

基于绿色荧光蛋白的冷鲜猪肉中大肠杆菌预测模型的构建

刘变芳, 胡辉帆, 张义奎, 蔡 锦, 杜双奎, 李俊丽, 曹梦茜, 吕 欣*

(西北农林科技大学食品科学与工程学院, 杨凌 712100)

摘 要: 为了预测和监控冷鲜猪肉储存过程中腐败细菌大肠杆菌的变化规律, 评估产品货架期, 建立微生物生长预测模型。该研究将绿色荧光蛋白质粒 pGFP 转入大肠杆菌 DH5 α , 构建 GFP 的标记大肠杆菌。基于绿色荧光蛋白报告基因和氨苄青霉素抗性, 采用稀释平板法定量追踪检测 0~24 °C 条件下冷鲜猪肉中 DH5 α 生长变化。采用 Gompertz 模型、平方根模型和响应面方程进行数据拟合, 构建数学预测模型。结果表明 Gompertz 模型拟合效果良好, 0~20 °C 条件下决定系数 R^2 为 0.96~0.99。温度与最大比生长速率平方根、延迟期倒数平方根模型 R^2 分别为 0.862、0.948。响应面模型揭示时间、温度对大肠杆菌的生长影响显著($P<0.05$), 二者交互作用明显, 响应面模型 R^2 为 0.815。模型能够有效拟合冷鲜猪肉中与温度、时间相关的大肠杆菌的生长变化规律, 研究结果为产品储存过程中细菌变化预测提供理论依据。

关键词: 温度; 模型; 冷鲜猪肉; 大肠杆菌 DH5 α ; 追踪检测; Gompertz 预测模型

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2021.01.035

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2021)-01-0299-07

刘变芳, 胡辉帆, 张义奎, 等. 基于绿色荧光蛋白的冷鲜猪肉中大肠杆菌预测模型的构建[J]. 农业工程学报, 2021, 37(1): 299-305. doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2021.01.035 http://www.tcsae.org

Liu Bianfang, Hu Huifan, Zhang Yikui, et al. Construction of the prediction model for *Escherichia coli* in chilled pork using green fluorescent protein[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2021, 37(1): 299-305. (in Chinese with English abstract) doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2021.01.035 http://www.tcsae.org

0 引 言

近年来, 冷鲜猪肉已逐步成为各大城市肉品消费的主流, 而随着生活水平的不断提高, 人们对其质量与安全问题越来越关注^[1]。冷鲜猪肉营养丰富, 含水率高, 极易受微生物污染, 特别是在生产、加工、销售过程如果冷链系统不完善, 温度条件控制不当, 微生物就会迅速增殖, 加速肉的腐败变质, 最终对公共健康构成潜在的威胁^[2-3]。大肠杆菌来源于人和动物的肠道, 广泛存在水、土壤、空气等生活环境中, 是冷鲜猪肉中的一类主要腐败菌, 也是食品必须检测的细菌指标。新鲜和冷冻的猪肉、牛肉以及相关的肉制品中, 普遍存在肠杆菌科微生物。一些肠道致病菌如沙门氏菌、志贺氏菌、产毒素大肠杆菌等和普通大肠杆菌来源和在环境中生长条件基本一致, 食品中的大肠杆菌污染指标也是这些肠道致病菌污染情况的一个间接指示^[4-5]。因此, 追踪检测并预测冷鲜猪肉生产、贮存和流通过程中的大肠杆菌的污染及生长变化规律, 对预测鲜肉保质期, 提高肉品质量和保障安全具有非常重要的实践意义^[6]。

预测微生物学是运用微生物学、工程数学以及统计学对食品微生物进行数学建模, 从而对微生物在食品加工、贮藏、流通等条件下的延迟、生长、残存和死亡进

行定量分析^[7-8]。预测食品中微生物的动态变化不仅可以对食品安全作出快速评估和预测, 而且可用于食品货架期预测^[9]。Gompertz 模型是用来描述生物种群生长发育规律的数学模型, 该模型最先是英国数学家 Benjamin Gompertz 于 1825 年提出作为动物种群生长模型, 用于描述种群的消亡规律^[10-12]。模型在应用特点上适合那些 S 型曲线、病情发展先快后慢的病害曲线拟合。已被广泛用于食品微生物生长预测领域的 Gompertz 模型能够较好地用于描述单细胞微生物的典型生长曲线, 分别用延迟期、最大比生长速率、最大菌落数来描述细菌生长的延迟期、指数期和稳定期的特征^[13]。绿色荧光蛋白 (Green Fluorescent Protein, GFP) 基因是可以在细胞内稳定表达, 不需要反应底物及其他辅助因子, 无种属组织特异性, 且产物 GFP 对细胞无毒性, 检测简单, 结果真实可靠的新型报告基因。近年来 GFP 报告基因广泛应用于肠道细菌的快速标记检测研究中^[14-16]。食品安全国家标准 GB 4789.2-2016^[17]规定食品的细菌总数检测采用稀释平板法, 大肠菌群检测采用 MPN 值测定方法, 这些方法要求对产品随机抽样检测, 检测程序中微生物需要经历多次培养, 方法不仅费时费力, 而且较难及时反映总体消费的安全性。预测微生物学的优势则在于利用现有的数据去预测未来发展趋势, 对实际生产和流通过程进行微生物预测和监控, 保证产品的安全性。本研究将绿色荧光蛋白质粒 (Plasmid of Green Fluorescent Protein, pGFP) 标记的大肠杆菌 (DH5 α) 定量转接到冷鲜猪肉介质中, 追踪检测不同温度条件下大肠杆菌的生长变化规律, 构建数学预测模型, 为快速监控和预测冷鲜猪肉产品中微生物的污染情况提供理论依据。

收稿日期: 2020-09-10 修订日期: 2020-12-15

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (项目编号 31972043)

