

超高压对副溶血性弧菌致死与损伤效应的研究

姬 华^{1,3}, 陈 艳², 刘秀梅^{2,*}, 郁倩倩³, 温吉红³

(1. 江南大学食品学院, 江苏无锡 214122;

2. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100021;

3. 石河子大学食品学院, 新疆石河子 832000)

摘要:采用超高压技术对副溶血性弧菌 ATCC17802 进行杀菌处理, 利用 Design Expert (7.1 版) 软件, 借助于 Box-Behnken 实验设计方法, 考察了压力、温度和保压时间协同超高压对副溶血性弧菌的杀菌效果, 建立了副溶血性弧菌致死响应面模型: $Y = 4.34 + 0.69x_1 + 2.48x_2 + 0.97x_3 + 0.6x_1x_2 + 0.22x_1x_3 + 0.39x_2x_3 - 0.27x_1^2 + 0.18x_2^2 + 0.29x_3^2$ 。得到超高压杀灭 6 个数量级副溶血性弧菌的工艺参数: 温度 25.2℃, 压力 230.3MPa, 保压时间 13.6min。研究超高压处理对副溶血性弧菌 ATCC17802 超微结构的影响, 利用透射电子显微镜观察, 超高压处理后副溶血性弧菌细胞断裂、出现缺口, 胞浆泄露。

关键词:超高压, 副溶血性弧菌, 响应面模型, 超微结构, 损伤

Study on lethal and damaged effects of the ultra high pressure on *Vibrio parahaemolyticus*

Ji Hua^{1,3}, Chen Yan², Liu Xiu-mei^{2,*}, Yu Qian-qian³, Wen Ji-hong³

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. National Institute of Nutrition and Food Safety, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100021, China;

3. Food College, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

Abstract: The ultra high pressure (UHP) was used to inactivate *Vibrio parahaemolyticus* ATCC17802, the effect of the UHP cooperated with different temperature and time on the deadly ratio of *V. parahaemolyticus* was designed and investigated by Design Expert (version 7.1) and the Box-Behnken experiment method, the response surface model of *V. parahaemolyticus* sterilized by UHP was built: $Y = 4.34 + 0.69x_1 + 2.48x_2 + 0.97x_3 + 0.6x_1x_2 + 0.22x_1x_3 + 0.39x_2x_3 - 0.27x_1^2 + 0.18x_2^2 + 0.29x_3^2$. The optimum process parameters for inactivation of *V. parahaemolyticus* of six log cycles were obtained as: temperature 25.2℃, pressure 230.3MPa, pressure holding time 13.6min. The effect of UHP on the microstructure of *V. parahaemolyticus* ATCC17802 was investigated by transmission electron microscope (TEM). The results showed that the cell wall of *V. parahaemolyticus* was fractured and breached, the cytoplasm leaked out.

Key words: UHP; *Vibrio parahaemolyticus*; response surface model; microstructure; damage

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)09-0091-04

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, VP) 是一种嗜盐菌, 属于弧菌科弧菌属, 藤野恒三郎于 1950 年在日本发生的一次群体性食物中毒事件中首次发现并分离得到^[1]。副溶血性弧菌是一种引起食源性

疾病的重要病原菌, 可导致患者出现腹泻、肠痉挛、恶心、呕吐、发烧等典型胃肠炎反应。国家食源性疾病预防网数据显示, 副溶血性弧菌引起的食物中毒、发生规模及人群暴露规模呈明显上升趋势, 已经高居微生物性食物中毒首位^[2]。超高压杀菌技术作为“二十一世纪”高新绿色加工技术, 在实现食品杀菌方面具有独到的优势。该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^[3-5]。国外有报道利用超高压技术杀死牡蛎中的副溶血性弧菌, 采用超高压方法

