

虾仁中副溶血弧菌灭活动力学模型的建立

刘媛, 方春, 程昌勇, 方维焕*

浙江大学动物预防医学研究所, 浙江省动物医学重点实验室, 杭州 310058

摘要: 【目的】建立醋酸、乳酸和柠檬酸对副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 在生理盐水和虾仁中的灭活动力学模型, 指导有机酸应用于虾仁加工过程中的抑菌保鲜。【方法】测定副溶血弧菌在生理盐水和新鲜虾仁中经不同浓度有机酸溶液浸泡处理 10min 后的存活率 P , 虾仁中的细菌存活率与有机酸浓度呈良好的线性关系; 生理盐水中的存活率通过 $\ln [P/(1-P)]$ 转换成 $\text{logit}(P)$, 与有机酸浓度之间的线性拟合度显著提高。通过拟合方程计算有机酸的 50% 和 90% 有效抑菌浓度 (EC_{50} 和 EC_{90}), 比较不同有机酸的抑菌能力以及在不同基质中的作用差异。【结果】副溶血弧菌在生理盐水中对有机酸较为敏感, 在虾仁中的杀菌效果相对较差, 虾仁中乳酸与柠檬酸的有效抑菌浓度 (EC_{50} 或 EC_{90}) 是生理盐水中浓度的 160-200 倍, 醋酸的浓度比其在生理盐水中的浓度高出 70 倍以上, 表明食品基质对有机酸的抑菌作用有显著影响, 但采用的有机酸在虾仁中的 EC_{90} 并未超过美国农业部规定的 2.5% 上限。以有机酸的总摩尔浓度比较, 柠檬酸的抑菌能力最强, 乳酸次之, 醋酸最弱。【结论】抑菌剂效应呈非线性时, 细菌存活率进行对数转换, 可显著提高线性拟合度 R^2 ; 食品基质对有机酸的抑菌作用有明显影响; 应用浓度为 2% 的 3 种有机酸可以有效降低水产品中弧菌的污染量, 提高产品的卫生质量。

关键词: 虾仁, 副溶血弧菌, 有机酸, 灭活动力学

中图分类号: Q37 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013) 01-0031-07

副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 是一种嗜盐性的革兰氏阴性短杆菌, 于 1950 年在日本首次作为食源性病原菌被分离鉴定, 能够引起人急性肠胃炎、伤口感染和败血症^[1], 其危害仅次于霍乱弧菌。近年来日本有 20% - 30% 的食源性疾病由副溶血弧菌引起^[2]; 我国部分沿海地区, 细菌性食物中毒病例中副溶血弧菌食物中毒占首位 (31%)^[3]。

副溶血弧菌广泛存在于海洋环境^[4], 海产品已受其污染, 人类发病多因生食海鲜而致。虾类作为世界范围内主要的海鲜食品, 具有较高的商业价值。

与大多数海鲜食品类似, 虾类产品极易被食源性病原菌污染, 进而腐败变质, 货架期大大缩短, 从而造成经济损失^[5]。传统工艺生产过程中主要采用含氯消毒剂浸泡处理作为主要的杀菌保鲜方法, 易造成有害物质残留, 并对产品风味造成一定的负面影响。因此, 安全可靠的抑菌保鲜措施亟待研究与开发。有机酸类是研究较多的食品保鲜剂, 除了调味, 还有很好的抑菌功能^[6], 且价格低廉, 易于推广。此外, 有机酸还可以参与人体正常的代谢, 如乳酸、柠檬酸、醋酸、苹果酸等。

基金项目: 国家十一五支撑计划项目 (2009BADB9B09)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-571-88982242; E-mail: whfang@zju.edu.cn

作者简介: 刘媛 (1988-), 女, 安徽桐城人, 硕士研究生, 主要从事动物源食品安全研究。E-mail: liuyuanlw@126.com

收稿日期: 2012-09-01; 修回日期: 2012-10-28

目前,无论是实验室条件下还是食品基质中,有机酸的抑菌试验基质主要侧重于牛肉,猪肉和禽肉等肉类产品^[7-9];也有报道将有机酸(乳酸和柠檬酸)作为粗加工蔬菜中的抗菌剂^[10-11]。而将有机酸用于海鲜产品中抑菌试验信息鲜见报道,尤其是虾仁作为一种特殊的粗加工虾产品,质地柔软,富含水分,更易受病原菌及腐败菌的污染,对其杀菌保鲜的要求也更为苛刻。有鉴于此,本试验系统研究了醋酸(AA)、乳酸(LA)和柠檬酸(CA)对副溶血弧菌生长抑制作用,建立相应的灭活动力学模型;在此基础上比较不同基质中(生理盐水和新鲜虾仁中)有机酸的灭活效果差异,从而为虾仁生产中的卫生质量控制及生产工艺制定提供一定的参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:副溶血弧菌 ATCC 33847 为标准参考株,ZJ9N 菌株为本实验室保存的环境分离株,ZJ6N 菌株为本实验室保存的临床分离株。

