

巴氏杀菌奶的微生物生长动力学模型研究

魏钊异¹, 姚昱昆¹, 潘洁茹^{2*}, 叶海梅², 林侃², 方婷^{1*}

(1. 福建农林大学食品科学学院, 福州 350002; 2. 福州市疾病预防控制中心, 福州 350004)

摘要: 目的 通过初级模型和二级模型来描述巴氏杀菌奶中微生物的生长动力学模型。**方法** 样品放置在4、8、16、25、30、37、40和43℃条件下培养, 使用IPMP 2013软件进行拟合, 初级模型采用Huang模型和Baranyi模型分析不同温度下的生长动力学特征, 二级模型采用Ratkowsky平方根模型、Huang平方根模型和Cardinal模型描述温度对其生长速率的影响。**结果** 在所有温度下都能观测到微生物的生长, 综合比较2种初级模型的均方根误差(root mean squared error, RMSE)、均方误差(mean squared error MSE)、赤池信息量准则(Akaike information criterion, AIC)和生长速率, 得到2种初级模型具有同等拟合效果; 而3种二级模型得到的最低生长温度和最高生长温度分别是-3.191、0.56、-4.962和47.309、45.277、44.408℃。**结论** Baranyi模型和Huang模型均适合描述巴氏杀菌奶中微生物菌群的生长, 3种二级模型都能用于评价温度对其生长速率的影响, 但Ratkowsky平方模型覆盖的温度范围更广, 可能更适合描述温度对巴氏杀菌奶中微生物菌群生长的影响。

关键词: 巴氏杀菌奶; 微生物菌群; 生长动力学; 预测模型

Microbial growth kinetics model of pasteurized milk

WEI Zhao-Yi¹, YAO Yu-Kun¹, PAN Jie-Ru^{2*}, YE Hai-Mei², LIN Kan², FANG Ting^{1*}

(1. School of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;
2. Fuzhou Center for Disease control and prevention, Fuzhou 350004, China)

ABSTRACT: Objective To describe the growth kinetics of microorganisms in pasteurized milk, by developing the primary and secondary models. **Methods** The samples were placed at 4, 8, 16, 25, 30, 37, 40 and 43 °C, and fitted with IPMP 2013 software. The primary model used Huang model and Baranyi model to analyze the growth kinetics at different temperatures, while the secondary model used Ratkowsky square root model, Huang square root model and Cardinal model to describe the influence of temperature on the growth rate. **Results** The growth of microorganisms could be observed at all temperatures. The root mean squared error (RMSE), mean squared error (MSE), akaike information criterion (AIC) and growth rate of the 2 primary models were compared comprehensively, and the 2 primary models had the same fitting effect. And 3 secondary model to get the lowest temperature and highest growth temperature were -3.191, 0.56, -4.962 and 47.309, 45.277, 44.408 °C, respectively. **Conclusion** Both of the Baranyi

基金项目: 国家自然科学基金项目(31401597, 31601393)、福建省高等学校杰出青年科研人才培养计划(K8015062A)、福建农林大学国际合作项目(KXb16012A)、2018年度福州市卫生计生科研创新团队培育项目(2018-S-wt7)

Fund: Supported by National Natural Science Foundation of China (31401597, 31601393), Outstanding Young Scientific Research Talents Training Program of Fujian Higher Education Institutions (K8015062A), Fujian Agriculture and Forestry University International Cooperation Project (KXb16012A) and 2018 Fuzhou Health and Family Planning Research and Innovation Team Cultivation Project (2018-S-wt7)

*通讯作者: 潘洁茹, 博士, 副主任技师, 主要研究方向为疾病预防控制。E-mail: pjr3852053@163.com

方婷, 博士, 教授, 主要研究方向为预测微生物学、食品非热加工技术。E-mail: fangting930@163.com

*Corresponding author: PAN Jie-Ru, Ph.D, Fuzhou Center for Disease Control and Prevention, Fuzhou 350004, China. E-mail: pjr3852053@163.com
FANG Ting, Ph.D, Professor, School of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, No.15, Shangxiadian Road, Cangshan District, Fuzhou 350002, China. E-mail: fangting930@163.com

model and Huang model are suitable to describe the growth of microorganisms in pasteurized milk. The 3 secondary models can be used to evaluate the influence of temperature on its growth rate, but the Ratkowsky square-root model describes a wide range of temperature, which is more suitable to describe the influence of temperature on the growth of microorganisms in pasteurized milk.

