

基于 LAMP 的肉类新鲜度检测效果评价

盛俊升, 张晋豪, 刘思露, 徐幸莲, 王虎虎*

(南京农业大学食品科技学院 肉品加工与质量控制教育部重点实验室 南京 210095)

摘要 冷鲜肉在贮藏期间发生的腐败现象,会对产业造成巨大的经济损失,建立一套肉品新鲜度快速检测方法至关重要。本文基于前期成功建立的环介导等温扩增(LAMP)体系,设计3种应用场景(检测实验室、终端市场和家庭厨房),采集现售的25种品牌冷鲜肉,共计125组样品,通过评估感官和细菌数量,验证LAMP体系在多场景下监测肉品新鲜度的准确性。结果表明:4℃环境下贮藏3d后,冷鲜肉的气味和产黏评分均降至阈值之下,菌落总数达6.0~7.5 lg(CFU/g)。LAMP体系在3种应用场景下均能准确监测肉品的新鲜状态,腐败肉样检测液呈蓝色,吸光度大于0.19;新鲜肉样检测液保持紫色,吸光度小于0.19。同时对比多场景检测结果与菌落总数测定结果,达到实验室端为100%,终端市场端为91.3%以及家庭厨房端为100%的腐败监测准确匹配度。本方法具有良好的准确性,可实现多场景下肉品新鲜度的监测,具有代替传统检测方法的可行性。

关键词 新鲜度;假单胞菌;快速检测;环介导等温扩增

文章编号 1009-7848(2025)01-0381-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2025.01.036

中国是世界肉类消费大国,更是全球最大的肉类生产国。据《2016—2021年中国肉类行业市场调研和投资机会研究报告》显示,中国冷鲜肉的增长速度最快,由2%增至20%,而热鲜肉则由89%降至60%,预计后续冷鲜肉将会持续保持增长趋势。冷鲜肉因屠宰、加工、运输等环节的特殊性,由微生物污染后易引发肉品腐败,会给消费者健康带来威胁^[1]。研究表明,假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)作为肉品腐败过程中的优势腐败菌^[2-3],其可以利用各类营养物质,如糖类和氨基酸作为碳源和氮源提供能量,产生醇、醛、酯、酮、硫化物和胺等腐败代谢产物,从而引发肉品绿变、发黏、变味等现象^[4]。在腐败初期,假单胞菌利用糖代谢途径消耗肉中葡萄糖以供自身繁殖,之后大多数假单胞菌会分泌胞外蛋白酶 aprX^[5]和脂肪酶 lipA^[6],水解肌肉纤维之间的结缔组织以及分解肉中脂肪,进而加速肉的腐败并产生令人不悦的挥发性气味^[7]。开发基于假单胞菌属的新鲜度快速检测方式对肉和肉制品的安全控制具有重要意义。

目前传统的假单胞菌检测方法主要是对样品

增菌培养后进行氧化酶试验^[8]、乙酰胺试验^[9]、葡萄糖酸盐试验^[10]来判定,此方法是行业的金标准,然而其检测周期较长。使用分子生物学方法检测是一种理想的替代方法。张淑红等^[11]利用直扩PCR技术检测桶装水中的铜绿假单胞菌,最低检出限为10³ CFU/mL。荧光定量PCR是在传统PCR扩增的基础上针对假阳性和检测效率问题衍生的新技术。李宁^[12]通过筛选假单胞菌属特异性基因 *sucD*,利用荧光定量PCR技术检测冷鲜猪肉的人工污染样品,其灵敏度为8.1×10² CFU/mL。虽然目前荧光定量PCR具有高灵敏度、高特异性的优点^[13],但是由于仪器和荧光探针的成本昂贵,操作人员技术要求高等,极大地限制了基于肉品新鲜度即时检测的需求^[14]。环介导等温扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是一种在恒温条件下对靶标核酸进行有效扩增的技术^[15],针对特异性靶标设计4~6条引物,可在短时间内扩增出大量目标核酸,从而快速、灵敏且高特异性地检测肉品中的特定靶标。其不需要昂贵的热循环仪器,一般可作为传统PCR的代替方案^[16-18]。

本课题组前期研究成功构建了一套基于LAMP特异检测冷鲜肉中假单胞菌数的技术体系^[19]。采用羟基萘酚蓝(HNB)为指示剂,以蓝色和紫色有效区分检测结果,并建立波长在646 nm处的定量模式,以辅助判别检测效果。本研究基于上

收稿日期:2024-01-08

基金项目:国家自然科学基金面上项目(32172266);江苏省自然科学基金面上项目(BK20221515)

第一作者:盛俊升,男,硕士生

通信作者:王虎虎 E-mail: huuwang@njau.edu.cn

述 LAMP 体系构建出一套适于多场景 (检测实验室、终端市场和家庭厨房) 的新鲜度表征方法, 通过检测市售冷鲜肉的新鲜度, 评估本方法在实际应用中的准确性和适用性, 以期为开发肉类新鲜度检测新技术, 拓展方法适用人群。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂耗材 假单胞 CFC 选择性培养基及其添加剂, 青岛高科园海博生物技术有限公司; 平板计数琼脂, 北京陆桥股份有限公司。Bst 2.0WarmStart™ DNA 聚合酶、MgSO₄、dNTP Mix, 北京 NEB 有限公司; 羟基萘酚蓝, 上海麦克林生物科技有限公司; LAMP 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

冷鲜鸡胸肉、冷鲜猪里脊、冷鲜牛里脊样品, 南京市超市和电商平台; 96 孔平底透明酶标板, Corning 公司; 0.2 mL PCR 平盖薄壁管, 美国 Axygen 公司。

1.1.2 仪器与设备 恒温恒湿箱 HPP260/ICP260, 德国 Memmert 公司; 高压灭菌锅 HVE-50, 日本 Hirayama 公司; 生物安全柜 SG403A, 美国 Baker 公司; BCM-1600A 超净台, 中国苏州安泰 AIRTECH 公司; Scan 1200 自动影像分析菌落计数仪, 法国 Interscience 公司; PTF-A300 型万分之一电子天平, 瑞士 Mettwe Toledo 公司; Milli-Q 超纯水系统, 美国 Millipore 公司; Microfuge 22R 台式离心机, 美国 Beckmen 公司; Nano Drop 2000 紫外可见分光光度计, 美国 Thermo Fisher 公司; 9700 PCR 仪, 美国 ABI 公司; 振荡型恒温金属浴, 杭州博日科技股份有限公司; M1000 酶标仪, 上海帝肯贸易有限公司。