1.1.2 主要试剂和仪器:脑心浸液干粉培养基(Brain Heart Infusion, BHI)、硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖琼脂培养基(Thiosulfate Citrate Bile salts Sucrose agar, TCBS)、无菌均质袋购自中国检验检疫科学研究院北京陆桥技术有限公司;柠檬酸(化学纯, $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ 含量 $\geq 99.0\%$, 分子量 210.14)、醋酸(分析纯, CH_3COOH 含量 $\geq 99.5\%$, 分子量 60.05)、乳酸(分析纯, $C_3H_6O_3$ 含量 $\geq 85.0\%$, 分子量 90)均购自国药集团化学试剂有限公司;Millipore 除菌滤膜(0.22 μm)购自上海普飞生物技术有限公司。

1.2 菌液制备

副溶血弧菌 3 株(参考菌株 ATCC 33847、临床分离株 ZJ6N 和环境分离株 ZJ9N)分别平板划线后挑取单菌落,于 BHI 中 37℃ 振荡培养过夜(12 h),次日各取 50 μL 菌液转接 5 mL 新鲜 BHI 中,培养 3-4 h,培养物调整 OD_{600} 至 0.15-0.20(约为 10^8 CFU/mL),3 株菌液等量混合后备用。使用 3 株细菌混合的目的是考虑到它们对抑菌剂的敏感性可能会存在差异,从确保食品安全的角度出发,要求预测模型能够包含可能具有抗性的菌株,国外报道的相关研究中都是使用 3 株以上细菌的混合菌液。本试

验 3 株副溶血弧菌对 3 种亚抑制浓度有机酸处理的敏感性差别不大($P > 0.05$)。

1.3 酸溶液配制及 pH 测定

用生理盐水(0.85% NaCl 溶液)配制 3 种有机酸(LA、AA 和 CA)不同浓度的溶液,测定 pH 值后过滤除菌。

1.4 有机酸对生理盐水中副溶血弧菌的灭活效果试验

在 Eppendorf 管中加入不同浓度的有机酸溶液或生理盐水(阴性对照)990 μL ,加入 10 μL 混合菌液混匀,室温(25℃)处理 10 min 后立即用 PBS 缓冲液($NaCl$ 8.0 g/L, KCl 0.2 g/L, $NaHPO_4 \cdot 12H_2O$ 3.58 g/L, KH_2PO_4 0.27 g/L, pH 7.2)进行连续 10 倍稀释,取适当稀释度的菌液各 10 μL 点样于 BHI 琼脂平板,37℃ 培养后计数,每个浓度设置 3 个平行重复。

1.5 有机酸对新鲜虾仁中副溶血弧菌的灭活效果试验

新鲜虾仁称重分装于均质袋中,每份 25 g,封口后放 Co60 辐照灭菌(辐照剂量 14 kGy)备用^[12-13];在灭菌虾仁中加入 5 mL 浓度约为 10^8 CFU/mL 混合菌液,轻轻揉捏至菌液分布均匀,4℃ 冰箱中放置约 1 h 以便细菌充分粘附;取出接种有细菌的虾仁,放入不同浓度的有机酸溶液中浸泡处理 10 min 后取出,滤纸轻轻蘸去多余酸溶液,置于新的无菌均质袋中,并立即加入 100 mL PBS 缓冲液,充分均质 2-3 min,吸取 100 μL 进行连续 10 倍稀释,取适当稀释度的菌液 10 μL 点样于 TCBS 选择性平板进行计数。每个浓度设置 3 个平行重复。