KEY WORDS: pasteurized milk; background microorganisms; growth kinetics; predictive model

1 引言

巴氏杀菌奶^[1]是以生鲜牛(羊)乳为原料,经过巴氏杀菌等工序制成的液态奶制品,它的特点在于采用低温杀菌技术将生鲜乳中有害微生物杀死的同时,最大限度保留住了鲜奶的营养成分和天然的口感。正因如此,使得巴氏杀菌奶为全球乳品消费的主流,在发达国家和地区市场上占有绝对优势,销量占到液态奶销量的 50%左右^[2,3]。目前国内市场流通售卖的巴氏杀菌奶占大多数的是预包装形式,散装的巴氏杀菌奶相对较少,预包装形式的巴氏杀菌奶一般通过超市和零售店售卖^[4]。李莹等^[5]对国内市售巴氏杀菌奶的微生物污染状况进行抽样检测并统计分析,发现预包装的巴氏杀菌乳中不满意样品率达到 4.91%。

预测微生物学是以计算机为基础,描述特定环境下微生物的生长、存活和死亡的情况,通过建立数学模型实现对微生物动态变化的快速预测和评价,从而为风险评估提供基础,现已应用在肉品、水产品、鲜切果蔬和乳制品等领域中^[6,7]。邢少华等^[8]研究 0、5、10、15、20 °C 下罗非鱼的微生物生长动力学模型,结果表明,结合 Baranyi 模型得出的微生物的生长动力学模型能够拟合实际冷链物流中罗非鱼微生物的变化情况,模拟试验验证得到的决定系数、均方误差、偏差因子、准确因子分别为 0.956、0.165、0.994、1.134。

国内针对巴氏杀菌奶中的微生物文献报道较少,因此,本研究拟用巴氏杀菌奶为原料,主要目的是通过初级模型和二级模型来描述在 4~43 °C 范围内(4、8、16、25、30、37、40、43 °C)巴氏杀菌奶中菌体的生长,并建立描述其生长规律的数学模型,以期对乳品工业和相关食品监管部门开展巴氏杀菌奶中微生物的风险评估提供科学基础。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

巴氏杀菌奶:市售,袋装(221 mL),产品标注的保质期为 0~4 °C 下 5 d。

胰酪大豆胨琼脂培养基(tryptic soy agar, TSA)、蛋白胨粉(广东环凯微生物科技有限公司)。

2.2 仪器与设备

AIRTECH 生物安全柜(苏州安泰空气技术有限公司);

SHP-250 细菌生化培养箱(上海精宏实验设备有限公司); KB-115 低温恒温箱(德国 BINDER 公司); VORTEX-5 漩涡混合器(上海习仁科学仪器有限公司); DX-200 高压灭菌器(德国 Systec 公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 样品的准备

以无菌操作,将巴氏杀菌奶分装到无菌试管中,每管 10 mL,备用。

2.3.2 生长实验与计数

将样品分别放置于 4、8、16、25、30、37、40、43 °C 的恒温培养箱中,按照预设的时间间隔取样,参考 GB 19645-2010^[9]用稀释平板法测定各组的细菌总数。其中每个温度条件设置 10~15 个取样点。

2.3.3 一级模型

分别采用 Huang 模型^[10]和 Baranyi 模型^[11]作为一级模型来拟合各个温度下巴氏杀菌奶中微生物菌群的生长趋势。其中 Huang 模型的表达式如式(1)和(2)所示,Baranyi 模型表达式如式(3)和(4)所示。

$$Y(t) = Y_0 + Y_{\max} - \ln \left\{ e^{Y_0} + \left[e^{Y_{\max}} - e^{Y_0} \right] e^{-\mu_{\max} B(t)} \right\} \quad (1)$$

$$B(t) = t + \frac{1}{\alpha} \ln \frac{1 + e^{-\alpha(t-\lambda)}}{1 + e^{\alpha\lambda}} \quad (2)$$

$$Y(t) = Y_0 + \mu_{\max} F(t) - \ln \left[1 + \frac{e^{\mu_{\max} A(t)} - 1}{e^{Y_{\max} - Y_0}} \right] \quad (3)$$

$$A(t) = t + \frac{1}{\mu_{\max}} \ln \left(e^{-\mu_{\max} t} + e^{-h_0} - e^{-\mu_{\max} (t-h_0)} \right) \quad (4)$$

