

# 二氧化碳联合益生菌对猪肉中单增李斯特菌抑制模型的建立

张文敏<sup>\*1</sup>, 董庆利<sup>\*2</sup>, 刘阳泰<sup>2</sup>, 辛宝<sup>1</sup>, 钱文文<sup>1</sup>, 任晓梅<sup>1</sup>, 马欣悦<sup>1</sup>

1 陕西中医药大学公共卫生学院, 陕西 咸阳 712046

2 上海理工大学健康科学与工程学院, 上海 200093

张文敏, 董庆利, 刘阳泰, 辛宝, 钱文文, 任晓梅, 马欣悦. 二氧化碳联合益生菌对猪肉中单增李斯特菌抑制模型的建立[J]. 微生物学通报, 2024, 51(3): 910-920.

ZHANG Wenmin, DONG Qingli, LIU Yangtai, XIN Bao, QIAN Wenwen, REN Xiaomei, MA Xinyue. Modeling for the inhibition of CO<sub>2</sub> combined with probiotic on *Listeria monocytogenes* in pork[J]. Microbiology China, 2024, 51(3): 910-920.

**摘要:** 【背景】由单增李斯特菌导致的猪肉食用安全问题不仅给消费者带来极大的食用风险, 也给食品加工业造成巨大的经济损失。加强对猪肉制品中单增李斯特菌致病力的控制可有效遏制社会公共卫生问题的发生。【目的】基于预测微生物学方法研究二氧化碳(CO<sub>2</sub>)联合植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) (CO<sub>2</sub>-LP)对猪肉中单增李斯特菌生长特性的影响, 筛选出CO<sub>2</sub>-LP抑制单增李斯特菌生长的最优组合。【方法】应用Jameson-effect模型描述CO<sub>2</sub>-LP对猪肉中单增李斯特菌的抑制影响, 并且分析该联合处理对单增李斯特菌生长动力学参数迟滞时间( $\lambda$ )、最大比生长速率( $\mu_{\max}$ )和最大污染浓度( $N_{\max}$ )的影响。【结果】构建的Jameson-effect模型能够很好地描述CO<sub>2</sub>-LP对单增李斯特菌的抑制作用。CO<sub>2</sub>-LP处理可延长单增李斯特菌的 $\lambda$ , 同时降低 $\mu_{\max}$ 和 $N_{\max}$ ; 并且CO<sub>2</sub>浓度越高, 抑制作用越强。与对照组相比, 80% CO<sub>2</sub>-LP处理可将猪肉中单增李斯特菌的 $\lambda$ 延长0.87倍,  $\mu_{\max}$ 降低47%,  $N_{\max}$ 降低2.05 lg (CFU/g)。虽然80% CO<sub>2</sub>-LP的抑菌效果最好, 但考虑到需要在气调包装中充入N<sub>2</sub>以维持包装结构稳定, 研究选择60% CO<sub>2</sub>-LP为最优组合。与对照组相比, 60% CO<sub>2</sub>-LP可将单增李斯特菌的 $\lambda$ 延长0.81倍,  $\mu_{\max}$ 降低33%,  $N_{\max}$ 降低1.83 lg (CFU/g)。【结论】CO<sub>2</sub>-LP处理能够从不同方面抑制单增李斯特菌的生长, 体现了栅栏技术的优势。

**关键词:** CO<sub>2</sub>; 益生菌; 联合; 抑制模型; 单增李斯特菌

资助项目: 陕西中医药大学博士科研启动基金(303-124020069); 陕西省科技厅一般项目(2024JC-YBQN-0236)

This work was supported by the Start-up Fund for Scientific Research of Doctor of Shaanxi University of Chinese Medicine (303-124020069) and the General Project of Department of Science and Technology of Shaanxi Province (2024JC-YBQN-0236).

\*Corresponding authors. E-mail: ZHANG Wenmin, zwenmin0309@163.com; DONG Qingli, dongqingli@126.com

Received: 2023-03-14; Accepted: 2023-06-21; Published online: 2023-12-18

## Modeling for the inhibition of CO<sub>2</sub> combined with probiotic on *Listeria monocytogenes* in pork

ZHANG Wenmin<sup>\*1</sup>, DONG Qingli<sup>\*2</sup>, LIU Yangtai<sup>2</sup>, XIN Bao<sup>1</sup>, QIAN Wenwen<sup>1</sup>, REN Xiaomei<sup>1</sup>, MA Xinyue<sup>1</sup>

1 School of Public Health, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, Shaanxi, China

2 School of Health Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China

**Abstract: [Background]** The pork safety problem caused by *Listeria monocytogenes* not only brings great consumption risks to consumers but also causes huge economic losses to the food processing industry. The virulence of *Listeria monocytogenes* in pork products should be controlled to curb the occurrence of public health events. **[Objective]** To explore the inhibitory effect of CO<sub>2</sub> combined with the probiotic *Lactobacillus plantarum* (CO<sub>2</sub>-LP) on *L. monocytogenes* in pork by the method of predictive microbiology and determine the optimal combination of CO<sub>2</sub>-LP. **[Methods]** The Jameson-effect model was employed to establish the growth curves of *L. monocytogenes* in pork samples treated with CO<sub>2</sub>-LP, and the kinetic parameters including lag phase ( $\lambda$ ), maximal growth rate ( $\mu_{\max}$ ), and maximum population density ( $N_{\max}$ ) were determined. **[Results]** The inhibitory effect of CO<sub>2</sub>-LP was well fitted by the Jameson-effect model. CO<sub>2</sub>-LP treatment prolonged the  $\lambda$  and reduced the  $\mu_{\max}$  and  $N_{\max}$  of *L. monocytogenes*. Moreover, the inhibitory effect of CO<sub>2</sub>-LP enhanced as the CO<sub>2</sub> concentration increased. Compared with the control group, the 80% CO<sub>2</sub>-LP treatment increased the  $\lambda$  by 0.87 fold and decreased the  $\mu_{\max}$  and  $N_{\max}$  by 47% and 2.05 lg (CFU/g), respectively. Although 80% CO<sub>2</sub>-LP had the best inhibitory effect, the 60% CO<sub>2</sub>-LP was selected as the optimal treatment, because the presence of N<sub>2</sub> could prevent pack collapse in modified atmosphere packaging. Compared with the control group, 60% CO<sub>2</sub>-LP treatment increased the  $\lambda$  by 0.81 fold and decreased the  $\mu_{\max}$  and  $N_{\max}$  by 33% and 1.83 lg (CFU/g), respectively. **[Conclusion]** CO<sub>2</sub>-LP treatment inhibited the growth of *L. monocytogenes* in pork from different aspects, which reflected the advantages of hurdle technology.

