

豆腐(豆浆)中屎肠球菌生长的温度预测模型

李 博¹ 李里特¹ 辰巳英三² 李再贵¹

(1. 中国农业大学 食品科学与营养工程学院,北京 100083; 2. 日本国农林水产省国际农林水产业研究中心)

摘 要 采用预测食品微生物学的方法研究了豆腐(豆浆)中主要腐败微生物屎肠球菌的生长规律,建立了屎肠球菌在豆浆培养基中的初级和二级预测模型,研究了0~55℃ 屎肠球菌的生长曲线。结果表明,在适温阶段屎肠球菌的生长曲线呈典型的S形,适合用 Gompertz 模型拟合;当温度接近最低生长温度和最高生长温度时,适合用线性回归方程拟合。屎肠球菌在豆浆中生长的温度模型符合 Ratkowsky³ 式。根据预测模型,屎肠球菌的最低生长温度为 4.8℃,最高生长温度为 54.6℃,最适生长温度为 41℃。对模型进行了验证。

关键词 预测模型; 屎肠球菌; 豆腐; 生长模型

中图分类号 TS 201.3; TS 214.2

文章编号 1007-4333(2003)02-0049-06

文献标识码 A

Predictive model for effect of temperature on the growth of *E. faecium* in tofu (soymilk)

Li Bo¹, Li Lite¹, Tatsumi Eizo², Li Zaigui¹

(1. College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries)

Abstract The growth characteristics of the major spoilage bacteria in tofu - *E. faecium* was studied by using the method of predictive microbiology. And predictive models for the growth curves and the effects of temperature on growth of microorganism were established. Growth curves were fitted by using the model of Logistic, Gompertz and Monod functions, and specific growth rates derived from the curve fitting were modeled. The experiment results were as follows: A study to build mathematical models that predict the growth of *E. faecium* in soymilk (tofu) was carried out. Growth curves were obtained at 0 - 55℃. The Gompertz model were found to fit with representation of experimental curves which are typical sigmoidal at 10 - 50℃. The Monod function were found to fit with the experimental curve at below 10℃ or above 50℃. The variations of growth rate with temperature were modeled. Data processing of the model has shown that the minimum growth temperature for *E. faecium* is 4.8℃, the maximum growth temperature is 54.6℃ and the optimal growth temperature is 41℃. The validity of the predictive model was evaluated under controlled laboratory conditions using soymilk.

Key words predictive modeling; *Enterococcus faecium*; tofu; growth model

豆腐是我国的传统食品。随着大豆营养价值和保健功能的新发现^[1~3],近年来美国和日本等国的豆腐行业有了突飞猛进的发展^[4,5]。然而在我国,由于豆腐的保质期短,制约了豆腐的生产和销售,从而制约了豆制品行业的发展。

经笔者鉴定,豆腐的腐败主要是由屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)和芽孢杆菌等微生物导致

的。屎肠球菌来源于大豆原料,是导致 GDL(葡萄糖醛酸- γ -内酯)豆腐迅速腐败的主要微生物,因此研究屎肠球菌的生长规律,找出抑制屎肠球菌生长的关键栅栏因子,对延长豆腐保质期具有重要意义。

国内外关于屎肠球菌生长模型的研究较少,B. Zanolini^[6]等人研究了意大利 Bolobna 香肠中屎肠球菌生长的温度预测模型。温度是影响微生物生长的

收稿日期:2002-06-07

基金项目:中日国际合作项目

作者简介:李 博,博士,副教授,主要从事食品安全和食品中微生物的研究。

最重要的因素之一,一些温度单因素的模型也能和食品中微生物生长数据相吻合^[7]。本文中着重研究了温度对屎肠球菌生长的影响,建立了豆腐中屎肠球菌的温度模型。

用于预测微生物生长速率的数学模型^[8~15]可分为 2 大类:一类是多项式数学模型,即把试验数据直接用多项式进行回归;另一类是通用的模型。本文中对 0~55 ℃ 屎肠球菌的生长规律进行了试验研究,使用通用数学模型对试验数据进行回归,在此基础上建立了屎肠球菌在豆浆中生长的初级和二级预测模型。

1 试验材料与方法

1.1 试验材料

大豆,科丰 6 号(1999 年产),购自农科院种子所;屎肠球菌菌株(*Enterococcus faecium*) E. f. 农大 927,由白玉豆腐中分离、纯化,在使用前从营养肉汤中接种到灭菌后的豆浆培养基中,4~8 ℃ 贮存。

