

不同试验条件下猪肉中气单胞菌生长预测模型的建立和验证

董庆利¹, 高 翠¹, 丁 甜², 余华星¹

(1 上海理工大学 食品科学与工程研究所, 上海 200093;

2 韩国国立江原大学 食品科学与生物技术学科, 韩国 春川 200701)

摘要:采用响应曲面模型(RSM)研究温度、pH、初始菌浓度对冷却猪肉中气单胞菌 *Aeromonas* spp. 生长的影响. 应用 Gompertz 模型对不同试验条件下气单胞菌的生长曲线进行拟合, 一级模型的参数生长率(U)和迟滞期(LPD)采用 RSM 方法构建冷却猪肉中气单胞菌生长的二级模型. 然后随机选择试验组合对建立的方程进行验证, 并应用计算均方误差(MSE)、准确因子(AF)和偏差因子(BF)的方法对建立的生长预测方程进行数学检验. 结果表明, 修正的 Gompertz 模型可以较好地模拟不同试验条件下冷却猪肉中气单胞菌的生长情况($R^2 > 0.96$), 温度、pH 和初始菌浓度对气单胞菌生长影响显著($P < 0.05$), 数学检验参数 MSE 较小, AF 和 BF 接近 1.0, 均在可接受范围, 用 RSM 方法建立的生长预测模型可以较好地模拟冷却猪肉中气单胞菌在不同试验条件下的生长情况.

关键词:气单胞菌; 冷却猪肉; 预测微生物学; 响应面模型

中图分类号:TS201.3; S431.3

文献标志码:A

文章编号:1001-411X(2012)01-0082-05

Establishment and Validation of Growth Predictive Model of *Aeromonas* spp. from Pork Under Different Experimental Conditions

DONG Qing-li¹, GAO Cui¹, DING Tian², YU Hua-xing¹

(1 Institute of Food Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China;

2 Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200701, Korea)

Abstract: The purpose of this paper was to study the effects of temperature, pH and inoculation level on the growth parameters of *Aeromonas* spp. in chilled pork under laboratory conditions. The curves generated within different conditions were fitted by Gompertz function as primary model. Then two parameters (growth rate and lag-time) of the growth curves were modeled using a quadratic polynomial equation of response surface model (RSM) as secondary model. Additional experimental conditions within the research domain were randomly selected for model validation, and mathematical testing were also applied for the developed models, including the mean square error (MSE), accuracy factor (AF) and bias factor (BF). The results indicated that modified Gompertz function could be used to model *Aeromonas* spp. growth under different experimental conditions ($R^2 > 0.96$). Moreover, the temperature, pH and inoculation level on the growth of *Aeromonas* spp. were significant ($P < 0.05$), and RSM with lower MSE and acceptable AF and BF values provided a useful and accurate method of predicting the growth parameters of *Aeromonas* spp.

Key words: *Aeromonas* spp.; chilled pork; predictive microbiology; response surface model

气单胞菌 *Aeromonas* spp. 属于革兰阴性兼性厌氧短杆菌, 在近几年的研究中被证实是一种人畜共患病的病原菌, 有关该菌为胃肠炎和败血症的一种重要致病菌的报道日益增多^[1-3], 同时该菌也是冷却

收稿日期: 2011-01-21

作者简介: 董庆利(1979—), 男, 副教授, 博士, E-mail: dongqingli@126.com.

基金项目: 国家自然科学基金(30800864).

猪肉中的优势腐败菌之一^[4]。冷却肉是指在卫生标准条件下,按照国家屠宰规范对畜禽进行屠宰后24 h内将肉冷却,使得肉的中心温度降至0~4℃,并在随后的排酸、分割、剔骨、包装、运输以及销售过程中,肉温始终保持在0~4℃^[5]。冷却猪肉的优势腐败菌有假单胞菌 *Pseudomonas* spp.、气单胞菌、肠杆菌属 *Enterobacteriaceae* 等^[6]。在国内外对冷却猪肉中微生物进行的相关研究中多是针对大肠埃希菌 *Escherichia coli*、假单胞菌等病原菌,而针对气单胞菌的相关研究较少。在对气单胞菌的研究过程中发现除温度外,pH和初始接种量对气单胞菌的生长也有显著影响,所以设计试验研究这3种环境因子对冷却猪肉中气单胞菌生长的影响,以便更好地监测其生长,降低病原菌污染食品的风险。本研究将气单胞菌直接接种到猪肉中,在不同的环境下进行培养,观测环境对其生长的影响规律,用一级和二级微生物模型对数据进行拟合,并通过数学检验和随机条件模拟,使得到的模型更接近于冷却猪肉中气单胞菌实际的生长规律。

