微流芯片电泳分离法对热加工猪肉及鸡肉的加热验证及卫生监控

韩 伟, 张 浩, 谢小珏, 张 柳, 顾 鸣*

(上海出入境检验检疫局, 上海 200135)

摘 要: 目的 利用微流芯片电泳分离法对猪肉馅和鸡里脊肉进行热加工验证。**方法** 采用微流芯片电泳分离蛋白质的方法, 对肉及含肉食品的热加工效果进行验证, 并对产品在不同热处理条件下进行卫生分析。**结果** 产品中心温度在 55 ℃以上到 70 ℃并保持 2 min 的处理区间细菌数有大幅度下降, 70 ℃加热 2 min 可使初始数量为 10^4~10^6 CFU/g 的细菌下降 3~4 个数量级, 有效控制肉及含肉食品中的微生物危害, 且此加热条件下猪肉和鸡肉组织电泳图谱与未处理样品相比产生显著差异, 证明产品经过充分的加热, 熟制完全。**结论** 采用微流芯片电泳分离技术可快速有效地验证产品的加热程度。

关键词: 热加工肉; 加热效果; 微流芯片电泳

Sanitary analysis and heating effect validating in processed pork and chicken by microfluidic chip electrophoresis separation method

HAN Wei, ZHANG Hao, XIE Xiao-Jue, ZHANG Liu, GU Ming*

(*Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau*, *Shanghai* 200135, *China*)

ABSTRACT: Objective To verify the thermal processing of minced pork and chicken tenderloin by microfluidic chip electrophoresis separation method. **Methods** A labchip microfluidic technology Experion™ automated electrophoresis was used to validate heating effect in processed meat and meat products, and sanitary analysis was carried out simultaneously. **Results** The bacteria count in both samples was significantly decreased over 55 ℃ then up to 70 ℃ 2 min process. With a 70℃ 2 min process, the bacteria count could reduced 3~4 log from 10^4~10^6 CFU/g at the beginning, which could effectively control the bio-hazard of the products. Also, under such heating condition, the electrophoresis strip showed a significant difference between processed and unprocessed meat, which indicated the meat had been fully heated. **Conclusion** The microfluidic automated electrophoresis could be used as an effective and quick method to validate heating effect.

KEY WORDS: processed meat; heating effect; microfluidic chip electrophoresis

1 引 言

对肉及含肉食品进行热加工处理既是肉制品加工重要的工艺过程, 也是确保产品质量安全的重要手段, 通过蒸、煮、油炸或其他方式处理, 能达到使产品不含致病性微生物的目的。但不论采用何种加热

*通讯作者: 顾鸣, 研究员, 主要研究方向为食品安全分析和风险。E-mail: gum@shciq.gov.cn

***Corresponding author:** GU Ming, Professor, Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No.1208, Minsheng Road, Shanghai 200135, China. E-mail: gum@shciq.gov.cn

方式, 均应对加热温度、时间等参数组合进行有效控制。《出口食品生产企业安全卫生要求》第十条中规定“应对速冻、冷藏、冷却、热处理、干燥、辐照、化学保藏、真空或改良空气包装等与食品安全卫生密切相关的特殊加工环节进行有效控制, 应有科学的依据或国际公认的标准证明该环节采取的措施能够满足安全卫生要求”。与此对应的是, GB/T 25007-2010《速冻食品生产 HACCP 应用准则》指出热处理应在 70 ℃以上停留不少于 2 min, 然后尽快地降到 10 ℃以下; 《输日热加工偶蹄动物产品卫生要求》中规定加热处理的制品需满足煮沸或暴露在 100 ℃以上的蒸汽下, 产品中心温度必须达到 70 ℃或以上不少于 1 min。而我国近年来曾多次发生我国出口至日本的热加工禽肉、偶蹄类产品多次被日本农林水产省检测出加热不充分, 相关企业被令暂停出口的事件。其判定依据即为产品中心温度未达到 70 ℃或以上 1 min。

