



刘小花, 周彬静, 彭菁, 等. 基于电子鼻和高光谱成像技术的冷鲜牛肉微生物的生长模型构建 [J]. 南京农业大学学报, 2023, 46(3): 595–605.
LIU Xiaohua, ZHOU Binjing, PENG Jing, et al. Modeling of microbial growth in chilled beef based on the E-nose and hyperspectral imaging techniques [J].
Journal of Nanjing Agricultural University, 2023, 46(3): 595–605.

基于电子鼻和高光谱成像技术的冷鲜牛肉 微生物的生长模型构建

刘小花¹, 周彬静¹, 彭菁¹, 屠康¹, 吴菊清¹, 徐静², 武杰^{2*}, 潘磊庆^{1*}

(1. 南京农业大学食品科学技术学院, 江苏 南京 210095; 2. 蚌埠学院食品与生物工程学院, 安徽 蚌埠 233030)

摘要: [目的] 本文旨在探究基于电子鼻和高光谱成像技术实现冷鲜牛肉中微生物生长曲线拟合的可行性。[方法] 采用平板计数法测定 4 ℃ 恒温贮藏下冷鲜牛肉中的菌落总数, 并采集其电子鼻和高光谱数据; 采用 Huang 模型和 Baranyi 模型建立基于传统平板计数法、电子鼻和高光谱特征信息的生长模型, 并对其进行比较。[结果] 基于传统平板计数法构建的生长模型精度较高, 模型决定系数 R^2 高达 0.993; 与平板计数法相比, 基于电子鼻特征信息的方法 i 和 ii 所建的生长模型精度略低, R^2 大于 0.871, 二者之间的相关系数 r 为 0.917~0.994。基于高光谱信息的方法 I 所建模型 R^2 与之相当, r 高达 0.998; 而基于高光谱响应值的方法 II 所建的模型表现稍差, R^2 为 0.749~0.918, r 为 0.761~0.859。[结论] 电子鼻和高光谱特征信息可用于冷鲜牛肉微生物生长曲线拟合, 这为无损检测技术在预测微生物学领域的应用提供了理论支持和技术参考。

关键词: 电子鼻; 高光谱成像; 冷鲜牛肉; 菌落总数; 曲线拟合

中图分类号: TS251.1

文献标志码: A

文章编号: 1000-2030(2023)03-0595-11

Modeling of microbial growth in chilled beef based on the E-nose and hyperspectral imaging techniques

LIU Xiaohua¹, ZHOU Binjing¹, PENG Jing¹, TU Kang¹, WU Juqing¹,
XU Jing², WU Jie^{2*}, PAN Leiqing^{1*}

(1. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. School of Food and Biological Engineering, Bengbu University, Bengbu 233030, China)

Abstract: [Objectives] The paper aimed to investigate the feasibility of growth simulation of the microorganisms in chilled meat by the E-nose and hyperspectral imaging techniques (HSI). [Methods] The total viable count of the chilled beef stored at 4 ℃ was determined by the plate count method, and the E-nose and HSI data were collected. And the Huang model and Baranyi model obtained from the plate count method, E-nose and HSI information were compared. [Results] The growth models based on the traditional plate count method were highly accurate, with the model coefficient of determination (R^2) of 0.993. Compared with the plate count method, growth models constructed by Method i and ii based on E-nose feature information were slightly less accurate, with R^2 greater than 0.871 and correlation coefficients (r) of 0.917–0.994 between them. The model established by Method I based on HSI had a comparable R^2 , with r of 0.998. Whereas the model based on hyperspectral values (Method II) performed slightly worse, with R^2 of 0.749–0.918 and r of 0.761–0.859. [Conclusions] The information of E-nose and HSI could be used to simulate the growth of microorganisms in chilled beef, which provided theoretical support and technical reference for the application of non-destructive testing techniques in predictive microbiology.

Keywords: E-nose; hyperspectral imaging; chilled beef; total viable count; curve fitting

牛肉是我国仅次于猪肉的第二大消耗肉品, 冷鲜牛肉更是凭借肉质鲜嫩多汁、低脂低胆固醇、高营养价值等优势成为肉品消费界的新星^[1]。通常, 冷鲜牛肉一直贮藏于 0~4 ℃ 的低温环境, 大部分微生物的生长繁殖受到抑制。但我国冷链系统不完善仍可能造成微生物的大量繁殖^[2], 引起冷鲜牛肉腐败变质。

收稿日期: 2022-04-26

基金项目: 江苏省重点研发计划项目 (BE2020693); 安徽省科技重大专项 (201903a06020010); 安徽省长三角科技创新联合攻关专项 (202004g01020009)

作者简介: 刘小花, 硕士研究生。* 通信作者: 潘磊庆, 博士, 教授, 研究方向为农产品无损检测、贮藏与加工, E-mail: pan_leiqing@njau.edu.cn; 武杰, 教授, 研究方向为农产品精深加工与贮藏保鲜、功能性食品开发, E-mail: 459853502@qq.com。

实际上,微生物是造成冷鲜肉腐败最直接最主要的原因。根据肉品卫生标准,新鲜肉的菌落总数低于 10^4 CFU·g⁻¹,次新鲜肉为 $10^4 \sim 10^6$ CFU·g⁻¹,变质肉高于 10^6 CFU·g⁻¹,而 Borch 等^[3]认为当肉中的菌落数量为 $10^7 \sim 10^9$ CFU·g⁻¹时,肉就开始腐败。因此,监测冷鲜牛肉贮藏过程中微生物数量的变化,模拟微生物的生长曲线对肉品质量和公共卫生安全控制具有重要而深远的意义。

预测微生物学结合传统平板计数法是微生物生长曲线拟合的常用方法。平板计数法是微生物测定的黄金法则^[4],PCR 及免疫学检测也是常见的食品微生物检测方法。平板计数法用于微生物检测的耗时较长、效率较低;PCR 属于分子生物学方法,快速、灵敏、特异性强,但成本及技术水平要求较高;免疫学检测法经济实用、重现性好、灵敏度和特异性强,但无法用于在线监测^[5-6],难以满足现代工业化、自动化、精细化生产的需求。因此,探索简单有效的快速无损检测技术在微生物生长曲线拟合方面的适用性,有望实现食品工业生产中微生物的在线监测。

电子鼻和高光谱成像技术(hyperspectral imaging technique, HSI)是常见的典型无损检测技术,可分别从肉类腐败过程中产生的挥发性物质(即气味)和肉类表面固有物理化学属性2个层面无损快速获取微生物信息。电子鼻技术通过感知微生物产生的挥发性化学物质可快速鉴别和检测食品微生物,已广泛应用于各种食品场景,如过程监控、新鲜度评估、保质期调查、掺假鉴定和产品可追溯性^[7-8]。Ye 等^[9]使用电子鼻评估了牛肉新鲜度;Li 等^[10]通过电子鼻定量预测了猪肉中的菌落总数。HSI 集成了成像和光谱技术,在微生物代谢物提供特征指纹的前提下,被广泛用于肉类微生物检测。如,Duan 等^[11]及 Khoshnoudi-Nia 等^[12]基于 HSI 成功检测了羊肉及鱼肉中的菌落总数。单一的检测技术在获取多性状信息方面具有一定局限性,可能无法准确评估肉类新鲜度,如电子鼻技术忽略了食品固有特性,HSI 则无法描述肉类气味特征。已有研究聚焦于将电子鼻和 HSI 结合以获取更全面的信息,提高食品质量评价的准确性。Liu 等^[13]使用电子鼻和 HSI 检测了羊肉新鲜度;Aheto 等^[14]则采用电子鼻和 HSI 检测猪肉的肌肉脂肪和过氧化值。目前,国内外基于电子鼻和 HSI 的研究主要集中在肉类新鲜度评价及微生物预测,本文侧重于探索电子鼻和 HSI 在微生物生长拟合上的适用性。

