

预测食品微生物学概述及应用

赵瑞兰¹ 李远钊² 张培正³

(1. 烟台职业学院, 山东 烟台 264001; 2. 烟台出入境检验检疫局技术中心, 山东 烟台 264000; 3. 山东农业大学食品科学与工程学院, 山东 泰安 271018)

摘要: 为了解预测食品微生物学的基本内容, 综述了预测微生物学在食品中的应用。预测食品微生物学通过数学模型来预测微生物在不同环境条件下生长或死亡的数据。预测模型的分类有多种方法, 根据微生物生长或失活的情况将预测模型分为生长模型和失活/存活模型。预测微生物模型已经广泛应用于食品安全质量管理和生产工艺中。

关键词: 预测; 食品微生物学; 模型; 理论

Predictive Food Microbiology

—Brief Introduction of Theory and Application

ZHAO Rui-lan, LI Yuan-zhao, ZHANG Pei-zheng

(Yantai Vocational College, Shangdong Yantai 264001, China)

Abstract: Predictive food microbiology is a mathematical methods by which the growth or inactivation data of bacteria in advance can be gotten. There are several ways to categorize the predictive models. In this article, the predictive models are categorized into tow types: growth model and inactivation/survival model. Today predictive microbiology has been used widely in food safety management and food technology.

Key word: Forecasting; Food Microbiology; Models, Theoretical

1 预测食品微生物学

预测食品微生物学是一个将微生物学、数学和统计学结合在一起的研究领域, 通过建立一些数学模型来预测微生物在不同环境条件下的生长、死亡情况。这些环境条件包括 pH 值、水分活度、温度、气体环境等。影响微生物生长和死亡的因素很多, 但是在大多数食品中, 起决定性作用的因素只有几种。将这些因素与微生物的生长、死亡等情况结合, 建立数学模型, 就产生了预测食品微生物学。

数学模型很早就开始在微生物学中应用。早在 20 世纪 20 年代, 食品工业中已建立了微生物的热致死模型。但是, 直到 20 世纪 80 年代, 数学模型在食品微生物中的应用才得到广泛的关注。McMeekin^[1] 认为有 2 个原因引起了人们对预测模型的重视。一是 20 世纪 80 年代发生的食品中毒事件, 使公众提高了警惕, 要求得到安全、健康的食品。二是许多微生物学家意识到, 许多传统的、快速检测食品质量和安全的方法都受时间限制, 几乎没有预测价值。

20 世纪 60 年代, 为了控制鱼类的腐败, Spencer^[2] 等人建立了温度对鱼类腐败速度影响的模

型。Olley^[3] 认为, 许多腐败过程受温度影响的变化是基本相似的, 并提出了一个通用腐败模型。Daud^[4] 等人后来将 Olley 的腐败模型应用到鸡肉腐败的研究中。

Genigeorgis^[5] 等人发现, 一些外界因素综合作用能阻止病原菌的生长和毒素的产生。英国的 Roberts^[6] 等人和 Bean^[7] 等人也研究了外界因素综合作用对微生物生长的影响。后来, Jarvis^[8] 等人将这些研究成果用一个方程式来表达, 描述了生长和产毒概率与这些因素之间的关系。

目前, 人们将电脑应用于预测微生物学, 通过人机对话, 预测出各种环境条件下的微生物生长情况, 已开发的微生物模型程序有 1992 年英国农业、渔业及食品部 (MAFF) 开发的“Food Micromodel”^[9], 美国农业部的微生物食品安全研究机构开发的应用软件“Pathogen Modeling Program”(致病菌模型程序)^[10]。

2 预测微生物模型分类

关于预测模型分类, 有多种方法。一种根据预测模型的建立方式, 分为动力学模型和概率模型。动力学模型模拟有关微生物的生长范围和速度, 而概率模型模拟一些特定事件发生的可能性, 如在给定时间内孢子萌发和产毒的概率。另一种根据描述