式中: $Y(t)$ 为 t 时刻细菌的浓度, ln CFU/g;

Y_0, Y_{\max} 为初始菌浓度和稳定期菌浓度, ln CFU/g;

μ_{\max} 为比生长速率, h^{-1} ;

t 为时间, h;

λ 为迟滞期;

h_0 为反应细菌所处的生理状态,且 $h_0 = \lambda_{\mu}$;

α 为常数(=4),定义细菌生长时由迟滞后期向对数期转化。

2.3.4 二级模型

分别采用 Ratkowsky 平方根模型^[12]、Huang 平方根模型^[13]和 Cardinal 模型^[14]来评价温度对巴氏杀菌奶中微生物菌群生长速率的影响。其中 Ratkowsky 平方根模型表达式如式(5)所示, Huang 平方根模型表达式如式(6)所示,

Cardinal 模型表达式如式(7)所示。

$$\sqrt{\mu} = a(T - T_0) \left[1 - e^{b(T - T_{max})} \right] \quad (5)$$

$$\sqrt{\mu_{max}} = a(T - T_{min})^{0.75} \{ 1 - \exp[b(T - T_{max})] \} \quad (6)$$

$$\mu_{max} = \frac{\mu_{opt}(T - T_{max})(T - T_{min})^2}{[(T_{opt} - T_{min})(T - T_{opt}) - (T_{opt} - T_{max})(T_{opt} - T_{min} - 2T)](T_{opt} - T_{min})} \quad (7)$$

式中: T_{min} 和 T_{max} 为最低生长温度和最高生长温度, °C;

T_0 为最低生长温度, °C;

T 为细菌所处的环境温度, °C;

μ_{max} 为比生长速率, h^{-1} ;

T_{opt} 为最适生长温度, °C;

μ_{opt} 为最适温度下的最适生长速率, h^{-1} ;

a 、 b 为常数。

2.3.5 数据拟合与分析

本研究采用预测微生物学专用软件 IPMP 2013^[15]对巴氏杀菌奶中微生物菌群生长数据进行拟合处理。采用方差分析(analysis of variance, ANOVA)分析比较各个模型参数之间的差异, 由此选择最优模型。

3 结果与分析

3.1 巴氏杀菌奶中微生物的生长特点

在各恒定温度生长试验中, 各温度的生长曲线均表现出迟滞期、对数期和稳定期 3 个阶段。在试验温度(4~43 °C)范围内, 生长速率呈现出先增大后降低的变化。在低温(4 °C)的生长速率较低; 当温度达到 40 °C, 生长速率达到最大; 当温度达到 43 °C后, 生长速率又降低了。

3.2 一级模型比较分析

各个试验温度所获得的生长数据都可以用 Huang 模

型和 Baranyi 模型来拟合。所得到的拟合曲线如图 1 所示。除了对迟滞期和对数期向稳定期的转折点的描述有差异外, 2 种模型均能较好地拟合巴氏杀菌奶中微生物的生长状况。统计参数均方根误差(root mean squared error, RMSE)、均方误差(mean squared error, MSE)和赤池信息量准则(Akaike information criterion, AIC), 是衡量模型拟合精确度的重要指标。一般来说, 其值越小说明模型拟合精确度越高。表 1 列出了 2 种一级模型的 RMSE、MSE、AIC 值, 2 种模型的 RMSE、MSE、AIC 值在同一统计量取值较为接近, 无显著差异, 可以认为 2 种模型同样具有良好的拟合精度。