1 材料与方法

1.1 试验设计

应用 Design-Expert v. 7. 1. 6 软件(美国 Stat-Ease 公司),参照预试验结果,对响应曲面的水平值进行中心组合设计(Central Composite Design, CCD),如表1所示。

表1 中心组合设计的因素和水平¹⁾

Tab. 1 Factors and levels from central composite design

水平	$\theta/^\circ\text{C}$	pH	初始接菌量(N_0)
-1.7	16.7	5.6	2.3
-1.0	20.0	6.0	3.0
0	25.0	6.5	4.0
+1.0	30.0	7.0	5.0
+1.7	33.4	7.3	5.7

1) N_0 为菌数 [$N/(\text{cfu} \cdot \text{g}^{-1})$] 的对数值 ($\lg N$)。

1.2 材料

五丰上食优质精腿肉购于上海卜蜂莲花超市,迅速置于0~4℃冰箱中冷藏备用。

1.3 菌种的选用及活化

气单胞菌(No. 23564)来源于中国工业微生物菌种保藏管理中心,于气单胞菌液体培养基(蛋白胨5 g,酵母提取物3 g,胰蛋白胨10 g,L-盐酸鸟苷酸5 g,甘露醇1 g,肌醇10 g, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g,枸橼酸铁胺0.5 g,溴甲酚紫0.02 g,琼脂3 g,溶于1 000 mL蒸馏水)中,27℃下活化3次,进而挑取良好的单菌

落制得初始菌悬液。培养基的配制参照文献[7]。

1.4 样品接种和贮藏

按试验设计中的20组处理,用5 mol·L⁻¹的HCl和5 mol·L⁻¹的NaOH将生理盐水(8.3 mg·L⁻¹的NaCl溶液)调到所需pH,121℃灭菌15 min,配制无菌水。称取25 g肉块,悬浮于80℃无菌水中10 s进行消毒。将1.3中制得的初始菌悬液用无菌生理盐水进行梯度稀释,并根据预实验中比浊法标准曲线方程调整至设计所需初始接种量,然后将灭菌后肉块悬浮于其中15 s进行接种。在无菌袋中注入20 mL相应pH的无菌水,将接种后肉块封装于上述无菌袋中,按试验设计分别置于相应温度下恒温培养。

1.5 微生物计数

适时取上述肉样,用灭菌剪刀将肉样剪碎置于装有205 mL灭菌生理盐水的三角瓶中,然后将无菌袋中的液体和残留菌冲至三角瓶中,充分摇匀,按10倍稀释法稀释到所需稀释度,参照文献[8]用平板计数法进行气单胞菌计数。直至细菌生长达到稳定期。其中培养基参照 Mccoy 等^[9]设计的气单胞菌鉴别培养基。

1.6 生长曲线的拟合和生长参数的观测

应用 Origin 8.0 软件(美国 OriginLab 公司),用修正的 Gompertz 模型^[10]对冷却猪肉中气单胞菌的生长曲线进行拟合,计算气单胞菌生长的最大比生长速率(U/h^{-1})和迟滞期(LPD/h)。具体如下:

$$N_t = A + C \times \exp \{ -\exp [-B \times (t - M)] \}, \quad (1)$$

式中: t 为时间/h, N_t 为 t 时菌数 [$N/(\text{cfu} \cdot \text{g}^{-1})$] 的对数值 ($\lg N$), A 、 B 、 C 、 M 为模型参数,

$$U = BC/e,$$

其中 $e = 2.7182$,

$$\text{LPD} = M - (1/B).$$

1.7 二级生长预测方程(RSM)的建立

应用 Design-Expert v. 7. 1. 6 软件建立变量的不同水平与生长参数之间的多元回归方程,应用方差分析及 F 检验多元回归方程及其系数的显著性。统计分析得到多元回归模型如下:

$$y = b_0 + \sum_{j=1}^k b_j x_j + \sum_{j=1}^k b_{jj} x_j^2 + \sum_{j < i}^k \sum_i b_{ji} x_j x_i + e, \quad (2)$$

