

金华火腿中杂色曲霉的生长预测模型*

李 敏 李 耘 韩北忠

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京, 100083)

摘 要 通过研究金华火腿中杂色曲霉在 4, 10, 15, 20, 28℃ 的生长情况, 建立了杂色曲霉生长的一级和二级预测模型。结果表明, 杂色曲霉生长曲线在低温阶段适宜用 Logistic 方程拟合, 随温度升高用 Gompertz 方程拟合的效果最佳。二级模型采用经典的平方根模型拟合, 发现杂色曲霉生长速率与温度呈较好的线性关系。模型验证表明预测值和实测值的残差在 ± 0.05 范围内, 偏差因子和准确因子均在可接受范围内。模型的可信度较高, 可以作为金华火腿安全性评价的定量分析工具。

关键词 金华火腿, 杂色曲霉, 预测模型, 生长速率

金华火腿的制作和成熟过程中表面会长霉, 霉菌代谢可能分泌的毒素在火腿中积累, 经一般加热过程也难以被破坏^[1]。毒理实验表明, 多数霉菌毒素有诱变作用, 能诱发肝癌的发生。本实验室已对金华火腿自然块中的霉菌菌相变化进行了研究, 结果表明杂色曲霉为稳定检出的优势菌。该菌产生杂色曲霉毒素的能力最强^[2], 产毒素条件为 20~30℃, 不十分苛刻。杂色曲霉毒素的致癌性较强, 对人类的危害仅次于黄曲霉^[3]。

预测食品微生物学(predictive food microbiology)是一门在微生物学、数学、统计学和计算机科学基础上建立起来的新兴学科。它是依据各种食品微生物在不同加工、储藏和流通条件下的特征信息库, 通过计算机的配套软件, 判断食品内主要病原菌和腐败菌生长或残存的动态变化, 从而对食品的质量安全做出快速评估^[4], 可以定量预测火腿生产后的储藏、运输、销售、消费等各个环节的质量和安全性。

国际上开发的预测模型软件已对常规的肉类, 如新鲜鸡肉、猪肉、牛肉等建立了一系列预测模型^[5], 但是针对金华火腿这样的传统发酵肉制品研究的较少。本研究将杂色曲霉作为火腿中的建模微生物, 预测其在不同温度条件下的生长变化, 为火腿的安全性评价和进一步建立发酵肉制品的预测模型提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与设备

1.1.1 实验菌株

第一作者: 硕士研究生(韩北忠为通讯作者)。

* 留学回国人员科研启动基金

收稿日期: 2005-07-21, 改回日期: 2005-09-22

杂色曲霉菌株, 由金华火腿中分离、纯化, 培养在高盐察氏斜面上, 4℃ 保藏。

1.1.2 培养基

a. 肉糜培养基: 用搅拌机将火腿自然块儿打碎均质, 加入适量水分搅拌成匀浆, 高压灭菌后用于接种杂色曲霉。

b. 计数培养基: 根据杂色曲霉在不同培养基上的培养效果, 选取高盐察氏培养基对其计数。

1.1.3 实验仪器

生化培养箱(LRH-150)上海一恒科技有限公司; 手提式压力蒸汽消毒器(HX-280)江阴滨江医疗设备厂; 电子天平(AY120)日本 SHIMADZU 公司; 电热干燥箱(WG2003)重庆银河实验仪器有限公司; 超净工作台(北京半导体设备一厂)。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种的活化

将 4℃ 保藏的杂色曲霉菌株接种到斜面上, 在 30℃ 培养 3 d, 连续传代 3 次, 使菌株恢复活力。接种前将培养基在预培养温度下平衡 10~12 h。

1.2.2 生长曲线的测定

用 0.1% 蛋白胨水对活化后的菌种适当稀释, 用无菌操作移取 2 mL 菌液接种到 200 mL 肉糜培养基中, 充分混合, 使初始菌液浓度达到 10^4 cfu/mL 左右, 再无菌分装到 10 mL 试管中, 取出一管测定初始菌数, 其余各管置于生化培养箱中。培养温度分别为 4, 10, 15, 20, 28℃。根据霉菌生长特性, 每隔一定时间取出一管, 用 0.1% 蛋白胨水稀释到适宜浓度, 用平板计数法测定菌落数。重复操作 2 次取平均值。

1.3 建立预测模型

1.3.1 一级预测模型

分别用 Compertz、Logistic 和 Linear 方程拟合杂

色曲霉在不同温度下的生长曲线,并通过统计分析选取拟合性好的方程建立一级预测模型。

1.3.2 二级预测模型

选用经典的平方根方程建立起杂色曲霉的生长速率随温度变化的二级预测模型。

最后用统计软件 SPSS v 12.0 对实验数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 一级模型的建立