在 4~40 °C时, Huang 模型中微生物菌群的 μ_{max} 随温度的增加由 0.018 增加到 0.937, 当温度达到 43 °C时的 μ_{max} 下降了 0.3 左右; Baranyi 模型中微生物菌群的 μ_{max} 随温度的增加由 0.019 增加了 0.995, 当温度达到 43 °C时的 μ_{max} 也下降了 0.3 左右。比较拟合得到的 Huang 模型和 Baranyi 模型估算得到的微生物生长速率之间的关系, 回归直线的斜率为 0.9879(如图 2 所示), 表明由这 2 种模型估算出的生长速率无显著差异, 进一步验证了 2 种初级模型对巴氏杀菌奶中微生物的生长具有同等拟合效果。

3.3 温度对微生物生长的影响

通过一级模型推算出来的巴氏杀菌奶样品中的微生物菌群的生长速率无显著性差异, 因此巴氏杀菌奶样品中微生物的生长速率可以合并起来用以评价温度对微生物菌群生长的影响。图 3 表明 3 种二级模型(Ratkowsky 平方根模型、Huang 平方根模型、Cardinal 模型)均可以用于描述温度对巴氏杀菌奶样品中微生物菌群生长速率的影响。表 2 列出了微生物菌群的 Ratkowsky 平方根模型、Huang 平方根模型和 Cardinal 模型的相关参数。

表 1 巴氏杀菌奶样品中微生物一级模型相关参数
Table 1 Coefficients for the primary models for the specific growth rates of microorganisms in pasteurized milk

温度/°C	MSE		RMSE		AIC	
	Huang	Baranyi	Huang	Baranyi	Huang	Baranyi
4	0.149	0.153	0.386	0.391	-14.37	-13.981
8	0.226	0.234	0.262	0.284	-5.692	-6.161
16	0.38	0.369	0.616	0.608	-1.264	-1.653
25	0.212	0.149	0.46	0.386	-6.946	-11.558
30	0.317	0.348	0.563	0.59	1.365	2.467
37	0.482	0.502	0.694	0.709	-2.741	-3.016
40	0.391	0.384	0.625	0.62	-3.011	-4.27
43	0.259	0.23	0.509	0.479	-8.93	-10.73