1.2 试验药品与设备

试验药品。营养琼脂(生化试剂),北京双旋微生物培养基制品厂生产;氯化钠、盐酸、氢氧化钠(分析纯),北京化工厂生产。

仪器设备。通电加热装置,本试验室自制;电热自控立式压力蒸汽灭菌器 YMQ.L31.400,北京将台医疗设备厂生产;移液器 Gilson,法国产;电热恒温水浴箱 DGSY GB11240-89,购于北京医疗设备意成公司;电热恒温培养箱 HH.B11.600,上海跃进医疗器械厂生产;低温培养箱 IL600,日本产;pH 值测定仪 F-23,日本产。

1.3 试验方法

1) 菌种的活化。

使用前,将屎肠球菌接种在豆浆培养基(含水率 92.1%)中,37 ℃ 培养 12 h,此时屎肠球菌处在稳定期。

2) 培养基的制备。

a. 豆浆培养基。豆浆试样的制做步骤如下:

大豆去杂 清洗 浸泡 磨浆 滤浆 煮浆 冷却 灭菌 备用(4~8 ℃)

将大豆剔去残豆和杂质,用自来水漂洗 3 次,然后用 3 倍于干豆质量的自来水浸泡大豆,室温(约 20 ℃)下浸泡 10~12 h。浸泡后的大豆(吸水量约为 1.2 倍)用多用食品打浆机打浆,加水量为干豆质量的 7 倍。间歇打浆 3 次,每次 1 min。用 300 目滤

布过滤,滤液用通电加热法煮沸后保持 5 min,立即在冰水中冷却直至 10 ℃ 以下。每个三角瓶(150 或 200 mL)内准确量取 100 mL 豆浆,2~4 h 内用蒸汽压力灭菌器灭菌,121 ℃,20 min。冷却后放在 4~8 ℃ 冰箱内备用。

b. 无菌生理盐水的制备。称取氯化钠,用蒸馏水配制成 0.85% 的生理盐水,在 121 ℃ 下杀菌 20 min,取出冷却备用。

3) 采用平板计数法计数。

4) 0~55 ℃ 屎肠球菌生长曲线的测定。

屎肠球菌生长曲线的测定方法:试验开始前,将豆浆培养基放在同一温度的培养箱或水浴锅中平衡一段时间。用无菌生理盐水对菌种进行适当稀释,初始细菌浓度控制在 $10^3 \sim 10^4$ cfu·mL⁻¹。无菌条件下移取 1 mL 菌种到 100 mL 豆浆培养基中,充分混合后分装到带塞玻璃试管中。测定管内初始菌数。将各试样放在生化培养箱中,每隔一定时间取出一支试管,用平板计数法测定菌落数。通常每条生长曲线测定 9~12 个点,测定终止时屎肠球菌至少繁殖 1 000 倍以上。

将活化的屎肠球菌菌种接种到豆浆培养基中,放入培养箱中培养,培养温度分别为 0,4(±1),5,10,14,19,22,25,28,32,36,37,38,40,45,50,55 ℃。测定屎肠球菌在不同温度下的生长曲线,每个试验重复 2 次,数据取平均值。

培养温度在 25 ℃ 以上(含 25 ℃)使用电热恒温培养箱,25 ℃ 以下时使用低温培养箱。电热恒温培养箱温度波动 ±0.5 ℃,低温培养箱温度波动 ±0.1 ℃,4 ℃ 培养时,低温培养箱受气温的影响温度波动在 ±1 ℃。

2 试验结果与分析

2.1 屎肠球菌生长曲线模型的确定

分别用 Logistic 和 Gompertz 方程拟合的 36 屎肠球菌的生长曲线见图 1。用 Logistic 方程, Gompertz 方程以及 Linear 方程对 0~55 ℃ 屎肠球菌的生长曲线进行回归,结果见表 1。表中对 3 种模型的相关指数 R^2 (或相关系数 r^2) 和剩余均方差(MSE)进行了比较。

从表 1 可以看出,在 10~50 ℃,除 14 ℃ 时屎肠球菌生长曲线不能用 Logistic 方程拟合以外,其余都能用 Logistic 方程和 Gompertz 方程拟合,且相关指数都在 0.97 以上。在 5 ℃ 或 55 ℃ 时, Gompertz 模