收稿日期: 2010-03-15 * 通讯联系人

作者简介: 姬华 (1980-), 女, 讲师, 博士研究生, 从事食源性病原微生物的研究。

基金项目: 国家“十一五”科技支撑项目 (2006BAK02A15); 国际科技合作项目 (2006DFA31470)。

处理的牡蛎能使原有生牡蛎的感官品质保持不变,而且还可使牡蛎自动开壳,便于加工^[6-8]。本文以副溶血性弧菌为研究对象,采用 Box-Behnken 实验设计方法建立超高压杀灭副溶血性弧菌的响应面模型,得到超高压杀灭 6 个数量级副溶血性弧菌的工艺参数。利用透射电子显微镜对超高压处理前、后副溶血性弧菌的超微结构进行观察。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) ATCC17802 购于中国科学院微生物研究所;胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)、胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)均购于青岛海博生物技术有限公司。

超高压实验装置 压力范围 0~600MPa,天津华泰森森生物工程技术有限公司;JEM-2100 透射电子显微镜 日本电子株式会社;净化工作台、恒温培养箱 上海博迅实业有限公司医疗设备厂;高压蒸汽灭菌锅 韩国 DAIHAN 实验设备公司;薄膜封口机 上海东亚包装设备制造有限公司;台式高速冷冻离心机 香港力康发展有限公司;微生物实验常规仪器。

供试菌株经 2.5% NaCl TSB 活化后,于 37℃,160r/min 振荡培养 48h,5000r/min 离心 10min,弃上清液,以 3% NaCl 磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.0)制成菌悬液^[9],调整细胞浓度,使起始菌数为 6.9×10^{10} CFU/mL,将其分装于 5mL 的无菌聚乙烯塑料包装袋中,热封口。按照实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。

1.2 超高压杀菌实验设计

微生物数量测定,以 0.1% 碱性蛋白胨水(3% NaCl)稀释对照及超高压处理后的供试菌悬液^[10],于 2.5% NaCl TSA 平板上,37℃ 培养 48h 后,按中华人民共和国食品卫生微生物学检验标准 GB4789 进行菌落计数。

本实验采用 Box-Behnken 实验设计模型,压力、温度、保压时间分别以 X_1 、 X_2 、 X_3 表示,因素水平见表 1。

表 1 实验因素水平及编码

因子	代码		水平		
	编码	非编码	-1	0	1
温度(℃)	x_1	X_1	20	30	40
压力(MPa)	x_2	X_2	80	180	280
保压时间(min)	x_3	X_3	5	10	15

注: $x_1 = (X_1 - 30)/10$; $x_2 = (X_2 - 180)/100$; $x_3 = (X_3 - 10)/5$ 。

副溶血性弧菌的死亡数量级 Y 为评价指标(响应值),由方程 $Y = -\log_{10} N_t/N_0$ 计算,式中: N_t 为超高压处理后 1mL 菌液中的活菌数; N_0 为对照 1mL 菌液中的活菌数。设超高压作用下副溶血性弧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方程式(1)。

$$Y = B_0 + \sum_{i=1}^n B_i X_i + \sum_{i,j=1}^n B_{ij} X_i X_j \quad \text{式(1)}$$

式(1)中, $n = 3$,则方程可转换为下列方程式(2)。

$$Y = B_0 + B_1 X_1 + B_2 X_2 + B_3 X_3 + B_{12} X_1 X_2 + B_{13} X_1 X_3 + B_{23} X_2 X_3 + B_{11} X_1^2 + B_{22} X_2^2 + B_{33} X_3^2 \quad \text{式(2)}$$

式中: Y 为预测响应值; B_0 为常数项; B_1 、 B_2 和 B_3 分别为线性系数; B_{12} 、 B_{13} 、 B_{23} 分别为交互项系数; B_{11} 、 B_{22} 、 B_{33} 分别为二次项系数。为了求得方程式(2)的各项系数,把表 1 数据输入到 Design Expert (version 7.1) 软件内,将自动生成 17 组实验组合,根据生成的组合进行实验。