**Keywords:** CO<sub>2</sub>; probiotic; combination; model of inhibition; *Listeria monocytogenes*

猪肉营养丰富, 极易被单增李斯特菌污染。动物和人类在摄入一定剂量的单增李斯特菌后会患李斯特菌病。由单增李斯特菌导致的食物安全问题不仅给消费者带来极大的食用风险, 也给食品加工工业造成巨大的经济损失。应用“栅栏技术”可以从不同方面控制单增李斯特菌, 从而提高猪肉的微生物安全。

CO<sub>2</sub> 气体是一种化学栅栏因子, 可通过降低细菌的胞内 pH 值、降低细菌摄入新陈代谢所需物质的速率、抑制细菌抗性和毒性基因的表达、

改变细菌的细胞膜结构等多种途径抑制有害菌的生长繁殖<sup>[1]</sup>。乳酸菌是一种生物抑菌剂, 可通过细胞间的直接接触、营养竞争或者产生抑菌代谢产物抑制细菌生长<sup>[2]</sup>。目前, 已有研究将 CO<sub>2</sub> 气调包装 (CO<sub>2</sub> modified atmosphere packaging, CO<sub>2</sub>-MAP) 和乳酸菌结合起来控制肉品中的单增李斯特菌, 如 Melero 等<sup>[3]</sup> 在鸡肉汉堡表面涂抹乳酸菌后再进行气调包装, 发现鸡肉汉堡的货架期相较于无处理组延长了一倍, 并且降低了单增李斯特菌的浓度。Costa 等<sup>[4]</sup> 将产细菌素的乳酸

菌添加到 CO<sub>2</sub>-MAP 鱼肉中抑制单增李斯特菌的生长,取得了良好的抑制效果。

先前的报道多集中于研究 CO<sub>2</sub>-MAP 联合乳酸菌对单增李斯特菌最大污染浓度( $N_{\max}$ )的影响<sup>[5-6]</sup>。致病菌在食品中能够达到的  $N_{\max}$  由致病菌的生长特性决定,而迟滞时间( $\lambda$ )、最大比生长速率( $\mu_{\max}$ )和  $N_{\max}$  等生长动力学参数是描述致病菌生长特性的重要指标。通过对致病菌的生长动态进行数学建模可以获得致病菌的生长动力学参数。近些年来,两菌交互模型如 Jameson-effect 描述性模型和 Lotkae-Volterra 机理性模型已经被广泛应用到预测微生物学领域<sup>[7-10]</sup>。机理性模型将微生物整个生长阶段中环境动态变化(如 pH 值和营养物质变化)及微生物之间的交互机制(如乳酸菌产生细菌素抑制单增李斯特菌)考虑进去<sup>[8]</sup>,能够很好地描述微生物间相互影响过程。

因此,本研究应用 Jameson-effect 模型建立了 CO<sub>2</sub>-MAP 联合乳酸菌对猪肉中单增李斯特菌的抑制模型,并且基于预测微生物学方法分析该联合处理对单增李斯特菌生长动力学参数  $\lambda$ 、 $\mu_{\max}$  和  $N_{\max}$  的影响,以期 CO<sub>2</sub>-MAP 联合乳酸菌处理应用于猪肉安全控制作出准确、科学的评估和预测。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌种

本试验所用单增李斯特菌(ATCC 13932, 血清型 4b)由本实验室保藏。植物乳杆菌 CICC 6257 为益生菌,购自中国工业微生物菌种保藏管理中心(<http://www.china-cicc.org/>)。

### 1.2 培养基、主要试剂和仪器

乳杆菌和单增李斯特菌活化所用培养基为营养肉汤培养基(brain heart infusion broth, BHIB),乳杆菌的选择性增菌培养基为 MRS 肉汤培养基(MRS broth, MRSB),单增李斯特菌的选择性增菌培养基为 TSB-YE 培养基,用于乳杆

菌和单增李斯特菌分离计数的培养基分别为 MRS 琼脂(MRS agar, MRSA)和 PALCAM 琼脂,培养基购自青岛海博生物技术有限公司。气调保鲜盒、气调保鲜膜和气调包装机购自苏州市凯康机械设备有限公司。无菌均质购自 Interscience 公司。

### 1.3 细菌培养和接种液制备

单增李斯特菌和乳杆菌接种液的制备过程为:试验前一天,用灭菌的接种环分别从 4 °C 冰箱保存的 TSA-YE 和 MRSA 培养基上挑取一株菌苔,分别接种于 100 mL BHIB 培养基中。单增李斯特菌在 37 °C、110 r/min 培养 18 h,乳杆菌在 37 °C 培养箱中静置培养 18 h,使细菌生长到稳定期。然后,分别取 10 mL 单增李斯特菌和乳杆菌的菌悬液于 4 °C、8 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,菌体分别用 10 mL 无菌生理盐水重悬,重复 2 次。最后用无菌生理盐水分别将单增李斯特菌和乳杆菌菌液稀释到 10<sup>4</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>6</sup> 和 10<sup>7</sup> CFU/mL 备用。

### 1.4 猪肉接种

在生物安全柜中称取已灭菌的猪肉 25 g/份(共 80 份),分装在无菌均质袋中,每份猪肉各接种 1 mL 乳杆菌和单增李斯特菌。将接种了菌液的猪肉用无菌均质机正反面各拍打 2 min,使菌液在猪肉中均匀分布。猪肉中乳杆菌和单增李斯特菌的初始接种浓度分别约为 10<sup>5</sup> CFU/g 和 10<sup>4</sup> CFU/g,确切初始接种量用平板计数法确认。取 2 份猪肉接种 2 mL 无菌生理盐水作为阴性对照组。

### 1.5 气调包装、贮藏及微生物计数

在生物安全柜中,将接种了乳杆菌和单增李斯特菌混合菌液的猪肉从无菌均质袋中转移到已经预先紫外辐照杀菌的气调保鲜盒中。将气调保鲜盒随机分成 4 组(每组 20 份样品),按表 1 中的气体配比进行气调包装。阴性对照组进行无菌空气包装。

表 1 气调包装中的气体配比  
Table 1 Gas compositions within packages

Groups	Gas composition (%)		
	CO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>
20% CO <sub>2</sub> -LP	20	20	60
40% CO <sub>2</sub> -LP	40	20	40
60% CO <sub>2</sub> -LP	60	20	20
80% CO <sub>2</sub> -LP	80	20	0

乳杆菌结合 20% CO<sub>2</sub>-MAP、40% CO<sub>2</sub>-MAP、60% CO<sub>2</sub>-MAP 和 80% CO<sub>2</sub>-MAP 气调包装处理的猪肉分别简称为：20% CO<sub>2</sub>-LP 组、40% CO<sub>2</sub>-LP 组、60% CO<sub>2</sub>-LP 组和 80% CO<sub>2</sub>-LP 组。将每组猪肉放置在 13 °C 恒温培养箱中培养，模拟“温度滥用(abuse temperature)”条件下猪肉中单增李斯特菌的生长情况。