常规的产品生熟度判定方法包括感官检测(即颜色、组织形态的判别法)、SDS-聚丙烯酰胺变性蛋白电泳法和特定的酶活性测定等[1,2,3]。本文采用一种基于荧光电泳原理的蛋白质测定方法-微流芯片分离电泳, 在一张含多个网络模式排列的微通道的蛋白检测芯片上进行蛋白质的毛细管电泳分离, 通过电泳工作站对整个通道网络上的电压和电流进行控制, 完成包括电泳, 染色, 脱色, 检测及基础数据分析等连续的步骤, 可以显著地提高分析速度及分离效率, 可在 30 min 内全自动完成整个蛋白电泳及条带分析, 并结合对偶蹄类和禽类肉及含肉食品在不同热处理状态的卫生分析, 可为产品加热终点温度的设定提供依据, 并判断加热终点温度是否达到加工工艺和相关法规的要求, 从而为热加工肉及含肉食品 HACCP 实施中的加热效果验证措施提供一种快速、有效的验证方法。

2　材料与方法

2.1　样　品

冰鲜猪瘦肉糜和冷冻鸡里脊肉购自上海超市; 含肉出口冷冻方便食品小笼包和油炸鸡块由上海地区的两家出口食品加工企业提供。

2.2　培养基与试剂

平板计数琼脂培养基; 0.01 mol/L PBS 溶液; 无菌去离子水; 二巯基乙醇(分析纯); Pro260 蛋白质分析试剂盒(美国 Bio-Rad 公司): 包括微流芯片和试剂, 可分辨并定量 10~260 kDa 大小的蛋白质样本, 蛋白标准 Ladder 从小到大依次为 1.2、10.0、20.0、25.0、37.0、50.0、75.0、100.0、150.0、260.0 kDa。

2.3　设备与仪器

Experion™ 系统自动电泳工作站及电脑、制胶工作站(美国 Bio-Rad 公司); 天平; Bagmixer100 击拍器(法国 Interscience 公司); 无菌样品袋; 刻度吸管; 低温离心机; 中心温度计, 恒温水浴, 冰水浴等。

2.4　模拟样品制备

将冰鲜猪瘦肉糜和冷冻鸡里脊肉恢复至室温(20~25 ℃)。无菌条件下分别称取 9 份猪肉糜和鸡里脊肉, 每份 10 g, 剪碎, 放入样品袋中。将这些小样按照设定的温度和时间在恒温水浴中进行模拟加热处理, 在样品中心放置中心温度计, 热处理方式分别为室温放置、50 ℃ 5 min、55 ℃ 5 min、60 ℃ 2 min、65 ℃ 2 min、70 ℃ 2 min、80 ℃ 1 min、90 ℃ 1 min 和 99 ℃ 1 min; 样品中心温度到达加热要求后立即放于冰浴中冷却; 然后添加 90 mL PBS, 用击拍器击拍 1 min 后, 取 10 mL 稀释液做平板菌落总数测定; 继续击拍 9 min 后静置 0.5 h; 避开脂肪层取上清液 1 mL, 8000 r/min 低温离心 20 min, 制成样品缓冲液备用。

2.5　自然样品制备

取含肉出口冷冻方便食品小笼包和油炸鸡块, 生产中的加热及处理要求见表 1。

小笼包取肉馅部分, 油炸鸡块取中心部分, 每种处理组的样品都取 10 g, 剪碎, 放入无菌样品袋中, 添加 90 mL PBS; 用 Bagmixer 击拍器击拍 1 min 后, 取 10 mL 稀释液做平板菌落总数测定; 继续击拍 9 min 后静置 0.5 h; 避开脂肪层取上清液 2 mL, 加入 2 个微量离心管, 每管 1 mL, 分别以红色笔和黑色笔做标记; 将红色字标记的离心管置 70 ℃水浴中, 用中心温度计观察样品提取液温度, 使之在 70 ℃维持 2 min, 快速冷却, 再在 8000 r/min 低温离心 20 min, 制成样品缓冲液备用。

2.6　菌落总数的测定

菌落总数测定按《食品安全国家标准 菌落总数测定》(GB4789.2-2010)进行。选择 2~3 个适宜稀释度的样品匀液, 各取 1 mL 分别加入无菌培养皿内,

表 1 不同产品的加热方式、温度要求与实测温度

Table 1 The heating methods, temperature requirements and the measured temperature of different products

加热方式	蒸煮	油炸
产品	小笼包	鸡块
加热要求	肉包进入蒸箱，100 ℃蒸汽蒸制 10 min，肉中心温度达到 70 ℃以上并保持 1 min 以上。	第一次油炸 160 ℃ 80 s; 经过 10 s 输送带后，进行第二次油炸，165 ℃ 135 s; 肉中心温度为 70 ℃以上并维持 1 min 以上
样品种类	1、生制产品(原料) 2、加热完成，中心温度 73.7 ℃(成品)	1、生制产品(原料) 2、第一次油炸，中心温度 50.1 ℃(半成品) 3、第二次油炸，中心温度 75.2 ℃(成品)