基于此,本研究测定冷鲜牛肉冷藏过程中的菌落总数,并采集其电子鼻和 HSI 数据,通过与传统平板计数法所建生长模型比较,探讨电子鼻和 HSI 特征信息在拟合冷鲜牛肉中微生物生长曲线上的适用性,旨在为无损检测技术在微生物生长拟合的应用提供理论和技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜牛肉(牛背最长肌)购于南京苏果超市。平板计数琼脂培养基购于青岛海博科技有限公司。

BD-HWS 型恒温培养箱购于南京贝蒂实验仪器有限公司;PEN 3 便携式电子鼻购于德国 AIRSENSE 公司;可见-近红外高光谱成像系统主要由 Im Spector V10E 型光谱成像仪(芬兰 Specim 公司)、ICLB1620CCD 相机(美国 Imperx 公司)、IT3900ER 150W 卤素光源(美国 Illumination Technologies 公司)、高光谱分析软件(五铃光学股份有限公司)等组成。

1.2 试验方法

1.2.1 样品处理 将冷鲜牛肉置于装有冰袋的泡沫盒中,15 min 内运至实验室进行处理。在超净台上剔除脂肪、筋膜后,将其分割成 4 cm×4 cm×1 cm 的牛肉块(约 30 g)。制备好的样本贮藏于(4±1)℃恒温培养箱中,每天采集 10 个样本的电子鼻和高光谱数据,并测定菌落总数,共计 12 d(包括 0 d),获得 120 个样本数据。

1.2.2 电子鼻数据采集 采用顾欣哲^[15]的方法并略有改动。试验前,打开电子鼻仪器预热 30 min。将牛肉样本放入 250 mL 玻璃烧杯中,室温下用锡箔纸密封,顶空 15 min,采集电子鼻数据。试验参数如下:进样时间为 45 s,洗气时间为 120 s,调零时间和样本准备时间均为 5 s,流速为 300 mL·min⁻¹。

1.2.3 高光谱数据采集与校正 采用戈永慧等^[16]的方法并略有改动。高光谱成像系统光谱分辨率为 2.8 nm,有效波段范围为 400~1 000 nm,共 420 个波段,数据采集模式为反射。通过预试验,高光谱数据采集参数设置如下:光源为 90 W 的卤素灯,曝光时间为 2.5 ms,输送速度为 7.23 mm·s⁻¹。

为消除相机暗流和光源强度等造成的不良影响,对原始图像进行黑白校正。校正方法为:采集聚四氟乙烯白板(反射率 99.9%)获得全白反射图像,盖住相机镜头以获得全黑反射图像,再通过公式(1)^[17]获

得校正后图像。

$$I_{\text{cal}} = \frac{I_{\text{raw}} - I_{\text{dark}}}{I_{\text{white}} - I_{\text{dark}}} \quad (1)$$

式中: I_{cal} 为校正后图像; I_{raw} 为原始图像; I_{white} 为全白反射图像; I_{dark} 为全黑反射图像。

1.2.4 菌落总数(TVC)测定 参照《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测:GB 4789.2—2016》,并略有修改。无菌环境下,取5 g牛肉置于无菌均质袋,加入45 mL 8.5 g·L⁻¹无菌生理盐水,均质器拍打2 min,10倍梯度稀释。选择2个合适梯度,取100 μL稀释液涂布于平板计数琼脂培养基,(36±1)℃恒温培养(48±1)h后计数。

1.3 数据处理

1.3.1 电子鼻数据处理 记录样本对应的10个传感器信号响应值,传感器响应值为相对电导率(G/G_0),其值越偏离1,表明气体浓度越大。电子鼻信号通过Origin 2021b软件(OriginLab公司)进行主成分分析(PCA),获得前3个主成分(PC)得分的加权平均值[公式(2),方法i];并经Pearson相关性分析获取与菌落总数相关性最强的传感器,提取特征传感器的响应值(方法ii),基于上述获取的特征信息用于微生物的生长拟合。

$$\text{PC} = \frac{a \times \text{PC1} + b \times \text{PC2} + c \times \text{PC3}}{a + b + c} \quad (2)$$

式中:PC为前3个主成分得分的加权平均值;PC1、PC2和PC3分别为第1、第2和第3主成分的得分值;a、b和c分别为第1、第2和第3主成分的方差贡献率。

1.3.2 高光谱数据处理 高光谱数据提取与处理均采用MATLAB R2016a软件(美国MathWorks公司)。高光谱数据以3:1比例划分为建模集(90个样本)和预测集(30个样本),采用一阶导数(1st derivative)、二阶导数(2nd derivative)、标准化(autoscale)、正交信号校正(OSC)、标准正态变换(SNV)和多元散射校正(MSC)等预处理算法,以消除光谱信号表面散射、基线漂移等产生的误差。然后,利用偏最小二乘回归法(PLSR)建立基于高光谱信息的冷鲜牛肉菌落总数的定量模型。依据均方根误差(RMSEC、RMSECV、RMSEP)、决定系数(R_c^2 、 R_{cv}^2 、 R_p^2)和相对预测性能(RPD),选出最优PLSR模型,根据其预测的菌落数进行微生物生长拟合(方法I)。同时,牛肉样本平均光谱曲线的峰值也将用于微生物生长拟合(方法II)。

1.4 数学模型

本文采用的生长模型为修正的Gompertz[公式(3)]、Logistic[公式(4)]、Huang[公式(5)和(6)]以及Baranyi模型[公式(7)和(8)]。

$$Y(t) = Y_0 + (Y_{\text{max}} - Y_0) \times \exp \left\{ -\exp \left[\frac{2.718 \times \mu_{\text{max}}}{Y_{\text{max}} - Y_0} \times (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (3)$$

$$Y(t) = Y_0 + \frac{Y_{\text{max}} - Y_0}{1 + \exp(\mu_{\text{max}} \times (\lambda - t))} \quad (4)$$

$$N(t) = N_0 + N_{\text{max}} - \ln \left[e^{N_0} + (e^{N_{\text{max}}} - e^{N_0}) \times e^{-\mu_{\text{max}} \times B(t)} \right] \quad (5)$$

$$B(t) = t + \frac{1}{4} \times \ln \frac{1 + e^{-4 \times (t - \lambda)}}{1 + e^{4\lambda}} \quad (6)$$

$$N(t) = N_0 + \mu_{\text{max}} \times A(t) - \ln \left(1 + \frac{e^{\mu_{\text{max}} \times A(t)} - 1}{e^{(N_{\text{max}} - N_0)}} \right) \quad (7)$$

$$A(t) = t + \frac{1}{\mu_{\text{max}}} \times \ln(e^{-\mu_{\text{max}} \times t} + e^{-\mu_{\text{max}} \times \lambda} - e^{-\mu_{\text{max}} \times t - \mu_{\text{max}} \times \lambda}) \quad (8)$$