### 1.6 微生物计数

在猪肉储存过程中，每隔适宜时间取样对乳杆菌和单增李斯特菌进行计数。取样时间间隔由预试验结果确定，CO<sub>2</sub> 浓度越高，取样间隔时间越长。计数方法为：

在无菌条件下，将气调保鲜盒中的猪肉转移到含有 225 mL 无菌生理盐水的均质袋中，然后在均质机上拍打 2 min，使得细菌从猪肉中剥落，散落在匀浆中。用十倍稀释法进行梯度稀释，选择 2-3 个适宜稀释度的菌悬液，用移液枪分别吸取 100 μL 涂布在预先准备好的 PALCAM 和 MRSA 培养基上，待培养基晾干之后，放于 37 °C 培养箱中倒置培养 48 h，用细胞计数器进行计数。

### 1.7 一级模型的构建

一级模型使用 Baranyi 模型，所用 Baranyi 模型的表达式为<sup>[11]</sup>：

$$\begin{cases} Y(t) = Y_0 + A(t) - \ln\left[1 + \frac{\exp(\mu_{\max} A(t)) - 1}{\exp(Y_{\max} - Y_0)}\right] \\ A(t) = \mu_{\max} t + \ln[\exp(-\mu_{\max} t) + \exp(-h_0) - \exp(-\mu_{\max} t - h_0)] \\ h_0 = \mu_{\max} t_\lambda \end{cases} \quad (1)$$

公式(1)中， $Y_0$ 、 $Y_t$  和  $Y_{\max}$  分别为在初始时刻、 $t$  时刻和达到稳定期时的单增李斯特菌的浓度  $\ln(\text{CFU/g})$ ； $\mu_{\max}$  为最大比生长速率  $\ln(\text{CFU}/(\text{g}\cdot\text{h}))$ ； $t_\lambda$  为细菌生长的迟滞时间(h)。

### 1.8 二级模型的构建

用二项式模型拟合单增李斯特菌的  $\lambda$ 、 $\mu_{\max}$  和  $N_{\max}$  与环境条件的关系：

$$\lambda = a + b(\text{CO}_2\text{-LP}) + c(\text{CO}_2\text{-LP})^2 \quad (2)$$

$$\mu_{\max} = d + e(\text{CO}_2\text{-LP}) + f(\text{CO}_2\text{-LP})^2 \quad (3)$$

公式(2)和公式(3)中， $a$ 、 $b$ 、 $c$ 、 $d$ 、 $e$  和  $f$  为常数项。

### 1.9 抑制模型的构建

首先，应用传统的 Baranyi 模型拟合得到乳杆菌与单增李斯特菌共同培养时两菌的生长动力学参数；其次，将得到的两菌生长动力学参数应用到修正的 Jameson-effect 模型中，拟合得到抑制系数  $\gamma$  和  $N_{\max}$ ；最后，应用 MATLAB 软件模拟乳杆菌对单增李斯特菌的抑制作用图。修正的 Jameson-effect 模型见公式(4)<sup>[12]</sup>。

$$\begin{cases} \frac{dLm(t)}{dt} \frac{1}{Lm(t)} = \mu_{\max-Lm} \frac{q_{Lm}(t)}{1 + q_{Lm}(t)} \left(1 - \frac{Lm(t)}{N_{\max-Lm}}\right) \left(1 - \frac{\gamma \times Lp(t)}{N_{\max-Lp}}\right) \\ \frac{dq_{Lm}(t)}{dt} = \mu_{\max-Lm} \times q_{Lm}(t) \\ \frac{dLp(t)}{dt} \frac{1}{Lp(t)} = \mu_{\max-Lp} \frac{q_{Lp}(t)}{1 + q_{Lp}(t)} \left(1 - \left[\frac{N_{Lp}(t)}{N_{\max-Lp}}\right]\right) \left(1 - \frac{Lm(t)}{N_{\max-Lm}}\right) \\ \frac{dq_{Lp}(t)}{dt} = \mu_{\max-Lp} \times q_{Lp}(t) \\ \frac{dN(t)}{dt} \frac{1}{Lm(t)} = 0 \end{cases} \quad (4)$$

在公式(4)和公式(5)中， $\mu_{\max-Lm}$  和  $\mu_{\max-Lp}$  分别为单增李斯特菌和乳杆菌的最大比生长速率；

$Lm(t)$ 和  $Lp(t)$ 分别为单增李斯特菌和乳杆菌在  $t$  时刻的菌落对数值;  $q_{Lm}$  和  $q_{Lp}$  分别为单增李斯特菌和乳杆菌的生理状态;  $N_{max-Lm}$  和  $N_{max-Lp}$  分别为单增李斯特菌和乳杆菌的最大菌落浓度。乳杆菌达到最大浓度后,若  $\gamma < 1$ ,单增李斯特菌继续生长,单增李斯特菌浓度增加;若  $\gamma > 1$ ,单增李斯特菌的污染浓度降低;若  $\gamma = 1$ ,单增李斯特菌停止生长。

### 1.10 抑制模型的数学评价

应用准确因子  $A_f$ 、偏差因子  $B_f$ 和均方根误差  $RMSE$  对构建的抑制模型进行数学评价。 $A_f$ 、 $B_f$ 和  $RMSE$  的计算见公式(6)—(8)。

$$A_f = 10^{\left(\frac{\sum |\lg(N_p/N_o)|}{n}\right)} \quad (6)$$

$$B_f = 10^{\left(\frac{\sum \lg(N_p/N_o)}{n}\right)} \quad (7)$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum (N_o - N_p)^2}{n}} \quad (8)$$

公式(6)–(8)中,  $n$  为观察的数据点个数;  $N_p$  为预测值,  $N_o$  为观察值。

### 1.11 猪肉 pH 值测定

筛选出  $CO_2$ -LP 抑制单增李斯特菌的最优组合,评估该最优  $CO_2$ -LP 处理对猪肉 pH 值的影响。未经任何处理的猪肉作为对照组。

### 1.12 数据处理与统计分析

应用 Microsoft Excel 2010 软件将单增李斯特菌菌落数“CFU/g”转换为“lg (CFU/g)”。应用 Microrisk Lab 软件(<https://microrisklab.shinyapps.io/english/>)拟合单增李斯特菌和乳杆菌的一级生长模型,得到单增李斯特菌和乳杆菌的  $\lambda$  和  $\mu_{max}$ 。应用 MATLAB R2016a 软件(MathWorks 公司)构建乳杆菌对单增李斯特菌的抑制模型。每个试验至少 3 次独立重复,应用 SPSS17.0 软件(IBM 公司)进行数据显著性分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 $CO_2$ -LP 对单增李斯特菌的抑制作用