1.2 检测体系

基于前期研究^[9], 根据假单胞菌属 16S rRNA 区段上的保守序列设计并筛选出特异性的 LMAP

引物(如表 1 所示), 后对 LAMP 检测方法中的各组分进行浓度优化, 得到最终反应体系为 1×Bst Recation Buffer, 6 mmol/L Mg²⁺, 1.0 mmol/L dNTP, 0.1 mmol/L 外引物 FB, 1.6 mmol/L 内引物 FBIP, 160 μmol/L HNB, 0.16 U/μL Bst2.0 Warmstart™ DNA 聚合酶。采用羟基萘酚蓝(HNB)作为显色指示剂, 以蓝色代表阳性结果可特异性检测出假单胞菌, 同时建立波长在 646 nm 处的定量模式, 以协助判别试验结果。

表 1 LAMP 引物
Table 1 LAMP primers

引物	序列(5'-3')
F3	GTCCATGGCCCTTACGGC
B3	TCACCCATGGTGTGACGG
FIP	ATTGCTCCACCTCGCGGCTTGGGCTACACACGTGCTAC
BIP	TGACTGCAACTCGACTGCGTGAAGGCCCGGAACGTATT

1.3 样品预处理

购买当日上市的 25 种品牌的冷鲜肉产品, 分别为 15 种冷鲜鸡肉、5 种冷鲜猪肉和 5 种冷鲜牛肉, 将其分别标记为 C1~C15、P1~P5 和 B1~B5。样品置于低温下转运至实验室, 托盘包装置于 4 ℃ 贮藏, 分别测定样品腐败指标以及模拟 3 种场景下的 LAMP 检测。

1.4 感官评定方法

冷鲜肉的感官评定参考 Chmiel 等^[20]、陈清敏^[21]和陈慧芝^[22]的方法并做适当调整。具体的评分由 10 名经过培训的学生完成, 主要从气味和表面黏度两个角度进行判别。进而对肉的品质进行量化分级, 评分为 1~9 分, 其中: 8~9 分为非常满意; 6~7 分为比较满意; 4~5 分为不满意; 1~3 分为非常不满意, 6 分认为是冷鲜肉处在可购买范围内的感官临界点, 具体评分标准如表 2 所示。

表 2 冷鲜肉感官评价标准

Table 2 Criteria for sensory evaluation of chilled meat

属性	评分标准/分			
	8~9	6~7	4~5	1~3
气味	正常肉香味	香味减弱或无味	略有酸味、霉味	刺激臭味、霉味
表面黏度	表面光滑, 多汁	略有斑点, 不发黏	发黏, 结块	极度黏手

1.5 细菌数量测定方法

参考标准《菌落总数测定》(GB 4789.2-2016)^[23]和《出口肉及肉制品中假单胞菌属的计数方法》(SN/T 4044-2014)^[24]进行计数。在超净台中拆开包装盒,用无菌镊和手术剪取 10 g 肉样装于无菌采样袋,并添加 90 mL 的无菌生理盐水,摇床 250 r/min 振荡 10 min。取 1 mL 洗脱液,按 10 倍比例稀释至适宜浓度;菌落总数的测定采用倾注法,置于 37 °C 下培养 48 h;假单胞菌数测定采用涂布

法,置于 30 °C 培养 48 h。

1.6 多场景 LAMP 检测

冷鲜肉在运输、储存和销售等环节虽一直处于低温环境,但仍需要时刻关注其新鲜度的变化,以保证产品质量。因此,本试验根据可能存在的贮藏环境分别设置检测实验室、终端市场和家庭厨房 3 种应用场景(如图 1 所示),并通过适当调整方案以满足不同人群对于肉品新鲜度的即时检测需求。

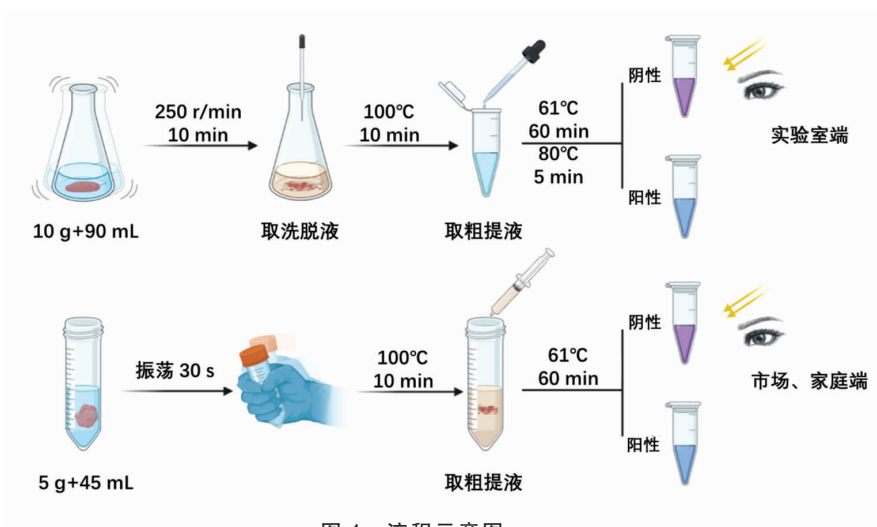


图 1 流程示意图

Fig.1 Schematic diagram of the process

1.6.1 检测实验室端设计 实验室端主要适宜检测人员对样品新鲜度的精准定量检测。通常企业或检测机构均具有实验室的基础设备,包括移液枪、天平、量筒、水浴锅、酶标仪等。本场景可提供 LAMP 预混液 (1×Bst Recation Buffer, 6 mmol/L Mg^{2+} , 1.0 mmol/L dNTP, 0.1 mmol/L 外引物 FB, 1.6 mmol/L 内引物 FBIP, 160 μ mol/L HNB, 0.16 U/ μ L Bst2.0 Warmstart™ DNA 聚合酶, 无菌超纯水补足至 48 μ L)。