作者简介: 刘变芳, 博士, 副教授。研究方向为食品安全、食品微生物。

Email: bfliu9509@163.com

*通信作者: 吕欣, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为食品生物技术。

Email: xinlu@nwsuaf.edu.cn

1 材料与方法

1.1 试验材料与仪器

大肠杆菌 DH5 α , 绿色荧光蛋白质粒 pGFP (含有氨苄青霉素 Amp 抗性基因), 均由本实验室保存。LB 培养基: 胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, NaCl 10 g, 琼脂粉 15 g, 1 000 mL 蒸馏水。配置后调整 pH 值至 7.0, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min, 备用。试验所用 4 °C 鲜猪肉购自超市, 选取前腿肉, 用绞肉机绞碎。主要试剂: 乙醇, 氯化钠, 葡萄糖, 硫酸等均为分析纯, 购于国药集团化学试剂有限公司; 氨苄青霉素, 胰蛋白胨, 酵母粉, 琼脂粉等均为分析纯, 购自上海生工生物工程有限公司。

倒置荧光显微镜 CFM-500、手提式紫外分析仪 WFH-203、日立紫外-可见光分光光度计 3900H (上海长方光学仪器有限公司); 冷冻离心机 TDL-36C (上海精密仪器有限公司); 精装绞肉机 SZ-32 (广州旭众食品机械有限公司); 高压蒸汽灭菌锅 MLS-3020CH (上海申安医疗器械厂); 洁净工作台 SW-CJ-ZFD (苏州安泰空气技术有限公司); 智能生化培养箱 HWS (宁波江南仪器厂)。

1.2 试验方法

1.2.1 构建 GFP 标记大肠杆菌 DH5 α

制备 DH5 α 感受态细胞, 从 37 °C 过夜培养 LB 平板上挑取单菌落, 转接到 100 mL LB 培养液中, 37 °C 震荡培养至吸光度 OD₆₀₀ 值为 0.45。培养物移至聚丙烯离心管中, 冰上放置 10 min, 4 °C, 4 200×g 离心 10 min 收集细胞。10 mL, 0.1 mol/L 的预冰冷的 CaCl₂ 重悬细胞沉淀, 冰浴。重复 1 次低温离心, 2 mL 0.1 mol/L 预冷 CaCl₂ 悬浮, 分装, -80 °C 冰箱保存备用。

pGFP 质粒转化 DH5 α 菌株。取新鲜 DH5 α 感受态细胞 200 μ L, 置于 1.5 μ L 离心管中, 加入 pGFP 质粒 2 μ L, 轻轻旋转混匀, 冰上放置 30 min。42 °C 水浴锅热激 90 s, 加入 LB 培养液 800 μ L, 37 °C 摇床培养 45 min 后, 涂布接种到在含 80 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 平板上, 37 °C 过夜培养。第二天, 筛选抗氨苄青霉素的转化子并用倒置荧光显微镜检测 GFP 表达, 将稳定表达 GFP 的单菌落划线转接抗性平板纯化扩增后, 用含体积分数 16% 甘油的 LB 培养液重悬, 于 -80 °C 冷冻保藏, 备用^[18-19]。

1.2.2 GFP 标记大肠杆菌 DH5 α 生长曲线测定

将 -80 °C 冷冻保藏稳定表达 GFP 的大肠杆菌 DH5 α 划线接种氨苄青霉素抗性平板活化, 37 °C 过夜培养。第 2 天挑取单菌落转接到含 5 mL LB 培养液试管中, 摇床培养至 OD₆₀₀ 值为 0.45, 按体积分数 1% 接种比例转接至 100 mL 新鲜 LB 培养液中, 37 °C 摇床培养, 分别在 0、1.5、3.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0、14.0、16.0、18.0、20.0、22.0 和 24.0 h 取 2 mL 菌液测定 OD₆₀₀ 值, 并以培养时间为横坐标, OD₆₀₀ 值为纵坐标绘制细菌生长曲线^[20]。大肠杆菌 DH5 α 用 LB 培养基活化培养, 作为对照菌株测定其生长曲线。

1.2.3 冷鲜猪肉样品处理及 GFP 标记大肠杆菌 DH5 α 的测定

参考中国现行分割鲜、冻猪瘦肉卫生标准 GB/T

9959.2-2008^[21]中规定的微生物指标, 菌落总数 $\leq 1 \times 10^6$ CFU/g, 大肠菌群 $\leq 1 \times 10^4$ MPN/100 g, 沙门氏菌不得检出。本试验对购自超市的冷鲜猪肉细菌总数和大肠菌群进行检测, 选择符合卫生标准的冷鲜猪肉作为本试验研究材料。取 500 g 冷鲜猪肉用绞肉机绞碎, 用无菌注射器定量接种 GFP 标记大肠杆菌 DH5 α 菌液, 混匀。测定菌液的 OD₆₀₀ 值, 按照菌液 OD₆₀₀ 值等于 1 时细胞浓度约为 10^8 个/mL, 根据实测菌液的 OD₆₀₀ 值按比例计算 500 g 猪肉样品中需要接种的菌液量, 控制接种初始浓度为 10^2 个/100 g。比如测定菌液 OD₆₀₀ 值为 0.2, 则其细胞浓度为 2×10^7 个/mL, 稀释 1 000 倍后细胞浓度为 2×10^4 个/mL, 按比例计算 500 g 猪肉样品中应添加 25 μ L 1 000 倍稀释的菌液, 则猪肉样品中细胞浓度为 10^2 个/100 g。对照组冷鲜猪肉样品绞碎但不接种细菌。样品放入锡箔纸杯并用保鲜膜封盖, 放置托盘上分别放入 0、4、8 °C 冰箱, 12、16、20 和 24 °C 的生化恒温培养箱培养, 定时取样检测大肠杆菌 DH5 α 菌数。