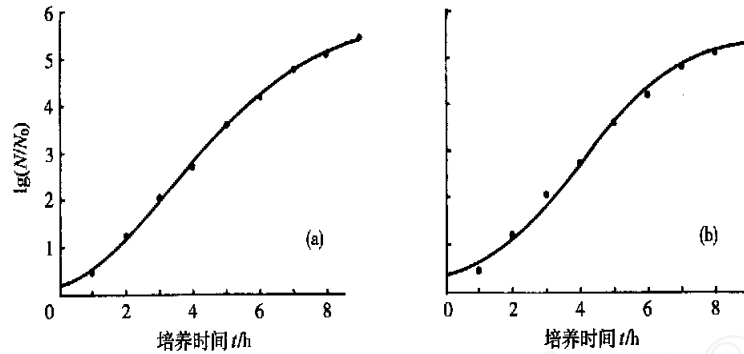


图 1 Gompertz 方程(a)和 Logistic 方程(b)拟合的屎肠球菌生长曲线(36)

Fig. 1 Growth curves of *E. faecium* fitted with Gompertz(a) and Logistic(b) models at 36

表 1 屎肠球菌生长曲线的统计分析

Table 1 Statistical-analytical data for growth curves of *E. faecium*

培养温度 /	相关指数 R^2			剩余均方差		
	Gomp.	Logis.	linear	Gomp.	Logis.	linear
0	—	—	0.903 7	—	—	0.001 92
4	—	—	0.990 5	—	—	0.004 14
5	—	0.702 4	0.669 9	—	0.011 70	0.011 68
10	0.977 1	0.970 5	0.972 2	0.131 29	0.168 92	0.126 24
14	0.983 2	—	0.991 0	0.063 59	—	0.030 12
19	0.987 2	0.977 0	0.922 1	0.031 97	0.057 16	0.172 36
22	0.984 5	0.977 3	0.973 2	0.065 36	0.095 85	0.100 72
25	0.997 1	0.989 6	0.987 9	0.016 88	0.060 46	0.061 65
28	0.986 9	0.974 2	0.959 9	0.037 04	0.073 11	0.099 69
32	0.995 3	0.994 0	0.973 7	0.015 52	0.019 95	0.076 29
36	0.998 1	0.992 5	0.985 5	0.009 67	0.037 41	0.063 25
38	0.985 5	0.985 4	0.970 2	0.055 15	0.055 65	0.099 48
40	0.987 9	0.987 9	0.970 7	0.055 27	0.055 29	0.116 75
45	0.993 3	0.988 4	0.970 2	0.026 34	0.045 82	0.094 34
50	0.983 4	0.976 2	0.968 4	0.055 87	0.079 84	0.092 77
55	—	0.796 6	0.949 1	—	0.253 29	0.047 50

型不适合所有曲线;Logistic 方程只有一半曲线能够拟合,且相关指数低于 0.80;linear 方程相关指数大部分都在 0.90 以上。

总的说来,在屎肠球菌适宜生长温度范围内,对于同一条生长曲线,Gompertz 模型拟合的相关指数大于 Logistic 方程,Logistic 方程的相关指数又大于 linear 方程;从剩余均方差来看,Gompertz 模型的最小,Logistic 方程的次之,linear 方程的最大。由此可见,在 10~50 ,Gompertz 模型对屎肠球菌生长曲线的拟合度最高,在微生物生长缓慢或出现负增长时,使用 linear 方程更合适。

根据屎肠球菌的生长情况,将温度分为 3 个阶

段:低温阶段(0~10),适温阶段(10~40 或 50)和高温阶段(最高生长温度及以上)。在适温阶段,用 Gompertz 模型拟合生长曲线数据;在低温阶段和高温阶段,由于微生物生长极为缓慢甚至不生长或负增长,因此生长曲线不具有 S 形的特点,宜用 linear 方程拟合。

表 2 中给出了用 3 种回归模型计算出的屎肠球菌的迟滞期、最大生长速率 μ_m 以及相对最大细菌浓度 A 。在各种模型的回归中,用 Gompertz 模型计算出的迟滞期和最大生长速率 μ_m (以下简称生长速率)要比 Logistic 方程得出的数值稍小,但是 F 检验法结果显示,2 个模型所得结果并无显著差异

表 2 由 Gompertz, Logistic 和 Linear 方程得到的屎肠球菌生长参数

Table 2 Values of parameters A , μ_m and of *E. faecium* obtained from the Gompertz, Logistic and Linear regression functions, respectively