每皿中加入 15~20 mL 平板计数琼脂培养基, 混匀, 培养计数各平板菌落数, 计算并报告结果。

2.7 加热程度的验证

2.7.1 芯片的制胶和加样

使用前, 将所有试剂盒中的试剂恢复到室温, 轻轻振荡混匀。按 Pro260 蛋白质分析试剂盒的使用手册要求制胶和制样: 过滤胶(G)后, 将染色剂加入胶(GS)中, 再过滤; 取 30 μL 样品缓冲液加入 1 μL 二巯基乙醇, 混匀; 将样品提取液 4 μL 与样品缓冲液 2 μL 混合, 沸水浴 5 min 变性后快速冷却; 加入 84 μL 无菌去离子水, 混匀, 制成上样液。

取出微流芯片置于清洁的工作台上, 按孔道标识加入 12 μL GS, 由制胶工作站对芯片的装填孔施加压力, 将 GS 注入到微通道的网格中。

将制备好的上样液和分子量标记各 6 μL 加入到芯片相应孔道中, 所有芯片孔均应填满。如果需要, 可在未使用的样本孔中加入空白液。再将移液器的吸样头插到芯片孔的底部, 缓慢地加入芯片试剂, 胶(G)和染色胶(GS)分别为 12 μL, 避免引入气泡。

2.7.2 运行分析

制胶并加样的芯片应立即或在 5 min 内放入自动电泳工作站中的芯片平台上, 固定妥当, 合上盖子; 运行软件; 波峰/电泳图谱和胶视图可即时显示, 以监测运行的进展结果; 运行结束时, 显示结果信息。

3 结果与分析

3.1 加热条件对肉类蛋白质和卫生状况的影响

不同加热温度与时间组合对猪肉和鸡肉制品的卫生状况的影响见图 1。随着中心温度的提高, 肉类产品中的细菌数量迅速下降。

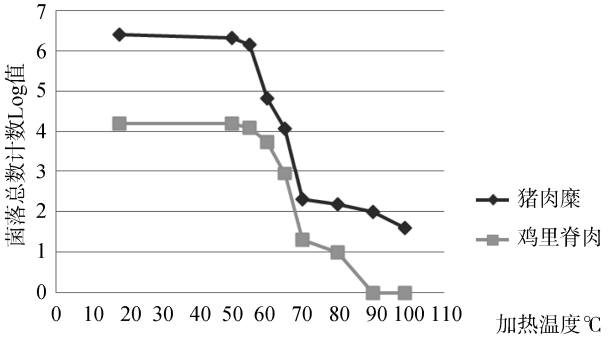


图 1 处理方式对含肉制品卫生状况的影响

Fig. 1 Effect of treatment method on the sanitary status of processed meats

室温(18 ℃)下冰鲜猪瘦肉糜的起始细菌数量为 2.8×10^6 CFU/g, 冻鸡里脊肉的起始细菌数量为 1.6×10^4 CFU/g。经 50 ℃ 5 min 和 55 ℃ 5 min 处理, 两种产品的细菌数基本保持在起始数量级, 提示此温度与时间组合对污染菌影响不大; 从 60 ℃ 2 min 开始, 细菌数量有大幅度的下降, 70 ℃ 2 min 的条件下分别下降了 4 个和 3 个数量级, 热致死率均在 99.8% 以上, 细菌存活率分别为 0.07‰和 1.3‰, 之后下降趋势减缓。其中猪肉糜由于起始细菌数较高, 细菌数的整体下降程度较大。

由图 1 可见, 肉制品中细菌数量下降幅度最大的加热温度与时间组合出现在 55 ℃ 2 min、60 ℃ 2 min、65 ℃ 2 min 和 70 ℃ 2 min 之间的处理区间, 提示肉制品的初始污染菌大部分在超过 55 ℃ 2 min 的热处理条件不能存活, 主要为革兰氏阴性杆菌和部分革兰氏阳性球菌与杆菌繁殖体。在 70 ℃ 2 min, 主要的食源性致病菌如沙门氏菌以及动物源性病毒如新城疫病毒可被有效灭活[4]。

