文章编号：1000-5773(2004)03-0273-06

响应曲面法优化超高压杀灭金黄色葡萄球菌条件的研究*

高瑀珑，王允祥，江汉湖

（南京农业大学食品科技学院，江苏南京 210095）

摘要：因子试验研究结果表明，显著影响超高压杀灭金黄色葡萄球菌效果的外界因子是温度、压力和保压时间。在此基础上，采用响应曲面法（Response Surface Methodology，RSM）建立了超高压杀灭金黄色葡萄球菌的二次多项数学模型，验证了模型的有效性，并探讨了上述3个因子的交互作用及其最佳水平范围，优化出杀灭6个数量级金黄色葡萄球菌 ATCC6538 的外界条件为：温度 34.35 ℃，压力 329.84 MPa，时间 15.53 min。

关键词：超高压杀菌；金黄色葡萄球菌；响应面法；优化

中图分类号：O521.9 **文献标识码**：A

1 引 言

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[2,3]；使酶失活，抑制褐变反应，弥补因冷冻保藏而引起的色泽变化、失去弹性等缺陷[4]；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[5]，1991 年 4 月，高压食品——果酱在日本问世，引起世界轰动，随之，欧美等国相继开展这方面的研究。

食品高压处理技术是食品加工业的一次重大革命[6]，而至今为止，学术界还未提出一种统一完善的食品超高压杀菌模型。鉴于此，本研究以食品中常见的致病菌金黄色葡萄球菌为试材，在因子实验研究的基础上，利用响应曲面法对影响灭活金黄色葡萄球菌的显著因子——温度、压力和保压时间进行了进一步的探索，建立了超高压杀灭该菌的二次多项数学模型，为超高压灭菌在食品工业中的应用提供了理论依据和技术支持。

本研究采用的 Box-Behnken 设计法是以回归方法作为函数估计的工具，将多因子试验中因素与试验结果（响应值）关系函数化，依次可对函数进行面分析，定量地分析各因素及彼此之间交互作用对响应值的影响。采用该统计学试验设计方法，能以较少的试验次数和时间对试验进行全面的研究[7,8]。近年来响应面方法已成功地应用于生物技术的许多方面，此方法日益受到重视。

* **收稿日期**：2003-11-17；**修回日期**：2004-02-09

基金项目：财政部、农业部农业科技跨越计划（2001-2003）

作者简介：高瑀珑（1975—），男，博士，主要从事食品微生物及生物技术研究.
E-mail：yulonggao19762001@yahoo.com.cn

通讯作者：江汉湖，男，博士生导师. E-mail：nnjhh@yahoo.com.cn

2 试验材料和方法

2.1 试剂

缓冲液：KCl(1.10 g)，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$(0.71 g)，$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$(3.77 g)，$CaSO_4 \cdot 2H_2O$(1.00 g)，$CaCl_2$(0.86 g)，柠檬酸(2.18 g)，乳糖(52.00 g)，重蒸水(1 000 mL，pH 7.0)，用微孔薄膜过滤器过滤除菌，冷藏备用；无菌生理盐水。以上试剂均为国产分析纯。

2.2 菌种

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)ATCC6538，购于中国科学院微生物研究所。

2.3 培养基

营养肉汁琼脂，营养肉汁：按文献[9]配制。

2.4 仪器设备

采用的仪器设备有：内蒙古包头市五十二所研制的超高压机(压力范围0～800 MPa，高压介质为葵二酸二辛脂)，上海麦尔多食品机械有限公司生产的FR-900型多功能薄膜封口机，上海安亭科学仪器厂生产的TGL-220型冷冻离心机，上海医科大学仪器厂生产的XW-80型旋涡混合器，北京塞多斯天平有限公司生产的Sartorious精密电子天平，美国Orion Research Inc.生产的818奥立龙酸度计，及微生物实验常规仪器。

2.5 试验方法

2.5.1 菌悬液制备及超高压处理

供试菌经牛奶活化后，接入营养肉汁培养基，37 ℃、140 r/min震荡培养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 N_0 为 10^9 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，并取未经超高压处理的菌悬液作为对照。

