

文章编号 1009-038X(2004)04-0013-03

外界因子对超高压杀灭大肠杆菌效果的影响

高瑀珑, 江汉湖*

(南京农业大学 食品科技学院, 江苏 南京 210095)

摘 要:通过鉴别设计法对影响超高压杀菌效果的外界因子,如压力、温度、保压时间、升压速度及卸压速度等关键因子进行考察与评价。结果表明:温度、压力和保压时间对灭活大肠杆菌影响显著,升压速度和卸压速度对灭活大肠杆菌影响不显著。

关键词:超高压; 大肠杆菌; 鉴别设计; 外界因子

中图分类号: TS 201.3

文献标识码: A

The Effects of External Factors on High Hydrostatic Pressure Inactivation for *Escherichia coli*

GAO Yu-long, JIANG Han-hu

(College of Food Science and Technology, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China)

Abstract: High hydrostatic pressure (HHP) is an effective cool technique of inactivation. Screening design was used for estimating the sterilized effects of external factors in High hydrostatic pressure in this study, with respect to the variables such as pressure, temperature, pressure holding time, ramp rate and depressurization rate. Result showed that the pressure, temperature and pressure holding time were the major affecting factors for high hydrostatic pressure inactivation while the ramp rate and depressurization rate not.

Key words: high hydrostatic pressure (HHP); *Escherichia coli*; screening design; external factor

长期以来,人们利用加热杀菌、冷冻保藏、干制盐渍、添加化学防腐剂等方法来保存各种食品,由于这些方法不可避免地存在营养成分——尤其是某些热敏性天然生理活性成分的损失。因此,为了获得更高品质的高效、安全且能保持食品原有风味与营养成分的食品,研究人员不断地探索其它新的食品保藏方法。食品超高压杀菌技术(High pressure processing, HPP)简称高压技术或静水压技术(High hydrostatic pressure, HHP),就是将食品密封于高压容器,在静高压下(大于 100 MPa)处理一段时间,

以达到食品保藏的目的^[1]。与热处理方法相比较,该项技术对食品作用均一、迅速且无体积和形状的限制,对风味物质、色素等小分子物质的天然结构无影响,能较好地保持食品的原汁、原味及营养成分等^[2-4]。超高压杀菌技术使酶失活,抑制褐变反应,弥补冷冻保藏引起的色泽变化、失去弹性等缺陷^[5],避免热杀菌带来的异臭以及异常物质的生成。20 世纪 90 年代,日本明治屋食品公司首次将超高压技术应用于食品杀菌研究^[6],1991 年 4 月,高压食品——果酱在日本问世,随之,欧美等国相继

收稿日期 2003-11-19; 修回日期 2003-12-20.

基金项目 财政部、农业部农业科技跨越计划(2001 年)资助课题.

作者简介 高瑀珑(1975-),男,山西忻州人,食品生物技术博士研究生;* 通讯作者.

开展这方面的研究.

食品高压处理技术是食品加工业的一次重大革命^[7],然而至今,学术界还未提出一种统一完善的食品超高压杀菌工艺模型. 鉴于此,作者以食品中常见的粪便污染指标菌——大肠杆菌为试材,采用鉴别设计(SD)法,对影响超高压杀灭大肠杆菌效果的相关外界因子进行了研究,所筛选出的关键影响因子为进一步优化超高压杀菌工艺参数奠定了基础.

传统的单次因子法(one-factor-at-a-time)试验设计是每次改变其中一种因子的水平,保持其它因子的水平不变,研究单因子的变化规律. 当考察的因子较多时,该方法需要较长的试验周期,对于具有交互作用的多因子试验,可能导致不可靠的甚至错误的结论. 与之相比,鉴别设计(Screening design, SD)法能以较少的试验次数,从诸多的影响因素中筛选出关键因子,且省时、省力、经济合理. 近年来,鉴别设计法已经成功地应用于各种生物工程的优化方面^[8],但用于优化杀菌条件的研究尚未见报道.