作者简介: 赵瑞兰 女 硕士生

微生物数量变化的情况,将预测模型分为生长模型和失活/存活模型。

本文按照第二种方法,分别介绍几种预测微生物模型。

2.1 生长模型

2.1.1 指数生长模型 在微生物生长的指数期,每个微生物个体以恒定时间间隔进行分裂,细胞数量以2的指数(2^n)方式增加,细胞数目增一倍所需时间称为代时(generation time)或倍增时间(doubling time)。因为细胞数目每隔一代倍增一次,对数期细胞数量可用 2^n (n 为代数)表示,因而细胞数量以指数或对数方式增加,可用以下公式表示。

$$N_t = N_0 \times 2^n$$

N_t :时间为 t 时的微生物细胞数的对数; N_0 :初始菌数。以上公式为最简单的指数生长模型。后来,这类模型又加入了时间参数。

$$N_t = N_0 e^{kt/\ln 2}$$

N_t :时间为 t 时的微生物细胞数的对数; N_0 :初始菌数; k :斜率; t :时间。

需要指出的是,这类模型描述的是微生物生长指数期的菌数变化。在指数期以外,不能用此类模型模拟。

2.1.2 Gompertz 函数 与指数生长模型不同的是,该模型加入了延滞期对微生物生长的影响。

Gbsin^[11]等的 Gompertz 函数生长模型表达为:

$$N_t = N_0 + \frac{1}{1 + \exp\{-\exp[-a_2(t - \tau)]\}}$$

N_t 、 N_0 :分别为以对数单位表达的 t 时和初始的微生物的细胞数; τ :稳定期与接种时的微生物数量的差值; a_2 :斜率; τ :函数曲线弯曲时的拐点。

2.1.3 平方根模型 Ratkowsky^[12]等介绍了一个模型,把微生物生长速率表示为温度的函数。Ohta 和 Hirahara^[13]建立了以下形式的平方根模型。

$$k^{1/2} = b(T - T_{min})$$

k :生长速率; T :温度; T_{min} :微生物生长所需的理论最低温度。 b :待估回归系数。

经修正,McMeekin^[14]等将水分活度(a_w)和 pH 因素加入平方根模型,将其扩展为:

$$k^{1/2} = b(T - T_{min})(a_w - a_{wmin})^{1/2}(pH - pH_{min})^{1/2}$$

Wijtjes^[15]等成功地将此模型运用于单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)的生长。李博^[16]等人建立了36 屎肠球菌在豆浆中的生长模型,用的是以下形式的平方根模型。

$$k = [b(T - T_{min})]^2 \{1 - \exp[c(T - T_{max})]\}$$

c :回归系数。

2.1.4 Arrhenius 方程 对于微生物的生长来说,温

度是一个很重要的影响因素。在微生物生长的部分温度区间,使用 Arrhenius 方程能比较准确地描述温度对微生物生长的影响。

假设微生物生长率决定于一种酶促反应的速度,在此基础上建立了 Arrhenius 方程式。Davey^[17]建立了食品温度与水分活度对微生物生长率影响的 Arrhenius 模型。

$$\ln k = \ln a_0 + \frac{1}{T} + \frac{2}{T^2} + \ln a_w + \ln a_w^2$$

k :生长率; $a_0 \sim a_4$:模型参数。

Molina M^[18]等建立了温度和丙酸浓度对寄生曲霉(*Aspergillus parasiticus*)生长影响的 Arrhenius 模型,用 Arrhenius 方程将生长率表示为贮存时间的函数,此方程可以用于预测产毒素型真菌的生长。

2.1.5 反应表面模型/多项式模型 Einarsson 和 Eriksson^[19]运用回归技术,将微生物的生长参数表示为一个多项式方程,其一般形式为:

$$y = a_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + \dots + b_i x_i + b_n x_i^2 + \dots + b_i x_i^2 + \dots + b_{ij} x_i x_j + \dots + b_m x_i x_j$$