2.5.2 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，于营养肉汁琼脂平板37 ℃培养48 h后，按文献[10]进行菌落记数。

2.6 试验设计

因子实验表明，温度、压力和保压时间是影响超高压杀灭金黄色葡萄球菌ATCC6538的关键因子，因此，采用Box-Behnken模型，分别以 X_1、X_2、X_3 来表示上述关键因子(自变量)，+1、0、−1代表其高、中、低水平，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，因子编码及水平见表1。

表1 试验因素水平及编码

Table 1 Code and level of factors chosen for the trials

Factor	Symbols		Level(1)		
	Coded	Uncoded	−1	0	1
Temperature/(℃)	x_1	X_1	20	30	40
Pressure/(MPa)	x_2	X_2	200	300	400
Pressure holding time/(min)	x_3	X_3	10	15	20

Note：(1) $x_1=(X_1-30)/10$；$x_2=(X_2-300)/100$；$x_3=(X_3-15)/5$.

金黄色葡萄球菌的死亡数量级 Y 为评价指标，即响应值，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。设超高压作用下金黄色葡萄球菌的死亡数量级的预测模型由最小二乘法拟合的二次多项方程为

$$Y = B_0 + B_1x_1 + B_2x_2 + B_3x_3 + B_{12}x_1x_2 + B_{13}x_1x_3 + B_{23}x_2x_3 + B_{11}x_1^2 + B_{22}x_2^2 + B_{33}x_3^2 \quad (1)$$

式中:Y 为预测响应值,即金黄色葡萄球菌的死亡数量级,B_0 为常数项,B_1、B_2、B_3 分别为线性系数,B_{12}、B_{13}、B_{23}为交互项系数,B_{11}、B_{22}、B_{33}为二次项系数。为了求得此方程的各项系数,需 17 组试验来求解(表 2)。本研究的试验设计与数据处理采用统计软件 Design Expert (Version 6.0.5,2001)来完成,设计及结果见表 2。

表 2　试验设计与结果

Table 2　Experimental design and results

Trial No.	x_1	x_2	x_3	Y	
				Observed	Predicted
1	−1	0	−1	2.97	2.92
2	1	0	−1	4.42	4.71
3	−1	0	1	4.84	4.55
4	1	0	1	5.96	6.01
5	−1	−1	0	2.91	3.02
6	1	−1	0	4.53	4.29
7	−1	1	0	4.85	5.09
8	1	1	0	7.18	7.07
9	0	−1	−1	3.21	3.15
10	0	−1	1	4.09	4.27
11	0	1	−1	5.42	5.23
12	0	1	1	6.98	7.04
13	0	0	0	5.52	5.26
14	0	0	0	5.08	5.26
15	0	0	0	5.31	5.26
16	0	0	0	5.21	5.26
17	0	0	0	5.17	5.26

3　结果和分析

3.1　模型建立及显著性检验

超高压杀灭金黄色葡萄球菌试验结果及其预测值见表 2。

利用 Design Expert 软件对表 2 试验数据进行多元回归拟合,获得超高压杀灭金黄色葡萄球菌 ATCC6538 的数量级(Y)对自变量温度(x_1)、压力(x_2)和保压时间(x_3)的二次多项回归模型方程为

$$Y = 5.26 + 0.82x_1 + 1.21x_2 + 0.73x_3 - 0.38x_1^2 - 0.01x_2^2 - 0.33x_3^2 + 0.18x_1x_2 - 0.08x_1x_3 + 0.17x_2x_3 \quad (2)$$

对该模型进行方差分析,结果见表 3,模型系数显著性检验见表 4。

表 3　回归模型方差分析表

Table 3　Analysis of variance (ANOVA) for regression equation

Source	Sum of squares	DF	Mean square	F value	Prob>F
Model	22.73	9	2.53	35.28	<0.0001
Lack of fit	0.39	3	0.13	4.58	0.0879
Pure error	0.11	4	0.16		
Cor total	23.24	16			