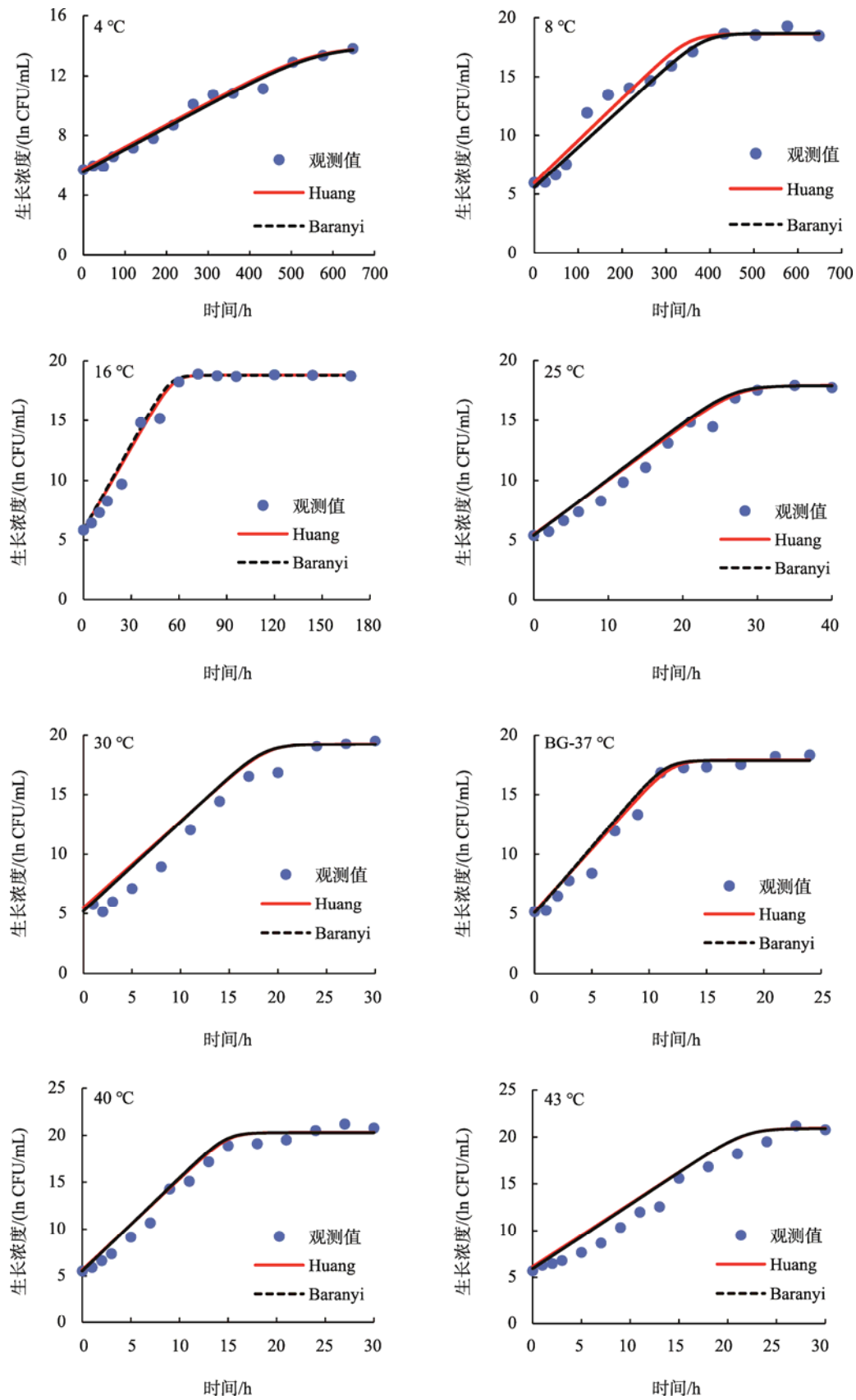


图1 巴氏杀菌奶样品中背景菌群在不同温度下(4~43 °C)的生长曲线

Fig.1 Growth of background microorganisms in pasteurized milk at different temperature conditions (4~43 °C)

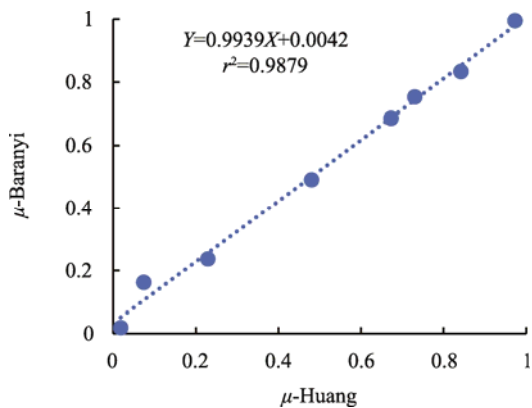


图 2 Huang 模型和 Baranyi 模型比生长速率之间的比较
Fig.2 Comparison of specific growth rates between the Huang model and the Baranyi model

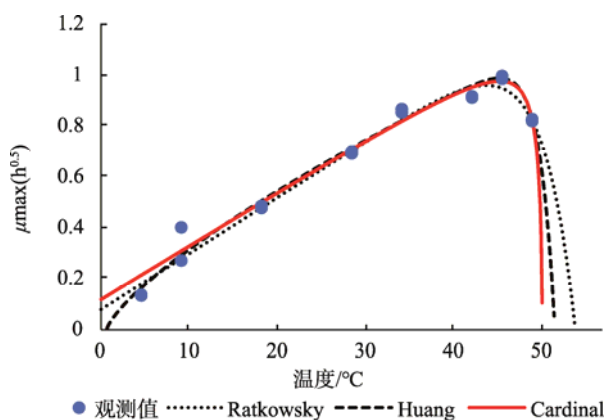


图 3 3 种二级模型描述温度对巴氏杀菌奶样品中微生物生长速率影响的拟合曲线
Fig.3 Effects of temperatures on the growth of microorganisms in pasteurized milk at selected temperature conditions