式中: Y_0 、 $Y(t)$ 和 Y_{max} 分别为初始、 t 时刻及最大细菌浓度,lg(CFU·g⁻¹); N_0 、 $N(t)$ 和 N_{max} 分别为初始、 t 时刻及最大细菌浓度,ln(CFU·g⁻¹) [为便于模型比较,数据被转换成lg(CFU·g⁻¹)]; μ_{max} 为最大比生长速率,h⁻¹;λ为迟滞期,h; t 为时间,h。

1.5 模型评价与验证

采用均方根误差(RMSE)、决定系数(R^2)和赤池信息准则(AIC)评价模型性能与可靠性[公式(9) — (11)]。RMSE反映模型误差大小,其越接近0,模型准确度越高; R^2 越接近1,模型回归性能越好;AIC越

小,模型拟合效果越好。模型验证数据来自重复进行的上述冷藏试验,通过准确因子(A_f) [公式(12)]、偏差因子(B_f) [公式(13)]及残差分布图评价模型验证结果^[18-19], A_f 表示实际值与预测值的平均误差, B_f 表示预测值对实测值的评估是否过低或过高,残差分布图则用于反映模型系统偏差。

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-p}} \quad (9)$$

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (10)$$

$$AIC = n \times \ln \left(\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n} \right) + 2p \quad (11)$$

$$A_f = 10^{\frac{\sum_{i=1}^n |\log(x_{pre}/x_{obs})|}{n}} \quad (12)$$

$$B_f = 10^{\frac{\sum_{i=1}^n \log(x_{pre}/x_{obs})}{n}} \quad (13)$$

式中: y_i 、 $\hat{y}_i$ 和 $\bar{y}$ 分别为第*i*个样本菌落总数的观测值、预测值及观测值平均值; n 为样本容量; p 为参数个数; x_{obs} 和 x_{pre} 分别为样本菌落总数的观测值和预测值。

2 结果与分析

2.1 基于传统平板计数法的冷鲜牛肉中微生物生长曲线拟合

由图1可见:微生物生长的延滞期不明显,其数量随时间呈上升趋势,约168 h后趋于平稳。基于修正的 Gompertz、Logistic、Huang 和 Baranyi 模型拟合冷鲜牛肉中微生物生长的效果良好,菌落总数(TVC)实测值在各生长曲线上小范围波动。

由表1可见:4个生长模型估计的初始菌落数约为 $5.50 \lg(\text{CFU} \cdot \text{g}^{-1})$,最大菌落数平均约为 $9.33 \lg(\text{CFU} \cdot \text{g}^{-1})$, μ_{max} 约为 0.033 h^{-1} 。迟滞期 λ 很难预测^[20],不同预测模型得到的 λ 不同。Logistic模型的 λ 约为64.21 h,其余模型的 λ 约为0.30 h,差别较大。总体而言,4个模型的 $RMSE$ 为 $0.128 \sim 0.227 \lg(\text{CFU} \cdot \text{g}^{-1})$, R^2 为 $0.976 \sim 0.993$,都能很好地模拟冷鲜牛肉中微生物的生长。Huang 模型和 Baranyi 模型的 AIC 最小,修正 Gompertz 模型次之,Logistic 模型不仅 AIC 最大, λ 估计值较大,且 R^2 较其他三者而言最小。Huang 模型和 Baranyi 模型虽均为机理模型,但拟合效果近乎相同,难以区分最佳模型,故均被用于后续基于电子鼻和高光谱成像技术的冷鲜牛肉中微生物的生长曲线拟合。

2.2 基于电子鼻技术的冷鲜牛肉中微生物生长曲线拟合

由图2可见:传感器 S6、S7、S9 和 S10 响应值较大,可能是由于牛肉中蛋白质、不饱和脂肪酸和碳水化合物被氧化分解,释放出 NO_2 、 H_2S 、 H_2 和 CH_4 等挥发性物质造成的^[13]。表明电子鼻可以检测牛肉变质过程产生的挥发性物质,从而间接表征微生物数量,尤其是传感器 S6、S7、S9 和 S10,其响应值在0~10 s变化迅速,30~40 s趋于平稳。故将第35秒的传感器响应值用于进一步的数据分析。

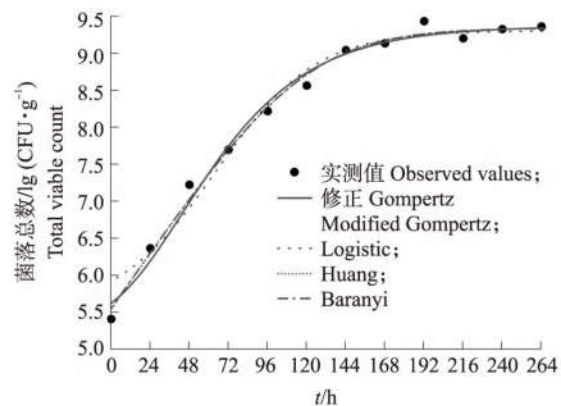


图1 基于平板计数法拟合的冷鲜牛肉中微生物的生长曲线

Fig. 1 Growth curves of microorganisms in chilled beef by the plate count method

表 1 基于平板计数法的冷鲜牛肉中微生物动力学参数及模型评价

Table 1 Kinetic parameters and model evaluation of the microbes in chilled beef by the plate count method

模型 Model	生长参数 Growth parameter				模型评价 Model evaluation		
	$N_0/\lg(\text{CFU}\cdot\text{g}^{-1})$	$N_{\max}/\lg(\text{CFU}\cdot\text{g}^{-1})$	$\mu_{\max}/\text{h}^{-1}$	λ/h	RMSE	R^2	AIC
修正 Gompertz Modified Gompertz	5.360	9.356	0.034	0.300	0.168	0.988	-39.677
Logistic	5.500	9.296	0.033	64.210	0.227	0.976	-32.453
Huang	5.550	9.332	0.033	0.300	0.129	0.993	-46.016
Baranyi	5.547	9.332	0.033	0.280	0.128	0.993	-46.203

注:AIC:赤池信息准则 Akaike information criteria. 下同 The same below.

对 10 个传感器进行主成分分析 (PCA), 得出前 3 个主成分 (PC1、PC2 和 PC3) 的方差贡献率分别为 67.7%、17.2% 和 5.7%, 累计方差贡献率为 90.6%, 可代表牛肉样本大部分的电子鼻信息。将 PC1、PC2 和 PC3 的加权平均数 (PC) 用于冷鲜牛肉中微生物的生长拟合 (方法 i)。由图 3 可见: 传感器 S7、S9 和 S10 与 TVC 之间的相关系数分别为 0.85、0.86 和 0.93, 具有显著相关性。方法 ii 选择相关性最强的传感器 S10 的响应值 (G/G_0) 作为冷鲜牛肉微生物生长拟合的输入值。