随着温度的进一步升高, 从 80 ℃ 5 min 处理组开始, 细菌数下降趋缓, 猪瘦肉糜由于起始菌量较高, 仍有部分残留, 99 ℃ 1 min 的处理条件下猪瘦肉糜的细菌数为 40 CFU/g, 提示可能是由于产细菌芽孢及真菌孢子的存在, 99 ℃ 1 min 的处理可有效控制细菌数量, 但并不能起到完全杀灭微生物的作用。而冻鸡里脊肉在 90 ℃ 1 min 和 99 ℃ 1 min 热处理下菌落总数均<10 CFU/g, 可能由于其污染菌中少有芽孢或孢子, 且起始菌量较低。

不同加热猪瘦肉糜和鸡里脊肉制备液的微流芯片蛋白电泳图, 如图 2, 3 所示: 随着中心温度的提高, 猪肉与鸡肉产品中的水溶性蛋白有明显的降解和变性。

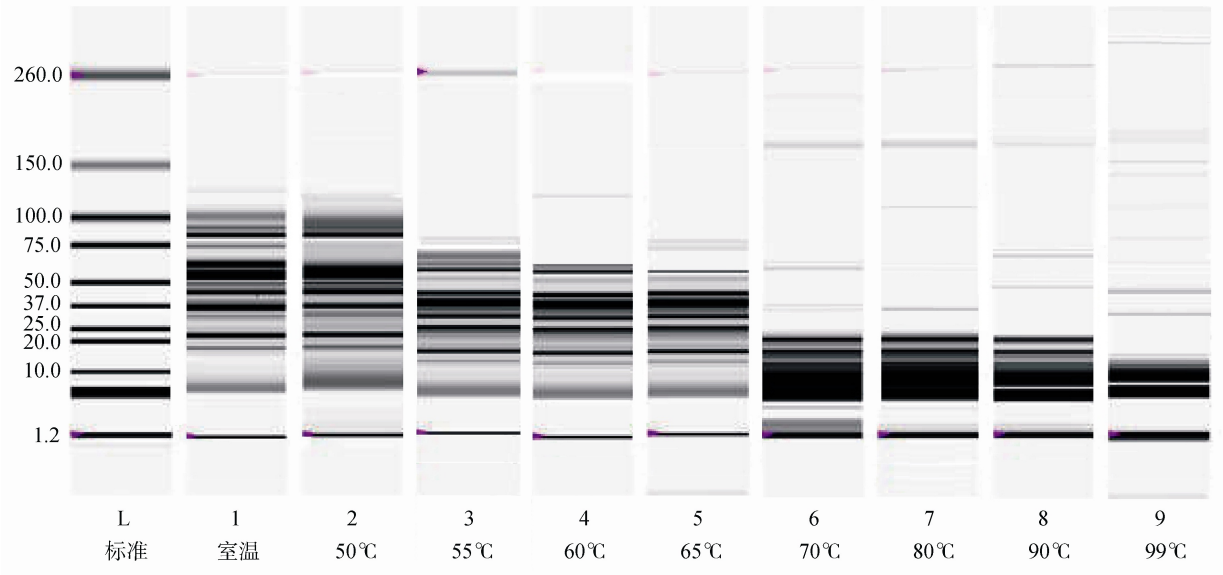


图 2　猪瘦肉糜水溶性蛋白的电泳图谱

Fig. 2　Electrophoresis of soluble protein of minced pork

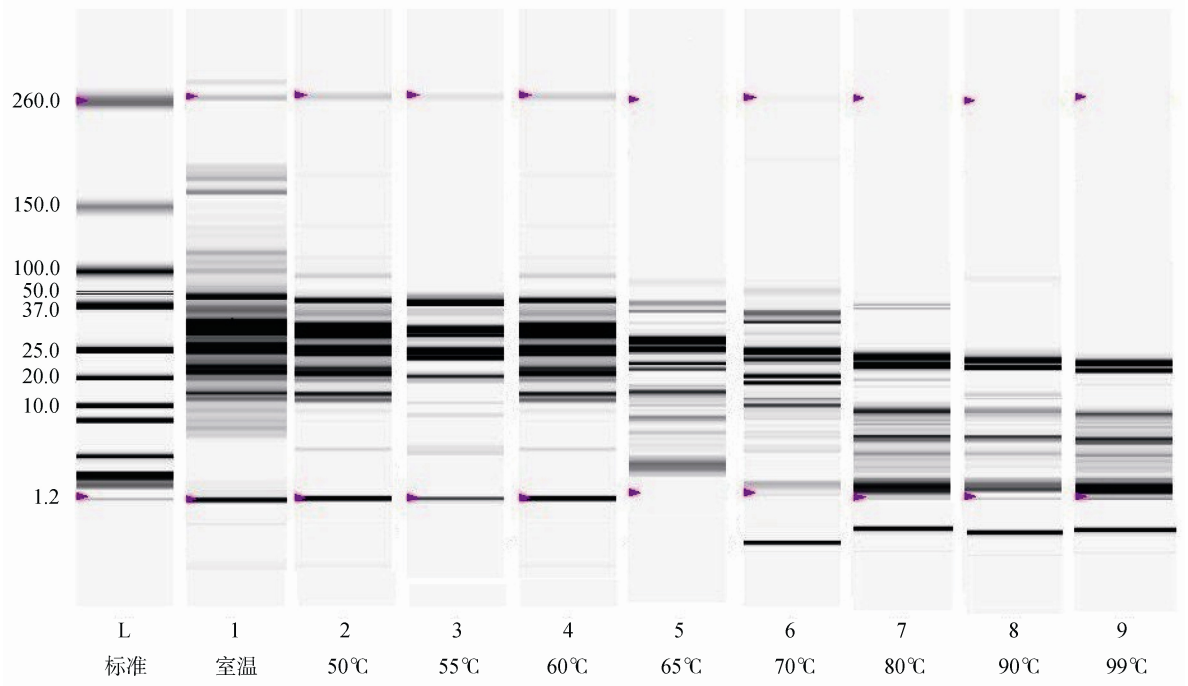


图 3　鸡里脊肉水溶性蛋白的电泳图谱

Fig. 3　Electrophoresis of soluble protein of chicken tenderloin

未经加热处理的动物肌肉组织，存在多种分子量的水溶性蛋白质，其电泳图谱呈现蛋白质浓度高和基本连续分布的特征。有研究指出，猪肉蛋白由 30%~34%的水溶性肌浆蛋白、50%~55%的溶于 8 mol/L 尿素的肌原纤维蛋白和 10%~15%的不溶的基质蛋白组成[5]；鸡肉蛋白中水溶性部分占 49.23%，盐溶性部分占 13.72%，不溶的基质蛋白占 37.03%[6]。采用本研究方法检测的是水溶性蛋白质。