培养温度 T /	迟滞期 /h		$\lg[\mu_m/(\text{cfu} \cdot \text{h}^{-1})]$			$\lg[A/(\text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1})]$	
	Gomp.	Logis.	Gomp.	Logis.	Linear	Gomp.	Logis.
0*	—	—	—	—	-0.01	—	—
4*	—	—	—	—	-0.04	—	—
5*	—	49.97	—	0.19	0.01	—	14.23
10*	2.23	2.88	0.55	0.61	0.42	6.57	5.72
14	3.97	—	0.10	—	0.09	7.38	—
19	3.96	4.75	0.24	0.26	0.11	3.41	3.32
22	4.89	5.94	0.30	0.36	0.19	4.47	4.14
25	2.20	3.08	0.47	0.53	0.36	7.67	6.93
28	2.50	2.76	0.52	0.53	0.32	3.77	3.57
32	1.80	2.11	0.75	0.82	0.52	4.70	4.22
36	0.79	1.10	0.87	0.93	0.65	5.98	5.45
38	1.55	1.97	0.70	0.78	0.56	6.43	5.18
40	1.69	2.08	0.82	0.91	0.61	5.85	5.16
45	2.24	2.33	0.88	0.92	0.61	10.35	5.95
50	2.75	3.31	0.45	0.48	0.32	4.66	4.27
55	—	3.78	—	-0.03	-0.04	—	-1.58

注: *所用时间单位为 d。

($\alpha = 0.05$)。由 Linear 方程得到的 μ_m 最小,这是受迟滞期和稳定期影响所致。

采用 t 检验法,计算出参数迟滞期和生长速率 μ_m 的 95% 的置信区间,如图 2 所示。的置信区间较大, μ_m 的较小,这表明在细菌生长的迟滞期内,数据的采集量较少。迟滞期随温度 T 的变化几乎没有规律性,这是因为受很多因素的影响,如试验数据很大程度上受所选择的计数时间的影

响,当微生物接种到新的环境中时,前期培养基的条件也能对其产生显著影响,此外,的定义,曲线所用的拟合模型等等都会影响其大小。试验结果表明,迟滞期的估计总的说来比生长速率 μ_m 的重复性要差,因此,在选择食品微生物生长预测模型时主要运用 2 个标准,一是代时(或生长速率),一是微生物数量发生特定变化的时间,如 1 000 倍增长时间。

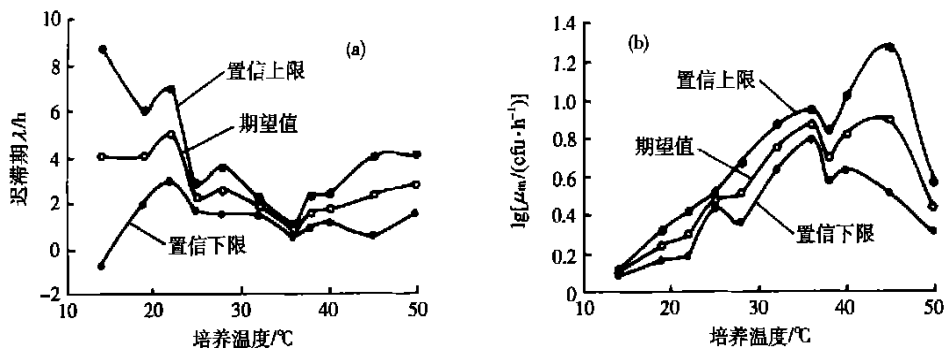


图 2 Gompertz 模型导出的屎肠球菌迟滞期 (a) 和生长速率 μ_m (b) 的 95% 的置信区间

Fig. 2 95% confidence intervals of lag times (a) and growth rates (b) of *E. faecium* fitted with Gompertz model

0~55 时屎肠球菌的迟滞期和生长速率 μ_m 见表 2。5 时屎肠球菌生长缓慢(5, 培养 28 d), $\lg[\mu_m/(\text{cfu} \cdot \text{d}^{-1})]$ 为 0.01; 55 时细菌总数缓慢下

降(55, 培养 64.5 h), $\lg[\mu_m/(\text{cfu} \cdot \text{h}^{-1})]$ 为 -0.03。因此屎肠球菌的最低生长温度为 4~5, 最高生长温度为 54~55。