检测方法: 1) 称取 10 g 样品, 装于无菌均质袋中, 添加 90 mL 无菌水, 将其置于摇床上 250 r/min 均质洗脱 10 min; 2) 取 1 mL 洗脱液, 于 100 °C 煮沸 10 min 后, 离心取上清液作为样品基因组的粗提液, 冷却备用; 3) 取 2 μ L 粗提液和 LAMP 预混液混匀, 61 °C 恒温孵育 60 min 后, 80 °C 灭活 5 min; 4) 观察预混液颜色变化, 并测定其在波长 646 nm 处的吸光值。

判断方法: 若预混液呈紫色, 且 OD_{646nm} 小于 0.19, 表明肉品仍处于新鲜状态; 若预混液呈蓝色, 且 OD_{646nm} 大于 0.19, 则表明肉品已腐败。

1.6.2 终端市场端设计 终端市场端 (主要为超市) 适宜于食品安全技术人员对零售样品进行即时的新鲜度检测。通常市场平台具备简单的操作仪器和设备, 包括天平、量筒、恒温设备、温度计等。本方法提供 LAMP 预混液 (1×Bst Recation Buffer, 6 mmol/L Mg^{2+} , 1.0 mmol/L dNTP, 0.1 mmol/L 外引物 FB, 1.6 mmol/L 内引物 FBIP, 160 μ mol/L HNB, 0.16 U/ μ L Bst2.0 Warmstart™ DNA 聚合酶, 超纯水补足至 20 μ L), 无菌量杯 (120 mL), 无菌注射器 (针号: 0.5)。

检测方法: 1) 称取 5 g 样品, 装入无菌量杯中, 添加 45 mL 无菌水, 手动振荡混匀 30 s; 2) 将量杯于 100 °C 煮沸 10 min, 取上清液作为样品基因组的粗提液, 冷却备用; 3) 用注射器吸取 1 mL 粗提

液,然后滴加1滴粗提液至LAMP预混液中,混匀,于61~65℃孵育60 min后,观察颜色变化。

判断方法:若预混液呈紫色,表明肉品仍处于新鲜状态;若预混液呈蓝色,则表明肉品已腐败。

1.6.3 家庭厨房端设计 家庭厨房端主要适宜于消费者对日常所购样品新鲜度即时检测。通常家庭不具备检测所需的基本仪器,因此本方法提供LAMP预混液(1×Bst Recation Buffer,6 mmol/L Mg^{2+} ,1.0 mmol/L dNTP,0.1 mmol/L 外引物 FB,1.6 mmol/L 内引物 FBIP,160 $\mu\text{mol/L}$ HNB,0.16 U/ μL Bst 2.0 Warmstart™ DNA 聚合酶,超纯水补足至20 μL),无菌量杯(120 mL),比例模块(3×3×3 cm),无菌注射器(针号:0.5)。

检测方法:1)将肉品按模块比例(3 cm×3 cm×3 cm)切成特定尺寸,迅速转移至刻度量杯;2)向量杯中添加45 mL 无菌水,手动振荡30 s;3)将量杯置于100℃煮沸10 min,滴加1滴粗提液至LAMP预混液中混匀,于61~65℃孵育60 min后,观察颜色变化。

判断方法:若预混液呈紫色,表明肉品仍处于新鲜状态;若预混液呈蓝色,则表明肉品已腐败。

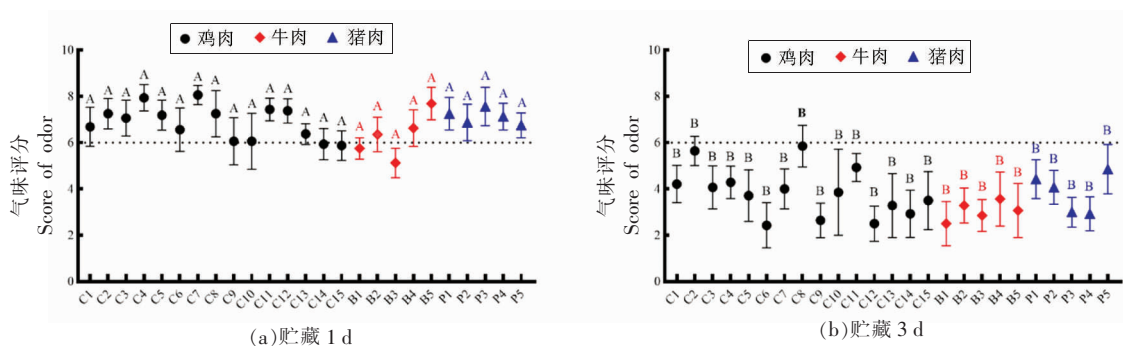
1.7 数据统计分析

试验结果以“平均数±标准差”表示, $n=5$;数据使用SAS 9.4 软件进行方差分析,用Duncan's multiple range test 进行显著性分析,采用Graph-Pad Prism 8.0.2 软件作图分析。