式中, y 为LPD或 U 的响应值, b_0 (系统中心点)和 b_j 、 b_{jj} 、 b_{ji} 为不同的常量系数, x_j 和 x_i 为因素温度(θ)、pH和初始接菌量(N_0)(其中 $i \neq j$), e 为模型误差^[12]。

1.8 预测方程的验证和检验

得到多元回归方程后,在所设试验条件范围内[温度20~30℃,pH6.0~7.0, N_0 为3 lg N ~5 lg N ,其中 N 为菌数/ ($\text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$)],设定10组随机数据,按上述方法采用 Origin 8.0 软件拟合生长曲线,计算

生长参数 U 和 LPD .

用所建的二级预测方程对用来建模的 20 组数据和用来验证的 10 组数据分别处理预测生长参数 U 和 LPD , 用均方误差 (Mean square error, MSE)、偏差因子 (Bias factor, BF) 和准确因子 (Accuracy factor, AF)^[13-14] 作为衡量模型的标准. 公式如下:

$$MSE = \frac{\sum (V_o - V_p)^2}{n}, \quad (3)$$

$$BF = 10^{(\sum \lg(V_p/V_o)/n)}, \quad (4)$$

$$BF = 10^{(\sum |\lg(V_p/V_o)|/n)}, \quad (5)$$

式中, V_o 为用修正的 Gompertz 模型拟合生长模型的参数 U 或 LPD 的观测值; V_p 为用建立的 RSM 方程得出的对 U 或 LPD 的预测值, n 为测定重复数^[12].

2 结果与分析

2.1 生长曲线的拟合与生长参数的观测

用修正的 Gompertz 模型拟合猪肉中气单胞菌的生长曲线, 计算生长曲线的参数 U 和 LPD . 结果 (表 2) 表明, 修正的 Gompertz 模型可以较好地模拟不同试验条件下冷却猪肉中气单胞菌的生长情况 ($R^2 > 0.96$).

2.2 RSM 生长预测方程的建立和验证

本研究中气单胞菌的生长曲线参数 U 和 LPD 都采用了常用对数的变化, 以达到均一化目的^[12], 然后用逐步回归方法 (引入水平为 0.05, 去除水平为 0.10) 建立生长曲线参数 U 和 LPD 对因素 θ 、pH 和 N_0 的响应曲面模型如下:

$$\ln U = -13.340 + 0.042 \theta + 3.320 \times \text{pH} - 0.085 N_0 - 0.240 \times \text{pH}^2, \quad (R^2 = 0.810); \quad (6)$$

$$\ln(LPD) = 5.860 - 0.068 \theta - 0.460 \times \text{pH}, \quad (R^2 = 0.722). \quad (7)$$

方程 (6) 说明自变量能够解释因变量 81.0% 的变化, 拟合效果较好, 对所得 RSM 模型进行方差分析, 模型和各系数显著 ($P < 0.05$), 失拟检验不显著 ($P > 0.05$). 方程 (7) 自变量能够解释因变量 72.2% 的变化, 因自变量 N_0 的概率 $P > 0.05$, 所以只有自变量 θ 和 pH 进入最后模型中. 建立的 RSM 模型能较好地模拟因素 θ 、pH 和 N_0 对冷却猪肉中气单胞菌的生长曲线参数 U 和 LPD 的影响. 初始接菌量 (N_0) 对气单胞菌的生长率 (U) 影响显著.

应用建立的 RSM 生长预测方程对建模的 20 组处理和验证的 10 组处理分别进行生长参数 U 和 LPD 的观测和预测 (表 2 和表 3).