巴氏杀菌奶样品中微生物的生长受温度的影响, 在较低温度下仍可以生长。根据表 2 可知, 由 Ratkowsky 平方根模型、Huang 平方根模型和 Cardinal 模型拟合的巴氏杀菌奶样品中微生物菌群的最低生长温度和最高生长温度分别是-3.191、0.56、-4.962 和 47.309、45.277、44.408 °C。用 Ratkowsky 平方根模型、Huang 平方根模型和 Cardinal 模型 3 种二级模型都适合描述温度对微生物菌群生长的影响。对于微生物菌群来说, Ratkowsky 平方模型可能覆盖的温度范围更广。在巴氏杀菌奶样品中, 微生物菌群的迟滞期受温度影响, 总体来说, 随着温度的升高, 迟滞期减少, 生长速率增加。在 Huang 模型中, 迟滞期和生长速率之间有着图 4 所示的对数线性关系。

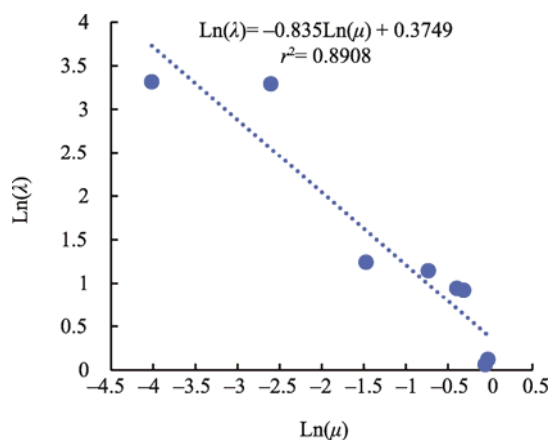


图 4 微生物一级模型(Huang 模型)λ 和 μ 的相互关系
Fig.4 Correlation the specific growth rate (μ) of microorganisms in pasteurized milk

表 2 巴氏杀菌奶样品中微生物生长速率 3 种二级模型参数

Table 2 Coefficients for the secondary models for the specific growth rates of microorganisms in pasteurized milk

模型	参数	取值	标准误差	t 值	Pr(> t)
Ratkowsky 平方根模型	a	0.025	0.002	14.871	4.29E-09
	b	0.289	0.114	2.522	2.68E-02
	T ₀	-3.191	1.401	-2.277	4.19E-02
	T _{max}	47.309	1.595	29.656	1.35E-12
Huang 平方根模型	a	0.065	0.002	28.168	2.48E-12
	b	0.642	0.389	1.651	1.25E-01
	T _{min}	0.56	0.807	0.693	5.01E-01
	T _{max}	45.277	1.334	33.936	2.73E-13
Cardinal 模型	T _{min}	-4.962	2.488	-1.994	6.94E-02
	T _{max}	44.008	0.554	79.401	1.06E-17
	T _{opt}	39.76	0.717	55.423	7.85E-16
	μ _{opt}	0.954	0.03	31.303	7.11E-13

4 结论

本研究探究了 4-43 °C 范围内巴氏杀菌奶中的微生物的生长动力学模型, 在所有温度下, 其生长良好, 并发展成完整的生长曲线, 所有曲线都包含滞后期, 指数期和稳定期。使用 Huang 模型和 Baranyi 模型作为初级模型, 对各个恒定温度得到的生长数据进行拟合, 综合分析比较 RMSE、MSE、AIC 值和生长速率, 结果表明 2 种初级模型描述巴氏杀菌奶的微生物的生长曲线无显著差异。

使用 Ratkowsky 平方根模型^[12]、Huang 平方根模型^[13]和 Cardinal 模型^[14]作为二级模型, 分析温度对于巴氏杀菌奶中微生物菌群的生长速率的影响。结果表明 3 种模型都可以描述温度对巴氏杀菌奶中微生物生长速率的影响。Ratkowsky 平方根模型推导出的温度范围覆盖更广泛, 更适合描述温度对巴氏杀菌奶中微生物菌群生长的影响。研究所建立的模型可为相关食品监管部门开展巴氏杀菌奶的微生物安全风险评估提供科学基础。