Gompertz、Logistic 和 Linear 模型拟合 4~28℃ 杂色曲霉生长曲线的统计分析见表 1。在 4℃ 和 10℃ 时 Logistic 模型的相关系数达到了 0.95 以上,而 Gompertz 和 Linear 模型的都在 0.90 以下。相反,在 15、20、28℃ 条件下,Gompertz 模型的相关系数最高,都在 0.95 以上。Logistic 和 Linear 模型的相关系数则总体上小于 Gompertz 和 Logistic 模型的。

表 1 杂色曲霉生长曲线统计分析

温度 /℃	相关系数 (R^2)			残差平方和 (RSS)		
	Gomp.	Logis.	Linear	Gomp.	Logis.	Linear
4	0.824	0.954	0.847	0.209	0.139	0.288
10	0.893	0.972	0.865	0.366	0.232	0.463
15	0.962	0.922	0.944	0.304	0.459	0.512
20	0.975	0.968	0.947	0.421	0.711	0.765
28	0.986	0.953	0.939	0.322	0.546	0.743

各模型的残差平方和与相关系数有相似的趋势。4℃ 和 10℃ 时 Logistic 模型的 RSS 值最小,Gompertz 模型次之,Linear 的最大;而在 15、20、28℃ 时,Gompertz 模型的 RSS 值最小,Logistic 模型次之,Linear 模型的依然最大。由对 R^2 和 RSS 的分析可知,在 4~28℃,模型拟合杂色曲霉生长曲线的情况有差异。在 4~15℃,Logistic 模型的拟合效果最好;在 15~28℃,Gompertz 模型的拟合效果最好。因此分别选用 Logistic 模型和 Gompertz 模型对杂色曲霉建立一级模型,2 个模型的拟合效果见图 1 和图 2。

由图 1 可知,在 4℃ 和 10℃ 时,实测值分别为 7 个和 8 个,且各有一个点脱离预测值的 95% 置信区间。由图 2 可知,15℃ 时实测值为 9 个,各有一个值位于预测值 95% 置信区间的上限和脱离 95% 置信区间;20℃ 时实测值为 9 个,各有一个值位于 95% 置信区间的上限和下限;28℃ 时实测值为 10 个,全部落在 95% 置信区间内。可见随着储藏温度的提高,相关系数 R^2 相对提高,实测值落在预测值 95% 置信区间的比率越来越高,模型的拟合效果也越来越好。

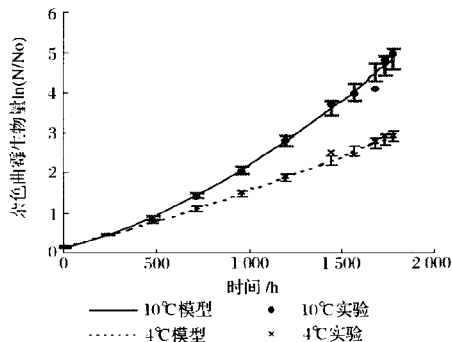
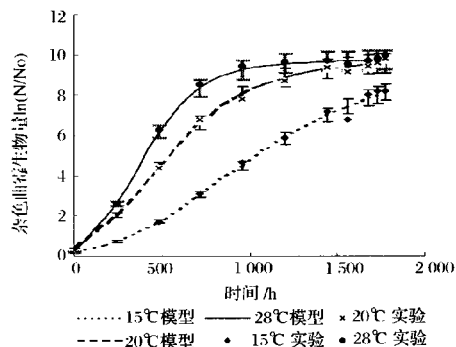


图 1 Logistic 模型拟合杂色曲霉在 4℃ 和 10℃ 的生长曲线



注:“ I ”表示模型预测值的 95% 置信区间

图 2 Gompertz 模型拟合杂色曲霉在 15、20 和 28℃ 的生长曲线

表 2 给出了在 Logistic 模型和 Gompertz 模型基础上,用非线性回归计算出的杂色曲霉生长参数。由表中可知,随储藏温度的升高,生长速率也逐渐增加。在低温下杂色曲霉生长缓慢, μ_m 值较低,随温度升高 μ_m 逐渐增大。与生长速率的趋势相反,迟滞期 λ 在低温下持续较长时间,随温度升高则明显缩短。因此,在低温下储藏火腿可以显著地降低杂色曲霉的生长速率和延长其迟滞期,相应地延长金华火腿的货架期。

2.2 二级模型的建立

二级模型建立在平方根模型基础上,其形式为: $\sqrt{\mu_m} = b(T - T_{min})$,其中 b 为系数, T_{min} 为最低生长温度,即通过外推回归线与温度轴相交得到的温度^[6]。通过线性回归,用平方根模型拟合不同温度下杂色曲霉的生长速率,计算出回归方程的预测值和回归系数,结果如图 2 和表 3 所示。