表 2 由 Gompertz 模型所得出的气单胞菌在不同试验条件下的生长参数¹⁾

Tab. 2 Growth parameters of *Aeromonas* spp. obtained from Gompertz model under different experimental conditions

处理	$\theta/^\circ\text{C}$	pH	N_0	生长参数				U/h^{-1}		LPD/h		R^2
				A	B	C	M	V_o	V_p	V_o	V_p	
1	20.0	6.0	3.0	2.992	0.123	4.875	13.330	0.221	0.228	5.200	5.697	0.982
2	30.0	6.0	3.0	3.030	0.223	4.405	8.433	0.361	0.350	3.585	2.858	0.984
3	20.0	7.0	3.0	3.035	0.186	4.403	9.600	0.301	0.282	4.214	3.597	0.992
4	30.0	7.0	3.0	2.858	0.203	4.664	6.283	0.346	0.427	1.354	1.804	0.984
5	20.0	6.0	5.0	4.970	0.210	2.584	10.273	0.200	0.192	5.518	5.697	0.983
6	30.0	6.0	5.0	4.943	0.313	2.328	6.350	0.267	0.295	3.152	2.858	0.985
7	20.0	7.0	5.0	4.903	0.226	2.574	6.986	0.214	0.237	2.691	3.597	0.993
8	30.0	7.0	5.0	4.845	0.266	2.733	5.173	0.364	0.361	2.553	1.804	0.989
9	16.7	6.5	4.0	3.974	0.140	3.640	13.501	0.186	0.212	6.340	5.697	0.965
10	33.4	6.5	4.0	3.863	0.320	3.771	5.023	0.444	0.436	1.890	1.804	0.995
11	25.0	5.6	4.0	3.895	0.229	3.536	7.079	0.217	0.217	4.044	4.711	0.993
12	25.0	7.3	4.0	3.934	0.263	3.499	7.029	0.340	0.307	3.227	2.181	0.968
13	25.0	6.5	2.3	2.279	0.207	5.476	9.010	0.419	0.353	4.187	3.222	0.987
14	25.0	6.5	6.0	5.956	0.534	1.546	5.512	0.304	0.259	3.638	3.222	0.972
15*	25.0	6.5	4.00	4.021	0.135	4.372	10.542	0.298	0.304	3.132	3.222	0.965
16*	25.0	6.5	4.00	4.119	0.257	3.294	7.792	0.310	0.304	3.899	3.222	0.968
17*	25.0	6.5	4.00	3.929	0.247	3.488	7.354	0.281	0.304	3.292	3.222	0.996
18*	25.0	6.5	4.00	3.910	0.218	3.502	7.881	0.317	0.304	3.306	3.222	0.989
19*	25.0	6.5	4.00	3.911	0.241	3.519	7.059	0.313	0.304	2.905	3.222	0.996
20*	25.0	6.5	4.00	3.884	0.231	3.555	6.833	0.301	0.304	2.495	3.222	0.995

1) * 表示中心点条件; 初始接菌量 (N_0) 为菌数 [$N/(\text{cfu} \cdot \text{g}^{-1})$] 的对数值 ($\lg N$).

表3 不同试验条件下用于验证的气单胞菌的生长观测和预测结果¹⁾

Tab.3 Observed and predicted U and LPD of *Aeromonas* spp. by RSM for validation under different combined conditions

处理	$\theta/^\circ\text{C}$	pH	N_0	U/h^{-1}		LPD/h	
				V_o	V_p	V_o	V_p
1	27.0	6.7	3.8	0.342	0.347	2.490	2.565
2	20.5	6.3	4.6	0.206	0.228	5.206	4.797
3	25.0	5.8	4.8	0.232	0.220	5.030	4.446
4	30.0	6.1	4.3	0.334	0.325	2.615	2.757
5	16.7	6.3	3.5	0.215	0.214	6.055	6.211
6	26.0	6.7	4.5	0.297	0.313	2.590	2.746
7	28.0	6.4	3.6	0.349	0.350	2.514	2.751
8	20.2	5.2	5.3	0.147	0.114	8.034	8.121
9	30.6	6.8	4.5	0.368	0.383	1.838	1.918
10	27.0	7.1	4.3	0.374	0.334	2.321	2.134

1) 初始接菌量(N_0)为菌数 $[N/(\text{cfu} \cdot \text{g}^{-1})]$ 的对数值($\lg N$).