2 结果与分析

2.1 感官评定

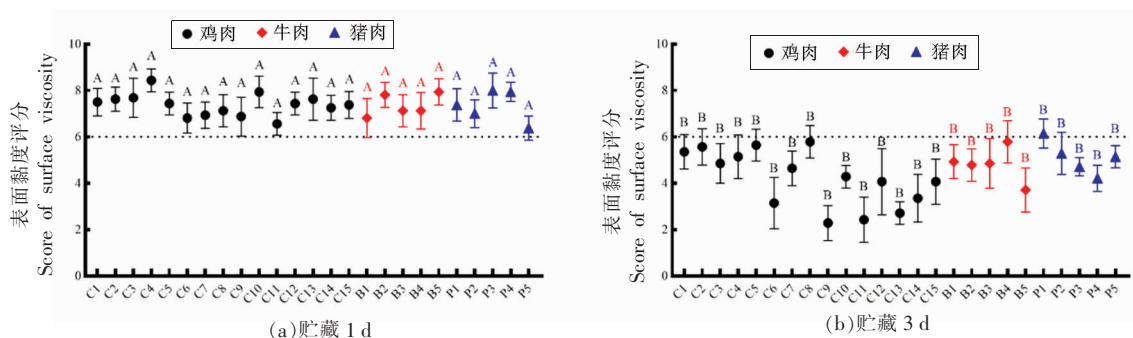
前期研究表明感官评定中以气味和产黏属性区分肉品新鲜度更为准确^[19]。如图2所示,贮藏1 d的肉品气味大部分处于可接受范围,表明此时品质仍可以接受,而B1和B3组评分已经低于6分,腐败程度也高于其它组别,这可能是由于样品微生物初始污染量较高,产生腐败现象^[25];贮藏3 d后,各样品组评分均降至6分以下,表明此时气味评分已发生显著降低,处于腐败状态。表面黏度如图3所示,样品在贮藏1 d后仍保持较为光滑



注:C1~C15为鸡肉;B1~B5为牛肉;P1~P5为猪肉。结果以“平均值±标准差”表示, $n=5$;不同大写字母表示组内差异显著($P<0.05$)。

图2 气味属性

Fig.2 Scent properties



注:C1~C15为鸡肉;B1~B5为牛肉;P1~P5为猪肉。结果以“平均值±标准差”表示, $n=5$;不同大写字母表示组内差异显著($P<0.05$)。

图3 产黏属性

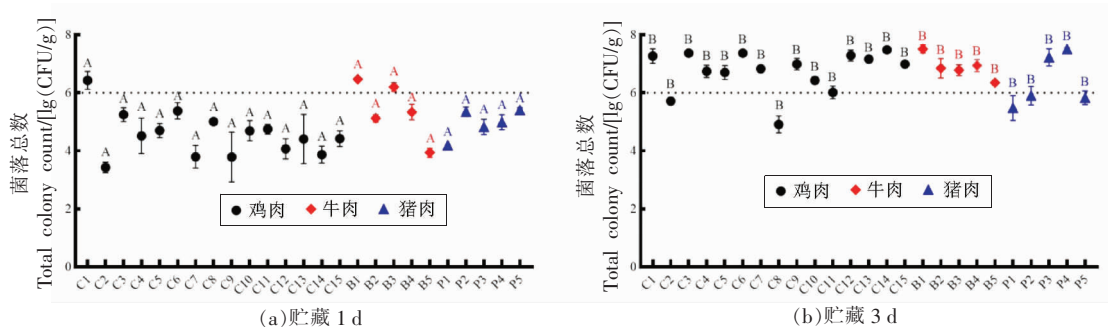
Fig.3 Production viscosity properties

不发黏的特性, 而贮藏 3 d 后则开始出现明显产黏现象, 品质下降。综上, 感官评定主要在于粗略鉴别新鲜肉和腐败肉, 尤其是对贮藏 3 d 后的肉样, 仍需借助其它腐败指标做进一步评价。

2.2 细菌数量

菌落总数常作为评价肉品新鲜度的金指标, 一般情况下, 肉的品质安全指标将菌落总数大于 6.0 lg(CFU/g) 定义为腐败肉^[26-27]。如图 4 所示, 样品贮藏 1 d 后, 菌落总数维持在 3.5~5.5 lg(CFU/g) 范围内, 符合鲜肉标准; 而 C1、B1 和 B3 组样品菌落总数此时已高于 6 lg(CFU/g), 表明其初始污染量较高^[28], 绝大部分样品在贮藏 3 d 后都处于 6.0~

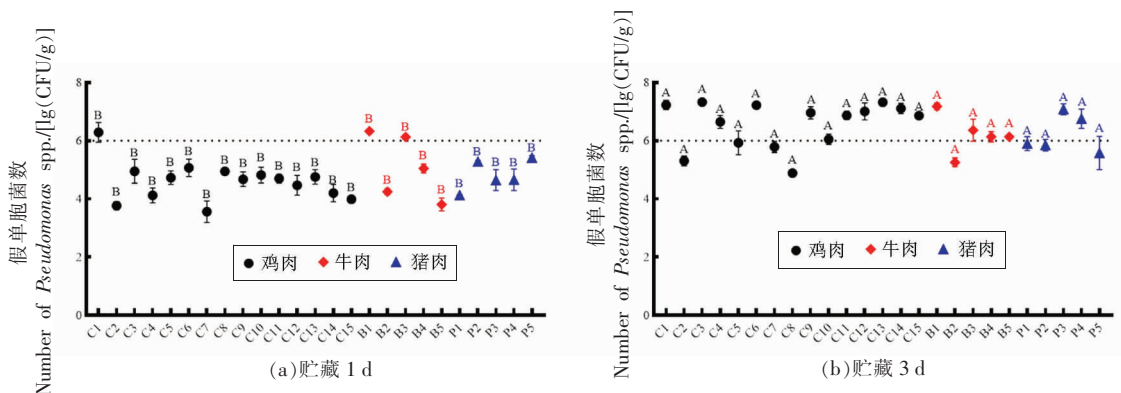
7.5 lg(CFU/g) 范围内, 表面此时肉样已腐败。Mansur 等^[29]和 Li 等^[30]的研究也证实了本研究结果。假单胞菌数见图 5, 贮藏 1 d 的样品中的假单胞菌数量总体在 6.0 lg(CFU/g) 以下, 部分肉样组菌数超过 6.0 lg(CFU/g), 贮藏 3 d 后, 样品中假单胞菌数普遍在 6.0~7.3 lg(CFU/g) 以上, 且增长速度较快。综上结果表明, 假单胞菌普遍存在于冷鲜鸡肉、猪肉和牛肉中, 且可以在低温有氧环境中迅速增殖; 对比细菌总数结果, 两种菌数的增长情况基本一致, 再次证明了假单胞菌是肉类腐败中的优势菌, 这也为本方法检测假单胞菌反映肉品新鲜度提供了理论基础。



注: C1~C15 为鸡肉; B1~B5 为牛肉; P1~P5 为猪肉。结果以“平均值±标准差”表示, n=5; 不同大写字母表示组内差异显著 (P<0.05)。

图 4 菌落总数

Fig.4 Total colony count



注: C1~C15 为鸡肉; B1~B5 为牛肉; P1~P5 为猪肉。结果以“平均值±标准差”表示, n=5; 不同大写字母表示组内差异显著 (P<0.05)。

图 5 假单胞菌数

Fig.5 Number of *Pseudomonas* spp.