$a_0 \sim b_m$:回归系数; $x_1 \sim x_j$:温度、时间、pH 值、 a_w 等影响微生物生长的因素。

T P Oscar^[20]等建立了温度、pH 值和接种前 pH 值对 BHI 肉汤中生长的沙门菌生长影响的反应表面模型。V K Juneja^[21]等建立了反应表面模型,模拟了温度、pH、氯化钠和焦磷酸钠对大肠杆菌 O157 H7 (*E. coli* O157)抗热性的影响,模型形式为多重回归的形式,较准确地预测了在试验范围内这种因素对该种微生物 D 值的影响。Olmez, HK^[22]等建立了温度、pH、乳酸钠和氯化钠浓度对蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)生长动力学参数影响的多项式模型,预测了其生长的延滞期和生长率,并与美国致病细菌模型程序中的模型进行比较,结果表明此模型能比较准确地预测 *B. cereus* 的生长动力学参数。

2.1.6 概率模型 将最可能法(most probable number, MPN)应用于微生物的生长或者产毒,可得出细菌生长或者产毒的概率模型。

Lindroth 和 Genigeorgis^[23]用一个概率模型模拟了肉毒杆菌(*Clostridium botulinum*)孢子生长并产毒的概率:

$$P(\%) = (MPN \times 100) / S$$

P :概率的百分数;MPN:生长并产毒的最可能孢子数; S :接种量。

概率模型还被用于描述微生物死亡和存活的情况。R C McKellar^[24]等人建立了温度、氯化钠浓度、pH 值、醋酸及蔗糖含量对胰酶大豆肉汤(Tryptic Soy Broth)中 *Escherichia coli* O157 H7 存活影响的概率模型。经验证,模型的准确率为 97.4%。Presser K

A^[25]等通过描述大肠杆菌 (*E. coli*) 在不同温度、pH 值、乳酸浓度以及水分活度下的生长概率,得出了大肠杆菌的生长限值。

2.2 失活/存活模型 在食品冷冻或货架期贮藏期间,其中病原菌的数量会有所下降。在许多食品中,微生物失活是由于其内部因素引起的。在失活过程中微生物数量呈快速下降的趋势,而存活则是一个缓慢下降的过程。

2.2.1 失活模型 微生物在高温条件下,会出现短时间内大量死亡的现象,这个过程可以用一个线性的失活模型来表示。此模型可用于 D 值和 Z 值的计算。

在一些研究中发现,微生物数量下降的对数值与时间的线性关系式和实际情况存在偏差。Cole^[26]等人用一个 logistic 模型模拟了单核细胞增生李斯特菌 (*L. monocytogenes*) 的失活过程,加入了失活前期的呈肩形的延滞期和呈平缓下降的后期失活过程。

$$N_t = n_1 + (n_2 - n_1) / \{1 + \exp[4k(t - t_1) / (n_2 - n_1)]\}$$

N_t : 存活微生物细胞数的对数值; n_1 : 初始菌数; n_2 : 最低菌数; t_1 : 斜率最大值出现的时间; k : 最大斜率; t : 菌数变化 10 倍的时间。

2.2.2 存活模型 在长期冷藏的食品中会有某种微生物数量缓慢下降的现象,这种变化可以用存活模型来表示。一般来说,这类模型开始都有一个相对稳定的延滞期,之后菌数缓慢下降,下降过程接近一个线性过程。

Buchanan^[27]等用 2 个方程模拟了这个过程。

$$N_t = N_0 \quad t < t_1$$

t_1 为延滞期。

此时的细菌数等于接种水平,经过一个延滞期后,细菌数开始下降。

$$N_t = N_0 + (t - t_1) \quad t > t_1$$

: 斜率,即 $-1/D$ 。

Koutsoumanis K^[28]等用 1 个二项式模拟了肠炎沙门菌 (*Salmonella enteritidis*) 在希腊鱼子酱中的存活情况。沙门菌数的下降决定于鱼子酱 pH、贮存温度以及牛至精油 (oregano essential oil) 的影响。

3 预测微生物学的应用

过去,食品微生物学专家依靠一定的规则和个人经验来进行新产品的开发和微生物风险管理。而仅仅依靠简单规则和经验来解决目前所遇到的各种复杂问题,有很大的局限性,特别是在加工过程和配方中几种因素相互影响时。传统方法是通过挑战性试验或微生物学实验来决定对微生物体系的哪