$R=0.9891$, $R^2=0.9784$, $R^2_{Adj}=0.9507$

表 4 回归方程系数显著性检验表

Table 4 Test of significance for regression coefficients

Model term	Coefficient estimate	DF	Standard error	95% CI low	95% CI high	Prob>F
Intercept	5.26	1	0.120	4.98	5.54	
x_1(Temperature)	0.82	1	0.095	0.59	1.04	<0.000 1
x_2(Pressure)	1.21	1	0.095	0.99	1.43	<0.000 1
x_3(Pressure holding time)	0.73	1	0.095	0.51	0.95	0.000 1
x_1^2	−0.38	1	0.130	−0.69	−0.08	0.021 6
x_2^2	−0.01	1	0.130	−0.31	0.30	0.961 6
x_3^2	−0.33	1	0.130	−0.63	−0.02	0.040 8
x_1x_2	0.18	1	0.134	−0.14	0.49	0.226 3
x_1x_3	−0.08	1	0.134	−0.40	0.23	0.557 0
x_2x_3	0.17	1	0.134	−0.15	0.49	0.244 5

由方差分析(ANOVA) 表 3 可以看出:$F_{HG}=35.28>F_{0.01}(9,4)=14.66$,$P<0.000\,1$,表明模型方程(2)极显著,不同处理间的差异极显著;$F_{SN}=4.58<F_{0.05}(9,3)=8.81$,失拟项 $P=0.087\,9>0.05$,不显著;模型的校正决定系数(Adjusted Determination Coefficient,R^2_{Adj}为 0.950 7,说明该模型能解释约 95%响应值的变化,仅有总变异的 5%不能用此模型来解释;相关系数 R 为 0.989 1,说明该模型拟合程度良好,试验误差小,该模型是合适的,可以用此模型来分析和预测超高压杀灭金黄色葡萄球菌的数量级。从表 4 回归方程系数显著性检验可知:模型(2)一次项 x_1($P<0.000\,1$),x_2($P<0.000\,1$),x_3($P=0.000\,1$)极显著;二次项 x_1^2(0.021 6)、x_3^2($P=0.040\,8$)极显著,x_2^2 不显著;交互项不显著。

3.2 金黄色葡萄球菌死亡数量级的响应面分析与优化

模型(2)的响应面及其等高线图解见图 1 和图 2。因食品原料污染的微生物总数小于 10^6 cfu/g 或 10^6 cfu/mL,以杀灭 6 个数量级的金黄色葡萄球菌为标准来优化超高压杀菌条件。

图 1 给出了保压时间为最佳值(15.53 min)时,温度和压力对灭活金黄色葡萄球菌的影响。从图 1 中可以看出,随着温度的升高、压力的增大,金黄色葡萄球菌的死亡数量级急剧增加,温度和压力分别在 24～40 ℃和 320～400 MPa 的范围内时,金黄色葡萄球菌死亡数量级大于 6,欲灭活其 6 个数量级,对模型方程(2)解逆矩阵得杀菌条件为:温度 34.35 ℃,压力 329.84 MPa。