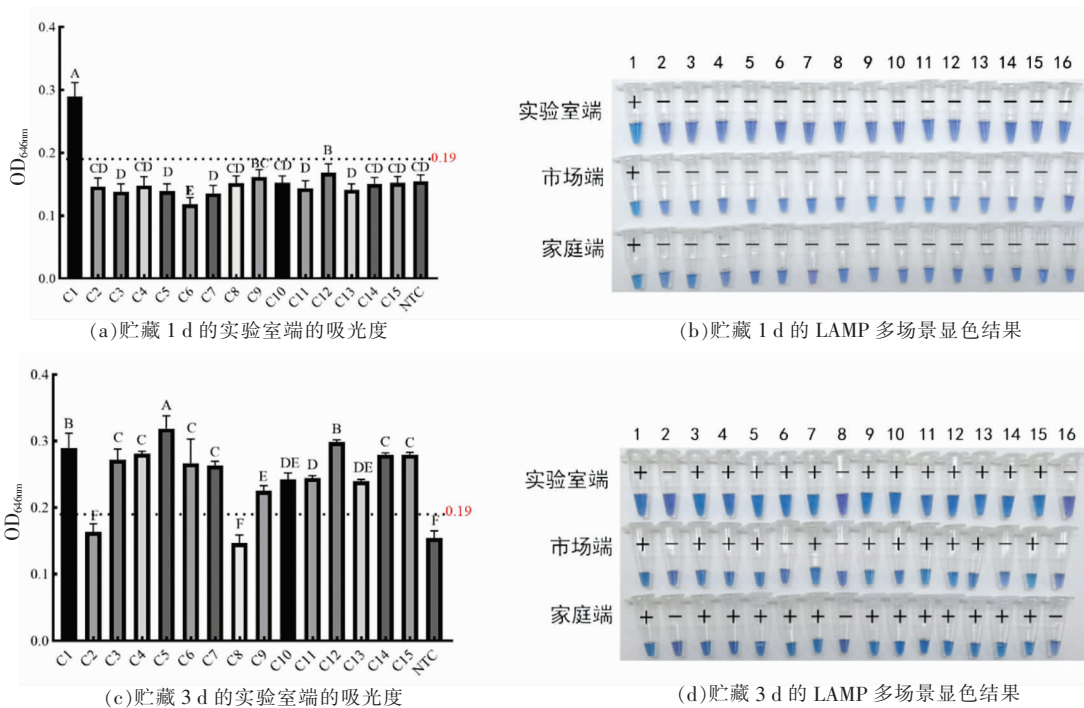
2.3 LAMP 可视化检测

按照 1.6 节所设计的 3 种场景端监测实际样品的新鲜度。如图 6 所示, 15 组冷鲜鸡肉贮藏 1 d 后, C1 组的结果呈阳性, 反应液呈蓝色且吸光度大于 0.19。表明 C1 组样品在第 1 天时已处于腐败

状态, C2~C15 组样品测试均为阴性。此结果与菌落总数测得结果一致; 贮藏 3 d 后 C2、C8 组样品结果呈现为阴性, 表明两组样品此时仍处于新鲜状态, 对比上述菌落总数以及感官评定指标, 其结果保持一致。其余组别样品的测试结果均为阳性,

表明此时已发生了腐败。图 7 结果所示,5 组冷鲜牛肉贮藏 1 d 后,B1、B3 组样品测试结果为阳性;贮藏 3 d 后 5 组样品均呈阳性结果,与菌落总数结果一致。如图 8 所示,5 组冷鲜猪肉贮藏 1 d 时测试结果均为阴性,表明肉品质良好;贮藏第 3 天时,P1~P4 组样品检测结果均为阳性,表明肉样已腐败。虽然 P1、P2 组样品此时的菌落总数未超过标准【6 lg(CFU/g)】,但也已接近腐败阈值,且出现明显感官评分下降,故可判断其处于腐败阶段。

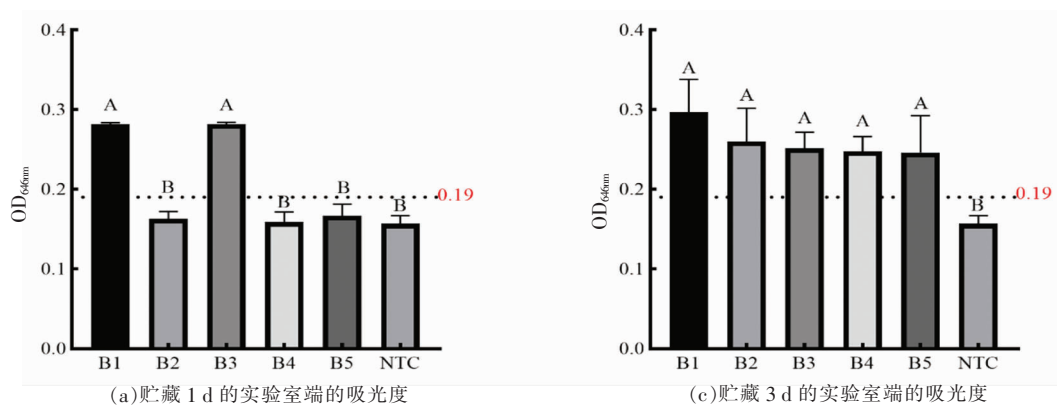
实验室端检测严格按照 1.6 节方法进行,可保证体系中各组分浓度稳定且精确控温,后通过测定最终吸光度以辅助验证检测结果,使其更具有可靠性。终端市场端和家庭厨房端因受限于检测条件,其检测过程较为简便。对比三者检测应用模式,其结果具有一致性,均可通过颜色判别,来有效鉴定肉品的新鲜度。综上,本研究构建的 LAMP 检测模式可在多场景中进行腐败表征,具有良好的适用性。