10~50 屎肠球菌迟滞期 与培养温度 T 密切相关。10 时 长达 64 h, 10~20 时 在 4 h 以上, 而 30~40 时, 仅在 2 h 以内。总的来说随 T 的升高而急剧下降, 越长, μ_m 越低。 μ_m 与 T 的关系见图 3, μ_m 随 T 的上升逐渐增大, 达到最适温度后迅速下降, 显示了一个特征的不对称的铃形趋势, 曲线适合用 Ratkowsky3 式数学模型拟合。表 3 示出屎肠球菌在豆浆中生长的预测模型和特征参数。

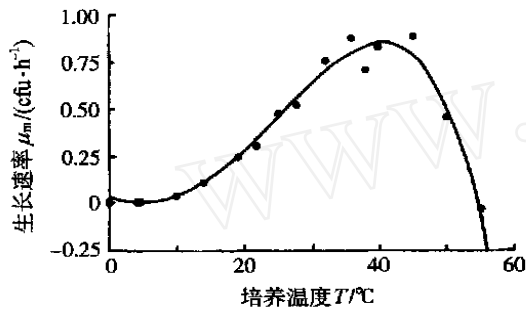


图 3 不同温度下屎肠球菌生长速率 μ_m 的试验数据和拟合曲线

Fig. 3 Data of the growth rates of *E. faecium* modeled by Ratkowsky and the fitting curves

表 3 豆浆中屎肠球菌生长的温度预测模型和特征参数

Table 3 Models and characteristic parameters used for predicting growth of *E. faecium* in soy milk

Ratkowsky 模型	$k = [b(T - T_{min})]^2 \cdot [1 - \exp\{c(T - T_{max})\}]$
参 数	$b = 0.0413, c = 0.0365,$ $T_{min} = 4.8469, T_{max} = 54.5660$

由预测模型估计的屎肠球菌最低生长温度为 4.8, 最高生长温度为 54.6, 最适生长温度为 41。其最高和最低生长温度与实测值相近, 而最适生长温度高于实测值, 这是因为在 40 以上的温度范围所取的试验点太少; 最适温度的预测值与文献资料相近^[3]。

由图 3 可以看出, 屎肠球菌的生长曲线适合 Gompertz 模型, 其培养温度 T 与生长速率 μ_m 的关系适合 Ratkowsky3 式, 这 2 个模型能够充分预测屎肠球菌在豆浆中的生长规律, 因此可以用于预测豆腐、豆浆加工和贮藏过程中微生物的变化, 指导豆腐、豆浆的加工和贮藏。

10~50 屎肠球菌的代生时间和 1 000 倍增长时间见图 4。10 时, 屎肠球菌代生时间为 13 h,

1 000 倍增长时间为 5 d, 由此可以推测, 10 贮藏时豆浆货架期最长可达 7 d。22 以下, 1 000 倍增长时间超过 10 h, 而当环境温度高于 30 时, 1 000 倍增长时间不超过 5 h, 故此时存储时间不会超过 1 d, 这与夏季豆腐、豆浆的保质期一致; 因此, 豆腐、豆浆中有屎肠球菌存在时, 贮藏温度是影响保质期的决定性因素, 只有在低温下贮藏产品才不会迅速腐败变质。可以推测, 当豆腐、豆浆在 4 贮藏时保质期可达数月之久, 这与试验结果相符。

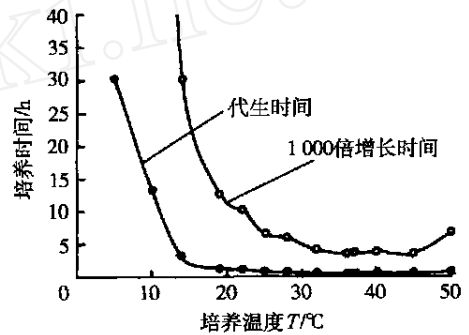


图 4 培养温度对屎肠球菌代生时间和 1 000 倍增长时间的影响

Fig. 4 Effect of temperature on the generation time and 1 000-fold time of *E. faecium*

2.2 温度模型的验证

对屎肠球菌温度模型的可信性在实验室条件下进行了评估, 屎肠球菌生长速率平方根 $\sqrt{\mu_m}$ 的残差 ($\sqrt{\mu_{m, 预测}} - \sqrt{\mu_{m, 实测}}$) 见图 5。可以看出, $\sqrt{\mu_m}$ 的残差几乎都在 ± 0.05 的范围内, 只有一个例外; 因此可认为预测模型在 $\alpha = 0.05$ 的水平上是可信的。代生时间的预测值与实测值的比较见图 6, 可以看出, 各点分布在对角线附近, 10 时代生时间的实测值比预测值要大, 而在适温阶段, 二者无显著差