冷鲜猪肉中大肠杆菌 DH5 α 的测定, 采用氨苄青霉素抗性 LB 平板稀释倾注法结合手提式紫外分析仪检测。0 °C 每 24 h 取样测定, 4、8 和 12 °C 每 12 h 取样测定, 16、20 和 24 °C 每 8 h 取样进行测定。称取样品 25 g 放入含 225 mL 无菌生理盐水三角瓶中, 震荡混匀, 进行 10 倍系列稀释。取稀释样品 1 mL 接种到无菌平皿, 然后平皿中倾注含 80 μ g/mL 氨苄青霉素、50 °C 得营养琼脂, 混匀冷却凝固后 37 °C 培养 48 h, 进行菌落计数, 并在手提式紫外分析仪下检测带绿色荧光菌落。选择 3 个连续的稀释度样品, 每个稀释度做 3 个平行, 无菌水做为阴性对照。

1.2.4 Gompertz 初级模型的建立

Gompertz 初级模型描述不同温度下大肠杆菌培养时间与细菌数量的关系, 模型的决定系数 R^2 描述了试验拟合参数的相关性, R^2 越接近 1 表明拟合度越高, 参数之间的相关性越强^[22]。采用 1stOpt1.5 软件进行数据模拟, 过程优化算法选择麦夸特法 (Levenberg-Marquardt) 加通用全局优化法, 结合模型均方根误差 (Root Mean Squared Error, RMSE)、残差平方和 (Residual Sum of Squares, RSS) 判定模型适用性。

Gompertz 方程式是双指数函数表达式为:

$$\lg N = A + C \cdot \exp \{-\exp[-B(t - M)]\} \quad (1)$$

式中 $\lg N$ 为细菌在时间 t 时菌数的对数, $\lg(\text{CFU}/100 \text{ g})$; A 是随时间无限减小时渐进菌数对数, (即初始菌落总数对数 $\lg N_0$); C 是随时间增加菌数增量的对数, $\lg(N_{\max}/N_0)$; B 是时间为 M 时相对最大比生长速率, h^{-1} ; M 为达到相对最大比生长速率所需时间, h 。公式中 C 、 B 和 M 为模型参数, 由 Gompertz 方程拟合得出, A 为初始菌数对数值由试验检测得出。根据不同温度条件下的大肠杆菌检测数据, 由 Gompertz 方程拟合得出 C 、 B 和 M 参数, 进而由公式推算大肠杆菌相关生长规律数据参数, 包括延迟期 (Lag Phase Duration, LPD)、最大比生长速率 (U_{\max}) 和最大细胞浓度 (Maximum Population Density, MPD)。

其中最大比生长速率 $U_{\max}=B \cdot C / e$, $e=2.718 2$; 延迟期 $LPD=M-(1/B)$; 最大细胞浓度 $MPD=A+C$ 。

1.2.5 平方根二级模型的建立

二级模型研究温度对于一级模型参数的影响, 采用平方根模型拟合温度与最大比生长速率 (U_{\max}) 平方根, 以及温度与延迟期 (LPD) 倒数的平方根之间的关系^[23]。利用初级模型计算最大比生长速率 (U_{\max}) 和延迟期 (LPD), 平方根模型表达式如下:

$$\sqrt{1/LPD} = k_{\text{lag}} \cdot (T - T_{\min}) \quad (2)$$

$$\sqrt{U_{\max}} = k_u \cdot (T - T_{\min}) \quad (3)$$

式中 T 是培养温度, $^{\circ}\text{C}$; T_{\min} 是微生物没有代谢活动时的温度, $^{\circ}\text{C}$, 即在此温度下最大比生长速率为 0; k_{lag} 和 k_u 分别为 2 个方程的系数。

1.2.6 响应面模型的建立

试验数据采用 Statistica 8.0 软件拟合分析, 对大肠杆菌在不同温度、时间下的生长规律建立双因素响应面二级模型。

1.2.7 预测模型的验证

不同温度试验条件下检测的大肠杆菌实际菌数值与模型预测值进行比较, 使用数学检验参数偏差值 (Bias factor, B_f) 和准确值 (Accuracy factor, A_f) 判定模型的可接受性和准确性^[24]。偏差值 B_f 是用来检查预测值上下波动的幅度, 准确值 A_f 是用来衡量预测值和实测值之间的差异。当计算得到的 B_f 和 A_f 数值为 1.0, 表示预测值没有误差, 数值 1.1 和 0.9 分别表示预测值的上下误差各为 10%。 B_f 和 A_f 的计算公式如下:

$$B_f = 10^{\sum \lg(N_{\text{pre}} / N_{\text{obs}}) / n} \quad (4)$$

$$A_f = 10^{\sum |\lg(N_{\text{pre}} / N_{\text{obs}})| / n} \quad (5)$$

式中 $\lg N_{\text{pre}}$ 是大肠杆菌生长数学模型预测得到的菌数对数 $\lg(\text{CFU}/100 \text{ g})$; $\lg N_{\text{obs}}$ 是实际测得的大肠杆菌菌数对数 $\lg(\text{CFU}/100 \text{ g})$; n 是试验次数。

Gompertz 初级模型的验证试验分别在 0、4、8、12、16、20 和 24 $^{\circ}\text{C}$ 培养条件下, 不同时间点共 10 次取样对大肠杆菌数进行检测和预测。响应面方程的验证试验在 4、10、18 $^{\circ}\text{C}$ 培养条件下, 分别在培养 6、12、24 h 共 3 次取样对细菌数进行检测和预测。依据公式 (4) 和 (5) 分别计算偏差值 B_f 和准确值 A_f , 评价模型的可靠性。