由图 4 可见: 不论是方法 i 还是方法 ii, Huang 模型和 Baranyi 模型都表现出良好的拟合精度, PC 值和 G/G_0 值都分布在 Huang 模型和 Baranyi 模型模拟的生长曲线附近。由表 2 可见: 在模型拟合效果方面, 方法 i 和方法 ii 中 Baranyi 模型性能更优, 具有比 Huang 模型更低的 RMSE 和 AIC, 以及更高的 R^2 , 但二者差异不显著, 均比平板计数法所得生长模型精度略低。方法 i 和方法 ii 中 Huang 模型的 $\mu_{\max}$ 值为 0.071 和 0.019 h^{-1} , Baranyi 模型的 $\mu_{\max}$ 值分别为 0.119 和 0.044 h^{-1} , 这与基于平板计数法所得 $\mu_{\max}$ 有略微差别; 而 λ 值却与平板计数法的相差甚远。尽管在生长动力学参数的估计上存在不足, 但整体上看, 基于电子鼻技术采用方法 i 和方法 ii 的生长曲线的 R^2 均高于 0.871, 结果大体令人满意, 且两者所得模型与基于传统计数法所得生长模型之间的相关系数 (r) 为 0.917~0.994, 二者高度相关。其中, 方法 ii 的 r 值更接近 1, 故与单个传感器响应值相比, 主成分能

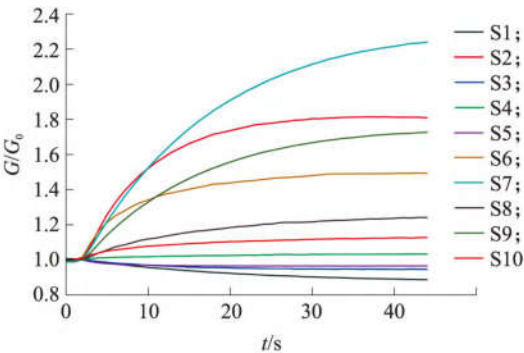


图 2 冷鲜牛肉贮藏 72 h 时 10 个电子鼻传感器 (S1—S10) 的响应值

Fig. 2 Response values of 10 E-nose sensors (S1—S10) when chilled beef was stored for 72 h

G/G_0 表示传感器响应值, 下同。 G/G_0 indicates sensor response values, the same below.

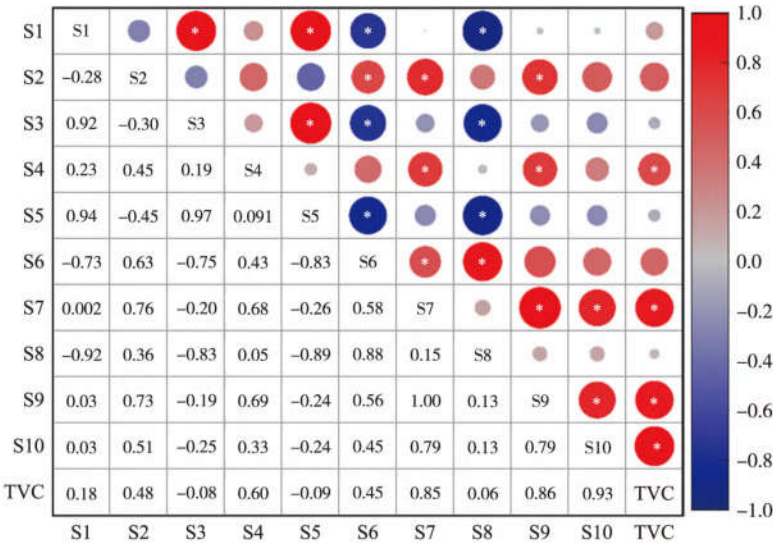


图 3 冷鲜牛肉贮藏过程中电子鼻响应值与菌落总数 (TVC) 之间的相关性分析

Fig. 3 Correlation analysis between E-nose response values and total viable count (TVC) during storage of the chilled beef

* $P<0.05$.

更全面充分地表达电子鼻信息, 获得更准确的生长模型。

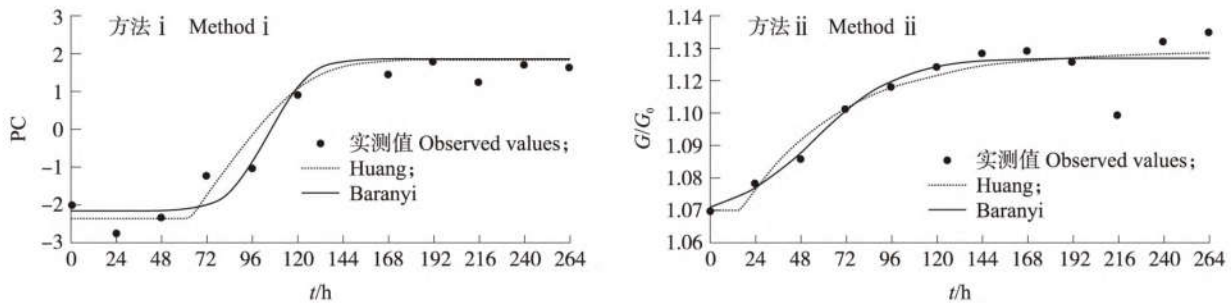


图 4 基于电子鼻信息拟合的冷鲜牛肉中微生物的生长曲线

Fig. 4 Growth curves of microorganisms in chilled beef by E-nose information

表 2 基于电子鼻信息的冷鲜牛肉中微生物动力学参数及模型评价

Table 2 Kinetic parameters and model evaluation of the microbes in chilled beef by E-nose information

方法 Method	模型 Model	生长参数 Growth parameter		模型评价 Model evaluation			
		$\mu_{\max} / \text{h}^{-1}$	λ / h	RMSE	R^2	AIC	r
方法 i	Huang	0.071	63.25	0.786	0.887	-2.645	0.946
Method i	Baranyi	0.119	87.40	0.731	0.902	-4.386	0.917
方法 ii	Huang	0.019	16.61	0.008	0.871	-112.745	0.994
Method ii	Baranyi	0.044	57.46	0.007	0.883	-115.950	0.990

注: r 为基于电子鼻信息和平板计数建立的生长模型之间的相关系数 (Pearson 相关性分析)。

Note: r is the correlation coefficient between the growth models based on the E-nose information and the plate count method (Pearson correlation analysis).

2.3 基于高光谱成像技术的冷鲜牛肉中微生物生长曲线拟合

2.3.1 光谱分析 由图 5 可见: 不同贮藏时间的平均光谱曲线形状大致相同, 响应值 (相对反射率) 存在差异, 暗示各贮藏时间牛肉样本的化学成分存在差异, 这与 Zhou 等^[21] 的研究结果一致。700~1 000 nm 内光谱相对反射率随时间降低, 原因可能是贮藏时间延长, 肉体腐烂、颜色变暗造成肉体表面反射光强变小, 故后续取光谱响应值的相反数拟合微生物生长曲线。此外, 本试验还观察到光谱曲线中存在多处波峰或波谷。其中, 430、490 和 560 nm 处的峰值可能与呼吸色素血红蛋白有关^[22], 755 nm 处的波谷可能与水分子的 O—H 键有关^[23], 800 nm 处的波峰可能是水分子中 O—H 的第一泛音引起的^[24], 970 nm 处的波谷可能归因于水分子的 O—H 伸缩振动二级倍频^[25]。光谱变化通常由牛肉微生物腐败时蛋白质降解与水分子变化引起, 代谢物能够指示微生物的特征指纹, 故光谱可检测牛肉变质过程微生物的数量变化。