本研究涉及全程冷链运输模型,由于在运输过程中卡车货物摆放方式和制冷系统的差异等原因,虽然理论温度设置范围为 0–4 °C,但实际货物的中心温度可能达到 10 °C 甚至更高<sup>[13]</sup>,因此本研究选取一个较高的温度来研究  $CO_2$  联合益生菌对猪肉中单增李斯特菌的抑制特性,以达到高估风险的目的。

不同  $CO_2$ -LP 处理对单增李斯特菌的抑制情况见图 1。如图 1 所示,在贮存期间,与对照组相比,4 种  $CO_2$ -LP 处理条件下,单增李斯特菌的  $\lambda$  延长,  $\mu_{max}$  和  $N_{max}$  均减小;  $CO_2$  浓度越高,单增李斯特菌生长得越缓慢,生长到稳定期时  $N_{max}$  越低。研究表明  $CO_2$ -LP 处理可以延长单增李斯特菌的  $\lambda$ 、降低  $\mu_{max}$  和  $N_{max}$ ,体现了栅栏技术的优势。

目前将  $CO_2$ -MAP 联合其他抑菌措施抑制单增李斯特菌的报道较多。有综述<sup>[14–16]</sup>很好地总结了 MAP 肉及肉制品的研究进展,并指出将  $CO_2$ -MAP 联合其他栅栏因子共同使用来提高食品质量和加强食品安全是未来发展的趋势。Djenane

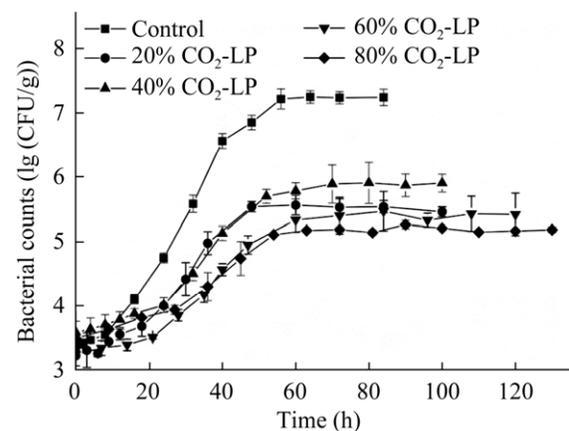


图 1 13 °C 储存时  $CO_2$ -LP 处理对猪肉中单增李斯特菌生长特性的影响

Figure 1 The inhibition effect of  $CO_2$ -LP on *Listeria monocytogenes* in pork at 13 °C.

等<sup>[17]</sup>将乳酸菌添加到 CO<sub>2</sub>-MAP 牛排中,发现单增李斯特菌的浓度降低了 2.5 lg (CFU/g)左右,并且这种联合处理对牛排的色泽、质构和 pH 值无负面影响。

先前的研究多集中于通过分析 CO<sub>2</sub>-MAP 联合乳酸菌对致病菌数量减少的影响来评估食品安全控制措施的有效性,未定量分析其对致病菌生长动力学参数  $\lambda$ 、 $\mu_{\max}$  和  $N_{\max}$  的影响。然而细菌的生长特性是由  $\lambda$ 、 $\mu_{\max}$  和  $N_{\max}$  三个参数共同影响的。因此十分有必要充分探究 CO<sub>2</sub>-MAP 和乳酸菌对单增李斯特菌  $\lambda$ 、 $\mu_{\max}$  和  $N_{\max}$  的影响。

### 2.2 CO<sub>2</sub>-LP 对猪肉中单增李斯特菌 $\lambda$ 、 $\mu_{\max}$ 和 $N_{\max}$ 的影响

用 Baranyi 模型拟合 CO<sub>2</sub>-LP 处理猪肉中乳杆菌和单增李斯特菌的生长曲线,得到乳杆菌和单增李斯特菌的生长动力学参数见表 2。如表 2 所示,对照组单增李斯特菌的  $\lambda$  为 10.68 h,  $\mu_{\max}$  为 0.089 lg (CFU/(g·h)),  $N_{\max}$  为 7.23 lg (CFU/g)。20% CO<sub>2</sub>-LP、40% CO<sub>2</sub>-LP、60% CO<sub>2</sub>-LP 和 80% CO<sub>2</sub>-LP 分别将单增李斯特菌的  $\lambda$  延长了 0.26、0.66、0.81 和 0.87 倍;  $\mu_{\max}$  降低了 18%、28%、33%和 47%;  $N_{\max}$  降低了 1.70、1.51、1.83 和 2.05 lg (CFU/g)。CO<sub>2</sub> 浓度达到 60%时可以显著 ( $P<0.05$ )延长单增李斯特菌的  $\lambda$ , 20% CO<sub>2</sub>-LP 能

显著 ( $P<0.05$ )降低单增李斯特菌的  $\mu_{\max}$  和  $N_{\max}$ 。

在食品加工和保藏过程中,仅靠一种防控措施很难达到理想的抑菌效果。一般是将多个不同的防控措施科学合理地组合起来综合控制有害菌<sup>[18]</sup>。CO<sub>2</sub> 在单增李斯特菌的迟滞期和生长期作用于单增李斯特菌细胞,导致细胞受损,当细胞处于损伤状态时,必须先自我修复至正常水平才能进行生长繁殖,因此单增李斯特菌生长变慢;当生长到稳定期的乳杆菌起到抑菌作用时,单增李斯特菌还处于较低浓度,最终导致 CO<sub>2</sub>-LP 处理条件下单增李斯特菌的  $\lambda$  延长,  $\mu_{\max}$  和  $N_{\max}$  降低,达到了抑制单增李斯特菌的理想效果,体现了“栅栏技术”的优势。

### 2.3 CO<sub>2</sub>-LP 与单增李斯特菌 $\lambda$ 和 $\mu_{\max}$ 的关系

在 CO<sub>2</sub>-LP 处理的猪肉中,“乳杆菌”“猪肉环境”和“单增李斯特菌”每一个因素都不是独立存在的,CO<sub>2</sub> 气体及乳杆菌(包括菌体和代谢产物)的存在会影响单增李斯特菌的生长环境,进而影响单增李斯特菌的生长繁殖,因此需构建此环境下单增李斯特菌生长的二级模型。将 Baranyi 模型拟合得到的 CO<sub>2</sub>-LP 处理猪肉中单增李斯特菌的  $\lambda$  和  $\mu_{\max}$  代入多项式模型,分别得到 CO<sub>2</sub>-LP 与单增李斯特菌  $\lambda$  和  $\mu_{\max}$  关系的拟合图,见图 2。

表 2 Baranyi 模型拟合得到的 13 °C 条件下不同 CO<sub>2</sub>-LP 处理猪肉中单增李斯特菌和乳杆菌的生长动力学参数  
Table 2 Parameters of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum* estimated from Baranyi model in pork at 13 °C under different CO<sub>2</sub>-LP treatments