1 材料与方法

1.1 试剂

缓冲液 KCl 1.10 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.71 g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 3.77 g, CaSO₄ · 2H₂O 1.00 g, CaCl₂ 0.86 g, 柠檬酸 2.18 g, 乳糖 52.00 g, 重蒸水 1 L, pH 7.0. 无菌生理盐水冷藏备用,过滤法除菌.

1.2 菌种

大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC 8739,购自于中国科学院微生物所.

1.3 培养基

营养肉汁琼脂 按文献[9]配制;营养肉汁 按文献[9]配制.

1.4 仪器设备

超高压机 内蒙古包头市五十二所研制,压力范围 0 ~ 800 MPa;高压介质 葵二酸二辛脂;FR-900 型多功能薄膜封口机 上海麦尔多食品机械有限公司制造;TGL-220 型冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂制造;XW-80 型旋涡混合器 上海医科大学仪器厂制造;Sartorius 精密电子天平 北京塞多斯天平有限公司制造;818 奥立龙酸度计:Orion Research Inc. 制造 其余均为微生物实验常规仪器.

1.5 试验方法

1.5.1 菌悬液制备及超高压处理 供试菌种经牛

奶活化后,接入营养肉汁培养基,于 37 ℃,140 r/min 振荡培养 48 h. 5 000 r/min 离心 15 min,弃上清液,以缓冲液制成菌悬液,调整细胞浓度,使起始菌数为 10⁹ CFU/mL. 将其分装于 5 mL 的无菌医用塑料瓶,热封口(不留顶隙),冷藏备用. 按照试验设计控制高压介质的温度,待样品温度与高压介质温度达到平衡后,进行超高压处理,每一样品重复 3 次. 处理后立即进行微生物计数,取未经超高压处理的菌悬液作为对照.

1.5.2 微生物数量测定 以无菌缓冲液适当稀释对照及超高压处理后的供试菌悬液,置于营养肉汁琼脂平板上,37 ℃ 培养 48 h 后,按文献[10]进行菌落记数.

1.6 实验设计

据文献[11]报道,影响超高压杀菌的外界因子是压强、温度、保压时间、升压速度和卸压速度,因此,以上述参数为主要的考察因子(自变量),分别以 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 和 X_5 表示之,自变量的高、低水平分别为 +1、-1,按方程 $x_i = (X_i - X_0) / \Delta X$ 对自变量进行编码. 其中, x_i 为自变量的编码值, X_i 为自变量的真实值, X_0 为试验中心点处自变量的真实值, ΔX 为自变量的变化步长(step change value),因子编码及水平见表 1. 大肠杆菌的死亡数量级 Y 为评价指标(响应值),由方程 $Y = \lg N_t / N_0$ 求得,式中 N_t 为超高压处理后 1 mL 菌液中的活菌数, N_0 为对照 1 mL 菌液中的活菌数.

试验设计与数据处理采用 JMP 4.05 软件完成.

表 1 试验因素水平及编码

Tab. 1 Code and level of factors chosen for the trials

变量	代码		水平 ^a	
	编码	非编码	-1	1
温度/℃	x_1	X_1	20	40
压强/MPa	x_2	X_2	150	350
保压时间/min	x_3	X_3	10	20
升压速度/(MPa/min)	x_4	X_4	50	100
卸压速度/(MPa/s)	x_5	X_5	50	100

注:^a $x_1 = (X_1 - 30) / 10$; $x_2 = (X_2 - 250) / 100$; $x_3 = (X_3 - 15) / 5$; $x_4 = (X_4 - 75) / 25$; $x_5 = (X_5 - 75) / 25$.

2 结果与分析

外界因子对超高压杀灭大肠杆菌效果的影响

见表 2.