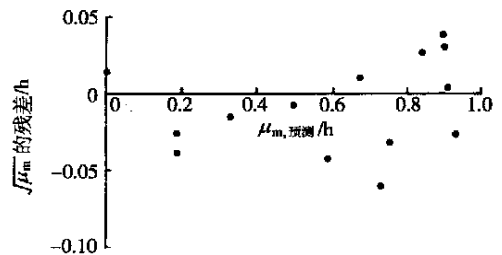


图 5 豆浆中屎肠球菌生长速率平方根 $\sqrt{\mu_m}$ 的残差分析图

Fig. 5 The residual graphs ($\sqrt{\mu_m}$ pre. - $\sqrt{\mu_m}$ obs): the comparison of the growth of *E. faecium* and prediction model

别。从以上分析可以看出,尿肠球菌温度模型预测的生长速率是准确的。

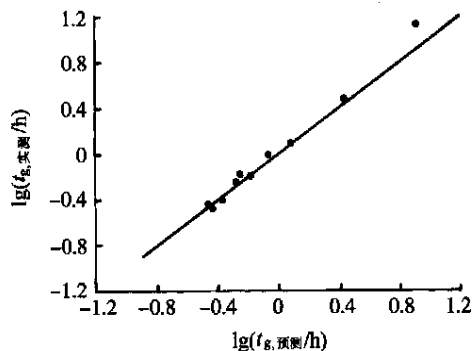


图 6 豆浆中尿肠球菌代生时间的实测值 $t_{g, \text{实测}}$ 与模型预测值 $t_{g, \text{预测}}$

Fig. 6 $\lg(t_{g, \text{observed}})$ versus $\lg(t_{g, \text{predicted}})$ for comparisons of the growth responses of *E. faecium* in soy milk compared to the model

3 结 论

1) 研究了 0~55 尿肠球菌的生长曲线,结果表明,在适温阶段尿肠球菌的生长曲线呈典型的 S 形,适合用 Gompertz 模型拟合;当温度接近最低生长温度和最高生长温度时,适合用线性回归方程拟合。

2) 建立了尿肠球菌在豆浆中生长的温度预测模型。根据预测模型,尿肠球菌的最低生长温度为 4.8,最高生长温度为 54.6,最适生长温度为 41。验证试验结果表明模型是充分可信的。

参 考 文 献

- [1] 李里特,刘志胜.大豆蛋白营养品质和生理功能研究进展[J].中国食物与营养,1999,4:21~23
- [2] 刘志胜,李里特,辰巳英三.大豆异黄酮及其生理功能研究进展[J].食品工业科技,2000(1):78~80
- [3] Kuhn M E. Soy in the spotlight[J]. Food Processing, 1996,5:52~58
- [4] Kevin K. Tofu comes of age[J]. Food Processing, 1994,7:81~82
- [5] U. S. Department of Agriculture. World markets and trade[J]. Soil Seeds, 1997(7):11
- [6] Zanoni. Modeling the Growth of *Enterococcus faecium* in Bologna Sausage[J]. Appl Environ Microbiol, 1993,59:3411~3417.
- [7] Hobbs B C. *Clostridium perfringens* and *Bacillus cereus* infections[M]. New York and London: Academic Press, 1969:65~70
- [8] Baker Genigeorgis. Predicting the safe storage of fresh fish under modified atmospheres with respect to *Clostridium botulinum* toxigenesis by modeling length of the lag phase[J]. J Food Protect, 1990,53:131~140
- [9] Gibson. Predicting microbial growth: growth responses of *Salmonellae* in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature[J]. Int J Food Microbiol, 1988,6:155~178
- [10] Mackey B M, Kerridge A L. The effect of incubation temperature and inoculums size on growth of *Salmonellae* in minced beef[J]. Int J Food Microbiol, 1998,6:57~65
- [11] Fu B, Taoukis P S, Labuza T P. Predictive microbiology for monitoring spoilage of dairy products with time-temperature integrators[J]. J Food Sci, 1991,56:1209~1215
- [12] Ratkowsky D A, Lowry R K, McMeekin T A, et al. Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range [J]. J Bacteriol, 1983,154:1222~1226
- [13] Ratkowsky D A, Olley T A, Ball A. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures [J]. J Bacteriol, 1982,149:1~5
- [14] Zwietering. Modeling of the bacterial growth curve[J]. Applied and Environmental Microbiol, 1990,6:1875~1881