Groups	$\lambda$ (h)		$\mu_{\max}$ (lg (CFU/(g·h)))		$N_{\max}$ (lg (CFU/g))	
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. plantarum</i>
Control	10.68±0.32a		0.089±0.01c		7.23±0.16c	
20% CO <sub>2</sub> -LP	13.4±3.03ab	6.89±0.74a	0.073±0.01b	0.081±0.01b	5.53±0.10ab	7.36±0.04a
40% CO <sub>2</sub> -LP	17.7±1.34ab	7.10±0.83a	0.064±0.00ab	0.071±0.01b	5.72±0.21b	7.13±0.02a
60% CO <sub>2</sub> -LP	19.37±2.19b	8.30±2.36a	0.060±0.00ab	0.068±0.00ab	5.40±0.25ab	7.30±0.14a
80% CO <sub>2</sub> -LP	20.0±6.26b	9.40±3.46a	0.047±0.00a	0.060±0.00a	5.18±0.00a	7.31±0.17a

数值表现形式,平均值±标准差;同一温度条件下,同列中的不同小写字母表示动力学参数有显著性差异 ( $P<0.05$ )

Numerical representation, mean±standard deviation; Under the same temperature conditions, different lowercase letters in the same column indicate significant differences of kinetic parameters ( $P<0.05$ ).

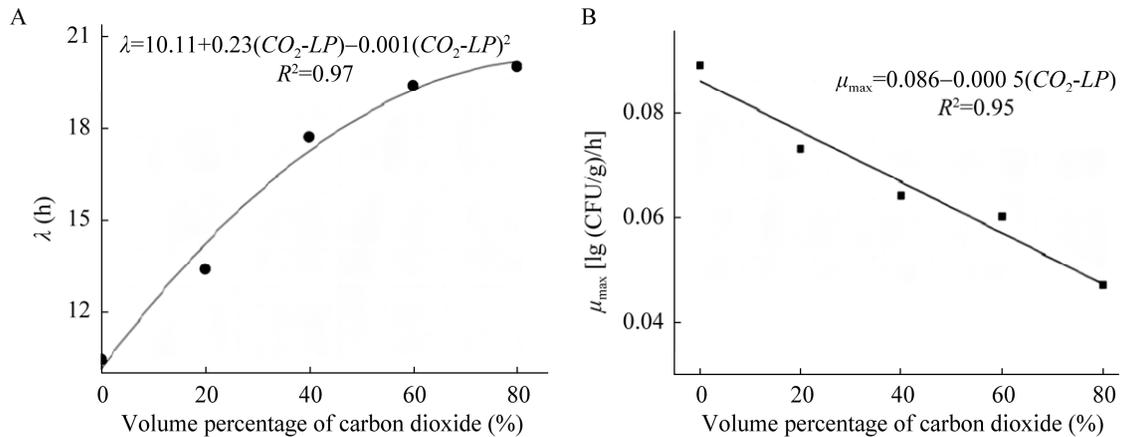


图 2  $\text{CO}_2$ -LP 抑制单增李斯特菌的二级模型

Figure 2 Secondary models of *Listeria monocytogenes* inhibited by  $\text{CO}_2$ -LP treatments. A:  $\lambda$ . B:  $\mu_{\max}$ .

单增李斯特菌在 20%  $\text{CO}_2$ -LP、40%  $\text{CO}_2$ -LP、60%  $\text{CO}_2$ -LP 和 80%  $\text{CO}_2$ -LP 处理条件下都可以生长繁殖。随着  $\text{CO}_2$ -LP 处理中  $\text{CO}_2$  浓度的增加,单增李斯特菌的  $\lambda$  延长、 $\mu_{\max}$  减小。说明  $\text{CO}_2$ -LP 是影响单增李斯特菌生长的重要参数,能够抑制单增李斯特菌的生长。另外,如图 2 所示,随着  $\text{CO}_2$  浓度的增加,单增李斯特菌  $\lambda$  增加的速率减小, $\mu_{\max}$  以恒定的速率减小。说明  $\text{CO}_2$ -LP 是影响单增李斯特菌生长的重要参数,能够抑制单增李斯特菌的生长。Francis 等<sup>[19]</sup>研究了  $\text{CO}_2$  气调包装食品中背景菌乳酸菌和单增李斯特菌的相互作用,发现高浓度的  $\text{CO}_2$  对乳酸菌的生长无显著影响,并且  $\text{CO}_2$  和乳酸菌能够协同抑制单增李斯特菌的生长。

我们尝试用 Ratkowsky-type 模型拟合  $\text{CO}_2$ -LP 与单增李斯特菌  $\lambda$  和  $\mu_{\max}$  的关系,模型评价结果表明 Ratkowsky-type 模型的拟合优度较差。二项式模型可以很好地描述  $\text{CO}_2$ -LP 对单增李斯特菌  $\lambda$  的影响,线性模型可以很好地描述  $\text{CO}_2$ -LP 对单增李斯特菌  $\mu_{\max}$  的影响。从建立的模型可以计算任意  $\text{CO}_2$ -LP 处理条件下单增李斯特菌的  $\lambda$  和  $\mu_{\max}$ ,不需要进行传统的微生物计数就能更好地监控单增李斯特菌的生长。

#### 2.4 抑制模型的建立及数学评价

将 Baranyi 模型拟合得到的猪肉中乳杆菌与单增李斯特菌的生长动力学参数代入 Jameson-effect 模型中,得到的乳杆菌对单增李斯特菌的抑制系数  $\gamma$  见表 3。

表 3 Jameson-effect 模型拟合得到的不同  $\text{CO}_2$ -LP 处理猪肉中单增李斯特菌  $N_{\max}$ 、模型的抑制系数和评价参数

Table 3 The  $N_{\max}$  values of *Listeria monocytogenes* and inhibition coefficient ( $\gamma$ ) as well as fitting evaluation of the established Jameson-effect models

Groups	$\gamma$	$N_{\max}$		Evaluation parameters		
		Measured values	Predictive values	$A_f$	$B_f$	RMSE
20% $\text{CO}_2$ -LP	0.80	5.45	5.76	1.05	0.96	0.33
40% $\text{CO}_2$ -LP	0.85	5.89	6.58	1.07	0.93	0.43
60% $\text{CO}_2$ -LP	0.86	5.41	6.13	1.08	0.93	0.43
80% $\text{CO}_2$ -LP	0.79	5.17	5.28	1.05	0.96	0.27