1.6 数据处理

将 1.2.3 和 1.2.4 中的计数结果用 Excel spread sheet 计算出 3 个重复样品的平均值及标准差,将有机酸处理组的活菌数除以生理盐水对照组的活菌数,得到不同浓度有机酸处理后副溶血弧菌的存活率 P 。若有机酸浓度与 P 之间的回归出现两端“拖尾”的倒“S”型曲线或单端“拖尾”现象,可以通过对存活率 P 进行 Logit 转换($\text{logit}(P) = \ln [P/(1-P)]$),将 P 转换成 $\text{logit}(P)$ ^[14-15],显著改善量-效之间线性拟合度。为便于计算和对数转换,生理盐水对照的存活率取 99% (0.99)。根据线性拟合方程计算出 50% 有效抑菌浓度(EC_{50})和 90% 有效抑菌浓度(EC_{90}),以比较 3 种有机酸溶液对副溶血弧菌的生

长抑制能力以及不同基质对抑菌效果的影响。

2 结果

2.1 生理盐水中有机酸对副溶血弧菌存活率的影响

表 1 显示,副溶血弧菌对 3 种有机酸敏感,经低浓度酸溶液处理后细菌的存活率显著降低。在本试验使用的最高浓度下,AA 和 CA 处理组细菌的存活率比对照组下降约 3 个 log, LA 处理的下降幅度也

在 2 个 log 以上。本试验确定有机酸浓度范围的依据是使细菌存活率在 90% 左右及其以下的可计算区间,以便使用回归分析方法比较不同有机酸的相对抑菌效力 (EC_{50} 或 EC_{90}), 含有不同浓度有机酸生理盐水溶液的 pH 值在 3.07 - 4.29 之间(表 1)。将表 1 中的 $\text{Logit}(P)$ 与有机酸浓度进行回归分析(图 1), 3 种酸 AA、LA 和 CA 浓度与细菌存活率呈良好的线性关系, R^2 分别为 0.99、0.98 和 0.96; 从斜率也可间接反映出副溶血弧菌对 3 种有机酸的敏感程度, 依次为 $CA > LA > AA$ 。

表 1 不同浓度醋酸、乳酸和柠檬酸生理盐水中的副溶血弧菌存活率

Table 1 Survival of *Vibrio parahaemolyticus* in saline solutions containing different concentrations of acetic acid, lactic acid and citric acid

| Organic acid | Concentration / (mmol/L) | pH | Bacterial counts (Log_{10} CFU) | Survival rate (P) | Logit (P) |
|--------------|--------------------------|------|---|-------------------|-----------|
| Acetic acid | 0 | 7.06 | 6.28 ± 0.000 | 0.99 | 4.5951 |
| | 1.75 | 3.70 | 6.13 ± 0.023 | 0.71 | 0.8954 |
| | 3.5 | 3.52 | 5.54 ± 0.027 | 0.18 | -1.5163 |
| | 5.25 | 3.41 | 4.49 ± 0.100 | 0.02 | -3.8918 |
| | 7 | 3.33 | 3.30 ± 0.000 | 0.0011 | -6.8113 |
| Lactic acid | 0 | 7.06 | 6.28 ± 0.000 | 0.99 | 4.5951 |
| | 0.30 | 4.29 | 6.26 ± 0.000 | 0.95 | 2.9444 |
| | 0.60 | 3.73 | 6.20 ± 0.000 | 0.84 | 1.6582 |
| | 0.90 | 3.52 | 5.98 ± 0.032 | 0.49 | -0.0400 |
| | 1.20 | 3.38 | 5.16 ± 0.064 | 0.076 | -2.4980 |
| Citric acid | 0 | 7.06 | 6.28 ± 0.000 | 0.99 | 4.5951 |
| | 0.35 | 3.47 | 5.72 ± 0.024 | 0.27 | -0.9946 |
| | 0.70 | 3.22 | 4.08 ± 0.051 | 0.0063 | -5.0609 |
| | 1.05 | 3.07 | 3.15 ± 0.213 | 0.00079 | -7.1427 |

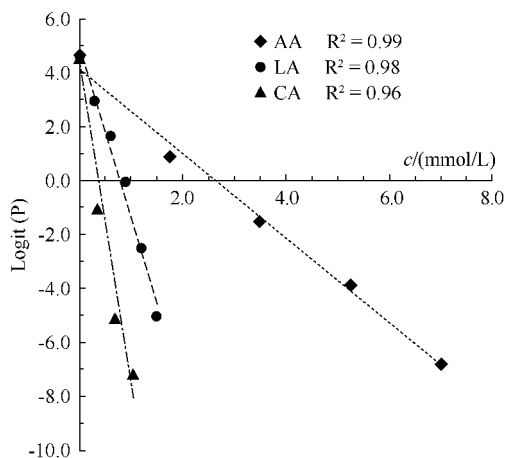


图 1 生理盐水中不同浓度醋酸(AA)、乳酸(LA)和柠檬酸(CA)与副溶血弧菌存活率($\text{Logit}(P)$)的线性回归分析

Fig. 1 Linear regression between concentrations of acetic acid (AA), lactic acid (LA) or citric acid (CA) and survival ($\text{Logit}(P)$) of *Vibrio parahaemolyticus* in saline.