1.2.8 数据处理

试验数据分别采用软件 1stOpt 1.5 和 Statistica 8.0 进行分析, 建立 Gompertz 模型、平方根模型和响应面方程。

2 结果与分析

2.1 DH5 α 大肠杆菌 GFP 标记检测及其生长曲线测定

通过化学转化法构建表达绿色荧光蛋白 GFP 的大肠杆菌 DH5 α 。划线转接传代转化子 3 次于含氨苄青霉素的 LB 平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养, 第二天用手提式紫外分析仪检测平板上的荧光绿色菌落, 同时挑取单菌落涂于载玻片上, 用倒置荧光显微镜检测稳定表达 GFP 的大肠杆菌 DH5 α , 结果如图 1 所示。

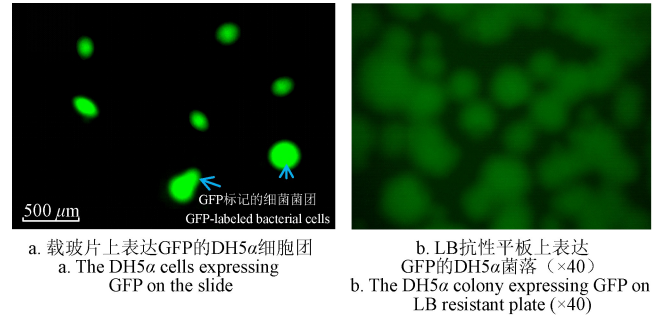


图 1 荧光显微镜下表达 GFP 的大肠杆菌 DH5 α
Fig.1 *E.coli* DH5 α expressing GFP under fluorescence microscopy

结果揭示传代过程中构建的大肠杆菌可以稳定表达绿色荧光蛋白, 同时具备氨苄青霉素抗性。在含 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的 LB 平板上手提式紫外分析仪检测到表达绿色荧光蛋白的大肠杆菌菌落, 同时在倒置荧光显微镜下观测到表达 GFP 的大肠杆菌 DH5 α , 说明 GFP 作为报告基因和氨苄青霉素抗性作为筛选标记可以实现对大肠杆菌 DH5 α 的追踪检测。

图 2 生长曲线测定结果表明 GFP 标记大肠杆菌 DH5 α 培养过程呈现典型细菌的 S 型生长曲线, 与对照菌株 DH5 α 的生长趋势基本一致。0~2 h 为迟缓期, 2~10 h 为对数生长期, 10~16 h 为稳定期, 16 h 以后进入衰亡期, 符合一般细菌动力学生长规律。

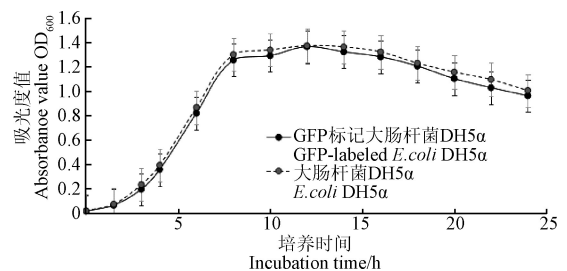


图 2 GFP 标记大肠杆菌 DH5 α 的生长曲线
Fig.2 Growth curve of *E.coli* DH5 α marked with GFP

2.2 冷鲜猪肉中大肠杆菌生长 Gompertz 预测模型的建立

GFP 标记菌株 DH5 α 定量接种冷鲜肉后, 不同温度条件下定时取样, 基于 GFP 标记和 Amp 抗性用稀释平板计数法进行追踪检测计数。试验数据采用 1stOpt 1.5 软件拟合得到 Gompertz 一级模型曲线和参数值 (见图 3 和表 1)。

由图 3 可见在冷鲜猪肉中 0 $^{\circ}\text{C}$ 条件下大肠杆菌生长非常缓慢, 静置 48 h (2 d) 后大肠杆菌数缓慢上升, 0 $^{\circ}\text{C}$ 保持 192 h (8 d 左右) 大肠杆菌菌落总数最大值为 6.56 $\lg(\text{CFU}/100 \text{ g})$ 。4 和 8 $^{\circ}\text{C}$ 条件下大肠杆菌生长缓慢, 静置 24 h 后大肠杆菌菌落总数明显上升, 72 h 进入细菌生长稳定期, 大肠杆菌菌落总数最大值分别为 6.32 和 7.09 $\lg(\text{CFU}/100 \text{ g})$ 。12、16、20 和 24 $^{\circ}\text{C}$ 条件下随着温度升高, 细菌生长速度显著加快, 延迟期明显缩短, 并和温度呈正相关, 接种后细菌很快进入对数期, 最大值分别为 7.47、6.97、7.53 和 10.04 $\lg(\text{CFU}/100 \text{ g})$ 。

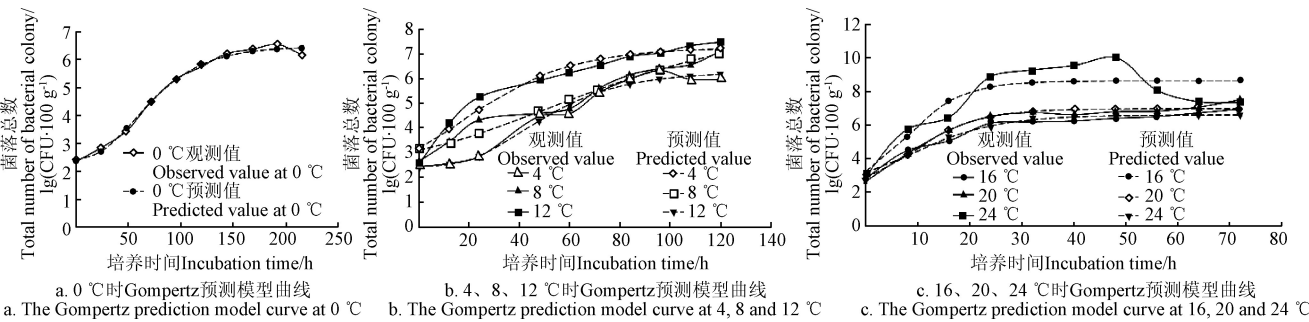


图3 冷鲜猪肉中大肠杆菌生长 Gompertz 预测模型
Fig.3 Gompertz model for predicting the growth of *Escherichia coli* in chilled pork