20% CO<sub>2</sub>-LP、40% CO<sub>2</sub>-LP、60% CO<sub>2</sub>-LP 和 80% CO<sub>2</sub>-LP 组中的  $\gamma$  值分别为 0.80、0.85、0.86 和 0.79，均小于 1，说明根据 Jameson-effect 模型的预测，在乳杆菌达到稳定期后，单增李斯特菌继续生长一段时间才停下来。20% CO<sub>2</sub>-LP、40% CO<sub>2</sub>-LP、60% CO<sub>2</sub>-LP 和 80% CO<sub>2</sub>-LP 组中单增李斯特菌达到稳定期时的实测值分别是 5.45、5.89、5.41 和 5.17 lg (CFU/g)。传统的 Baranyi 模型预测得到的 20% CO<sub>2</sub>-LP、40% CO<sub>2</sub>-LP、60% CO<sub>2</sub>-LP 和 80% CO<sub>2</sub>-LP 组单增李斯特菌的  $N_{max}$  分别是 5.53、5.72、5.40 和 5.18 lg (CFU/g) (表 2)。Jameson-effect 模型预测得到的 20% CO<sub>2</sub>-LP、40% CO<sub>2</sub>-LP、60% CO<sub>2</sub>-LP 和 80% CO<sub>2</sub>-LP 组单增李斯特菌的  $N_{max}$  分别是

5.76、6.58、6.13 和 5.28 lg (CFU/g)。

在 4 种 CO<sub>2</sub>-LP 环境条件下，Jameson-effect 模型预测得到的单增李斯特菌  $N_{max}$  均大于实测值，这说明在单增李斯特菌风险评估中不会出现“失败-危险”的结果。另外，Jameson-effect 模型预测的单增李斯特菌  $N_{max}$  大于传统的 Baranyi 模型预测得到的  $N_{max}$ ，说明在用数学模型描述单增李斯特菌的生长时，应该将单增李斯特菌实际的生长环境(如 CO<sub>2</sub>-LP 条件)考虑进去，并且选用合适的数学模型更加准确地描述乳杆菌对单增李斯特菌的抑制作用，为食品安全决策者提供更为准确的单增李斯特菌生长信息。

不同 CO<sub>2</sub> 浓度下，乳杆菌对猪肉中单增李斯特菌的抑制作用见图 3。如图 3 所示，乳杆菌

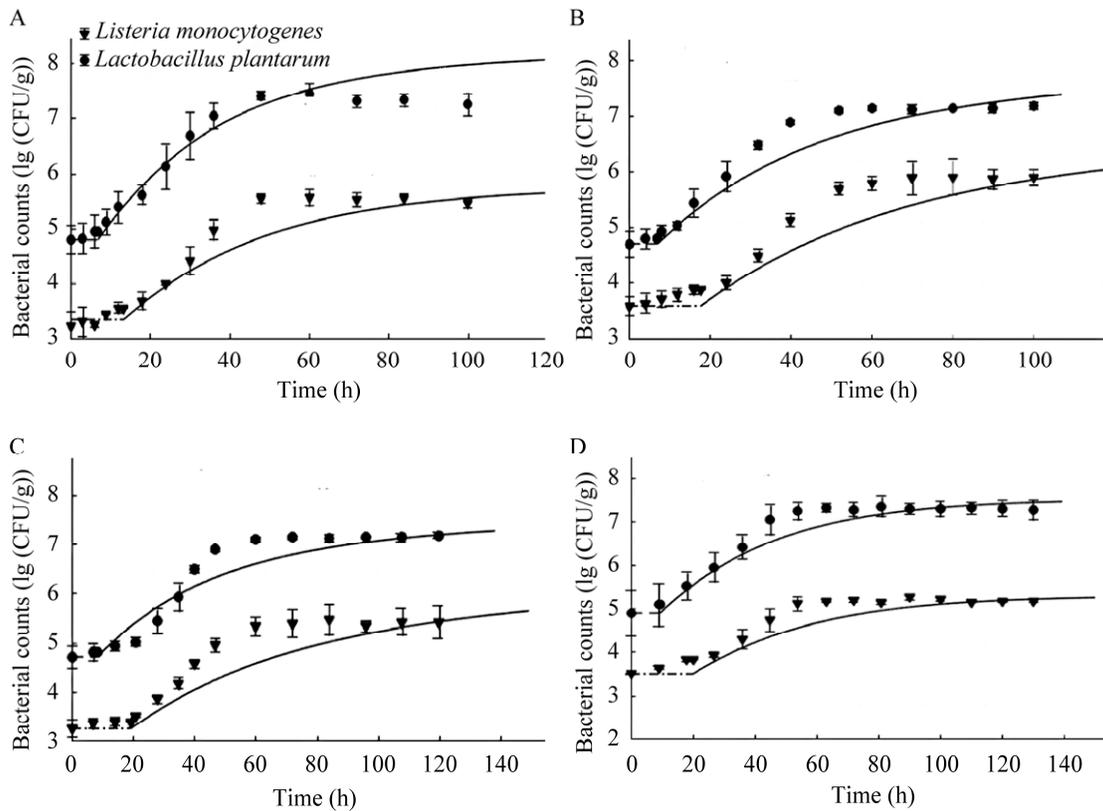


图 3 Jameson-effect 模型模拟 13 °C 贮存猪肉中乳杆菌对单增李斯特菌的抑制作用

Figure 3 The inhibitory effects of *Lactobacillus plantarum* on *Listeria monocytogenes* in pork stored at 13 °C were modeled by the Jameson-effect model. A: 20% CO<sub>2</sub>-LP. B: 40% CO<sub>2</sub>-LP. C: 60% CO<sub>2</sub>-LP. D: 80% CO<sub>2</sub>-LP.

的生长受  $\text{CO}_2$  浓度的影响较小, 而  $\text{CO}_2$ -LP 可以抑制猪肉中单增李斯特菌的生长, 并且  $\text{CO}_2$  浓度越高,  $\text{CO}_2$ -LP 对单增李斯特菌的抑制作用越强; 随着  $\text{CO}_2$  浓度增加, 单增李斯特菌的  $\lambda$  延长, 并且  $\mu_{\max}$  和  $N_{\max}$  越低。这可能是因为  $\text{CO}_2$  在气调包装的气体组分中占的比例越高, 溶解于猪肉中的  $\text{CO}_2$  会越多, 作用于单增李斯特菌细胞的  $\text{CO}_2$  也会越多, 因此对单增李斯特菌在迟滞期和指数生长期的抑制作用越强; 当乳杆菌生长到稳定期起到抑菌作用时, 单增李斯特菌还处于较低浓度。