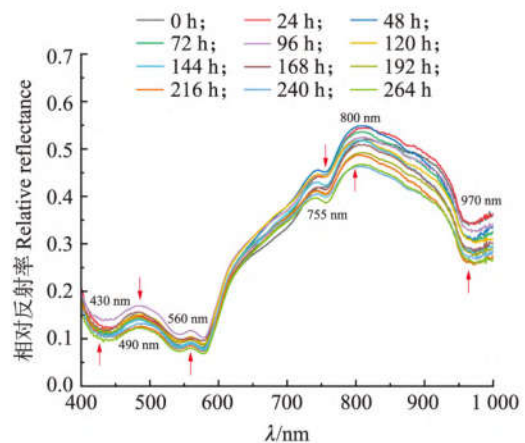


图 5 不同贮藏时间牛肉样本的平均光谱值 (400~1 000 nm)

Fig. 5 Mean spectra of beef samples at different storage time (400~1 000 nm)

2.3.2 基于高光谱成像技术的生长曲线拟合 采用 2 种方法基于高光谱数据拟合冷鲜牛肉中微生物的生长曲线。方法 I 用不同算法对高光谱数据进行预处理, 建立 TVC 的偏最小二乘回归 (PLSR) 预测模型, 使用最佳 PLSR 模型所得 TVC 预测值进行冷鲜牛肉中微生物的生长曲线拟合。方法 II 利用 400~1 000 nm 内峰值较高的 2 处光谱值 (755 和 800 nm), 表示为方法 II_{755 nm} 和方法 II_{800 nm}。

由表 3 可见: 比较各个模型的均方根误差、决定系数和相对预测性能 (RPD) 可知, 除 2nd Derivative 和 Autoscale 算法外, 其余预处理算法的 PLSR 模型精度均有所提高。最佳模型为 MSC-PLSR 模型, RPD 接近 3.0, 是比较理想的模型。因此, MSC-PLSR 模型的预测值被用于生长曲线拟合 (方法 I)。

由图 6 可见: 基于方法 I 利用 Huang 模型和 Baranyi 模型绘制的生长曲线几乎重合, 数据点均匀分布在生长曲线附近; 基于方法 II_{755 nm} 和 II_{800 nm} 利用 Huang 模型模拟得到的曲线虽贴近各个数据点, 但稳定阶

段不明显, Baranyi 模型在图中的表现更符合微生物的生长阶段。由表 4 可知: 方法 I 的 R^2 为 0.983, $RMSE$ 为 0.187, AIC 为 -37.105, 其预测精度可与平板计数法相媲美; 方法 II_{755 nm} 的 $RMSE$ 和 AIC 相对较小, 但 R^2 仅为 0.75, 其模型性能不及方法 I 和平板计数法; 方法 II_{800 nm} 的 $RMSE$ 为 0.010 和 0.009, R^2 为 0.897 和 0.918, AIC 低至 -107.389 和 -109.918, 模型预测准确度虽不及平板计数法, 但模型 R^2 接近 0.90, 预测效果良好。

此外, Huang 模型和 Baranyi 模型在方法 I 中表现出良好的参数估计能力, $\mu_{\max}$ 和 λ 约为 0.034 h⁻¹ 和 0.30 h, 这与平板计数法的估计值相当。方法 II_{755 nm} 和 II_{800 nm} 中 Baranyi 模型的 $\mu_{\max}$ 值与传统平板计数法一致, 但 λ 值相差较大; 而 Huang 模型的 $\mu_{\max}$ 和 λ 值与平板计数法相比都存在较大差异。另外, 基于高光谱信息的冷鲜牛肉中微生物生长模型与平板计数法所得模型之间的相关系数 r 为 0.761~0.998。其中, 方法 I 的 r 值可以达到 0.998, 高于电子鼻技术中的方法 i 和方法 ii, 表明高光谱技术可能更适用于微生物的生长曲线拟合。即, 相比于气味, 肉品固有的物理化学属性能更真实地反映肉品质量。方法 II_{755 nm} 的 r 值 0.823 和 0.822, 方法 II_{800 nm} 的 r 值为 0.859 和 0.761, 其模型精度和参数估计准确度仍有很大提升空间。由此可见, 高光谱数据的提取方法仍需要改进, 以提高模型性能。

表 3 不同预处理算法的冷鲜牛肉中微生物定量偏最小二乘回归 (PLSR) 预测模型 (400~1 000 nm)
Table 3 Partial least squares regression (PLSR) quantitative prediction model for microbes in chilled beef with different pretreatment algorithms (400~1 000 nm)

预处理方法 Preprocessing method	建模集 Calibration		交叉验证集 Cross-validation		预测集 Prediction		RPD
	$RMSEC$	R_C^2	$RMSECV$	R_{CV}^2	$RMSEP$	R_P^2	
原始光谱 Raw spectra	0.457	0.878	0.585	0.801	0.541	0.852	2.649
二阶导数 2nd derivative	0.513	0.846	0.692	0.724	0.592	0.825	2.436
标准化 Autoscale	0.498	0.855	0.624	0.774	0.572	0.826	2.443
正交信号校正 Orthogonal signal correction	0.259	0.961	0.537	0.835	0.507	0.855	2.676
一阶导数 1st derivative	0.405	0.904	0.529	0.838	0.511	0.862	2.743
标准正态变化 Standard normal variate	0.405	0.904	0.541	0.829	0.495	0.873	2.860
多元散射校正 Multiplicative scatter correction	0.378	0.917	0.501	0.853	0.459	0.882	2.967

注: $RMSEC$ 、 $RMSECV$ 和 $RMSEP$ 分别表示建模集、交叉验证集和预测集的均方根误差; R_C^2 、 R_{CV}^2 和 R_P^2 分别表示建模集、交叉验证集和预测集的决定系数。RPD: 相对预测性能。

Note: $RMSEC$, $RMSECV$ and $RMSEP$ represent the root mean square error of the calibration set, cross-validation set and prediction set, respectively; R_C^2 , R_{CV}^2 and R_P^2 represent the coefficients of determination of the calibration set, cross-validation set and prediction set, respectively. RPD: Relative percent deviation.