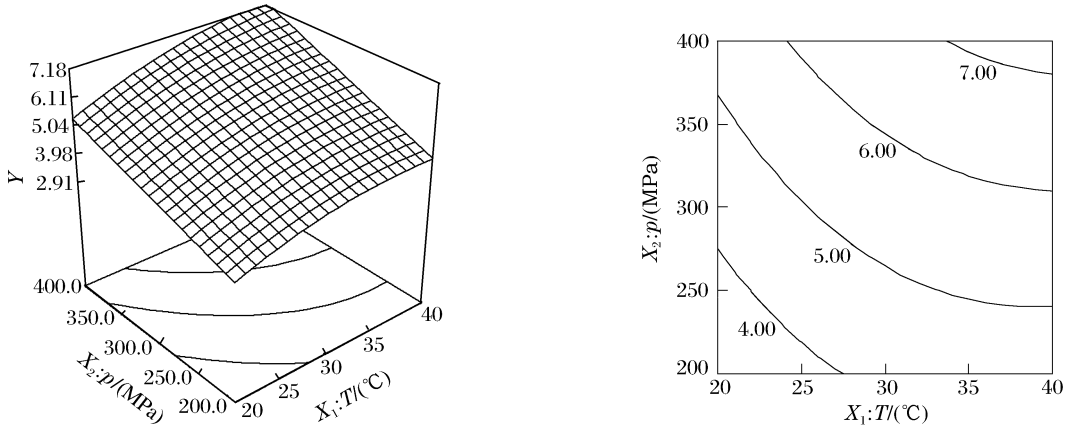


图 1 温度、压力及其交互作用对超高压杀灭金黄色葡萄球菌影响的响应面和等高线

Fig. 1 Response surface plot and its contuor plot of the effect of temperature and pressure and their mutual interactions on *Staphylococcus aureus* of UHHP sterilization

图 2 显示了压力为最佳值(329.84 MPa)时,温度和保压时间对灭活金黄色葡萄球菌的影响。从图 2 中可以看出,随着温度的升高、时间的延长,金黄色葡萄球菌的死亡数量级急剧增加,温度和时间分别在 21～40 ℃和 14.5～20 min 的范围内时,金黄色葡萄球菌死亡数量级大于 6,欲灭活其 6 个数量级,对模型方程(2)解逆矩阵得杀菌条件为:温度 34.35 ℃,时间 15.53 min。

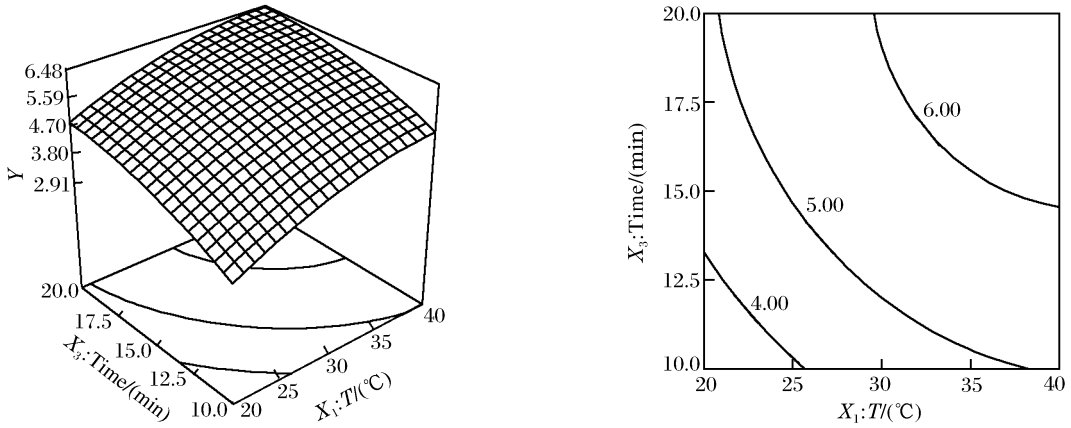


图 2　温度、保压时间及其交互作用对超高压杀灭金黄色葡萄球菌影响的响应面和等高线

Fig. 2　Response surface plot and its contuor plot of the effect of temperature and pressure holding time and their mutual interactions on *Staphyloccus aureus* of UHHP sterilization

3.3　模型验证试验

为了检验超高压杀菌模型方程(2)的合适性和有效性,进行了 10 组验证试验,其结果见表 5。

利用 SPSS(Version 10.0,SPSS Inc. USA)对表 5 数据进行相关性分析,金黄色葡萄球 ATCC6538 死亡数量级 Y 的实测值和预测值的相关系数为 0.994 6,充分说明方程模型是合适有效的。

表 5　模型的验证结果

Table 5　Verified results of the model equation

Trial No.	Variable			Y	
	X_1	X_2	X_3	Observed	Predicted
1	25.0	250.0	14.0	4.10	4.04
2	25.0	300.0	16.0	4.87	4.90
3	25.0	320.0	13.0	4.58	4.60
4	30.0	200.0	16.0	4.15	4.14
5	30.0	330.0	12.0	4.97	5.03
6	30.0	350.0	16.0	6.17	6.01
7	30.0	200.0	10.0	3.21	3.15
8	35.0	260.0	15.0	5.10	5.05
9	25.0	300.0	12.0	4.19	4.17
10	35.0	250.0	11.0	3.61	3.64