表 1 冷鲜猪肉中大肠杆菌 Gompertz 初级模型参数

Table 1 Parameters of gompertz primary model for *E.coli* in chilled pork

温度 Temperature/°C	A	C	B	M	U_{\max}	MPD	LPD	RMSE	RSS	R^2
0	2.40	4.13	0.03	56.48	0.05	2.43	56.24	0.12	0.14	0.99
4	2.45	3.81	0.05	41.13	0.07	2.50	40.87	0.20	0.40	0.98
8	3.11	5.75	0.02	50.88	0.04	3.13	50.71	0.26	0.69	0.96
12	3.19	4.70	0.04	17.26	0.07	3.23	17.05	0.31	0.97	0.96
16	3.19	3.77	0.11	8.39	0.15	3.3	8.12	0.22	0.50	0.97
20	2.87	4.33	0.14	8.23	0.22	3.01	8.00	0.22	0.48	0.98
24	3.25	5.64	0.16	7.19	0.33	3.41	7.01	0.91	0.84	0.79

注: A: 菌落总数初始值, $\lg(\text{CFU}\cdot 100\text{ g}^{-1})$; C: 随时间变化菌数增加量的对数值, $\lg(N_{\max}\cdot N_0^{-1})$; B: 相对最大比生长速率, h^{-1} ; M: 达到相对最大比生长速率所需时间, h; U_{\max} : 最大比生长速率, h^{-1} ; MPD: 最大细胞浓度, $\lg(\text{CFU}\cdot 100\text{ g}^{-1})$; LPD: 延迟期, h; R^2 : 模型决定系数; RMSE: 均方根误差, $\lg(\text{CFU}\cdot 100\text{ g}^{-1})$; RSS: 残差平方和。
Note: A: Initial total number of bacterial colony, $\lg(\text{CFU}\cdot 100\text{ g}^{-1})$; C: The logarithm value of the increase in the number of bacteria over time, $\lg(N_{\max}\cdot N_0^{-1})$; B: Relative maximum specific growth rate, h^{-1} ; M: The time required to reach the maximum relative specific growth rate, h; U_{\max} : The maximum specific growth rate, h^{-1} ; MPD: Maximum population density $\lg(\text{CFU}\cdot 100\text{ g}^{-1})$; LPD: Lag phase duration, h; R^2 : Determination coefficient of model; RMSE: Root mean square error, $\lg(\text{CFU}\cdot 100\text{ g}^{-1})$; RSS: Residual sum of squares.

由表 1 可知, 定量接种后冷鲜猪肉样品中的初始大肠杆菌菌落总数为 2.40~3.25 $\lg(\text{CFU}/100\text{ g})$ 。随着温度的升高, 相对最大比生长速率 B 和最大比生长速率 U_{\max} 增大, 延迟期 LPD 减小, 表明温度是影响大肠杆菌在猪肉中增殖的关键因素之一。0~8 °C 时猪肉中大肠杆菌生长非常缓慢, 延迟期 LPD 大于 40 h。16~24 °C 时大肠杆菌生长延迟期 LPD 为 7~8 h。冷鲜猪肉中大肠杆菌 Gompertz 预测模型 24 °C 决定系数 R^2 为 0.79, 0~20 °C 时 R^2 为 0.96~0.99, 拟合效果良好。

2.3 冷鲜猪肉中大肠杆菌平方根二级模型

基于一级预测模型参数拟合温度与最大比生长速率 (U_{\max}) 平方根, 以及温度与延迟期 (LPD) 倒数的平方根之间关系的平方根二级预测模型, 如图 4 所示。

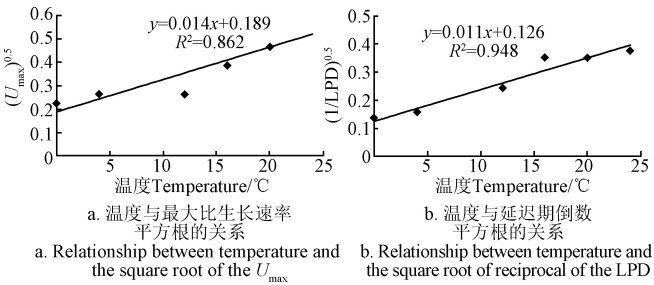


图 4 冷鲜猪肉中大肠杆菌平方根二级模型
Note: U_{\max} 为最大比生长速率, h^{-1} ; LPD 为延迟期, h。
Note: U_{\max} : the maximum specific growth rate, h^{-1} ; LPD: Lag phase duration, h.