参考文献

- [1] 吕加平, 张书文, 刘鹭, 等. 巴氏杀菌奶加工技术及质量控制现状[J]. 食品科学技术学报, 2016, 34(1): 9-15.
Lv JP, Zhang SW, Liu L, *et al.* Processing technology and quality control of pasteurized milk [J]. Food Sci Technol, 2016, 34(1): 9-15.
- [2] 邹毅峰, 林朝朋, 傅伟. 巴氏杀菌乳冷藏配送期间的温度及品质变化[J]. 食品工业科技, 2009, (2): 97-98.
Zou YF, Lin ZP, Fu W. Temperature and quality changes during cold distribution of pasteurized milk [J]. Food Ind Technol, 2009, (2): 97-98.
- [3] 王慧, 杨永龙, 张杰, 等. 浅析巴氏杀菌奶在中国的发展前景[J]. 饮料工业, 2010, (11): 4-7.
Wang H, Yang YL, Zhang J, *et al.* Analysis on prospects of pasteurized milk in China [J]. Bever Ind, 2010, (11): 4-7.
- [4] 吴达雄, 李冬梅, 李颂群, 等. 巴氏杀菌乳门店冰箱冷藏贮存售卖期间的温度及品质变化[J]. 现代食品科技, 2017, 33(12): 99-103.
Wu DX, Li DM, Li SQ, *et al.* Temperature and quality changes of pasteurized milk during refrigerated storage and sale in refrigerator [J]. Mod Food Sci Technol, 2017, 33(12): 99-103.
- [5] 李莹, 裴晓燕, 闫琳, 等. 市售巴氏杀菌乳中微生物污染状况调查[J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(5): 639-641.
Li Y, Pei XY, Yan L, *et al.* Investigation on the microbial contamination of pasteurized milk in retail market [J]. Chin J Health Lab Technol, 2017, 27(5): 639-641.
- [6] Daniela FO, Viviana OS. Kinetic modeling of quality changes of chilled ready to serve lasagna [J]. J Food Eng, 2012, 110(3): 487-492.
- [7] 张亚红, 王婷, 杨海荣, 等. 预测微生物学在乳及乳制品中的应用[J]. 检验检疫学报, 2015, 25(6): 62-65.
Zhang YH, Wang P, Yang HR, *et al.* Application of predictive microbiology in dairy products [J]. J Inspect Quarant, 2015, 25(6): 62-65.
- [8] 邢少华, 张小栓, 马常阳, 等. 波动温度下罗非鱼微生物生长动力学模型[J]. 农业机械学报, 2013, 44(7): 194-198.
Xing SH, Zhang XQ, Ma CY, *et al.* Microbial growth kinetics model of tilapia under variable temperatures [J]. Agric Mach, 2013, 44(7): 194-198.
- [9] GB 19645-2010 食品安全国家标准 巴氏杀菌乳[S].
GB 19645-2010 National food safety standard-Pasteurized milk [S].
- [10] Huang L. Growth kinetics of *Listeria monocytogenes* in broth and beef frankfurters-determination of lag phase duration and exponential growth rate under isothermal conditions [J]. J Food Sci, 2008, 73(5): 235-242.
- [11] Baranyi J, Roberts TA. Mathematics of predictive food microbiology [J]. Int J Food Microbiol, 1995, 26(2): 199-218.
- [12] Ratkowsky DA, Lowry RK, McMeekin TA, *et al.* Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range [J]. J Bacteriol, 1983, 154(3): 1222-1226.
- [13] Huang L, Hwang CA, Phillips J. Evaluating the effect of temperature on microbial growth rate—The Ratkowsky and a Bělehrádek-type models [J]. J Food Sci, 2011, 76(8): 547-557.
- [14] Rosso L, Lobry JR, Bajard S, *et al.* Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth [J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61(2): 610-616.
- [15] Huang L. IPMP 2013-a comprehensive data analysis tool for predictive microbiology [J]. Inter J Food Microbiol, 2014, (171): 100-107.

(责任编辑: 苏笑芳)

作者简介



魏钊异, 硕士, 主要研究方向为预测微生物学。

E-mail: 619436744@qq.com

潘洁茹, 博士, 副主任技师, 主要研究方向为疾病预防控制。

E-mail: pjr3852053@163.com

方婷, 博士, 教授, 主要研究方向为预测微生物学、食品非热加工技术。

E-mail: fangting930@163.com