4　结　论

利用试验设计软件 Design Expert,首次通过响应面法(RSM)建立了超高压杀灭金黄色葡萄球菌的二次多项数学模型,经检验证明是合理可靠的,同时利用模型的响应面及其等高线对影响超高压杀菌的关键因子及其相互作用进行探讨,优化出杀灭 6 个数量级金黄色葡萄球菌 ATCC6538 的外界条件为:压力 329.84 MPa,温度 34.35 ℃,时间 15.53 min。可见,利用响应面法对超高压杀菌条件的研究,省时省力、经济可靠。

References:

[1] Ruan Z, Zeng Q X. Effects of Environmental Factors on the Inactivation of High Hydrostatic Pressure [J]. Food Science, 1997, 18(4): 8－10. (in Chinese)
阮 征, 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] Knorr D. Effects of High-Hydrostatic-Pressure Processes on Food Safety and Quality [J]. Food Technology, 1993, 6: 156－161.

[3] Mertens B, Knorr D. Developments of Nonthermal Processes for Food Preservation [J]. Food Technology, 1992, 46: 124－133.

[4] Lin S Y, Kong B H. Effects of Ultrahigh Pressure on Food Enzymes [J]. Food & Machinery, 1999, 73(5): 30－31. (in Chinese)
林淑英, 孔保华. 超高压对食品中酶的影响 [J]. 食品与机械, 1999, 73(5): 30－31.

[5] Chen X K. New Technique of High Hydrostatic Pressure Inactivation [J]. Food and Fermentation Industries, 1995, 4: 69－79. (in Chinese)
陈祥奎. 超高压杀菌新技术 [J]. 食品与发酵工业, 1995, 4: 69－79.

[6] Pan J, Zhang W C, Cheng C G. Equipment Design and Technology of Food Sterilization by Superhigh Pressure [J]. Food & Machinery, 1999, 73(5): 32－33. (in Chinese)
潘 见, 张文成, 成从贵. 超高压食品杀菌工艺及设备的设计 [J]. 食品与机械, 1999, 73(5): 32－33.

[7] Montgomery D C. Design and Analysis of Experiments (2nd ed) [M]. New York: John Wiley, 1991.

[8] Annadurai G, Sheeja R Y. Use of Box-Behken Design of Experiments for the Adsorption of Verofix Red Using Biopolymer [J]. Bioprocess Engineering, 1998, 18: 463－466.

[9] Zhou Y G. Microbiological Culture Catalog (3rd ed) [M]. Beijing: China Agriculture Technology Press, 1997. 230. (in Chinese)
周宇光. 菌种目录(第3版) [M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1997. 230.

[10] Shen P, Fan X R, Li G W. Laboratory Experiments in Microbiology (3rd ed) [M]. Beijing: High Education Press, 2000. 92－94. (in Chinese)
沈 萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验(第3版) [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000. 92－94.

Optimization of Conditions to Sterilize Staphyloccus Aureus by Ultra-High Hydrostatic Pressure Using Response Surface Methodology

GAO Yu-Long, WANG Yun-Xiang, JIANG Han-Hu

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

Abstract: The results of factorial experiment showed that the significant external factors affecting UHHP sterilization were pressure, temperature and pressure holding time. Based on the results, response surface methodology (RSM) was employed and a second order quadratic equation for UHHP sterilization was built in the present work. The applicability of the model equation for predicting the optimum response values was verified effectively by the validation data. By analyzing the response surface plots and their corresponding contour plots as well as solving the quadratic equation, the optimum process parameters for sterilization *Staphyloccus aureus* of six log cycles were obtained as: temperature 34.35 ℃, pressure 329.84 MPa, and pressure holding time15.53 min.

Key words: ultra-high hydrostatic pressure (UHHP) sterilization; *Staphyloccus aureus*; response surface methodology (RSM); optimization