图 4 The square root secondary model of *E. coli* in chilled pork

二级预测模型大肠杆菌生长温度和最大比生长速率的平方根模型、生长温度与迟滞期倒数的平方根模型拟合效果良好, 其决定系数 R^2 分别为 0.862 和 0.948。

2.4 冷鲜猪肉中大肠杆菌生长与温度、时间的响应面模型

温度和时间是影响冷鲜猪肉中大肠杆菌变化的 2 个主要因素, 采用 Statistica 8.0 软件进行双因素响应面模型拟合, 结果如图 5 所示。

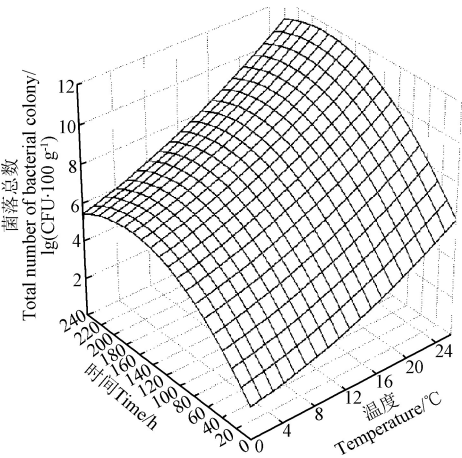


图 5 冷鲜肉猪中大肠杆菌生长与温度、时间双因素响应曲面模型
Fig.5 Temperature and time two-factor response surface model for the growth of *E.coli* in chilled pork

响应曲面模型揭示温度和时间 2 个因素对大肠杆菌的生长均有明显影响，随温度升高和时间延长，冷鲜猪肉中大肠杆菌菌数增多。模型揭示温度和时间二者交互作用明显 ($P<0.05$)。在 0~24 ℃ 范围内随着温度升高响应曲面升高，且随时间趋于平缓趋势加快，表明大肠杆菌进入生长稳定期时间缩短。响应面模型决定系数 R^2 为 0.815，调整决定系数 R^2_{adj} 为 0.801。

大肠杆菌响应面模型的拟合方程为：

$$\lg N=1.740\ 6+0.073\ 1x+0.054\ 9y+0.003\ 6x^2+0.000\ 2xy-0.000\ 2y^2$$

(6)

式中 x 代表温度，℃； y 代表时间，h。

2.5 模型有效性的验证

偏差值 B_f 表示模型的结构偏差，即低估预测或高估预测的程度。偏差值常结合准确值 A_f 来对模型进行数学检验。 A_f 值等于 1 表示预测值与观测值之间完全吻合。模型验证试验偏差值与准确值统计结果见表 2。

表 2 模型的偏差值与准确值
Table 2 The bias factor and accuracy factor of the model

指标 Indexes	Gompertz 模型 Gompertz model							响应曲面模型 Response surface model		
	0 ℃	4 ℃	8 ℃	12 ℃	16 ℃	20 ℃	24 ℃	4 ℃	10 ℃	18 ℃
偏差值 B_f	0.999	0.999	1.007	1.012	1.007	1.006	1.011	1.002	1.004	1.021
准确值 A_f	1.020	1.030	1.048	1.058	1.042	1.029	1.114	1.057	1.051	1.036

注：Gompertz 模型试验次数为 10；响应曲面模型试验次数为 3。
Note: The Gompertz model was tested 10 times ; The response surface model was tested 3 times.

由表 2 可知，Gompertz 预测模型有效性验证中， $0.999<B_f<1.012$ ，模型偏差小拟合度良好， A_f 值均在 1 附近波动不大，揭示模型具有一定准确性。响应面模型验证中 $1.002<B_f<1.021$ ， A_f 值均接近 1 波动不大，模型拟合效果良好。

3 讨 论

微生物生长预测模型中 Gompertz 模型能够较好地模拟微生物生长情况，被广泛用于食品中微生物的生长模拟研究。董庆利等^[25]研究揭示在 0~35 ℃ 条件下 Gompertz 模型对猪肉中气单胞菌的生长曲线拟合很好，模型决定系数 R^2 均大于 0.99，本研究建立的 Gompertz 模型能够很好预测大肠杆菌在冷鲜猪肉中的生长变化，模型决定系数 R^2 为 0.96~0.99，偏差值和准确值均接近 1，模型拟合度良好。本研究揭示猪肉冷藏温度低于 8 ℃ 时，大肠杆菌生长非常缓慢，大肠杆菌的生长受到温度因素的明显抑制，这个结果与 Tang 等^[26]对冷却猪肉货架期预测研究中腐败微生物生长的研究结论基本一致，均表明低温条件下猪肉中一些腐败微生物和致病微生物的生长收到明显抑制，随着温度的升高细菌延迟期缩短，生长速率加快。

食品微生物预测模型研究大多是在细菌培养基中试验建立，这样不仅操作简单还能在短时间内获得大量数据，然而食品基质成分复杂多样对微生物生长影响大，细菌在培养基中的增殖并不能代表食品基质中的真实状态，建立的微生物预测模型准确性也受到局限。食品及其原料自然状态下会存在多种微生物混居一起，针对某种纯培养细菌预测模型的建立则首先需要对食品基质进行灭菌处理，然而高温等方式灭菌后的食品基质会被改变，不能代表其真实状态^[27-28]。本研究对冷鲜猪肉仅进行了简单机械搅碎，未进行灭菌处理，通过 GFP 和抗生素抗性双重选择既实现了对食品基质自然状态下大肠杆菌的选择性培养和追踪检测，也提高了预测模型的实用和准确性。GFP 作为报告基因应用广泛，有研究报道成

功构建了增强型绿色荧光蛋白在 DH5α 大肠杆菌中的表达，减少了筛选鉴定的工作量，提高了工作效率^[18]。本研究中也成功构建了能够稳定表达 GFP 的大肠杆菌 DH5α，用于对食品中大肠杆菌生长繁殖情况追踪检测方法的改进具有十分重要的意义。基于这种方法改进，本研究建立的 Gompertz 模型、平方根模型和响应面模型均能较好预测一定温度下大肠杆菌在冷鲜猪肉中变化规律，为产品贮存条件、卫生安全关键控制点和货架期研究提供有效方法和理论支持。

4 结 论

本研究基于对绿色荧光蛋白标记大肠杆菌的定量追踪检测，构建了冷鲜猪肉中大肠杆菌生长预测模型，得出以下主要结论：

1) 通过化学转化法将绿色荧光蛋白质粒转入大肠杆菌 DH5α，成功构建了稳定表达绿色荧光蛋白（Green Fluorescent Protein, GFP）的标记菌株。定量接种后基于 GFP 报告基因和氨苄青霉素抗性双选择标记可以实现冷鲜猪肉中大肠杆菌的追踪检测。