表 2 由 Logistic 模型和 Gompertz 模型得到的杂色曲霉生长参数

T/℃	一级模型	μ_m/h^{-1}	λ/h	$A/\log(cfu\cdot mL)^{-1}$
4	$y = 5.84/[1 + \exp[0.00075(445.36 - t) + 2]]$	0.0011	445.36	5.84
10	$y = 7.32/[1 + \exp[0.0014(318.67 - t) + 2]]$	0.0026	318.67	7.32
15	$y = 10.208\exp[-\exp(0.3581 - 0.0016x)]$	0.0067	223.81	10.21
20	$y = 9.7434\exp[-\exp(0.4574 - 0.0029x)]$	0.0097	157.72	9.73
28	$y = 9.7240\exp[-\exp(0.5609 - 0.0045x)]$	0.0145	124.64	9.72

由表 3 知,模型拟合的最低生长温度为 -4.84℃,但值得注意的是,由于微生物在极限条件下的生长速率难以准确测定,此温度可能不是杂色曲霉的实际最低生长温度,实际上杂色曲霉在 0℃ 时已几乎不生长了。尽管如此,平方根模型已在很多食品上得以成功应用,这一问题并不影响其适用性。由图 3 知,在 4~28℃ 范围内,杂色曲霉的生长速率与温度呈较好的线性关系,且生长速率随温度的升高而增加。回归方程的相关系数为 0.9791,拟合度较高。

另外对回归方程进行方差分析,得到 $F = 188.376 > F_{0.01}(1, 3) = 34.12$,说明回归方程在显著水平($\alpha = 0.01$)上差异极显著。因此,平方根模型能够有效地预测杂色曲霉在 4~28℃ 范围内的生长情况,为火腿的安全性和货架期评价提供定量的科学依据。

表 3 杂色曲霉温度预测模型和参数估计值

回归方程	回归参数
$\sqrt{\mu_m} = 0.0038T + 0.0184$	$T_{min} = -4.84℃$ $b = 0.0038$

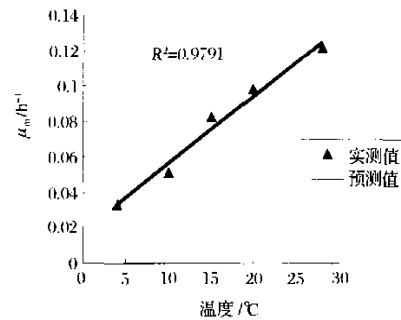


图 3 杂色曲霉生长速率的温度模型

3 温度预测模型的验证

表 4 给出了杂色曲霉温度生长速率的平方根 $\sqrt{\mu_m}$ 在不同温度下的实测值和预测值及其残差 ($\sqrt{\mu_m}_{\text{预测}} - \sqrt{\mu_m}_{\text{实测}}$)。除了 4℃ 时残差为负值,其余温度下的都为正值,说明一般情况下生长速率的预测值都大于实测值,即模型预测的杂色曲霉的生长比实际生长要快,预测结果比较保险可靠。残差值都在 -

0.05 到 +0.05 之间,误差很小,可以认为预测模型在 $\alpha = 0.05$ 的水平上是可信的。

表 4 杂色曲霉温度预测模型的验证分析

温度(℃)	$\sqrt{\mu_m}_{\text{预测}}$	$\sqrt{\mu_m}_{\text{实测}}$	残差	偏差因子	准确因子
4	0.0332	0.0446	-0.0114	0.8168	1.1283
10	0.0508	0.0362	0.0146		
15	0.0819	0.0617	0.0202		
20	0.0985	0.0684	0.0301		
28	0.1204	0.1012	0.0192		

为了更客观地评价此模型,应用 Ross^[7]引入的偏差因子和准确因子对预测值和实测值进行了分析。其中,

偏差因子 = $10^{[\sum \log(\text{实测生长速率}/\text{预测生长速率})]/n}$
准确因子 = $10^{[\sum |\log(\text{预测生长速率}/\text{实测生长速率})|]/n}$
n 为测定次数,本实验 n = 5。

偏差因子衡量预测值是否过高或过低估计了实测值。该值小于 1 表明生长速率预测值比实测值大,预测值较为安全^[8]。相反,大于 1 意味着预测结果不可靠。一般认为偏差因子在 0.75 到 1.25 之间,模型即可被接受。本模型的偏差因子 0.8168 界于这一范围。准确因子衡量预测值与实测值的平均误差,该值等于 1 表明预测值与实测值完全吻合,预测很准确,但一般在 1.1~1.9 之间均可接受^[9]。本模型的准确因子为 1.128 3,说明预测值与实测值的平均误差为 12.83%,预测值较为合理,可以接受。