由图 2 和图 3 可见，在 50~60 ℃处理后的猪肉和鸡肉组织，电泳图谱仅产生了轻微差异，反映了蛋白质热变性程度较轻，蛋白质分子中的大多数不耐热化学键尚未断裂，少数的化学键发生断裂，溶液中的化学组成变化较小，因此图谱未产生明显变化。

经 70 ℃处理后的猪肉和鸡肉组织，电泳图谱与未处理样品相比产生显著差异，电泳条带变少，低分子量区域条带聚集和增多，说明样品蛋白质的大多数不耐热化学键已经完全断裂，溶液的化学组成发生明显变化，溶液中形成相对稳定的亚基，多肽等化学组成，某些蛋白质分子被降解成小分子多肽，电泳跑出了分离胶，所以呈现出电泳条带变少，浓度变低，只在特定分子量处出现条带[7]。

经 80~99 ℃热处理后的肌肉组织，其电泳图谱图谱与未处理样品差异更大，且温度梯度之间无差别，从而说明当温度达到 80 ℃或以上时，样品蛋白质已经完全变性，所有不耐热化学键已经完全断裂，溶液中形成稳定的亚基，多肽等化学组成，不再随着温度的升高，时间的变长而变化。猪瘦肉糜和鸡里脊肉的水溶性蛋白普遍降解到 25 kDa 及之下。

3.2 微流芯片法对加热效果的验证应用

小笼包和鸡块两种产品各个处理组的卫生状况见表 2。

两种产品各处理组的蛋白质变性情况见图 4 和图 5。

比对同一个样品制备液及经 70 ℃ 2 min 处理的制备液的电泳图，若两者电泳条带一致或类似，说明该样品已达到要求的 70 ℃ 2 min 的加热条件；若未经处理的制备液的电泳条带明显多于处理过的制备液，且有大量条带在 25 kDa 及以上的分子量区间，则提示样品的加热过程没有达到要求的加热温度和加热时间，存在加热不充分的状况。