2.2 有机酸处理对新鲜虾仁中副溶血弧菌存活率的影响

为使细菌存活率在 90% 左右及其以下的可计算区间,根据预试结果确定了新鲜虾仁中不同有机酸的浓度范围(表 2), 虾仁处理用有机酸生理盐水溶液的 pH 范围在 1.85 - 2.54 之间。结果表明,不同有机酸在最高浓度下处理 10 分钟的细菌存活率比对照组下降约 1 - 1.5 个 log。由于有机酸浓度与细菌存活率 P 之间存在良好的线性关系,无需 $\text{Logit}(P)$ 转换(图 2), R^2 分别为 0.98、0.99 和 0.96 ($\text{Logit}(P)$ 转换后的 R^2 分别为 0.99、0.95 和 0.91)。从斜率判断副溶血弧菌对 3 种有机酸的敏感程度,亦依次为 $CA > LA > AA$ 。

2.3 副溶血弧菌在生理盐水与新鲜虾仁中对有机酸的敏感性差异比较

根据生理盐水或新鲜虾仁中有机酸浓度与副溶

表 2 不同浓度醋酸、乳酸和柠檬酸对新鲜虾仁中副溶血弧菌存活率影响

Table 2 Survival of *Vibrio parahaemolyticus* in fresh shrimp meat treated with saline solutions containing different concentrations of acetic acid, lactic acid and citric acid

| Organic acid | Concentration / (mmol/L) | Corresponding Concentration / % | pH | Bacterial counts (Log ₁₀ CFU) | Survival rate (P) | Logit (P) |
|--------------|--------------------------|---------------------------------|------|--|-------------------|-----------|
| Acetic acid | 0 | 0.00 | 6.20 | 6.52 ± 0.035 | 0.99 | 4.5951 |
| | 200 | 1.14 | 2.54 | 6.21 ± 0.012 | 0.49 | -0.0400 |
| | 300 | 1.72 | 2.43 | 5.61 ± 0.070 | 0.12 | -1.9924 |
| | 400 | 2.29 | 2.35 | 4.98 ± 0.012 | 0.03 | -3.4761 |
| Lactic acid | 0 | 0.00 | 6.05 | 6.51 ± 0.043 | 0.99 | 4.5951 |
| | 85 | 0.64 | 2.14 | 6.32 ± 0.011 | 0.64 | 0.5754 |
| | 170 | 1.28 | 1.99 | 5.92 ± 0.112 | 0.27 | -0.9946 |
| | 255 | 1.92 | 1.87 | 5.24 ± 0.024 | 0.05 | -2.9444 |
| Citric acid | 0 | 0.00 | 6.75 | 6.90 ± 0.010 | 0.99 | 4.5951 |
| | 25 | 0.53 | 2.20 | 6.83 ± 0.017 | 0.86 | 1.8153 |
| | 50 | 1.05 | 2.03 | 6.55 ± 0.017 | 0.46 | -0.1603 |
| | 100 | 2.10 | 1.85 | 6.06 ± 0.055 | 0.15 | -1.7346 |

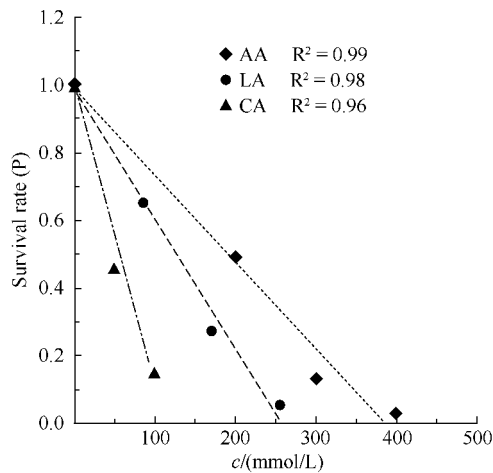


图 2 不同浓度醋酸 (AA)、乳酸 (LA) 和柠檬酸 (CA) 对新鲜虾仁中副溶血弧菌存活率 P 的线性回归分析

Fig. 2 Linear regression between concentrations of acetic acid (AA), lactic acid (LA) or citric acid (CA) and survival (P) of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp meat.