4 结论与讨论

通过测定金华火腿中杂色曲霉在不同温度下的生长曲线,建立了预测其生长的温度模型。经验证模型预测较为可靠,可以定量地预测火腿储藏期杂色曲霉的生长变化。

本实验的温度模型最好在建模范围 4~28℃ 内应用。因为一旦环境温度超出这一范围,杂色曲霉的代谢活动就会发生变化,生长速率可能不随温度一直上升,反而会呈下降趋势,这时模型的预测结果就不准确了。

金华火腿的成分复杂,杂色曲霉的生长还受到很多环境参数(如水分活度、pH值、O₂含量)和防腐剂、包装材料等的影响。另外,因火腿是发酵制品,微生物生态复杂,各菌间可能相互促进或抑制。有些细菌可能产生抑菌物质,阻碍杂色曲霉的生长。把这些因素考虑在内会提高模型预测的准确性,但是增加参数必然会增加模型的复杂度和建模难度。所以在不是很必要的情况下,一般可以忽略那些非决定性因素。考虑到温度是影响杂色曲霉生长的主导因素,通过建立杂色曲霉生长的温度模型对金华火腿进行安全评价是较为合理和可信的。

参 考 文 献

- 1 Brown D W, Yu J H, Kelkar H S. Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*[J]. Science, 1996, 93: 1 418~1 422
- 2 王叔淳. 食品卫生检测技术手册[M]. 北京:化学工业出版社, 2003. 145 ~ 237
- 3 江汉潮. 食品微生物学[M]. 北京:中国农业出版社, 2001. 428~431
- 4 Whiting R C. Predictive Microbiology in Food [J]. Crc Cr Rev Food Sci, 1995, 35: 467~494
- 5 McMeekin T A, Ross T. Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management[J]. Int J Food Microbiol, 2002, 78: 133~151
- 6 Messens W, Verluyten J, Leroy F. Modelling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 in response to temperature and pH values used for European sausage fermentation processes [J]. Int J Food Microbiol, 2003, 81: 41~52
- 7 Ross T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology[J]. J Appl Bacteriol, 1996, 81: 501~508
- 8 Giffel M C, Zwietering M H. Validation of predictive models describing the growth of *Listeria monocytogenes* [J]. Int J Food Microbiol, 1999, 46: 135~149
- 9 Braun P, Sutherland J P. Predictive modeling of growth and enzyme production and activity by a cocktail of *Pseudomonas* spp., *Shewanella putrefaciens* and *Acinetobacter* sp.[J]. Int J Food Microbiol, 2003, 86: 271~282

Predictive Growth Model of *Aspergillus versicolor* in Jinhua Ham

Li Min Li Yun Han Beizhong

(College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

ABSTRACT The primary and secondary predictive models of *Aspergillus versicolor* in Jinhua ham were created based on its growth conditions at 4, 10, 15, 20, 28℃. The result showed that the optimum fit to the growth curve was obtained by using the Logistic equation at low temperature and the Compertz equation when temperature increased. The secondary model was based on the classical Square Root equation, which displayed a good linear relationship between the growth rate of *Aspergillus versicolor* and temperature. Validation of the models showed that the residual difference of predicted and observed value was within ± 0.05 , and the values of bias factor and accuracy factor were also acceptable statistically. Since the predictive models are highly reliable, it could serve as a quantitative tool to analyze and estimate the safety of Jinhua ham.

Key words Jinhua ham, *Aspergillus versicolor*, predictive model, growth rate

行业动态

光明与丹尼斯克联手开发酸奶新菌种

2005年9月27日,光明乳业股份有限公司与丹尼斯克集团在上海签订了酸奶菌种合作协议书。

总部设在丹麦的丹尼斯克集团开发发酵乳制品菌种系列产品已有百年历史,在相继完成对德国 Wisby 菌种公司和法国罗地亚食品公司的收购之后,已成为世界最大菌种生产商之一,并在法国、德国和美国设有菌种开发应用及生产基地,在芬兰设有专门的营养健康研究中心,该中心已开发出用以测定益生菌和益生元作用模式的技术。

光明乳业与丹尼斯克在乳制品研究、开发和生产方面,早已进行了广泛的合作。现已投入生产的“活力e菌”就是双方合作的结晶。此次开发的酸奶专用菌种,是在活力e菌的基础上开发的,该菌在工艺性能方面有着上佳表现,能够产生独特的风味和状态。此酸奶专用菌种在活力c菌的基础上,添加了由几种益生菌菌株组成的复合益生菌。由于乳杆菌和双歧杆菌分别定植在人体肠道的上、下部,所以,复合使用意味着将在肠道整体中发挥益生菌的健康效应,具有促进营养成分消化吸收、平衡和改善肠道微生态、调节人体自然免疫力以及减少过敏发生等多项功能。光明乳业已获得该专用菌种在国内的独家使用权。有专家指出,这对提升国内乳制品的档次和乳业的整体水平有着积极的作用。