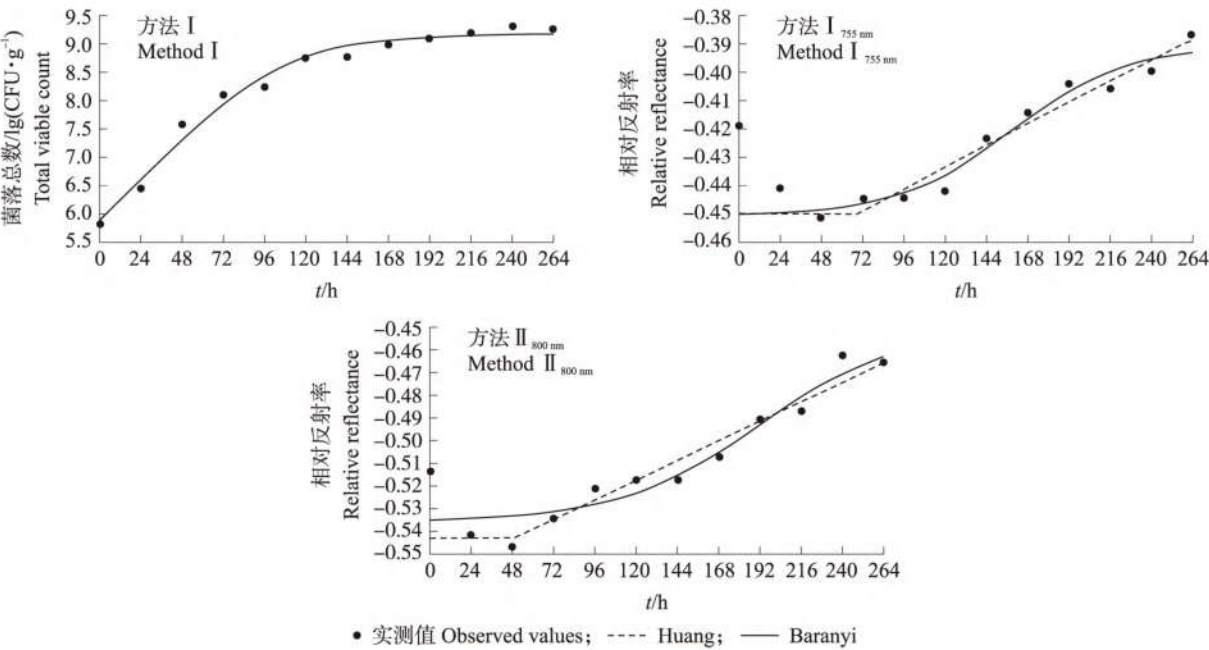


图 6 基于高光谱成像技术信息拟合的冷鲜牛肉中微生物的生长曲线

Fig. 6 Growth curves of microorganisms in chilled beef by hyperspectral imaging technique (HSI) information

表 4 基于高光谱成像技术的冷鲜牛肉中微生物动力学参数及模型评价

Table 4 Kinetic parameters and model evaluation of the microbes in chilled beef by HSI

模型 Model		生长参数 Growth parameter		模型评价 Model evaluation			
		$\mu_{\max}/\text{h}^{-1}$	λ/h	RMSE	R^2	AIC	r
方法 I	Huang	0.034	0.30	0.187	0.983	-37.105	0.998
Method I	Baranyi	0.034	0.25	0.187	0.983	-37.105	0.998
方法 II _{755 nm}	Huang	0.000 9	69.25	0.012	0.749	-103.458	0.823
Method II _{755 nm}	Baranyi	0.030	158.30	0.012	0.756	-103.014	0.822
方法 II _{800 nm}	Huang	0.000 4	49.55	0.010	0.897	-107.389	0.859
Method II _{800 nm}	Baranyi	0.024	190.30	0.009	0.918	-109.918	0.761

注: r 为基于 HSI 信息和平板计数建立的生长模型之间的相关系数 (Pearson 相关性分析)。
Note: r is the correlation coefficient between the growth models based on the HSI information and the plate count method (Pearson correlation analysis).

2.4 模型验证

为验证生长模型的准确性和鲁棒性,重复上述牛肉恒温冷藏试验。由图 7 可知:基于传统平板计数法拟合的冷鲜牛肉中微生物的生长曲线十分贴近验证数据点,预测性能较好,基于电子鼻技术的方法 i 和方法 ii 以及基于高光成像技术的方法 I、方法 II_{755 nm} 和方法 II_{800 nm} 也具有同样好的预测效果。

一般, $1.015 < A_f < 1.205$ 时,模型误差较低; $1.1 < A_f < 1.9$ 时,模型是可接受的。 $0.9 < B_f < 1.05$ 时,模型最好; $1.06 < B_f < 1.15$ 时,模型是可被接受的^[26]。由表 5 可知:传统平板计数法的 A_f 为 1.019, B_f 为 0.988,表明平板计数法模型是非常有效可靠的。而基于电子鼻和高光谱成像技术所得生长模型的 A_f 为 1.005~1.414, B_f 为 0.933~1.075,表示这 2 种技术建立的生长模型拟合优度尚可,有效性和可靠性都可被接受。此外,图 8 中各模型服从均值约为 0 的正态分布,能比较准确地拟合冷鲜牛肉中微生物的生长曲线。

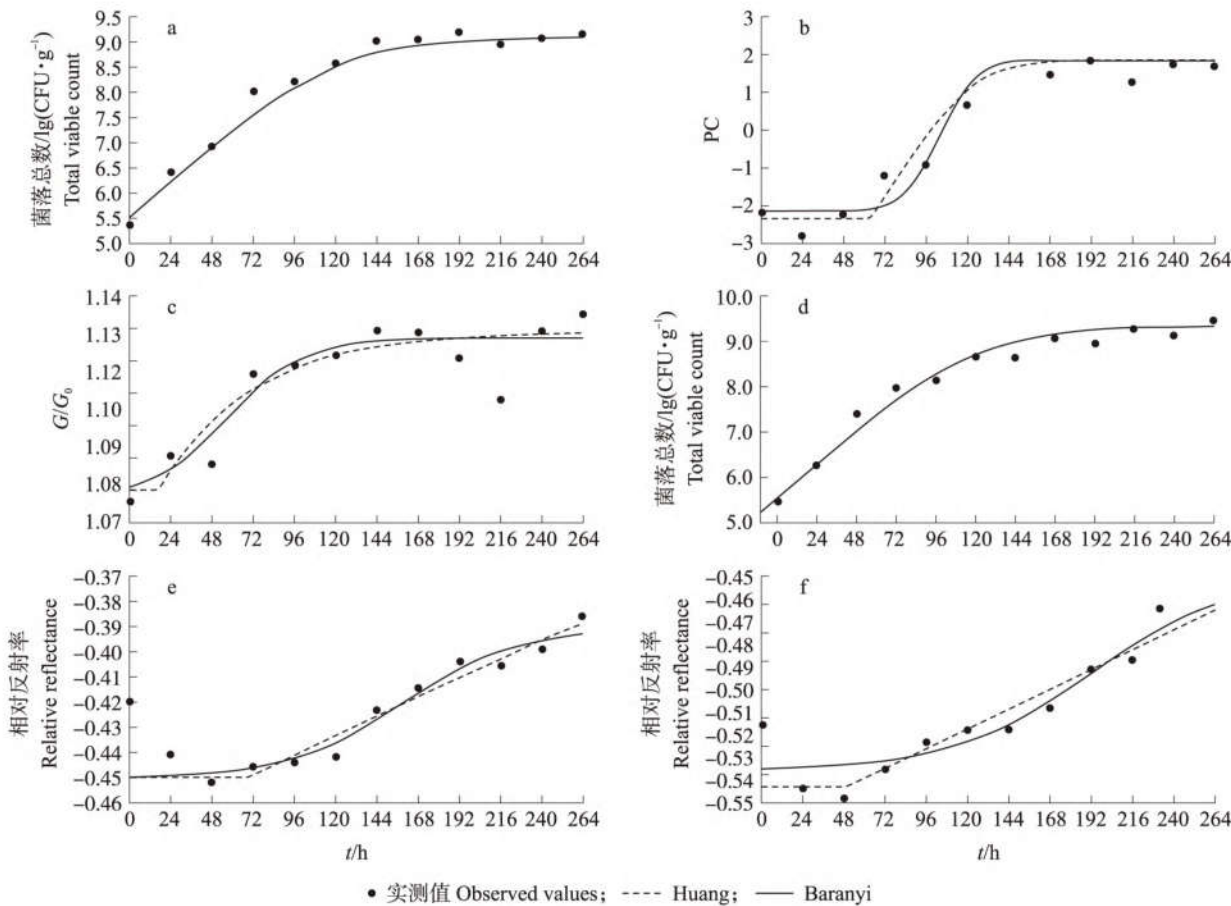


图 7 生长模型的验证

Fig. 7 Validation of growth models

a.传统平板计数法 Plate count method; b.方法 i Method i ; c.方法 ii Method ii ; d.方法 I Method I ; e.方法 II_{755 nm} Method II_{755 nm} ; f.方法 II_{800 nm} Method II_{800 nm} .