血弧菌存活率的线性关系 (图 1 和 2), 得出相应的线性方程 (表 3), 可以计算出两种不同基质中 3 种有机酸对副溶血弧菌的 50% 或 90% 有效抑菌浓度。从 EC₅₀ 或 EC₉₀ 浓度进行分析比较, 有机酸对副溶血弧菌在新鲜虾仁和生理盐水中的抑菌效果均依次为 CA > LA > AA。但是它们在虾仁中的抑菌作用显著降低, 虾仁中 LA 与 CA 的 EC₅₀ 或 EC₉₀ 约为生理盐水中的 160 - 200 倍, 而 AA 的 EC₅₀ 或 EC₉₀ 约为生理盐水中的 73 - 87 倍。

3 讨论

副溶血弧菌对酸敏感, pH 4.0 - 5.0 处理 2h 丧失生存能力^[17-18]。基于此, 已有不少研究将有机酸应用于副溶血弧菌的抑制与灭活。但大多数均将有机酸浓度与处理时间相结合, 研究不同组合处理后

表 3 醋酸、乳酸和柠檬酸在生理盐水和虾仁中副溶血弧菌的灭活效果比较

Table 3 Comparison of inhibitory effects of acetic, lactic and citric acids on *Vibrio parahaemolyticus* between shrimp meat and saline

| Organic acid | Shrimp meat | | | | Saline | | | |
|--------------|---------------------------|----------------|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------|----------------|-------------------------------|---------------------------------|
| | Linear model [*] | R ² | EC ₅₀ [§] | EC ₉₀ ^{§11} | Linear model [*] | R ² | EC ₅₀ [§] | EC ₉₀ ^{§11} |
| Acetic acid | $y = -0.0025x + 0.984$ | 0.98 | 194 | 354 | $y = -1.58x + 4.17$ | 0.99 | 2.65 | 4.04 |
| Lactic acid | $y = -0.0038x + 0.976$ | 0.99 | 125 | 231 | $y = -6.31x + 5.00$ | 0.98 | 0.79 | 1.14 |
| Citric acid | $y = -0.0089x + 1.006$ | 0.96 | 57 | 102 | $y = -11.22x + 3.74$ | 0.96 | 0.33 | 0.53 |

^{*} x represents the molar concentration of organic acids (mmol/L); y represents the survival rate (P) of *V. parahaemolyticus* (in shrimp meat) or logit (P) (in saline), and logit (P) = $\ln [P / (1 - P)]$.

[§] EC₅₀ and EC₉₀ represent the 50% and 90% effective inhibitory concentration (mmol/L), respectively.

¹¹ The US Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service (USDA-FSIS) approved the maximum level (2.5%) of organic acid solutions^[16], which is equivalent to 435 mmol/L for acetic acid, 325 mmol/L for lactic acid and 130 mmol/L for citric acid for food decontamination.

产品中副溶血弧菌的降低程度^[19-20]。而本研究统一设定有机酸处理时间为 10 min (更长时间的酸处理可能会改变虾仁的色泽和质地^[20]), 得到不同有机酸浓度下副溶血弧菌存活率 P 。拟合的酸灭活动力学模型线性关系良好, 虾仁中 3 种有机酸的拟合度 R^2 均大于 0.96。若有机酸处理后的存活率 P 的远端呈现显著“拖尾”现象, 使用对数转换公式 $\text{logit}(P) = \ln [P/(1-P)]$, 将 P 转换成 $\text{logit}(P)$ 形式, 可提高线性拟合度^[14]。3 种有机酸对副溶血弧菌在生理盐水中作用的浓度对 $\text{logit}(P)$ 的拟合度 R^2 分别为 0.99、0.98 和 0.96 (未经转换的 R^2 分别为 0.90、0.92 和 0.80)。