由图 4 和图 5 可见，两种含肉速冻方便食品的生制品和半成品均有较多的大分子蛋白连续分布，成品则电泳条带较少，且集中在低分子量区域，说明成品经过充分加热，熟制完全。从表 2 的卫生状况分析可见，生制小笼包、生制鸡块及鸡块半成品均含一定量的细菌，而加热后的成品菌落总数计数结果均为 <10 CFU/g，微生物危害得到了有效的控制，符合产品的安全卫生要求。

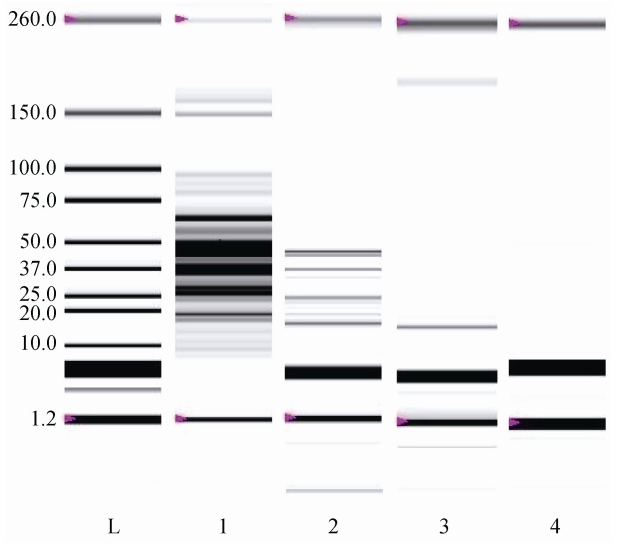
4 结 论

初始菌量分别在 10^6 CFU/g 的猪肉产品和 10^4 CFU/g 的鸡肉产品经过中心温度达至少 70 ℃并保持 2 min 的热处理之后，细菌分别下降 4 个和 3 个数量

表 2 产品各处理组的菌落总数计数结果

Table 2 The total number of colonies of all treatment groups

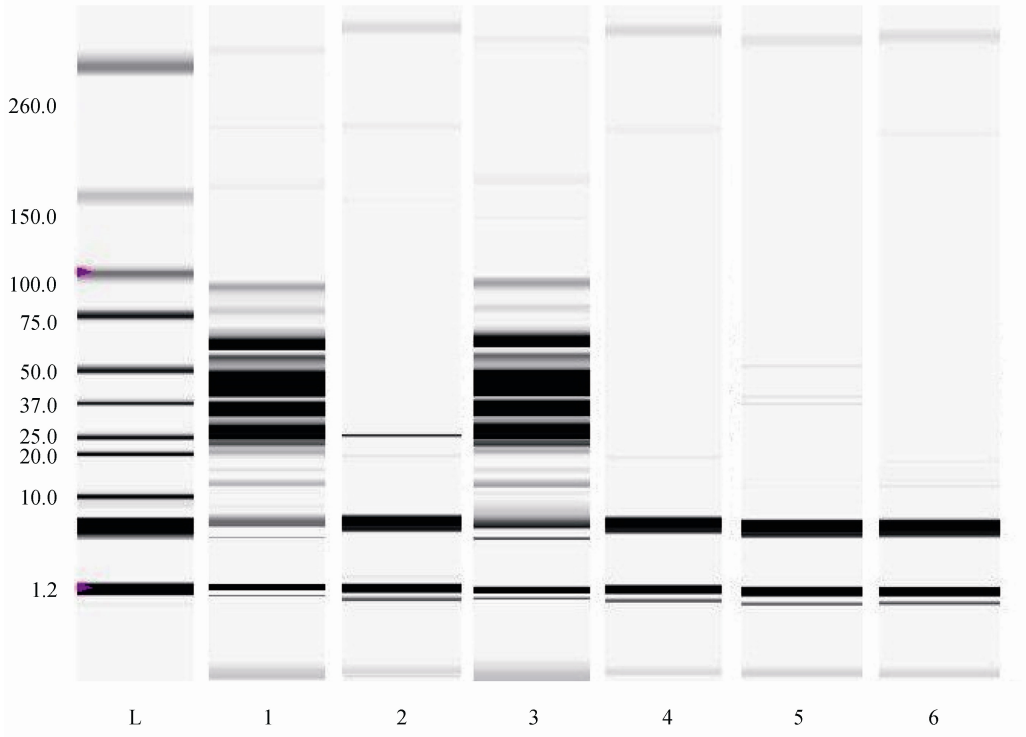
	生制品 CFU/g	半成品 CFU/g	熟制品(成品) CFU/g
小笼包	5.5×10^4	/	<10
鸡块	4.3×10^3	3.6×10^3	<10