表 5 模型验证结果
Table 5 Results of model validation

方法 Method			A_f		B_f	
			Huang	Baranyi	Huang	Baranyi
平板计数法 Plate count method			1.019	1.019	0.988	0.988
电子鼻 E-nose	方法 i Method i		1.414	1.249	0.933	1.075
	方法 ii Method ii		1.005	1.005	1.001	1.001
高光谱 HSI	方法 I Method I		1.021	1.021	1.005	1.005
	方法 II 755 nm Method II 755 nm		1.015	1.015	1.007	1.008
	方法 II 800 nm Method II 800 nm		1.012	1.013	1.004	0.999

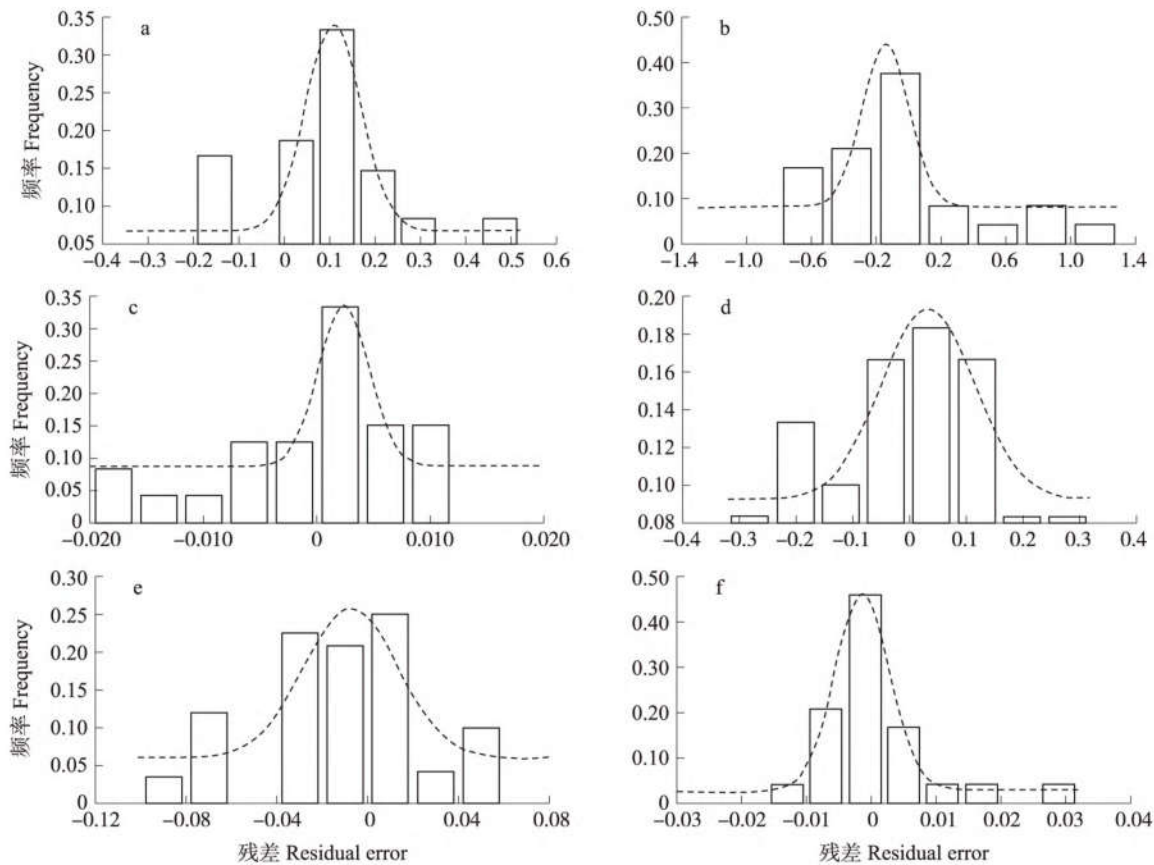


图 8 验证试验残差拟合分布图
Fig. 8 Distribution of residual errors for the validation experiment

a. 传统平板计数法 Plate count method; b. 方法 i Method i; c. 方法 ii Method ii; d. 方法 I Method I; e. 方法 II 755 nm Method II 755 nm; f. 方法 II 800 nm Method II 800 nm.

3 讨论与结论

本研究通过平板计数采用 2 种经验模型 (修正的 Gompertz 模型和 Logistic 模型) 及 2 种机理模型 (Huang 模型和 Baranyi 模型) 分别拟合了冷鲜牛肉中微生物的生长曲线。经验模型和机理模型侧重点不同, 二者的差异较难定义, 前者忽略了细胞的生化过程, 拟合能力是其被使用的唯一标准, 而后者偏向对细胞生化过程及细胞行为的理解^[27]。当模型拟合能力可被接受时, 机理模型或可认为是首选。因此, 本研究采用 Huang 模型和 Baranyi 模型基于电子鼻和高光谱成像技术对冷鲜牛肉微生物进行了生长拟合。然而, 依据模型评价指标 ($RMSE$ 、 R^2 和 AIC) 判断各模型对微生物生长曲线拟合的适宜性时, 显示机理模型相对较好, 这可能还需要更多试验进一步验证。

基于电子鼻技术采用主成分 (方法 i) 和相关性 (方法 ii) 分析所建生长模型 R^2 高于 0.871, 准确度略低于平板计数法, 所得 μ_{max} 值与之略有不同, 但二者的相关系数 r 高达 0.917~0.994, 表明基于电子鼻构建的生长模型准确度和可信度较好。另外, 研究还表明主成分能够反映大多数的电子鼻信息, 比单个传感器

的响应值更能准确地描述微生物的生长曲线。

对于高光谱成像技术,依据 MSC-PLSR 模型的预测值(方法 I)构建的生长模型精度和生长参数($\mu_{\max}$ 和 λ)与平板计数法一致,相关系数 r 高达 0.998。这在一定程度上表明了高光谱成像技术在微生物生长曲线拟合中的优越性高于电子鼻技术。而基于光谱值(方法 II)的生长模型整体上表现稍差,相关系数 r 仅为 0.761~0.859。验证试验证实了基于电子鼻和高光谱成像技术构建的微生物生长模型的有效性和可靠性。

本研究仅探讨了电子鼻和高光谱成像技术在冷鲜牛肉菌落总数生长曲线拟合上的适用性,其在某一特定微生物或多种微生物间相互作用上的应用仍有待研究,如假单胞菌、热杀索丝菌、气单胞菌等优势腐败菌等。若能从电子鼻和高光谱信息中提取每种微生物的指纹气味或指纹光谱,或可实现依据电子鼻和高光谱拟合任意一种微生物的生长曲线。其次,电子鼻和高光谱各自在菌落总数生长曲线拟合上表现良好,但二者结合后或能更全面地表征微生物以提高拟合优度。

