van HOUTDT R, MICHIELS CW. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 109(4): 1117-1131.
- [26] AVILA-NOVOA MG, GONZÁLEZ-TORRES B, GONZÁLEZ-GÓMEZ JP, GUERRERO-MEDINA PJ, MARTÍNEZ-CHÁVEZ L, MARTÍNEZ-GONZÁLES NE, CHAIDEZ C, GUTIÉRREZ-LOMELÍ M. Genomic insights into *Listeria monocytogenes*: organic acid interventions for biofilm prevention and control[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(17): 13108.
- [27] LUO Q, SHANG JL, FENG XQ, GUO XX, ZHANG L, ZHOU QC. PrfA led to reduced biofilm formation and contributed to altered gene expression patterns in biofilm-forming *Listeria monocytogenes*[J]. *Current Microbiology*, 2013, 67(3): 372-378.
- [28] WANG WK, ZHOU XJ, SUO YJ, DENG XY, CHENG MY, SHI CL, SHI XM. Prevalence, serotype diversity, biofilm-forming ability and eradication of *Listeria monocytogenes* isolated from diverse foods in Shanghai, China[J]. *Food Control*, 2017, 73: 1068-1073.
- [29] RAENGPRADUB S, WIEDMANN M, BOOR KJ. Comparative analysis of the sigma B-dependent stress responses in *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains exposed to selected stress conditions[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(1): 158-171.
- [30] van SCHAIK W, ABEE T. The role of sigmaB in the stress response of Gram-positive bacteria: targets for food preservation and safety[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2005, 16(2): 218-224.