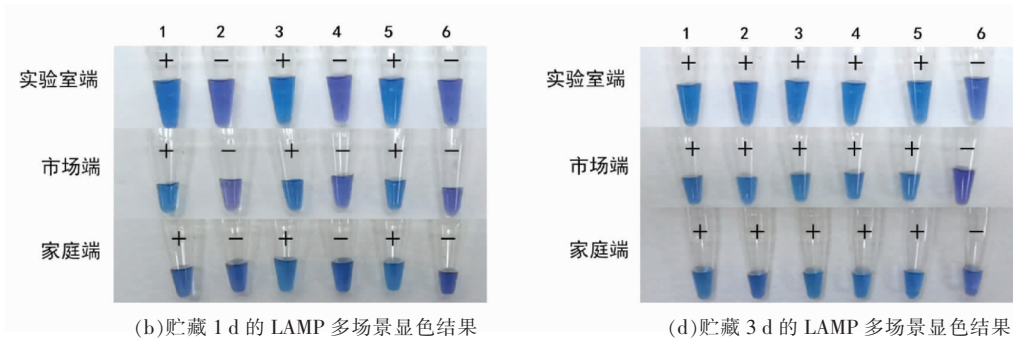


注:1~15 为 C1~C15 鸡肉;16 为 NTC。+, 阳性检测液为蓝色;-。阴性检测液为紫色。结果以“平均值±标准差”表示,n=5;不同大写字母表示组内差异显著(P<0.05)。

图 6 冷鲜鸡肉组检测结果

Fig.6 Test results of chilled chicken group

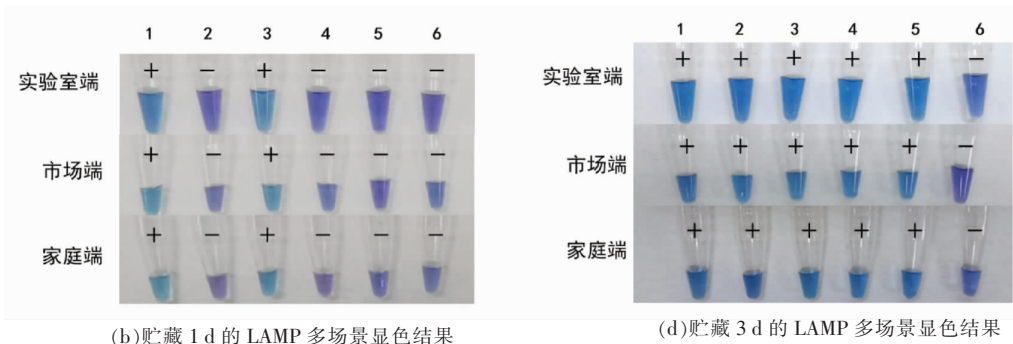
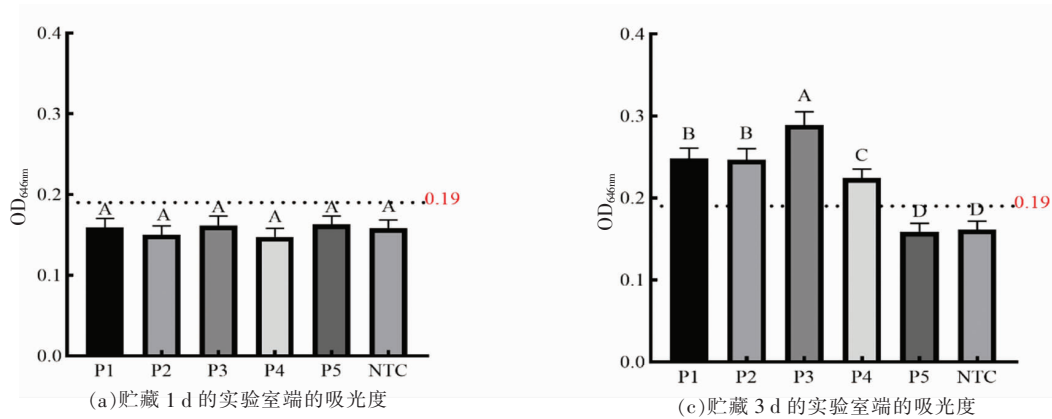




注:1~5 为 B1~B5 牛肉;6 为 NTC。+。阳性检测液为蓝色;-。阴性检测液为紫色。结果以“平均值±标准差”表示,n=5;不同大写字母表示组内差异显著(P<0.05)。

图 7 冷鲜牛肉组检测结果

Fig.7 Test results of chilled beef group



注:1~5 为 P1~P5 猪肉;6 为 NTC。+。阳性检测液为蓝色;-。阴性检测液为紫色。结果以“平均值±标准差”表示,n=5;不同大写字母表示组内差异显著(P<0.05)。

图 8 冷鲜猪肉组检测结果

Fig.8 Test results of chilled pork group

2.4 准确性评估

综上 LAMP 结果显示,检测实验室端、终端市场端和家庭厨房端 3 种场景下均可对肉品新鲜度进行有效监测。为了验证本方法在实际样品检测中的准确性,将 50 个样品(鸡肉 C1~C15、牛肉 B1~B5、猪肉 P1~P5 在贮藏 1 d 和 3 d 后的样品)的 LAMP 检测结果与其菌落总数测定结果进行比

较。菌落总数测定共检测到 23 个腐败样品和 27 个新鲜样品。与菌落总数结果对比,检测实验室端共检测出 25 个新鲜样品和 23 个腐败样品、终端市场端共检测出 25 个新鲜样品和 21 个腐败样品;家庭厨房端共检测出 25 个新鲜样品和 23 个腐败样品。如表 3 所示,实验室、市场和家庭端的 LAMP 检测分别与菌落总数之间具有 100%,

91.3%,100%的腐败评估准确匹配度。因此本研究展示的实际检测方法与传统菌落总数测定之间具

有高度的相关性,存在有效代替传统检测模式的可行性。

表3 LAMP多场景检测和菌落总数测定结果的相关性

Table 3 Correlation between the results of LAMP multi-scenario assay and colony size determination