在 4 种  $\text{CO}_2$ -LP 条件下, 抑制模型的  $A_f$  和  $B_f$  值在 0.93–1.08 之间, 说明建立的模型对单增李斯特菌的拟合性是可以接受的。另外,  $RMSE$  值较小, 说明 Jameson-effect 模型能够准确地描述猪肉中乳杆菌对单增李斯特菌的抑制作用。建立的乳杆菌对单增李斯特菌的抑制模型, 准确地反映了二者之间的关系, 不需要进行传统的微生物计数就可以从建立的抑制模型中获知任意时间乳杆菌和单增李斯特菌的生长动态, 这对食品中单增李斯特菌的防控非常重要。此外, 在 2.3 中建立了  $\text{CO}_2$ -LP 处理与单增李斯特菌  $\lambda$  和  $\mu_{\max}$  的函数关系, 根据建立的二级模型, 同样可以在不经过微生物检验的情况下, 得到任意  $\text{CO}_2$ -LP 处理条件下单增李斯特菌的  $\lambda$  和  $\mu_{\max}$ , 将  $\lambda$  和  $\mu_{\max}$  代入 Jameson-effect 模型, 可以得到任意  $\text{CO}_2$ -LP 处理条件下乳杆菌对单增李斯特菌的抑制模型, 进而获得  $\text{CO}_2$ -LP 处理猪肉中单增李斯特菌的生长信息。为了更准确地描述食品中微生物的生长情况, 预测微生物学家已经将两种甚至三种细菌之间的交互作用引入到预测微生物学领域。如 Valík 等<sup>[20]</sup>将传统的 Baranyi 模型和 Gempertz 模型整合成了两菌交互模型, 用整合得到的模型构建了牛奶中乳酸菌对金黄色葡萄球菌的抑制模型。Mejlholm 等<sup>[21]</sup>应用修正后的 Logistic 模型构

建了蛋黄酱海鲜沙拉中乳酸菌对单增李斯特菌的抑制模型。Bolívar 等<sup>[22]</sup>应用 Lotkae-Volterra 模型构建了即食鱼肉制品中乳酸菌对单增李斯特菌的抑制模型。Quinto 等<sup>[23]</sup>用贝叶斯方法构建了单增李斯特菌、英诺克李斯特菌和假单胞菌 3 种细菌之间的交互模型。

上述研究是基于“细菌在混合培养时的生长动力学参数和细菌单独培养时的生长动力学参数相同”这一假设建立细菌间交互模型的, 也就是用细菌单独培养时的生长动力学参数来构建细菌之间的交互模型。这种假设在本研究中是不合适的, 因为试验结果表明  $\text{CO}_2$ -LP 组单增李斯特菌的  $\lambda$ 、 $\mu_{\max}$  和  $N_{\max}$  和对照组显著 ( $P < 0.05$ ) 不同。因此, 本研究建立了  $\text{CO}_2$ -LP 与单增李斯特菌  $\lambda$  和  $\mu_{\max}$  的关系。应用  $\text{CO}_2$ -LP 处理条件下乳杆菌和单增李斯特菌的动力学参数来建立 Jameson-effect 模型。结果表明, 构建的模型能够很好地描述  $\text{CO}_2$ -LP 处理条件下乳杆菌对单增李斯特菌的抑制作用。

研究结果表明 80%  $\text{CO}_2$ -LP 处理对单增李斯特菌的抑制效果最好, 能够最大程度地延长单增李斯特菌的  $\lambda$ , 降低  $\mu_{\max}$  和  $N_{\max}$ 。但是 80%  $\text{CO}_2$ -LP 处理时, 气调包装的气体组分中不含  $\text{N}_2$ , 随着猪肉贮存时间的延长, 包装内的  $\text{O}_2$  被消耗,  $\text{CO}_2$  在猪肉中溶解, 如果包装内完全不含惰性气体  $\text{N}_2$  会导致包装结构塌陷。因此本研究选用 60%  $\text{CO}_2$ -LP 处理作为抑制单增李斯特菌的最优组合。

## 2.5 抑制模型的建立及数学评价

贮存过程中猪肉的 pH 值变化见图 4。如图 4 所示, 13 °C 贮存 72 h 时, 对照组猪肉的 pH 值显著 ( $P < 0.05$ ) 增加到 6.75, 成为变质肉; 60%  $\text{CO}_2$ -LP 组猪肉的 pH 值先轻微下降然后上升, 在整个贮存期间, 60%  $\text{CO}_2$ -LP 组猪肉的 pH 值在 5.95–6.05 之间变化。但是, 即使 60%  $\text{CO}_2$ -LP

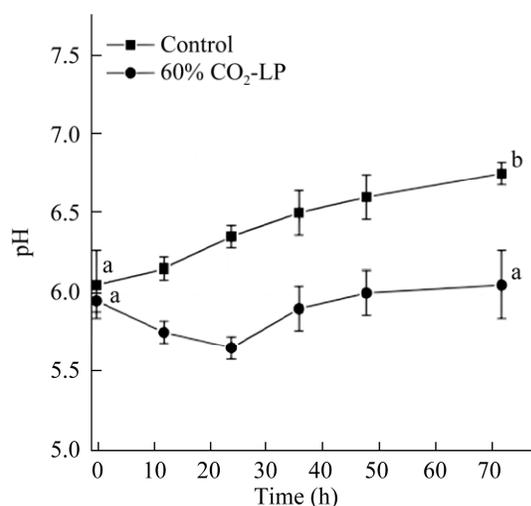


图4 60% CO<sub>2</sub>-LP处理对猪肉pH值的影响 同一条线上不同字母表示数据有显著差异( $P < 0.05$ )

Figure 4 Influence of 60% CO<sub>2</sub>-LP on the pH values of pork meat. Different letters on the same line indicate significant differences of data ( $P < 0.05$ ).

组猪肉的pH值属于“新鲜肉”范畴，猪肉已经出现色泽变暗、有异味、表面发黏等腐败变质的现象。值得注意的是，在货架期初期，60% CO<sub>2</sub>-LP组猪肉的pH值小于对照组，这可能是由于CO<sub>2</sub>-LP处理猪肉中，CO<sub>2</sub>溶解于猪肉后也会降低猪肉的pH值。

60% CO<sub>2</sub>-LP处理不仅能够延长单增李斯特菌的 $\lambda$ 、降低 $\mu_{\max}$ 和 $N_{\max}$ ，在货架期内对猪肉的pH值无显著影响，有很大潜力应用到食品中控制单增李斯特菌危害，提高猪肉的微生物安全。

### 3 结论与建议

Jameson-effect模型能够很好地描述CO<sub>2</sub>-LP处理对单增李斯特菌的抑制作用，CO<sub>2</sub>-LP能够延长单增李斯特菌的 $\lambda$ 、同时降低 $\mu_{\max}$ 和 $N_{\max}$ ，并且对单增李斯特菌的抑制作用随着CO<sub>2</sub>浓度的增加而增强，体现了栅栏技术的优势。本研究涉及的温度条件只考虑了猪肉的全程冷链运输环境，温度是单增李斯特菌生长的重要因素，可

以直接影响单增李斯特菌的生长及对不良环境的抗性，进而可能影响CO<sub>2</sub>-LP处理对单增李斯特菌的抑制效果，因此需继续研究其他温度条件下CO<sub>2</sub>-LP处理对单增李斯特菌的抑制作用，为CO<sub>2</sub>-LP处理应用到食品中控制单增李斯特菌提供理论依据。另外，单增李斯特菌的生长特性决定了猪肉被加工处理前单增李斯特菌的污染浓度，其对不利环境的抗性影响了进入宿主感染周期的剂量，进入宿主感染周期后，单增李斯特菌细胞毒性大小与宿主患病概率密切相关，因此需继续探究CO<sub>2</sub>-LP处理能否影响单增李斯特菌的抗性和毒性，进而降低单增李斯特菌的致病力。