本试验旨在为有机酸净化虾仁中副溶血弧菌的污染提供实验依据。结果显示, 食品基质对有机酸的抑菌作用具有很显著的影响, 虾仁中乳酸与柠檬酸的有效抑菌浓度是生理盐水中的 160–200 倍, 醋酸的浓度也比在生理盐水中高出 70 倍以上。这就是说, 食品防腐剂在纯溶液中的试验结果不能直接“移植”到食品中, 这也就是为什么国外食品类学术刊物在评审有关抗菌防腐剂 (包括抗菌肽) 相关论文时, 要求在可能应用该制剂的食品中进行试验。尽管如此, 本试验结果表明: 有机酸在虾仁中的 90% 有效抑菌浓度未超过美国农业部规定的上限 (2.5%)^[16]: 醋酸 354 mmol/L [< 435 mmol/L, 2.5% 时的摩尔浓度 (下同)]、乳酸 231 mmol/L (< 325 mmol/L)、柠檬酸 102 mmol/L (< 130 mmol/L)。且对虾仁的色泽和风味不会造成明显的不良影响^[20]。因此, 在虾仁等水产品生产加工过程中可以根据实际需求, 使用浓度为 2% 的上述有机酸溶液进行杀菌处理可以显著降低弧菌的污染量。

有机酸作为一种食品添加剂及防腐剂被广泛应用于食品产业, 可有效延长货架期。其抑菌原理主要是依赖于未解离的有效酸浓度。未解离的有机酸具有不同程度脂溶性, 可与细胞膜中磷脂分子和脂多糖等成分互作, 破坏膜稳定性, 并通过自由扩散方式进入菌体内。细菌胞质内 pH 为中性偏碱性环境, 远高于有机酸的解离 pKa。因此, 分子形式的有机酸在细胞内解离, 解离的质子和酸根离子不能通

过自由扩散方式跨膜, 由此造成质子在细菌胞内聚集、pH 下降, 细胞稳态被破坏, 从而达到抑菌目的^[21-24]。本研究结果显示, 在有机酸溶液初始 pH 值不调整的情况下, 醋酸溶液的抑菌效果相对较差, 所需的摩尔浓度最高, 柠檬酸的抑菌效果优于乳酸, 但这并不足以说明 3 种有机酸的抑菌活性顺序依次为柠檬酸 $>$ 乳酸 $>$ 醋酸。Young and Foegeding 等人^[25]指出: 在溶液 pH 相同、有机酸总摩尔浓度相等时, 醋酸比乳酸的抑菌效果好。但若通过加入不同量的有机酸分子, 将未解离的有机酸浓度控制在同一个水平时却出现相反的结果, 即乳酸比醋酸具有更强的抑菌效果。这主要是因为醋酸的 pKa 为 4.76, 大于乳酸的 pKa (3.86), 乳酸在细菌细胞内的中性环境中更易解离 H^+ 和酸根离子, 因此表现较强的抑菌活性。

试验表明, 副溶血弧菌的存活率与有机酸溶液本身的 pH 值之间呈现正相关关系, 但并不是酸溶液的 pH 值越低, 抑菌效果就越明显。这是由于酸溶液的 pH 值只是由有机酸本身的 pKa 决定, 而有机酸的抑菌能力首先取决于进入细菌胞质内的未解离的分子数, 再与有机酸在胞内解离出质子和酸根离子的聚集呈现正相关。Carpenter 等^[26]根据 Henderson-Hasselbach 公式推导出了胞外解离有机酸的质子 (H^+) 和酸根离子 (ROO^-) 与其在胞内聚集程度的关系: $[A^-]_{\text{胞内}} = [H^+]_{\text{释放量}} = [A^-]_{\text{胞外}} \times \text{antilog}(pH_{\text{胞内}} - pH_{\text{胞外}})$ 。表明胞内质子释放量和酸根离子聚集程度与胞外酸根离子浓度、内外 pH 差值有关, 两者相互独立且存在各自平衡, 共同影响胞内酸根离子聚集, 从而对有机酸的最终抑菌能力产生影响^[27-29]。

总之, 本研究结果表明: 在食品防腐抑菌剂效应呈现非线性的情况下, 对细菌存活率进行对数转换, 可提高线性拟合度; 食品基质对有机酸等防腐剂的抑菌作用具有显著影响, 新型食品防腐剂的开发除了在纯溶液或培养基中进行试验外, 应在目标食品中进行平行比较; 应用浓度为 2% 的 3 种有机酸可以有效降低水产品中弧菌的污染量, 提高产品的卫生质量。