2) 以绞碎的冷鲜猪肉为基质，采用 Gompertz 模型拟合其中大肠杆菌生长情况，结果揭示 0~20 ℃ 条件下 Gompertz 模型预测结果能够较准确反映大肠杆菌的实际生长情况，模型决定系数 R^2 为 0.96~0.99。模型偏差值和准确值均接近 1，拟合度良好。冷鲜猪肉作为细菌培养基质未经过高温除菌处理，更能真实反映实际生产产品中微生物变化规律。

冷鲜肉中大肠杆菌生长温度和最大比生长速率的平方根模型、生长温度与迟滞期倒数的平方根模型拟合效果良好，其决定系数 R^2 分别为 0.862 和 0.948。温度和时间双因素响应面模型揭示 2 个因素对大肠杆菌的生长均有明显影响，2 者交互作用明显 ($P<0.05$)，模型决定系数 R^2 为 0.815。响应面模型能够有效拟合冷鲜猪肉中大肠杆菌生长变化规律，为生产实践中冷鲜猪肉产品储存条件及货架期预测提供理论依据。

[参 考 文 献]

- [1] 江琦, 王烨, 刘英, 等. 冷鲜猪肉的研究进展[J]. 农产品加工, 2015(1): 69-71.
Jiang Qi, Wang Ye, Liu Ying, et al. Advanced on chilled meat[J]. Farm Products Processing, 2015(1): 69-71. (in Chinese with English abstract)
- [2] 姚兴海. 冷鲜猪肉的微生物腐败[J]. 农村经济与科技, 2019, 30(2): 136-137.
- [3] 方华, 陈慧阳, 李浩景, 等. 冷鲜肉加工的关键技术及微生物控制[J]. 肉类工业, 2020, 417(7): 36-38.
Fang Hua, Chen Huiyang, Li Haojing, et al. Key technology and microorganism control in the process of chilled meat[J]. Meat Industry, 2020, 417(7): 36-38. (in Chinese with English abstract)
- [4] 李江华, 孙晓宇, 张鹏, 等. 我国肉类食品追溯标准现状分析[J]. 肉类研究, 2017, 10(31): 58-62.
Li Jianghua, Sun Xiaoning, Zhang Peng, et al. Current status of China's meat food traceability standards[J]. Meat Research, 2017, 10(31): 58-62. (in Chinese with English abstract)
- [5] Tareq M O, Anas A A, Dinesh K D, et al. Growth behaviour and thermal inactivation of *E.coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in ground lean camel meat[J]. International Journal of Food Microbiology, 2020, 316: 108423.
- [6] 靳玉龙, 王涛, 张强, 等. 冷鲜猪肉生产过程中微生物污染分析及控制对策[J]. 肉类工业, 2015(2): 35-39.
Jin Yulong, Wang Tao, Zhang Qiang, et al. Microbial contamination analysis and control countermeasure in production of cold fresh meat[J]. Meat Industry, 2015(2): 35-39. (in Chinese with English abstract)
- [7] 郭全友, 王锡昌, 杨宪时, 等. 不同贮藏温度下养殖大黄花鱼货架期预测模型的构建[J]. 农业工程学报, 2012, 28(10): 267-273.
Guo Quanyou, Wang Xichang, Yang Xianshi, et al. Predictive model construction of shelf life for cultured *Pseudosciaena crocea* stored at different temperatures[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2012, 28(10): 267-273. (in Chinese with English abstract)
- [8] Mcmeekin T A, Tamplin M, Ross T, et al. The way forward with predictive microbiology in the dairy industry[J]. Australian Journal of Dairy Technology, 2010, 65(8): 91-97.
- [9] 李除夕, 董明盛, 陈晓红, 等. 豆腐中库特氏菌生长动力学模型和货架期预测[J]. 农业工程学报, 2009, 25(增刊1): 82-86.
Li Chuxi, Dong Mingsheng, Chen Xiaohong, et al. Construction of microbial growth kinetics prediction model of *kurthia* in tofu and shelf life prediction[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2009, 25(Supp.1): 82-86. (in Chinese with English abstract)
- [10] Mariel G K, Maria J S. Growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7 on the epicarp of fresh vegetables and fruits[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2018, 49(1): 104-111.
- [11] Aline M S O Z, Carlos A L O, Sheila N O, et al. Growth curves by Gompertz nonlinear regression model for male and female Nile tilapias from different genetic groups[J]. Aquaculture, 2019, 511: 734243.
- [12] Lu G C, Lu Z Y. Geometric approach for global asymptotic stability for three species competitive Gompertz models[J]. Journal of Mathematical Analysis and Applications, 2017, 445(1): 13-22.
- [13] Chatterjee T, Chatterjee B K, Majumdar D, et al. Antibacterial effect of silver nanoparticles and the modeling of bacterial growth kinetics using a modified Gompertz model[J]. Biochimica et Biophysica Acta. 2015, 1850(2): 299-306.
- [14] 陈彩玲, 毛丙永, 崔树茂, 等. 绿色荧光蛋白标记植物乳杆菌及其生物学特性分析[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(20): 22-28.
Chen Cailing, Mao Bingyong, Cui Shumao, et al. Biological properties of green fluorescent protein labelled *Lactobacillus plantarum*[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(20): 22-28. (in Chinese with English abstract)
- [15] Novaes L C D, Mazzola P G, Pessoa A, et al. Citrate and phosphate influence on green fluorescent protein thermal stability[J]. Biotechnology Progress, 2011, 27(1): 269-272.
- [16] Mishra M K, Devi S, McCormac A, et al. Green fluorescent protein as a visual selection marker for coffee transformation[J]. Biologia, 2010, 65(4): 639-646.
- [17] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品微生物学检验菌落总数测定 GB 4789.2-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [18] 王晓辉. 增强型绿色荧光蛋白在 DH5 α 大肠杆菌中的表达[J]. 食品科学, 2010, 31(21): 200-203.
Wang Xiaohui. Expression of enhanced green fluorescent protein in DH5 α *E.coli* [J]. Food Science, 2010, 31(21): 200-203. (in Chinese with English abstract)
- [19] Xue H, Song D S, Shi B et al. Tracking of green fluorescent protein labeled *Escherichia coli* confirms bacterial translocation in blind loop rat[J]. Journal of Surgical Research. 2007, 143(2): 206-210.
- [20] 何岚, 王柳懿, 朱琪, 等. 两种绘制枯草芽孢杆菌和大肠杆菌生长曲线方法的比较[J]. 天津农业科学, 2017, 23(5): 14-18.
He Lan, Wang Liuyi, Zhu Qi, et al. Comparison of two methods for drawing the growth curve of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*[J]. Tianjin Agricultural Sciences, 2017, 23(5): 14-18. (in Chinese with English abstract)
- [21] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 分割鲜、冻猪瘦肉: GB/T 9959.2-2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [22] Liu H Y, Chen N, Feng C P, et al. Impact of electro-stimulation on denitrifying bacterial growth and analysis of bacterial growth kinetics using a modified Gompertz model in a bioelectrochemical denitrification reactor[J]. Bioresource Technology, 2017, 232: 344-353.
- [23] Juneja V K, Marks H M. Predictive model for growth of *Clostridium perfringens* during cooling of cooked cured chicken[J]. Food Microbiology, 2011, 28(4): 791-795.
- [24] Mehrnoosh F R, Amirhossein M, Nader M, et al. Efficient refolding of recombinant reteplase expressed in *Escherichia coli* strains using response surface methodology[J].