几种因素进行控制,这些方法花费大,时间长,需要进行反复实验,才能作出判断。而预测微生物模型则克服了这些缺点,能更客观、更快速、更准确地作出预测,且能节省大量资金。因此,预测微生物学是食品安全质量管理和食品生产加工中微生物控制的有效工具。

3.1 在食品安全质量管理中的应用

3.1.1 在良好操作规范 (GMP) 中的应用 20 世纪 80 年代中期,新西兰肉品工业研究所 (MIRINZ) 的工作者们建立了一种温度函数积分模型^[29] (TFI 模型)。通过对微生物生长参数和温度进行积分,来测定肉冷却过程中大肠杆菌的潜在增殖。在屠宰后肉的冷却过程中,有 2 个冷却阶段,要求深层肉的温度在 24 h 内降低到 7℃。根据 TFI 模型,计算并比较了 5 个不同处理过程中大肠杆菌在肉表面的潜在生长程度。结果表明,第一阶段采用 10、18 h 冷却方法,大肠杆菌生长最少,为 7.6 代。以此为依据,新西兰肉品工业研究所对屠宰后肉的处理标准进行了规范,以保证屠宰肉的微生物安全性。

3.1.2 在 HACCP 中的应用 危害分析与关键控制点 (HACCP) 是为了确保食品的安全而实行的一项质量管理体系。通过对食品加工过程中各个步骤可能产生的危害进行分析,确定关键控制点并制定关键限值,并对整个生产过程进行监控,以确保食品的安全。

在相关条件已知的情况下,预测模型可以确定某个食品工艺步骤能否导致有关微生物的生长或繁殖以及其生长或繁殖程度,由此可以定量地评估该工艺过程对该食品安全的影响程度,并建立该食品生产过程的关键控制点,确定其关键限值。20 世纪 90 年代中期,澳大利亚肉品工业以预测微生物学为依据,制定了一系列肉制品在加工、运输、销售、零售以及贮存的标准,作为其 HACCP 体系的管理标准^[30]。

例如在肉的冷却过程中,由于整箱肉中心温度下降速度比较慢,在此过程中有可能导致某些有害微生物的繁殖,因此确定此冷却过程为一个关键控制点。大肠杆菌数目的对数值低于 $\log 1.5$ 不会造成危害,根据预测模型的计算,原料肉必须冷却到 7℃。这是一个制定关键限值的例子。

3.1.3 在风险分析中的应用 预测微生物学是暴露评估的一个有用工具。通过建立数学模型来描述不同环境下微生物的生长、存活及失活的变化,从而对致病菌在整个暴露过程中的变化进行预测,并最终估计出各个阶段及食品食用时致病菌的浓度水平,然后将这一结果输入剂量 - 反应模型,即可得出

该致病菌在消费食品中的分布及消费者的摄入量,再由风险描述将这些定量、定性的信息综合到一起,即可得出某种食品安全性的一个评价。

联合国粮农组织和世界卫生组织于2002年对鸡蛋及肉鸡中的沙门菌的危害进行了风险评估^[31]。在鸡蛋中沙门菌的暴露评估中,沙门菌的摄入量取决于鸡蛋生下来到烹制成食物这一段时间肠炎沙门菌的生长情况,以及鸡蛋的制备和烹制方式。受感染鸡蛋上肠炎沙门菌的生长情况随储存的时间和温度而变化。在肉鸡中沙门菌的暴露评估中,关于沙门菌的生长情况,采用肉鸡胴体的零售店储存时间、运输时间、家庭存放时间和温度等随机指标加以推断。关于烹制过程中沙门菌的死亡情况,用肉鸡没有充分煮熟的概率、附着在不能直接受热部位沙门菌的比例,因此而受保护病菌的受热温度、受热的时间长短等随机指标加以推断。然后将这些数据输入有关预测微生物生长、存活或致死模型,将得出的预测数据输入剂量反应模型,就可得出食用一份食物所带来的疾病的风险。