2.3 预测方程的数学检验

用来对结果进行验证的组的预测值与观测值的比较如图1和图2所示.说明所建预测模型可靠性能够接受,可以较好地模拟在本试验条件下冷却猪肉中气单胞菌的生长情况.

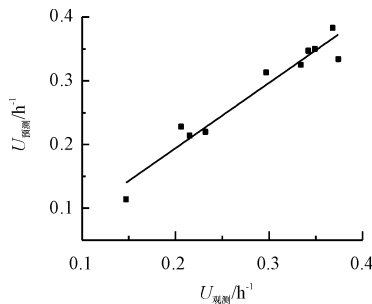


图1 应用RSM预测方程对 U 预测值与观测值的图形比较

Fig.1 Graphical comparisons between observed and predicted U of *Aeromonas* spp. by RSM for validation

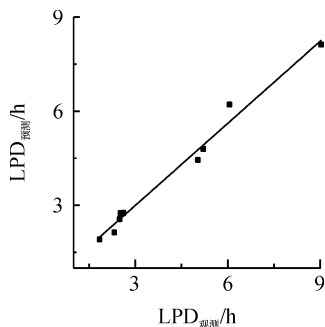


图2 应用RSM预测方程对LPD预测值与观测值的图形比较

Fig.2 Graphical comparisons between observed and predicted LPD of *Aeromonas* spp. by RSM for validation

用于建模试验组合的RSM预测方程的数学固有检验和用于验证试验组合的RSM预测方程的数学扩展检验如表4所示. MSE的值越小,说明模型表达试验数据越充分. 用于建模试验组合的 U 和LPD的MSE分别为 2.0×10^{-4} 和 64.0×10^{-4} ,而用于验证的分别为 0.1×10^{-4} 和 36.0×10^{-4} ,表示预测值和观测值相似,均方误差较小,表明所得模型可以很好地拟合试验数据.

偏差因子(BF)是衡量模型的一个非常重要的参数,Ross^[11]认为,对于微生物生长模型的验证,如果BF值在0.90~1.05的范围之内,认为该模型能够很好地预测微生物生长速度和生长状况;如果BF值在0.7~0.9或者1.06~1.15范围之内,则该模型是可以被接受的;如果BF值大于1.15或者小于0.7,则说明该模型是失败的.这一判断方法也成功用于单增李斯特菌 *Listeria monocytogenes* 生长模型的判定^[15].由表4可知,本试验所得用于建模试验组合的 U 和LPD的BF值分别为0.9807和0.9917,用于验证的分别为0.9898和0.9885,说明建立的模型可以较好地表达微生物的生长状况.当AF=1的时候,说明模型有很高的精确性,数值越大,或者越小,说明该模型的准确性越低^[16].如表4所示,用于建模试验组合的 U 的AF值都属于可以接受的结果.本试验建立的预测方程适合预测不同试验条件下冷却猪肉中气单胞菌的生长参数.

表4 RSM预测方程的数学固有检验和扩展检验

Tab.4 Internal and external mathematical validation by RSM for model validation

指标 ¹⁾	MSE/ 10^{-4}	BF	AF
U	2.0	0.9807	1.0195
LPD	64.0	0.9917	1.0120
U^*	0.1	0.9898	1.0103
LPD*	36.0	0.9885	1.0116

1) U 和LPD分别为用于建模组合的最大比生长速率和迟滞期, U^* 和LPD*分别为用于验证试验组合的最大比生长速率和迟滞期.