表 2 试验设计与结果							
Tab.2 Experimental designs and results							
试验号	变 量					响应值	
	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	实测值	预测值
1	-1	1	-1	1	1	2.67	2.51
2	1	1	1	-1	-1	6.63	6.44
3	1	1	1	1	1	6.91	6.44
4	1	-1	1	1	-1	4.03	4.17
5	-1	1	1	1	-1	2.86	3.16
6	-1	-1	-1	-1	1	0.21	0.24
7	-1	-1	1	-1	-1	0.95	0.89
8	-1	-1	-1	1	-1	0.32	0.24
9	1	-1	1	-1	1	3.98	4.17
10	1	-1	-1	1	1	3.61	3.52
11	-1	1	-1	-1	-1	2.64	2.51
12	1	1	-1	-1	1	5.45	5.79
13	-1	-1	1	1	1	1.01	0.89
14	1	1	-1	1	-1	5.68	5.79
15	1	-1	-1	-1	-1	3.54	3.52
16	-1	1	1	-1	1	2.94	3.16

利用 JMP 软件对表 2 的数据进行逐步回归分析,得最优一次拟合多元回归模型方程为: $Y = 3.339\ 34 + 1.639\ 4\ x_1 + 1.133\ 1\ x_2 + 0.324\ 4\ x_3$,多元回归模型方差分析(ANOVA)结果见表 3,各因子系数显著性检验见表 4.

表 3 回归模型方差分析					
Tab.3 Analysis of variance (ANOVA) for regression equation					
变异源	自由度	平方和	均方	F 值	Prob>F
模型	5	65.264 081	13.052 8	210.9333	<0.0001
误差	10	0.618 812	0.061 9		
总和	15	65.882 894			
		$r = 0.995\ 2$	$R^2 = 0.990\ 6$		

由表 3 可以看出: $F = 210.933\ 3 > F_{0.01}(5,10) = 5.64, P < 0.000\ 1$,表明模型方程极显著,不同处理间的差异极显著,证明该模型在 99% 的水平上

足够拟合了试验数据.该模型的决定系数为 0.990 6,表明 99.06% 的试验数据的可变性可用此模型解释,仅有总变异的 1% 不能用此模型来解释;复相关系数为 0.995 2,说明回归模型的拟合度良好,预测值与试验值高度相关.影响超高压杀菌效果的 5 个外界因子中,温度 $X_1(P < 0.000\ 1)$ 、压力 $X_2(P < 0.000\ 1)$ 和保压时间 $X_3(P = 0.000\ 4)$ 对灭活大肠杆菌影响显著,升压速度 $X_4(P = 0.468\ 4)$ 及卸压速度 $X_5(P = 0.898\ 6)$ 对灭活大肠杆菌影响不显著.

表 4 回归方程系数显著性检验表				
Tab.4 Test for significance of regression coefficients				
系数项	回归系数	标准误	t 值	Prob> t
常数项	3.339 375	0.062 19	53.7	<0.000 1
温度 (20,40 ℃)	1.639 375	0.062 19	26.36	<0.000 1
压强 (150,350 MPa)	1.133 125	0.062 19	18.22	<0.000 1
保压时间 (10,20 min)	0.324 375	0.062 19	5.22	0.000 4
升压速度(50, 100 MPa/min)	0.046 875	0.062 19	0.75	0.468 4
卸压速度(50, 100 MPa/min)	0.008 125	0.062 19	0.13	0.898 6

3 讨 论

通过鉴别设计法(SD)对各因子的效应进行评价,有效地找出主效应,发现在影响超高压杀灭大肠杆菌效果的外界因子中,温度、压力和保压时间影响显著,升压速度和卸压速度影响不显著.据 J. P. P. M. Smelt^[11]的研究认为,细菌细胞尤其是没有液泡的大肠杆菌对升压和卸压速度不敏感,而具有液泡结构的微生物细胞对升压和卸压速度普遍较敏感,如酵母菌等.尽管在本试验水平范围内升压和卸压速度对灭活大肠杆菌影响不显著,但在试验水平范围外,此两因素对灭活供试菌是否具有显著效应还有待进一步研究.为了缩短食品加工时间、节约能源,升压速度和卸压速度分别采用 100 MPa/min 和 100 MPa/s 较合理.