- International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 164: 1321-1327.
- [25] 董庆利, 曾静, 丁甜, 等. 猪肉中气单胞菌生长与失活的 Gompertz 模型构建[J]. 食品科学, 2011, 32(11): 118-122. Dong Qingli, Zeng Jing, Ding Tian, et al. Establishment of Gompertz model for the growth and inactivation of *Aeromonas spp.* in pork[J]. Food Science, 2011, 32(11): 118-122. (in Chinese with English abstract)
- [26] Tang X Y, Sun X H, Wu V C H, et al. Predicting shelf-life of chilled pork sold in China[J]. Food Control, 2013, 32: 334-340.
- [27] 彭亚博, 李晓婷, 方婷, 等. 鸡肉中沙门氏菌和背景菌群生长动力学模型[J]. 食品科学, 2019, 40(9): 7-15. Peng Yabo, Li Xiaoting, Fang Ting, et al. Modelling growth kinetics of salmonella and background microorganisms in chicken[J]. Food Science, 2019, 40(9): 7-15. (in Chinese with English abstract)
- [28] Hwan H Y, Ye J S, Yeon J K, et al. Predictive model of growth kinetics for *Staphylococcus aureus* in raw beef under various packaging systems[J]. Meat Science, 2020, 165: 1-6.

Construction of the prediction model for *Escherichia coli* in chilled pork using green fluorescent protein

Liu Bianfang, Hu Huifan, Zhang Yikui, Cai Jin, Du Shuangkui, Li Junli, Cao Mengqian, Lyu Xin^{*}

(College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: Predicting dynamic changes of microorganisms can contribute to the rapid assessment of food safety for the shelf life in food prediction. *Escherichia coli* originated from human or animal intestines are the main spoilage bacteria in fresh and chilled meat products. It is highly demanding to predict and monitor the changes of *E.coli* in the chilled pork to ensure the safety and quality of food products. In this study, the green fluorescent protein plasmid (pGFP) with ampicillin resistance was transferred into *Escherichia coli* DH5 α by chemical transformation, thereby to construct a GFP labeled *E.coli* DH5 α strain. After quantitative inoculation of labeled strain in the chilled pork that was simply mechanically mashed, the dilution plate was used to detect the growth of *E. coli* at different temperatures, using the GFP reporter gene and ampicillin resistance. The Gompertz model, the square root model, and the response surface equation were used to fit the number of bacteria, further to construct a mathematical prediction model. The results showed that the Gompertz model had a good fitting effect on *Escherichia coli* in fresh pork, where the determination coefficient R^2 were 0.96-0.99 at 0-20 $^{\circ}\text{C}$, and 0.79 at 24 $^{\circ}\text{C}$, respectively. The Gompertz model indicated that the growth of *Escherichia coli* was very slow in the cold fresh pork at 0-8 $^{\circ}\text{C}$, and the lag phase duration (LPD) was over 40 h. It inferred that the growth rate of *E.coli* was significantly inhibited by the temperature, when the storage temperature of fresh pork was lower than 8 $^{\circ}\text{C}$. The two square root models had good fitting effects, which described the relationship between temperature and the square root of the maximum specific growth rate, and the relationship between temperature and the square root of reciprocal of LPD, where the determination coefficient R^2 were 0.862 and 0.948, respectively. The response surface model demonstrated that there were significant effects of time and temperature on the growth of *E.coli* in fresh pork, where the interaction between the two factors was significant ($P<0.05$), with the R^2 of 0.815. In the verification test, the prediction model revealed that the bias factor (B_f) and accuracy factor (A_f) were close to 1, indicating high accuracy and adaptability of the model. These models could effectively fit the growth rule of *Escherichia coli* in the chilled pork, providing a sound theoretical basis to predict bacterial change during product storage.

Keywords: temperature; models; chilled pork; *Escherichia coli*; tracking and detection; Gompertz prediction model