1.3 透射电镜对副溶血性弧菌超微结构的观察

用无菌移液管吸取 2mL 菌液于无菌聚乙烯塑料袋中,使用多功能薄膜封口机封口,处理参数为 400MPa、28℃ 下保温保压 10min,进行超高压处理。分别取少量未经高压处理的菌液和高压处理后的菌液,置于福尔马膜上,使菌液于膜上吸附,用滤纸将福尔马膜上的菌液吸干后,磷钨酸液体滴于膜上染色 2min,用无菌水冲洗磷钨酸液体,于透射电子显微镜下观察。

2 结果与分析

2.1 超高压致死副溶血性弧菌的响应面分析

2.1.1 回归模型建立及显著性检验 利用 Design Expert7.1 软件对表 2 实验数据进行多元回归拟合,获得超高压杀灭副溶血性弧菌数响应值(Y)对自变量温度(x_1)、压力(x_2)和保压时间(x_3)的二次方程式(3)。对该模型进行模型系数显著性检验和方差分析,结果见表 3。

$$Y = 4.34 + 0.69x_1 + 2.48x_2 + 0.97x_3 + 0.6x_1x_2 + 0.22x_1x_3 + 0.39x_2x_3 - 0.27x_1^2 + 0.18x_2^2 + 0.29x_3^2 \quad \text{式(3)}$$

表 2 实验设计与结果

实验号	x_1	x_2	x_3	响应值 Y	
				实测值	预测值
1	0	1	1	8.72	8.65
2	0	-1	-1	1.66	1.75
3	-1	1	0	5.34	5.44
4	1	0	1	6.18	6.24
5	1	1	0	7.99	8.02
6	-1	0	-1	2.98	2.92
7	0	0	0	4.31	4.34
8	1	-1	0	1.95	1.86
9	0	1	-1	5.97	5.93
10	0	-1	1	2.87	2.91
11	-1	0	1	4.44	4.42
12	-1	-1	0	1.71	1.68
13	1	0	-1	3.84	3.86
14	0	0	0	4.22	4.34
15	0	0	0	4.37	4.34
16	0	0	0	4.45	4.34
17	0	0	0	4.34	4.34

由表 3 可见, F 模型 = 705.69 > $F_{0.01(9,4)} = 14.66$, $P < 0.001$,说明模型显著,不同处理间的差异显著; F 失拟 = 2.14 < $F_{0.01(9,3)} = 14.66$,失拟项 $P = 0.2374 > 0.05$,不显著;模型的校正决定系数 $\text{Adj } R^2 = 0.9975$,说明该模型能解释 99.75% 响应值的变化。相关系数为 0.9995,说明该模型拟合程度良好,实验误差小,可

以用此模型来分析和预测超高压杀灭副溶血性弧菌的程度。表3中,一次项 x_1 、 x_2 、 x_3 和二次项 x_1x_2 、 x_2x_3 、 x_1x_3 、 x_1^2 、 x_2^2 、 x_3^2 差异极显著 ($P < 0.01$), 说明压力、温度和保压时间及三者之间的交互作用对副溶血性弧菌的致死作用产生极显著的影响。

表3 回归模型和回归系数的方差分析

变异源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	63.44	9	7.05	705.69	<0.0001
x_1	3.76	1	3.76	376.62	<0.0001
x_2	49.16	1	49.16	4921.37	<0.0001
x_3	7.53	1	7.53	753.76	<0.0001
x_1x_2	1.45	1	1.45	144.88	<0.0001
x_1x_3	0.19	1	0.19	19.38	0.0031
x_2x_3	0.59	1	0.59	59.43	0.001
x_1^2	0.3	1	0.3	30.04	0.0009
x_2^2	0.13	1	0.13	13.32	0.0082
x_3^2	0.35	1	0.35	35.40	0.0006
残差	0.07	7	0.009989		
失拟项	0.043	3	0.014	2.14	0.2374
纯误差	0.027	4	0.006703		
总和	63.51	16			