参考文献：

[1] 阮曾, 曾庆孝. 环境因子对超高压效果的影响[J]. 食品科学, 1997, 18(4): 8-10.
[2] Cheftel J C. Review :high-pressure, microbial inactivation and food preservation[J]. Food Sci Technol Int, 1995, (1) 75-90.

参考文献：

[1] G Blix, A Gottscharlk, E Klenk. Proposed nomenclature in the field of neuraminic and sialic acid[J]. **Nature**, 1957, 179 : 1088.

[2] Gwo-Jenn Shen, Arun K, Masayuki Izumi, *et al.* Expression of α -2,9/ α -2,8-Polysialyltransferase from *Escherichia coli* K92 [J]. **Biol Chem**, 1999, 274 (49) :35139 – 35146.

[3] Zbigniew J, Karl A Nieforth. Carbohydrate in Drugs Design [M]. New York :Marcel Dekker, 1997.

[4] 高剑峰,冯万祥. 血液中唾液酸的提取和结晶纯化 [J]. 中国医药工业杂志,1996,27 (6) 246 – 247.

[5] Lekh Raj Juneja, Mamoru Koketsu. Large-scale preparation of sialic acid from chalaza and egg-yolk membrane [J]. **Carbohydrate Research**, 1991, 214 :179 – 186.

[6] M W Whitehouse, F Zilliken. Isolation and determination of neuraminic (sialic) acids [J]. **Methods of Biochemical Analysis**, 1960, 8 :199 – 218.

[7] Massarn Shimatanl. Process for manufacturing sialic acids-containing composition [P]. USP :5 270 462, 1993-12-14.

[8] 于军华,詹晓北,朱莉. 聚唾液酸的摇瓶工艺 [J]. 无锡轻工大学学报,2002,21 (6) 583 – 587.

[9] Xiaobei Zhan, Li Zhu, Jianrong Wu, *et al.* Effect of pH on the production of polysialic acid from batch and fed-batch fermentation [J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2002, 11 :201 – 204.

[10] 钱世钧,李剑,高建梅,等. 从大肠杆菌 C-8 制备和纯化唾液酸 [J]. 微生物学报,1999,39 (2) 178 – 180.

(责任编辑 朱 明)

(上接第 15 页)

[3] Knorr D. Effects of high-hydrostatic-pressure processes on food safety and quality [J]. **Food Technol**, 1993, (6) 156 – 161.

[4] Mertens B. New Methods of Food Preservation [M]. London :Blackie, 1995. 135 – 158.

[5] 林树英. 超高压对食品中酶的影响 [J]. 食品与机械, 1999, 73 (5) 30 – 32.

[6] 陈祥奎. 超高压杀菌新技术 [J]. 食品与发酵工业, 1995, (4) 69 – 79.

[7] 潘见, 张文成, 成从贵. 超高压液体饮料实用性灭菌工艺及设备设计 [J]. 食品科学, 1999, (1) 62 – 64.

[8] Armando Smendes, Joao E Decarvalho. Factorial design and response surface optimization of crude violacein for *Chromobacterium violaceum* production [J]. **Biotechnol Lett**, 2001, 23 :1963 – 1969.

[9] 周宇光. 菌种目录 [M]. 北京 :中国农业科技出版社, 1997. 231.

[10] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验 [M]. 北京 :高等教育出版社, 2000. 92 – 94.

[11] Smelt J P P M. Recent advances in the microbiology of high pressure processing [J]. **Trends Food Sci Technol**, 1998, (9) : 152 – 158.

(责任编辑 李春丽)