3.1.4 预测食品的货架期 微生物是导致食品腐败的主要因素。因此,微生物的生长繁殖情况直接影响了食品的货架期。预测微生物学模型定量描述了食品中特定腐败微生物的潜在的生长繁殖,为合理地监控食品在贮存、销售和零售期间的管理提供了充分的依据。K Koutsoumanis^[32] 监控了金头鲷 (*Sparus aurata*) 在不同温度(0~15)贮存微生物正常菌群的生长情况,确定假单胞杆菌 (*Pseudomonas sp.*) 为其在有氧条件下贮存的腐败菌。根据其生长数据,建立了温度对假单胞杆菌影响的 Belehradek 模型。对预测值与动态条件下的试验值进行了比较,结果表明,得出的细菌的生长和货架期预测值与实验值的平均差别为 5.8%,此模型能够比较精确地用于预测实际条件下鱼类产品的质量。H Einarsson^[33] 建立了温度影响的鳕鱼片的货架期模型,并对鳕鱼片在变动的温度下的货架期的预测值与实测值做了比较,结果表明鳕鱼在0.6 空气中贮存货架期(通过感官评定得出)为 11 d,与预测值相近。微生物增长的实测值要低于预测值。而对于鳕鱼片,在 5 空气中 3 d,0.6 3 d,然后在 - 2 贮存,其货架期为 7 d,这个结果与预测的货架期相符合。

参考文献

- [1] McMeekin T A, Olley J, Ross T, et al, Predictive microbiology: theory and application [M]. Taunton, UK: Research Studies Press, 1993.
- [2] Spencer R, Bains C R. The effect of temperature on the spoilage of wet fish. I. Storage at constant temperature between -1 and 25 [J]. Food Microbiol, 1964, 18: 769-772.
- [3] Olley J, Ratkowsky D A. The role of temperature function integration in monitoring fish spoilage[J]. Food Technol N Z, 1973, 8: 13.
- [4] Daud H B, McMeekin T A, Olley J. Temperature function integration and the development and metabolism of poultry spoilage bacteria[J]. Appl Environ Microbiol, 1978, 36(5): 650-654.
- [5] Genigeorgis C A, Meng J, Baker D A. Behavior of nonproteolytic *Clostridium botulinum* type B and E spores in cooked turkey and modeling lag phase and probability of toxigenesis[J]. J Food Sci, 1991, 56: 373-379.
- [6] Roberts T A, Ingram M. Inhibition of growth of *Cl. Botulinum* at different pH values by sodium chloride and sodium nitrite[J]. J Food Technol, 1973, 8: 467-475.
- [7] Bean P G, Roberts T A. The effect of pH, sodium chloride and sodium nitrite on heat resistance of *Staphylococcus aureus* and growth of damaged cells in laboratory media[J]. Food Science Technology IUFST, 1974, 3: 93-102.
- [8] Jarvis B, Rhodes A C, Patel M. Microbiological safety of pasteurized cured meats: inhibition of *Clostridium botulinum* by curing salts and other additives[J]. Food Microbiol and Technol, 1979, 251-266.
- [9] Jozsef Baranyi. The ComBase project to pool food microbiology data and expertise [DB/OL]. <http://www.cost920.com/Baranyi.pdf>.
- [10] The Pathogen Modeling Program [DB/OL]. www.arserrc.gov/nfs/PATHOGEN.HTML.
- [11] Gibson A M, Bratchell N, Roberts T A. The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry[J]. J Appl Bacteriol, 1987, 62: 479-490.
- [12] Ratkowsky D A, Olley J, McMeekin T A, et al. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures[J]. J Bacteriol, 1982, 149(1): 1-5.
- [13] Ohta F, Hirahara T. Rate of degradation in cool-stored carp muscle[J]. Mem Fac Fish Kagoshima Univ, 1977, 26: 97-102.
- [14] McMeekin T A, Chandler R E, Doe P E, et al. Model for combined effect of temperature and salt concentration/water activity on the growth rate of *Staphylococcus xylosum* [J]. J Appl Bacteriol, 1987, 62(6): 543-550.
- [15] Wijties T, McClure P J, Zwietering M H, et al. Modelling bacterial growth of *Listeria monocytogenes* as a function of water activity, pH and temperature [J]. Int J Food Microbiol, 1993, 18: 139-149.
- [16] 李博,李里特,辰巴英三,等.豆腐(豆浆)中屎肠球菌生长的温度预测模型[J]. 中国农业大学学报, 2003, 8(2): 49-54.