参考文献

- [1] Yeung PS, Boor KJ. Epidemiology, pathogenesis and prevention of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* infections. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2004, 1 (2) :74-88.
- [2] Alam MJ, Tomochika KI, Miyoshi SI, Shinoda S. Enviromental investigation of potentially pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in the Seto-Inland Sea, Japan. *FEMS Microbiology Letters* 2002, 208 (1) :83-87.
- [3] Liu X, Chen Y, Wang X, Ji R. Foodborne disease outbreak in China from 1992 to 2001-National Foodborne Disease Surveillance System. *Wei Sheng Yan Jiu*, 2004, 33 (6) :725-727. (in Chinese)
刘秀梅, 陈艳, 王晓英, 计融. 1992 - 2001 年食源性疾病暴发资料分析-国家食源性疾病预防网. 卫生研究, 2004, 33 (6) :725-727.
- [4] Baffone W, Tarsi R, Pane L, Campana R, Repetto B, Mariottini GL, Pruzzo C. Detection of free-living and plankton-bound vibrios in coastal waters of the Adriatic Sea (Italy) and study of their pathogenicity-associated properties. *Environmental Microbiology*, 2006, 8 (7) : 1299-1305.
- [5] Norhana MN, Poole SE, Deeth HC, Dykes GA. Prevalence, persistence and control of *Salmonella* and *Listeria* in shrimp and shrimp products: a review. *Food Control*, 2010, 21 (4) :343-361.
- [6] Gao X, Li B, Gao H, Zou W, Chang Z. Antiseptic effect of three organic acids on pork. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2007, 38 (4) :628-630. (in Chinese)
高鑫, 李博, 高红亮, 邹伟, 常忠义. 3 种有机酸对冷却猪肉的保鲜作用. 沈阳农业大学学报, 2007, 38 (4) : 628-630.
- [7] Bogaert JC, Naidu AS. Acid-antimicrobials: lactic acid//Naidu AS. Natural Food Antimicrobial Systems. First edition. New York: CRC Press, 2000:617-629.
- [8] Quattara B, Simard RE, Holley RA. Inhibitory effect of organic acid upon meat spoilage bacteria. *Food Protection*, 1997, 60 (3) :246-253.
- [9] Kim CR, Marshsall DL. Quality evaluation of refrigerated chicken wings treated with organic acids. *Food Quality*, 2000, 23 (3) :327-335.
- [10] Uyttendaele M, Neyts K, Vanderswalmen H, Notebaert E, Debevere J. Control of *Aeromonas* on minimally processed vegetables by decontamination with lactic acid, chlorinated water, or thyme essential oil solution. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 90 (3) :263-271.
- [11] Simón A, Fandos G, Vázquez M. Effect of washing with citric acid and packaging in modified atmosphere on the sensory and microbiological quality of sliced mushrooms (*Agaricus bisporus* L.). *Food Control*, 2010, 21 (6) : 851-856.
- [12] Tamplin ML. Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in raw ground beef stored at 10°C and the influence of competitive bacterial flora, strain variation, and fat level. *Journal of Food Protection*, 2002, 65 (10) : 1535-1540.
- [13] Tamplin ML, Greg P, Marmer BS, Phillips J. Models of the behavior of *Escherichia coli* O157:H7 in raw sterile ground beef stored at 5 - 46°C. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 100 (1-3) :335-344.
- [14] Cramer J. The early origins of the logit model. *Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, 2004, 35 (4) :613-626.
- [15] Fisher RA, Yates F. Statistical tables for biological, agricultural and medical research. Sixth edition revised and enlarged. London: Oliver & Boyd, 1963:78.
- [16] Huffman RD. Current and future technologies for the decontamination of carcasses and fresh meat. *Meat Science*, 2002, 62 (3) :285-294.
- [17] Waterman SR, Small PLC. Acid-sensitive enteric pathogens are protected from killing under extremely acidic conditions of pH 2.5 when they are inoculated onto certain solid food sources. *Applied Environmental Microbiology*, 1998, 64 (10) : 3882-3886.
- [18] Koo J, Marshall DL, Depaola A. Antacid increases survival of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio vulnificus* phage in a gastrointestinal model. *Applied Environmental Microbiology*, 2001, 67 (7) : 2895-2902.
- [19] Salem AM, Amin RA. Evaluation of some organic acids as potential decontaminants of *Vibrio parahaemolyticus* in fresh shrimp. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 2012, 7 (1) : 41-48.
- [20] Shirazinejad A, Ismail N, Bhat R. Lactic acid as a potential decontaminant of selected foodborne pathogenic bacteria in shrimp (*Penaeus merguensis* de Man). *Foodborne Pathogens and Disease*, 2010, 7 (12) :1531-1536.
- [21] Zhang J, Tian Z, Wang J, Wang A. Advances in antimicrobial molecular mechanism of organic acids. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2011, 42 (3) :323-328. (in Chinese)
张军, 田子罡, 王建华, 王安如. 有机酸抑菌分子机理研究进展. 畜牧兽医学报, 2011, 42 (3) : 323-328.
- [22] Hsiao CP, Siebert KJ. Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 1999, 47 (3) :189-201.