$R = 0.9995$ $R^2 = 0.9989$ $Adj R^2 = 0.9975$

2.1.2 超高压杀菌参数的确定 因为要求食品原料污染的微生物总数小于 10^6 cfu/mL 或 10^6 cfu/g, 以杀灭6个数量级的副溶血性弧菌为标准优化超高压杀菌条件。

图1显示了保压时间最佳值为13.6min, 温度和压力对灭活副溶血性弧菌的影响。从图1可以看出, 随着温度升高, 压力增大, 副溶血性弧菌的死亡数量急剧增加。温度和压力分别在20~40℃和180~280MPa时, 副溶血性弧菌的死亡数量级大于6。欲灭活其6个数量级, 对响应面方程式(3)解逆矩阵得到杀菌条件为温度25.2℃, 压力230.3MPa。

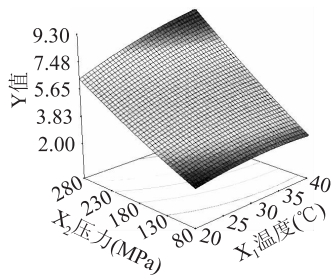


图1 温度、压力及其交互作用对超高压杀灭副溶血性弧菌的响应面

图2显示了压力最佳值为230.3MPa时, 温度和保压时间对灭活副溶血性弧菌的影响。从图2可以看出, 随着温度升高, 时间延长, 副溶血性弧菌的死亡量急剧增加, 温度和时间分别在22~40℃和8~15min, 副溶血性弧菌的死亡数量级大于6。欲灭活其6个数量级, 对响应面方程式(3)解逆矩阵得到杀菌条件为温度25.2℃, 保压时间13.6min。

2.1.3 响应面模型的验证 为了检验超高压杀菌模型的有效性, 进行6组验证实验, 其结果见表4。利用 Microsoft Excel 2003 对表4数据进行相关性分析, 副溶血性弧菌死亡响应值Y的实测值和预测值的相关系数为0.9917, 说明响应面方程有效。

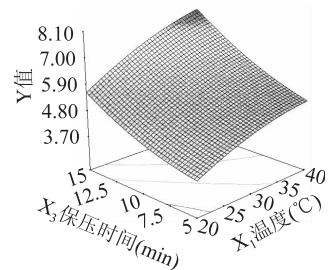


图2 温度、保压时间及其交互作用对超高压杀灭副溶血性弧菌的响应面

表4 模型的验证结果

实验组	温度(℃)	压力(MPa)	保压时间(min)	预测值	实验值
1	25	80	15	2.688	2.276
2	25	220	15	6.134	6.000
3	30	100	5	2.103	2.595
4	30	200	10	4.843	4.662
5	34	248	15	8.118	7.987
6	40	100	10	2.411	2.156

2.2 超高压处理对副溶血性弧菌超微结构的影响

2.2.1 正常副溶血性弧菌的超微结构 图3显示副溶血性弧菌弯曲呈弧形, 长0.8~3μm、宽0.5~1.5μm, 在透射电子显微镜下, 副溶血性弧菌细胞形态正常, 稍微弯曲。其细胞结构完整, 胞壁完整光滑。

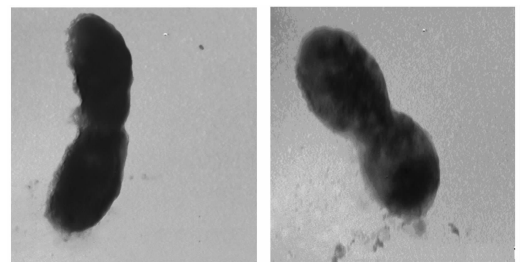


图3 正常副溶血性弧菌营养体

2.2.2 超高压处理后副溶血性弧菌的超微结构 400MPa、28℃条件下保温保压对副溶血性弧菌处理10min, 图4显示副溶血性弧菌的细胞结构呈现多种破坏形式, 其细胞结构不完整、细胞出现了明显的断裂、细胞壁局部被破坏、细胞出现缺口、细胞质分布不均、胞浆外漏、胞浆层次消失。