- [17] Davey K R. A predictive model for combined temperature and water activity on microbial growth during the growth phase[J]. J Appl Bacteriol, 1989, 67(5): 483-488.
- [18] Molina M, Gannuzzi L. Combined effect of temperature and propionic acid concentration on the growth of *Aspergillus parasiticus* [J]. Food research international, 1999, 32:677-682.
- [19] Einarsson H, Eriksson S G. Microbial growth models for prediction of shelf life of chilled meat [J] Int J Food Microbiol, 1986, 301-305.
- [20] T P Oscar. Response surface models for effects of temperature, pH, and previous growth pH on growth kinetics of *Salmonella typhimurium* in brain heart infusion broth[J]. J Food Protect, 1998, 62: 106-111.
- [21] V K Juneja, B S Mamer, B S Eblen. Predictive model for the combined effect of temperature, pH, sodium chloride and sodium pyrophosphate on the heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7 [J]. Journal of Food Safety, 1999, 19: 147-160.
- [22] Olmez H K, Aran N. Modeling the growth kinetics of *Bacillus cereus* as a function of temperature, pH, sodium lactate and sodium chloride concentrations[J]. Int J Food Microbiol, 2005, 98(2): 135-143.
- [23] Lindroth S E, Genigeorgis C A. Probability of growth and toxin production by nonproteolytic *Clostridium botulinum* in rockfish stored under modified atmospheres[J]. Int J Food Microbiol, 1986, 3: 167-181.
- [24] R C McKellar, X Lu, P J Delaquis. A probability model describing the interface between survival and death of *Escherichia coli* O157:H7 in a mayonnaise model system [J]. Food microbiology, 2002, 19: 235-247.
- [25] Presser K A, Ross T, Ratkowsky D A. Modelling the growth limits (growth no growth interface) of *Escherichiacoli* as a function of temperature, pH, lactic acid concentration and water activity[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(5): 1773-1779.
- [26] Cole M, Davies K W, Munro G, et al. A vitalistic model to describe the thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* [J]. Soc Ind Microbiol, 1993, 12: 232-239.
- [27] Buchanan R L, Golden M H, Whiting R C, et al. Expanded models for the non-thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*[J]. J Appl Microbiol, 1997, 82: 567-577.
- [28] Konstantinos P Koutsoumanis, Petros S Taoukis, Eleftherios H Drosinos. Applicability of an arrhenius model for the combined effect of temperature and CO₂ packaging on the spoilage microflora of fish [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(8): 3528-3534.
- [29] Neil H Armitage. Use of predictive microbiology in meat hygiene regulatory activity[J]. Int J Food Microbiol, 1997, 36: 103-109.
- [30] J Sumner, K Krist. The use of predictive microbiology by the Australian meat industry [J]. Int J Food Microbiol, 2002, 73: 363-366.
- [31] Risk assessment of Salmonella in eggs and broiler chickens, 2002 [DB/OL]. <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/en/salm-summary.pdf>.
- [32] Koutsoumanis K. Predictive modeling of the shelf life of fish under nonisothermal Conditions [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67: 1821-1829.
- [33] Einarsson H. Evaluation of a predictive model for the shelf life of cod (*Gadus morhua*) fillets stored in two different atmospheres at varying temperatures [J]. Int J Food Microbiol, 1994, 24: 93-102.

[收稿日期:2005-10-18]

中图分类号:R15;TS201.3 文献标识码:E 文章编号:1004-8456(2006)05-0464-05

卫生部文件

卫监督发[2006]211号

卫生部关于对婴幼儿食品中营养强化剂使用问题的批复

浙江省卫生厅:

你厅《关于婴幼儿食品中营养强化剂使用问题的请示》(浙卫[2006]18号)收悉。经研究,现批复如下:
《食品营养强化剂使用卫生标准》(GB 14880—1994)矿物质类备注栏中列出的乳酸亚铁等13类铁盐均可作为铁源在婴幼儿食品中使用,强化量(以铁元素计)为60~100 mg/kg。
此复。

卫生部
二 六年六月七日