L: 蛋白标准; 1: 生制品; 2: 70 ℃ 2 min 处理的生制品; 3: 成品; 4: 70 ℃ 2 min 处理的成品

图 4 小笼包的加热验证图

Fig. 4 The verification of dumpling heating



L: 蛋白标准; 1: 生制品; 2: 70 ℃ 2 min 处理的生制品; 3: 半成品; 4: 70 ℃ 2 min 处理的半成品; 5: 成品; 6: 70 ℃ 2 min 处理的成品

图 5　油炸鸡块的加热验证图

Fig. 5　The verification of fried chicken heating

级, 热致死率在 99.8%以上。采用 Experion™ 全自动蛋白芯片检测系统显示, 热处理满足中心温度 70 ℃ 2 min 的条件下, 猪肉和鸡肉组织的电泳图谱与未加热或不完全加热的样品相比明显不同, 水溶性蛋白普遍降解到 25 kDa 及之下。70 ℃ 2 min 的热处理条件可有效地控制畜禽类肉中的微生物危害, 并在肉产品的水溶性蛋白电泳结果上呈现显著差异, 可由此验证产品经过了充分的加热, 熟制完全。微流芯片电泳技术应用于畜禽类肉制品中加热变性蛋白的检测具有快速、简单、高效等特点, 且能保证试验的重复性与稳定性。

参考文献

[1] SN/T 2545-2010 动物源性食品中热变性蛋白检测方法[S].
SN/T 2545-2010 Testing method of thermal denaturation protein in animal derived food [S].

[2] 方绍庆, 许红岩, 高宏伟, 等. 肉食品热加工生熟度检测方法研究[J]. 肉类工业, 2007, 5: 15–17.
Fang SQ, Xu HY, Gao HW, *et al*. Study on the method for determining temperature of meat during heating process [J]. Meat Ind, 2007, 5: 15–17.

[3] 董佩谕, 孙京新, 徐幸莲, 等. SDS-PAGE 法检测动物肌肉蛋白质加热终点温度的研究[J]. 食品工业科技, 2011, 11: 65–68.
Dong PY, Sun JX, Xu XL, *et al*. Research om identification of the endpoint temperature of aniamal tissue protein through sodium dodecyl sulfate-polyacrylamaide gel electrophoresis [J]. Sci Technol Food Ind, 2011, 11: 65–68.

[4] 禽肉中禽流感病毒和新城疫病毒的有效热灭活条件[J]. 中国家禽, 2008,14: 63.
Effective thermal inactivation conditions for avian influenza virus and Newcastle disease virus in poultry [J]. China Poultry, 2008, 14: 63.

[5] 王振宇, 刘欢, 马俪珍, 等. 热处理下的猪肉蛋白质特性[J]. 食品科学, 2008, 5: 73–76.
Wang ZY, Liu H, Ma LZ, *et al*. Characteristics of porcine protein by heat treatment [J]. Food Sci, 2008, 5: 73–76.

[6] 周雪松, 赵谋明, 林伟锋, 等. 鸡肉蛋白质组成与分离研究[J]. 食品与发酵工业, 2005, 10: 71-73.

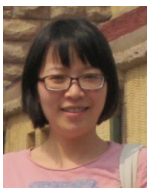
Zhou XS, Zhao MM, Lin W, *et al*. Study on Isolation and Protein Composition of Chicken Meat [J]. Food Ferment Ind, 2005, 10: 71–73.

[7] 贺艳, 郑文杰, 刘煊, 等. 肉类加热重点温度检测方法的研究进展[J]. 食品与机械, 2004, 4: 22–24.

He Y, Zheng WJ, Liu X, *et al*. Detect methods on the endpoint heating temperature of meat and meat products [J]. Food Mach, 2004, 4: 22–24.

(责任编辑: 赵静)

作者简介



韩伟, 学士、高级工程师, 主要研究方向为食品微生物检验和食品安全。
E-mail: hanw@shciq.gov.cn

顾鸣, 学士, 研究员, 主要研究方向为食品安全分析和风险。
E-mail: gum@shciq.gov.cn