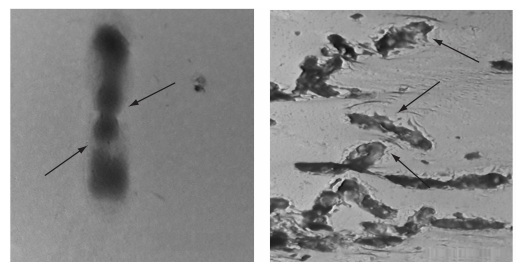


图4 超高压后副溶血性弧菌营养体

3 结论与讨论

3.1 响应面致死模型的建立

国外已有报道利用超高压技术杀死牡蛎、牛奶、碱性蛋白胨水中的副溶血性弧菌, 这些报道集中研究副溶血性弧菌的 Linear、Weibull、Logistic 等一级致死模型^[7-8,10]。本研究得到超高压杀死副溶血性弧菌的响应面二级方程式: $Y = 4.34 + 0.69x_1 + 2.48x_2 +$

$0.97x_3 + 0.6x_1x_2 + 0.22x_1x_3 + 0.39x_2x_3 - 0.27x_1^2 + 0.18x_2^2 + 0.29x_3^2$ 。欲灭活 6 个数量级的副溶血性弧菌, 对响应面方程式 (3) 解逆矩阵得到杀菌条件为温度 25.2℃, 压力 230.3MPa, 保压时间 13.6min。对响应面方程验证, 响应值 Y 的实测值和预测值的相关系数为 0.9917, 此模型可有效拟合超高压杀灭副溶血性弧菌 ATCC17802 的程度。

预测微生物学是微生物学、数学、微生态学和计算机技术结合一门新兴学科。各种数学模型都有其优缺点, 在实验过程中诸如压力的稳定性、温度的变化等因素影响模型的准确度, 今后的研究可以做出平方根模型、阿列尼斯模型与响应面模型进行比较, 以选出最优。

3.2 超高压处理对副溶血性弧菌的致死效应

超高压导致微生物失活有以下几种原因: 蛋白质变性、微生物细胞的形态破坏、微生物遗传机制发生变化、细胞膜破裂、菌体内物质泄漏、酶的失活、生化反应等。在 400MPa、28℃ 条件下, 对副溶血性弧菌 ATCC17802 高压处理 10min, 副溶血性弧菌细胞被压成段, 出现缺口, 胞浆泄露, 结构层次感消失, 细胞严重破坏。不同食品基质对超高压杀灭副溶血性弧菌的影响、静水压对不同血清型副溶血性弧菌的杀菌生化机理还需要进一步深入研究。

参考文献

- [1] Miyamoto Y, Kato T, Obara Y, et al. In vitro hemolytic characteristic of *Vibrio parahaemolyticus*; its close correlation with human pathogenicity [J]. J Bacteriol, 1969, 100: 1147-1149.
- [2] 刘秀梅. 食源性疾病监控技术的研究 [J]. 中国食品卫生杂志, 2004, 16(1): 3-9.
- [3] 潘见, 张文成, 成从贵. 超高压液体饮料实用性灭菌工艺

(上接第 90 页)

表 3 正交实验的方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A	540.0622	2	270.0311	13.9736	0.0668
B	72.9622	2	36.4811	1.8878	0.3463
C	38.6489	2	19.3244	0.0769	0.9269
D	894.1422	2	447.0711	23.135	0.0414
误差	38.6489	2	19.3244		
总和	1545.816				

从以上正交实验结果的极差分析中我们可以得出, 使玉米淀粉饺子透明度最佳的比例为 $D_1A_1B_2C_1$, 即当玉米淀粉量为 100g 时, 加入磷酸单酯淀粉为 7g, 水温为 90℃, 水的添加量为 100g, 蔗糖添加量为 1g, 得出的产品透明度最好。经验证实验, 该配方玉米淀粉饺子皮的透光率为 89%。从方差分析结果可知, 磷酸单酯淀粉是对玉米淀粉饺子皮透明度影响最大的因素, 在 $P=0.05$ 水平上影响显著。