综上所述,电子鼻和高光谱成像技术在冷鲜牛肉微生物生长曲线拟合方面具有巨大潜力,这不仅丰富电子鼻和高光谱成像技术在肉品微生物检测研究中的理论和技术,也有助于推广其在肉品质量和安全评价中的应用。但还应注意,电子鼻和高光谱成像技术在预测微生物学应用方面还有很大的提升空间,如何在消除冗余信息的同时获取有效信息的方法还需深入研究,生长参数的准确性还有待提高。

参考文献 References:

- [1] 曲超,陶翠,牛琳茹,等. 我国肉类加工业“十三五”期间发展状况及趋势[J]. 肉类研究,2021,35(11):44-49.
Qu C, Tao C, Niu L R, et al. Status of and trends in the meat processing industry in China during the 13th five-year plan period[J]. Meat Research, 2021, 35(11):44-49 (in Chinese with English abstract).
- [2] 张玉华,孟一,郭风军,等. 基于预测微生物学的冷却牛肉货架期预测模型的建立[J]. 肉类研究,2019,33(11):61-66.
Zhang Y H, Meng Y, Guo F J, et al. Predictive modelling for shelf-life determination of chilled beef based on predictive microbiology[J]. Meat Research, 2019, 33(11):61-66 (in Chinese with English abstract).
- [3] Borch E, Lindberg C W. Predicting aerobic growth of *Yersinia enterocolitica* O:3 at different temperatures, pH values and L-lactate concentrations[J]. Contributions to Microbiology and Immunology, 1995, 13:134-136.
- [4] Yoo S M, Lee S Y. Optical biosensors for the detection of pathogenic microorganisms[J]. Trends in Biotechnology, 2016, 34(1):7-25.
- [5] Wei Q, Wang X, Sun D W, et al. Rapid detection and control of psychrotrophic microorganisms in cold storage foods: a review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 86:453-464.
- [6] Wang K Q, Pu H B, Sun D W. Emerging spectroscopic and spectral imaging techniques for the rapid detection of microorganisms: an overview[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2018, 17(2):256-273.
- [7] Falasconi M, Concina I, Gobbi E, et al. Electronic nose for microbiological quality control of food products[J]. International Journal of Electrochemistry, 2012, 2012:1-12.
- [8] Ghasemi-Varnamkhasti M, Mohtasebi S S, Siadat M, et al. Meat quality assessment by electronic nose (machine olfaction technology)[J]. Sensors (Basel, Switzerland), 2009, 9(8):6058-6083.
- [9] Ye X, Jin J J, Hui G H, et al. Determination of the freshness of beef strip loins (*M. longissimus lumborum*) using electronic nose[J]. Food Analytical Methods, 2014, 7(8):1612-1618.
- [10] Li M Y, Wang H B, Sun L X, et al. Application of electronic nose for measuring total volatile basic nitrogen and total viable counts in packaged pork during refrigerated storage[J]. Journal of Food Science, 2016, 81(4):M906-M912.
- [11] Duan H W, Zhu R G, Yao X D, et al. Sensitive variables extraction, non-destructive detection and visualization of total viable count (TVC) and pH in vacuum packaged lamb using hyperspectral imaging[J]. Analytical Methods, 2017, 9(21):3172-3183.
- [12] Khoshnoudi-Nia S, Moosavi-Nasab M. Nondestructive determination of microbial, biochemical, and chemical changes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during refrigerated storage using hyperspectral imaging technique[J]. Food Analytical Methods, 2019, 12(7):1635-1647.
- [13] Liu C C, Chu Z J, Weng S Z, et al. Fusion of electronic nose and hyperspectral imaging for mutton freshness detection using input-modified convolution neural network[J]. Food Chemistry, 2022, 385:132651.
- [14] Aheto J H, Huang X Y, Tian X Y, et al. Multi-sensor integration approach based on hyperspectral imaging and electronic nose for quantitation of fat and peroxide value of pork meat[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2020, 412(5):1169-1179.
- [15] 顾欣哲. 基于电子鼻响应信息的猪肉假单胞菌生长预测模型的构建[D]. 南京:南京农业大学, 2017.
Gu X Z. Constructing the predictive growth model of *Pseudomonas* in pork based on electronic nose[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2017 (in Chinese with English abstract).
- [16] 戈永慧,宋进,潘磊庆,等. 基于高光谱成像检测猕猴桃冷害的研究[J]. 南京农业大学学报, 2022, 45(2):386-394. DOI: 10.7685/jnau.202106009.

- Ge Y H, Song J, Pan L Q, et al. Research on detecting chilling injury of kiwifruit based on hyperspectral imaging technology [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2022, 45 (2) : 386–394 (in Chinese with English abstract) .
- [17] Amigo J M, Santos C. Data handling in science and technology [J]. Elsevier, 2020, 32: 37–53.
- [18] Jia Z, Peng Y, Yan X, et al. One-step kinetic analysis of competitive growth of *Salmonella* spp. and background flora in ground chicken [J]. Food Control, 2020, 117: 107103.
- [19] Tarlak F, Khosravi-Darani K. Development and validation of growth models using one-step modelling approach for determination of chicken meat shelf-life under isothermal and non-isothermal storage conditions [J]. Journal of Food and Nutrition Research, 2021, 60 (1) : 76–86.
- [20] Lin Z, Qin X, Li J, et al. Machine learning approach for predicting single cell lag time of *Salmonella enteritidis* after heat and chlorine treatment [J]. Food Research International, 2022, 156: 111132.
- [21] Zhou B J, Fan X, Song J, et al. Growth simulation of *Pseudomonas fluorescens* in pork using hyperspectral imaging [J]. Meat Science, 2022, 188: 108767.
- [22] 郭建宏, 王彩霞, 王松磊, 等. 滩羊肉中特征脂肪酸含量的高光谱检测及可视化 [J]. 中国食品学报, 2021, 21 (10) : 188–196.
- Guo J H, Wang C X, Wang S L, et al. Hyperspectral detection and visualization of characteristic fatty acid content in Tan mutton [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21 (10) : 188–196 (in Chinese with English abstract) .
- [23] Chen W, Feng Y Z, Jia G F, et al. Application of artificial fish swarm algorithm for synchronous selection of wavelengths and spectral pretreatment methods in spectrometric analysis of beef adulteration [J]. Food Analytical Methods, 2018, 11 (8) : 2229–2236.
- [24] Weng S, Guo B, Tang P, et al. Rapid detection of adulteration of minced beef using Vis/NIR reflectance spectroscopy with multivariate methods [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2020, 230: 118005.
- [25] 张珏, 田海清, 张丽娜, 等. 高光谱成像技术对羊肉新鲜度的无损检测 [J]. 食品与发酵工业, 2020, 46 (12) : 237–243.
- Zhang J, Tian H Q, Zhang L N, et al. Non-destructive detection of lamb freshness with hyperspectral imaging technology [J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46 (12) : 237–243 (in Chinese with English abstract) .
- [26] 张国治, 刘悦, 张康逸, 等. 青麦糕中微生物生长动力学模型及货架期研究 [J]. 河南工业大学学报 (自然科学版), 2021, 42 (1) : 49–55.
- Zhang G Z, Liu Y, Zhang K Y, et al. Study on microbial growth kinetic model and shelf life of green wheat cake [J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2021, 42 (1) : 49–55 (in Chinese with English abstract) .
- [27] Devlieghere F, Francois K, Vermeulen A, et al. Predictive microbiology [M] // Predictive Modeling and Risk Assessment. Boston, MA: Springer US, 2008: 29–53.

责任编辑: 范雪梅