	LAMP检测									
	实验室端			市场端			家庭端			
	阳性+	阴性-		阳性+	阴性-		阳性+	阴性-		
菌落总数	阳性+	23	0	PAAM:100%	21	2	PAAM:91.3%	23	0	PAAM:100%
	阴性-	2	25	NAAM:92.6%	2	25	NAAM:92.6%	2	25	NAAM:92.6%

注:菌落总数:鸡肉 C1~C15、牛肉 B1~B5、猪肉 P1~P5 在贮藏 1 d 和 3 d 后测得的 50 个样品量数据;PAAM. 阳性评估准确匹配度;NAAM. 阴性评估准确匹配度。

3 结论

本研究建立的 LAMP 多场景检测模式可有效反映各环境下待测肉样中的假单胞菌数,从而评价肉品腐败的情况。通过合理搭配反应条件和应用模式,可实现对加工环节高风险区、市售环境以及家庭厨房中冷鲜肉中的假单胞菌可视化检测。同时将 LAMP 检测与菌落总数测定结果对比,3 种场景下肉品腐败评估可达到实验室端为 100%,终端市场端为 91.3%,家庭厨房端为 100%的准确匹配度,表明该方法在多场景下对冷鲜肉样的新鲜度评估具有良好效果。因此,本方法能在 75 min 内实现可视化鉴定出腐败肉品,且操作简单,可极大程度提高即时检测肉品新鲜度的效率。本研究方式不仅拓展了即时检测技术的受众范围,而且存在替代传统检测的潜在可能性,具有广阔的应用前景。

参 考 文 献

[1] 张晋豪,王浩东,刘欣悦,等.基于 LAMP 技术快速检测冷鲜鸡新鲜度[J].食品科学,2023,44(6):351-359.
ZHANG J H, WANG H D, LIU X Y, et al. Rapid detection of freshness of chilled chicken based on LAMP technology[J]. Food Science, 2023, 44(6): 351-359.

[2] 吴亚婕. 莓实假单胞菌 *aprD* 基因调控冷鲜鸡肉腐败过程的作用机制[D]. 南京:南京财经大学,2023.
WU Y J. Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa aprD* gene in regulating spoilage of chilled chicken meat[D]. Nanjing: Nanjing University of Finance and

Economics, 2023.

[3] 丁紫璇. 全谱脉冲光波对冰鲜鸡的保鲜效果研究[D]. 南京:南京农业大学,2022.
DING Z X. Study on the preservation effect of full-spectrum pulsed light wave on chilled chicken[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2022.

[4] 刘永吉,谢晶,赵丽珺,等. 冷却猪肉及托盘表面细菌生物被膜分析和肉源荧光假单胞菌的鉴定与被膜研究[J]. 现代食品科技,2016,32(6):42-49.
LIU Y J, XIE J, ZHAO L J, et al. Bacterial biofilm analysis on the surface of cooled pork and trays and identification and periplasmic study of meat-derived *Pseudomonas fluorescens* [J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(6): 42-49.

[5] 孟璐. 生鲜乳中假单胞杆菌属鉴定及不同储存温度下蛋白酶活性的研究[D]. 北京:中国农业科学院,2021.
MENG L. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* in raw milk and protease activity under different storage temperatures [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2021.

[6] 李猛刚. 防御假单胞菌 Pf-5 脂肪酶 LipA 调控基因的筛选及调控机理研究[D]. 武汉:华中科技大学,2017.
LI M G. Screening of *Pseudomonas aeruginosa* Pf-5 lipase LipA-regulated genes and study of regulatory mechanism[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2017.

[7] 方金玉. 冷鲜牛肉中假单胞菌和热死环丝菌致腐机制及其光动力杀菌控制研究[D]. 杭州:浙江工商大学,2022.
FANG J Y. Study on the rotting mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* and *Cyclospora thermophila*

- in chilled beef and their photodynamic sterilization control[D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2022.
- [8] COMOLLI J C, DONOHUE T J. Differences in two *Pseudomonas aeruginosa* cbb3 cytochrome oxidases[J]. Molecular Microbiology, 2004, 51(4): 1193–1203.
- [9] 赵端阳, 阎学燕, 陈磊. 不同方法鉴定包装饮用水中铜绿假单胞菌含量比较分析[J]. 疾病监测与控制, 2021, 15(5): 352–354.
- ZHAO D Y, YAN X Y, CHEN L. Comparative analysis of different methods for identification of *Pseudomonas aeruginosa* in packaged drinking water[J]. Disease Surveillance and Control, 2021, 15(5): 352–354.
- [10] 张若煜, 董鹏程, 朱立贤, 等. 生鲜肉中假单胞菌致腐机制的研究进展[J]. 食品科学, 2020, 41(17): 291–297.
- ZHANG R Y, DONG P C, ZHU L X, et al. Progress in the study of spoilage mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* in fresh meat[J]. Food Science, 2020, 41(17): 291–297.
- [11] 张淑红, 吴清平, 徐晓可, 等. 桶装水中铜绿假单胞菌检测方法的比较[J]. 现代食品科技, 2011, 27(11): 1403–1405, 1335.
- ZHANG S H, WU Q P, XU X K, et al. Comparison of detection methods for *Pseudomonas aeruginosa* in bottled water[J]. Modern Food Science and Technology, 2011, 27(11): 1403–1405, 1335.
- [12] 李宁. 冷鲜猪肉中微生物多样性和优势腐败菌分子检测技术研究[D]. 无锡: 江南大学, 2019.
- LI N. Research on microbial diversity and molecular detection technology of dominant spoilage bacteria in cold pork[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019.
- [13] 余姓鸿, 张婧, 安徽, 等. 猪肉及制品中 HEV、PEDV 和 PDCoV 三重 qPCR 方法的建立与应用[J]. 食品工业科技, 2023, 45(2): 210–219.
- YU X H, ZHANG J, AN W, et al. Establishment and application of a triple qPCR method for HEV, PEDV and PDCoV in pork and products[J]. Food Industry Science and Technology, 2023, 45(2): 210–219.
- [14] MAO Z F, CHEN R P, WANG X J, et al. CRISPR/Cas12a-based technology: A powerful tool for biosensing in food safety[J]. Trends in Food Science & Technology, 2022, 122(4): 211–222.
- [15] 谢佳芮, 寇美玲, 苗海生. 环介导等温扩增技术的最新研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2021, 53(2): 119–125.
- XIE J R, KOU M L, MIAO H S. Recent advances in ring-mediated isothermal amplification[J]. Livestock and Veterinary Medicine, 2021, 53(2): 119–125.
- [16] CRAW P, BALACHANDRAN W. Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: A critical review[J]. Lab on a Chip, 2012, 12(14): 2469.
- [17] WONG Y P, OTHMAN S, LAU Y L, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A versatile technique for detection of micro-organisms[J]. J Appl Microbiol, 2018, 124(3): 626–643.
- [18] NOTOMI T, MORI Y, TOMITA N, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): Principle, features, and future prospects[J]. Journal of Microbiology, 2015, 53(1): 1–5.
- [19] 张晋豪. 基于 LAMP 技术的冰鲜鸡新鲜度可视化检测方法研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2022.
- ZHANG J H. Research on the visualization of freshness detection method for chilled chicken based on LAMP technology[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2022.
- [20] CHMIEL M, SŁOWIŃSKI M. Effect of storage in display cases on the sensory quality of chicken breast meat (*M. pectoralis*)[J]. Revista Brasileira de Ciência Avícola, 2018, 20(1): 91–98.
- [21] 陈清敏. 反复冻融牛肉品质变化评价技术的适用性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2020.
- CHEN Q M. Study on the applicability of the technique of evaluating the quality change of beef by repeated freezing and thawing[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020.
- [22] 陈慧芝. 基于智能包装标签的典型生鲜配菜新鲜度无损检测的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2019.
- CHEN H Z. Research on non-destructive detection of the freshness of typical fresh side dishes based on smart package labeling[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019.
- [23] 卫生部, 中国国家标准化管理委员会. 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: 2–7.
- Ministry of Health, National Standardization Administration of China. Microbiological examination of foodhygiene. Detection of aerobic bacterial count:

- GB 4789.2-2016[S]. Beijing: China Standard Press, 2016: 2-7.
- [24] 国家质量监督检验检疫总局. 出口肉及肉制品中假单胞菌属的计数方法: SN/T 4044-2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014: 2-4.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine. Enumeration method of *Pseudomonas* spp. in meat and meat products for export: SN/T 4044-2014[S]. Beijing: China Standard Press, 2014: 2-4.
- [25] 孙彦雨. 冰鲜鸡肉腐败微生物分析及其减菌剂的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
- SUN Y Y. Analysis of spoilage microorganisms in chilled chicken meat and research on bacteriostatic reduction[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2011.
- [26] 刘婷婷, 方忠意, 范念亭, 等. 冷鲜猪肉贮藏期间微生物污染对其品质的影响[J]. 中国动物检疫, 2018, 35(8): 29-31, 48.
- LIU T T, FANG Z Y, FAN N T, et al. Effect of microbial contamination on the quality of cold pork during storage[J]. China Animal Quarantine, 2018, 35(8): 29-31, 48.
- [27] 徐晓瑾. 气调包装生鲜冷却牛肉中腐败菌和生物胺的相关性[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.
- XU X J. Correlation between spoilage bacteria and biogenic amines in air-conditioned packaged fresh cooled beef[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013.
- [28] 庄文静, 包建强, 郑稳, 等. 微冻和冰藏期间大菱鲜鲜度及组织结构的变化规律[J]. 食品与发酵工业, 2023, 50(10): 220-229.
- ZHUANG W J, BAO J Q, ZHENG J, et al. Changes of freshness and tissue structure of turbot during micro-frozen and ice storage[J]. Food and Fermentation Industry, 2023, 50(10): 220-229.
- [29] MANSUR A R, SONG E, CHO Y, et al. Comparative evaluation of spoilage-related bacterial diversity and metabolite profiles in chilled beef stored under air and vacuum packaging[J]. Food Microbiology, 2019, 77(1): 166-172.
- [30] LI N, ZHANG Y X, WU Q P, et al. High-throughput sequencing analysis of bacterial community composition and quality characteristics in refrigerated pork during storage[J]. Food Microbiology, 2019, 83(10): 86-94.

Evaluation of the Effectiveness of LAMP-Based Meat Freshness Detection

SHENG Junsheng, ZHANG Jinhao, LIU Silu, XU Xinglian, WANG Huhu*

(State Key Laboratory of Meat Quality Control and Cultured Meat Development, College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract Spoilage of cold meat during storage can cause huge economic losses to the industry, and it is crucial to establish a set of rapid test methods for meat freshness. In this paper, based on the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) system successfully established in the previous stage, three application scenarios (testing laboratory, terminal market and home kitchen) were designed, and a total of 125 sets of samples were collected from 25 brands of chilled meats sold in the market to verify the accuracy of the LAMP system in monitoring the freshness of meat under multiple scenarios, by evaluating the organoleptic and bacterial counts. A total of 125 samples were collected from 25 brands of cold meat sold in the market. The results showed that after 3 days of storage at 4 °C, the odor and viscosity scores of cold meat dropped below the threshold, and the total number of bacterial colonies reached 6.0-7.5 lg(CFU/g). The LAMP system could accurately monitor the freshness of meat in all three scenarios, with the spoiled meat samples showing a blue color and an absorbance value of more than 0.19, and fresh meat samples keeping a purple color and an absorbance value of less than 0.19. The LAMP system was also used in multiple scenarios to evaluate the freshness of meat. Meanwhile, comparing the results of multi-scenarios with the total colony count determination, the accuracy of spoilage monitoring can reach 100% for the experimental end of the test, 91.3% for the end-market end, and 100% for the home kitchen end. Therefore, this method has good accuracy in assessing the freshness of cold meat in different scenarios, and can realize the monitoring of meat freshness in multiple scenarios, with the feasibility of replacing the traditional detection methods.

Keywords freshness; *Pseudomonas*; rapid detection; ring-mediated isothermal amplification