- [23] Hirshfield IN, Terzulli S, Byrne C. Weak organic acids: a panoply of effects on bacteria. *Science Program*, 2003, 86 (4) :245-269.
- [24] Maurer LM, Yohannes E, Bondurant SS, Radmacher M, Slonczewski JL. pH regulates genes for flagellar motility, catabolism, oxidative stress in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187 (1) :304-319.
- [25] Young KM, Foegeding PM. Acetic, lactic and citric acids and pH inhibition of *Listeria monocytogenes* Scott A and the effect on intracellular pH. *The Journal of Applied Bacteriology*, 1993, 74 (5) :515-520.
- [26] Carpenter CE, Broadbent JR. External concentration of organic acid anions and pH: key independent variables for studying how organic acids inhibit growth of bacteria in mildly acidic foods. *Journal of Food Science*, 2009, 74 (1) :12-15.
- [27] Pieterse B, Leer RJ, Schuren FH, Werf MJ. Unravelling the multiple effects of lactic acid stress on *Lactobacillus plantarum* by transcription profiling. *Microbiology*, 2005, 151 (12) : 3881-3894.
- [28] Molatova Z, Skrivanova E, Macias B, Mcewan NR, Brezina P, Marounek M. Susceptibility of *Campylobacter jejuni* to organic acids and monoacylglycerols. *Folia Microbiology (Praha)*, 2010, 55 (3) :215-220.
- [29] Buchanan R, Golden M, Whiting RC, Phillips JG, Smith JL. Non-thermal inactivation models for *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Science*, 1994, 59 (1) : 179-188.

Inactivation kinetics of *Vibrio parahaemolyticus* in peeled shrimp treated with organic acids

Yuan Liu, Chun Fang, Changyong Cheng, Weihuan Fang*

Zhejiang University Institute of Preventive Veterinary Medicine and Zhejiang Provincial Key Laboratory of Preventive Veterinary Medicine, Hangzhou 310058, China

Abstract: [Objective] To establish the kinetic inactivation models of *Vibrio parahaemolyticus* in saline and peeled shrimp treated with acetic acid, lactic acid and citric acid for guidance of their potential application in shrimp decontamination. [Methods] To determine the survival rate (P) of *V. parahaemolyticus* in saline and peeled shrimp treated with organic acids, dose-response in peeled shrimp between P and concentrations of organic acids was modeled directly. Logit (P) was transformed from survival P with the formula $\ln [P/(1 - P)]$ for linear modeling. Both linear models were used to interpolate 50% and 90% effective inhibitory concentrations (EC_{50} and EC_{90}), which were then used to compare the difference of inhibitory potency between saline and peeled shrimp. [Results] Organic acids in saline were more inhibitory to *V. parahaemolyticus* in saline than in peeled shrimp, seen as 160 to 200-fold increase of EC_{50} and EC_{90} for lactic acid and citric acid, and more than 70-fold increase for acetic acid. These results indicate that food matrix had significant impact on the antimicrobial activity of organic acids. We also found that EC_{90} of the tested organic acids in peeled shrimp was far below the 2.5% limit for use as food ingredients regulated by USDA. With equimolar concentration in the test solutions, the order of inhibitory potency is citric acid > lactic acid > acetic acid. [Conclusion] Food matrix could have negative impact on antimicrobial activity of organic acids. Concentrations of organic acids around 2% could lead to significant reduction of *V. parahaemolyticus* contamination of peeled shrimp for improved food safety.

Keywords: shrimp meat, *Vibrio parahaemolyticus*, organic acids, inactivation kinetics

(本文责编:王晋芳)

Supported by the 11th Five-Years Key Programs for Science and Technology Development of China (2009BADB9B09)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-571-88981242; E-mail: whfang@zju.edu.cn

Received: 1 September 2012 / Revised: 28 October 2012