### REFERENCES

- [1] 蒋慧亮, 邓英媛, 王正云, 朱永. 气调包装结合电子束辐照对蚌肉冰藏品质的影响[J]. 现代食品科技, 2023, 39(6): 115-123.  
JIANG HL, DENG YY, WANG ZY, ZHU Y. Effects of modified atmosphere packaging combined with electron beam irradiation on the quality of frozen mussel meat[J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(6): 115-123 (in Chinese).
- [2] 杜东晓, 赵龙妹, 李旺, 李元晓, 丁轲, 何万领, 曹平华. 具有优良抑菌特性乳酸菌的筛选鉴定及活性物质检测[J]. 微生物学通报, 2022, 49(8): 3165-3178.  
DU DX, ZHAO LM, LI W, LI YX, DING K, HE WL, CAO PH. Screening and identification of lactic acid bacteria with excellent antibacterial properties and detection of active substances[J]. Microbiology China, 2022, 49(8): 3165-3178 (in Chinese).
- [3] MELERO B, VINUESA R, DIEZ A M, JAIMEI, ROVIR J. Application of protective cultures against *Listeria monocytogenes* and *Campylobacter jejuni* in chicken products packaged under modified atmosphere[J]. Poultry Science, 2013, 92(4): 1108-1116.
- [4] COSTA JCCP, BOVER-CID S, BOLÍVAR A, ZURERA G, PÉREZ-RODRÍGUEZ F. Modelling the interaction of the sakacin-producing *Lactobacillus sakei* CTC494 and *Listeria monocytogenes* in filleted gilthead sea bream (*Sparus aurata*) under modified atmosphere packaging at isothermal and non-isothermal conditions[J]. International Journal of Food Microbiology, 2019, 297: 72-84.
- [5] COUVERT O, GUÉGAN S, HÉZARD B, HUCHET V,

- LINTZ A, THUAULT D, STAHL V. Modeling carbon dioxide effect in a controlled atmosphere and its interactions with temperature and pH on the growth of *L. monocytogenes* and *P. fluorescens*[J]. Food Microbiology, 2017, 68: 89-96.
- [6] LISERRE AM, LANDGRAF M, DESTRO MT, FRANCO BDGM. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* strain in modified atmosphere packaged Brazilian sausage[J]. Meat Science, 2002, 61(4): 449-455.
- [7] BLANCO-LIZARAZO CM, SOTELO-DÍAZ I, LLORENTE-BOUSQUETS A. *In vitro* modelling of simultaneous interactions of *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus sakei*, and *Staphylococcus carnosus*[J]. Food Science and Biotechnology, 2016, 25(1): 341-348.
- [8] CHENG CS, LIU BX, TIAN ML, FANG T, LI CC. Application of interaction models in predicting the simultaneous growth of *Staphylococcus aureus* and different concentrations of background microbiota in Chinese-style braised beef[J]. Meat Science, 2023, 200: 109162.
- [9] LEROY F, LIEVENS K, de VUYST L. Modeling bacteriocin resistance and inactivation of *Listeria innocua* LMG 13568 by *Lactobacillus sakei* CTC 494 under sausage fermentation conditions[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(11): 7567-7570.
- [10] CHEN Q, ZHAO ZY, WANG XY, XIONG K, SHI C. Microbiological predictive modeling and risk analysis based on the one-step kinetic integrated Wiener process[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2022, 75:102912.
- [11] BARANYI J, ROBERTS TA. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food[J]. International Journal of Food Microbiology, 1994, 23(3/4): 277-294.
- [12] JAMESON JE. A discussion of the dynamics of salmonella enrichment[J]. Journal of Hygiene, 1962, 60(2): 193-207.
- [13] 刘阳泰, 孙苑霞, 刘宝林, 董庆利. 3种流通模式下生猪肉中单增李斯特菌的暴露评估[J]. 食品科学, 2019, 40(1): 85-91.
- LIU YT, SUN WX, LIU BL, DONG QL. Quantitative exposure assessment of *Listeria monocytogenes* in raw pork under three transportation modes[J]. Food Science, 2019, 40(1): 85-91 (in Chinese).
- [14] MCMILLIN KW. Advancements in meat packaging[J]. Meat Science, 2017, 132: 153-162.
- [15] ZHOU GH, XU XL, LIU Y. Preservation technologies for fresh meat - a review[J]. Meat Science, 2010, 86(1): 119-128.
- [16] ARVANITOYANNIS IS, STRATAKOS AC. Application of modified atmosphere packaging and active/smart technologies to red meat and poultry: a review[J]. Food and Bioprocess Technology, 2012, 5(5): 1423-1446.
- [17] DJENANE D, MARTÍNEZ L, SÁNCHEZ-ESCALANTE A, MONTAÑÉS L, BLANCO D, YANGÜELA J, BELTRÁN JA, RONCALÉS P. Effect of lactic acid bacteria on beef steak microbial flora stored under modified atmosphere and on *Listeria monocytogenes* in broth cultures[J]. Food Science and Technology International, 2006, 12(4): 287-295.
- [18] BIANCHI F, STEWART C, ASTBURY NM, COOK B, AVEYARD P, JEBB SA. Replacing meat with alternative plant-based products (RE-MAP): a randomized controlled trial of a multicomponent behavioral intervention to reduce meat consumption[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2022, 115(5): 1357-1366.
- [19] FRANCIS GA, O'BEIRNE D. Effects of the indigenous microflora of minimally processed lettuce on the survival and growth of *Listeria innocua*[J]. International Journal of Food Science & Technology, 1998, 33(5): 477-488.
- [20] VALÍK L, AČAI P, MEDVED'OVÁ A. Application of competitive models in predicting the simultaneous growth of *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria in milk[J]. Food Control, 2018, 87: 145-152.
- [21] MEJLHOLM O, DALGAARD P. Modelling and predicting the simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and psychrotolerant lactic acid bacteria in processed seafood and mayonnaise-based seafood salads[J]. Food Microbiology, 2015, 46: 1-14.
- [22] BOLÍVAR A, TARLAK F, COSTA JCCP, CEJUDO-GÓMEZ M, BOVER-CID S, ZURERA G, PÉREZ-RODRÍGUEZ F. A new expanded modelling approach for investigating the bioprotective capacity of *Latilactobacillus sakei* CTC494 against *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat fish products[J]. Food Research International, 2021, 147: 110545.
- [23] QUINTO EJ, MARÍN JM, CARO I, MATEO J, SCHAFFNER DW. Bayesian modeling of two- and three-species bacterial competition in milk[J]. Food Research International, 2018, 105: 952-961.