3 讨论与结论

本研究仅对猪肉中优势腐败菌之一的气单胞菌开展研究,冷却猪肉中气单胞菌生长情况复杂,影响模型建立的因素很多,冷却猪肉中的气单胞菌菌龄并不完全一样,会对模型的参数产生影响.有研究表明,早期的环境和所处的生长阶段都会对细胞转入新环境后适应和再次生长所用的时间产生影响^[16].另外,冷却猪肉中存在的其他微生物也会对气单胞

菌的生长有协同或拮抗作用,已有专门对试验条件下混合菌种的研究^[17],也可用单一的预测模型进行模拟.同时,实际食品环境的复杂性远远高于试验条件组合,一般认为试验条件下的预测会出现 Fail-Safe 情况,试验条件下得到的生长预测模型在用于生产实践前,要经过实际食品的验证才能真正推广使用.

试验除了将温度作为对微生物生长的主要影响因素加以研究外,还将 pH 和初始接菌量作为显著影响因素引进了预测方程,从所建的生长预测模型来看,温度、pH 都对冷却猪肉中气单胞菌的生长有显著影响,而初始接种量只对气单胞菌生长的最大比生长速率 U 有影响,对迟滞期 LPD 的影响则可以忽略.本研究建立的生长预测模型经数学检验预测误差较低,拟合性较好,而且因为试验是基于真正食品环境,比用培养基培养得出的结果更适合用于生产实践.

参考文献:

- [1] 张勇刚,王永椽. 560 例急性膜泻病患者气单胞菌感染调查[J]. 中华流行病学杂志, 1997, 18(6): 153-155.
- [2] 刘燕,陈道利,霍开兰. 气单胞菌污染直接入口食品的调查分析[J]. 现代预防医学, 2001, 28(4): 526-527.
- [3] 曲芬,鲍春梅,崔恩博,等. 气单胞菌不同种的流行及耐药性[J]. 中国抗感染化疗杂志, 2004, 4(5): 302-305.
- [4] 李苗云. 冷却猪肉中微生物生态分析及货架期预测模型的研究[D]. 南京:南京农业大学, 2006.
- [5] 李晓红,王菲菲. 冷却肉及其保鲜技术的研究进展[J]. 农产品加工, 2010(2): 49-51.
- [6] 李苗云,张秋会,柳艳霞. 冷却肉中微生物的多样性及其研究概况[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(12): 5026-5027.
- [7] 陈天寿. 微生物培养基的制造与应用[M]. 北京:中国农业出版社, 1995: 250-279.
- [8] 国家卫生部标委会. GB/4789. 2—2008 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, 2009.
- [9] MCCOY R H, PILCHERK S. Peptone beef extract glyco-gen agar, a selective and differential *Aeromonas* medium [J]. Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 1974, 31: 1553-1555.
- [10] GIBSON A M, BRATCHELL N, ROBERTS T A. The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extend of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry [J]. Journal of Applied Bacteriology, 1987, 62: 479-490.
- [11] ROSS T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology [J]. Journal of Applied Bacteriology, 1996, 81(5): 501-508.
- [12] 董庆利,郭黎洋,屠康,等. 不同试验条件下生孢梭菌孢子生长预测方程的建立[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版, 2007, 33(2): 162-168.
- [13] BARANYI J, PIN C, ROSS T. Validating and comparing predictive models [J]. International Journal of Food Microbiology, 1999, 48(3): 159-166.
- [14] GARCÍA-GIMENO R M, BARCO E, RINCÓN F, et al. Response surface model for estimation for *Escherichia coli* O157:H7 growth under different experimental conditions [J]. Journal of Food Science, 2005, 70(1): 30-36.
- [15] 丁甜,董庆利,相启森,等. *Listeria monocytogenes* 在经高氧化还原电位酸性水处理的鲜食莴苣上预测模型的建立[J]. 食品工业科技, 2010(3): 87-90.
- [16] WHITING R C, BAGI L. Modeling the lag phase of *Listeria monocytogenes* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2002, 73(2/3): 291-295.
- [17] VEREECHEN K M, DENS E J, VAN IMPE J F. Predictive modeling of mixed microbial populations in food products: evaluation of two-species models [J]. Journal of Theoretical Biology, 2000, 205: 53-72.

【责任编辑 李晓卉】