3 结论

通过正交实验和方差分析, 得出了高透明度玉米淀粉饺子皮的优化工艺参数, 即 100g 玉米淀粉中加水量 100%、蔗糖添加量 1%、磷酸单酯淀粉添加量 7%, 水温 90℃, 磷酸单酯淀粉对玉米淀粉饺子皮的

及设备设计 [J]. 食品科学, 1999, 73(5): 30-32.

- [4] Trujillo A J, Capellas M, Saldo J, et al. Applications of hydrostatic pressure on milk and dairy products; a review [J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2002, 3(4): 295-307.
- [5] Butz P, Edenharter R, Garcia A F, et al. Changes in functional properties of vegetables induced by high pressure treatment [J]. Food Research International, 2002, 35(2-3): 295-300.
- [6] Murchie L W, Cruz-Romero M, Kerry J P, et al. High pressure processing of shellfish: A review of microbiological and other quality aspects [J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2005(6): 257-270.
- [7] Calik H, Morrissey M T, Reno P W, et al. Effect of High-Pressure Processing on *Vibrio parahaemolyticus* strains in pure culture and pacific oysters [J]. Journal of Food Science, 2002, 67(4): 1506-1510.
- [8] Hu X, Mallikarjunan P, Koo J, et al. Comparison of kinetic models to describe high pressure and gamma irradiation used to inactivate *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* prepared in buffer solution and in whole oyster [J]. Journal of Food Protection, 2005, 68(2): 292-295.
- [9] Harrigan W F 著, 李卫华译. 食品微生物实验室手册 [M]. 第三版. 北京: 中国轻工业出版社, 2004, 35-38.
- [10] Chen H Q. Use of linear, Weibull and log-logistic functions to model pressure inactivation of seven foodborne pathogens in milk [J]. Food Microbiology, 2007, 24: 197-204.
- [11] 黄训端, 潘见, 谢慧明, 等. 高静压对醋芽孢杆菌的致死与损伤效应 [J]. 核农学报, 2006, 20(6): 511-515.
- [12] 曾庆梅, 谢慧明, 潘见, 等. 超高压处理对枯草芽孢杆菌超微结构的影响 [J]. 高压物理学报, 2006, 20(1): 83-87.

透明度影响显著 ($P=0.0414 < 0.05$)。

参考文献

- [1] 汪玉明, 高国强. 玉米饺子粉工艺的研究 [J]. 食品工业科技, 2007, 28(9): 115-116.
- [2] 娄爱华, 杨泌泉. 面粉特性与冷冻水饺品质相关性的研究 [J]. 冷饮与速冻食品工业, 2004, 10(2): 1-4.
- [3] 李昌文, 岳青, 等. 影响速冻水饺品质的因素 [J]. 粮油加工与食品机械, 2005(8): 79-81.
- [4] 李梦琴, 张剑, 冯志强, 等. 高档速冻饺子粉的研究 [J]. 食品工业科技, 2007, 28(8): 163-165.
- [5] 王肇慈. 粮油食品品质分析 [M]. 第二版. 北京: 中国轻工业出版社, 2000.
- [6] 吴俊, 李斌, 苏喜生, 等. 玉米淀粉的粒度效应与其微观形貌和性能关系研究 [J]. 中国粮油学报, 2004, 19(5): 33-36.
- [7] 李文卿. 面点工艺学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2003.
- [8] 杜先锋, 许时婴, 王璋, 等. 淀粉糊的透明度及其影响因素的研究 [J]. 农业工程学报, 2002, 18(1): 129-131.
- [9] 李光磊, 师玉忠, 等. 磷酸单酯淀粉糊透明度影响因素的研究 [J]. 粮油食品科技, 2003(5): 8-9.