

响应面法优化二氧化氯 杀灭蛋壳大肠杆菌工艺研究

罗红霞¹, 任发政², 郭慧媛², 赵磊¹, 黄彦芳¹, 汪长钢¹, 王建¹
(1.北京农业职业学院食品与生物工程系, 北京 102442;
2.中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要:利用 Design Expert 软件, 根据 Box-Behnken 设计(BBD)原理采用四因素三水平的响应面分析法, 对二氧化氯杀灭鲜鸡蛋壳大肠杆菌的条件进行了研究, 获得了二次多元回归模型。对模型进行手动优化, 利用优化模型优化出十组杀菌工艺参数, 并对工艺参数进行了验证。

关键词:二氧化氯, 大肠杆菌, 鸡蛋, 响应面法, 优化

Optimum process of *Escherichia coli* of chlorine dioxide inactivation on eggshell by response surface methodology

LUO Hong-xia¹, REN Fa-zheng², GUO Hui-yuan², ZHAO Lei¹,
HUANG Yan-fang¹, WANG Chang-gang¹, WANG Jian¹

(1. Food Bioengineering Department, Beijing Vocational Agricultural, Beijing 102442, China;
2. College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: By using Design Expert software in accordance with theory of Box-Behnken design, the condition that *Escherichia coli* of eggshell of fresh eggs killed by chlorine dioxide as a response of four variables was researched. Then the fitted multivariate quadratic regress model was obtained. The model was optimized by manual operation. By utilizing optimization model, process parameters of ten groups were optimized. The process parameters were tested and verified.

Key words: chlorine dioxide; *Escherichia coli*; egg; response surface methodology; optimization

中图分类号: TS201.2 文献标识码: B 文章编号: 1002-0306(2011)11-0283-04

响应面法(Response Surface Methodology, RSM)是利用合理的实验设计, 采用多元二次回归方程拟合因素与响应值之间的函数关系, 通过对回归方程的分析来寻求最优工艺参数, 解决多变量问题的一种统计方法, 广泛应用于化学化工、生物工程、食品工业等方面。它与正交实验设计法相比, 具有实验周期短、求得的回归方程精度高、能研究几种因素间交互作用等优点。本研究以鸡蛋壳大肠杆菌杀菌量为评价指标, 在二氧化氯浓度、pH、灭菌温度和浸泡时间四个单因素预实验的基础上, 利用响应面分析法优化二氧化氯杀灭蛋壳大肠杆菌的条件, 为鲜蛋消毒剂的进一步开发和保洁蛋生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

鸡蛋 同批新鲜柴鸡蛋, 采自北京农业职业学

院养鸡场; 二氧化氯 食品级, 山东兆冠化工集团公司; 营养肉汤培养基、营养琼脂培养基 国药集团化学试剂有限公司; 大肠杆菌 8099 北京农业职业学院食品与生物工程系食品检测实验室保藏。

精确电子天平; XSP-BM15 显微镜; MVS-1 漩涡混合器; 100 级洁净工作台; DHP-9272 型电热恒温培养箱; 移液枪; 灭菌枪头; 手提式压力蒸汽消毒器; HZQ-C 空气浴振荡器; pH213 台式酸度离子计; 菌落计数器; 血球计数板; 灭菌生理盐水; 灭菌蒸馏水; 烧杯; L 形玻棒; 放大镜等。

1.2 实验方法

1.2.1 鸡蛋处理 将鲜鸡蛋用自来水冲洗, 除掉表面污物, 沥干后用 75% 酒精擦洗蛋壳, 置超净工作台内紫外照射 1h, 中间翻转一次, 以达到蛋壳灭菌效果。

1.2.2 菌种制备和接菌 将大肠杆菌 8099 以无菌操作方式接入营养肉汤培养基, (37 ± 1) °C 振荡培养 12h, 制备菌悬液。利用显微镜直接计数, 将菌悬液稀释至适当浓度(5 × 10⁶ cfu/mL 以上), 然后分装密封于 10mL 离心管中, 放入 4°C 冰箱, 备用。用移液枪以无菌操作方式取 1mL 菌悬液, 注入含有 9mL 灭菌

收稿日期: 2010-08-23

作者简介: 罗红霞(1962-), 女, 教授, 博士, 研究方向: 畜产品科学。
基金项目: 国家科技支撑计划子课题(2006BAD22B02); 国家蛋品工程技术研究中心资助项目。

表3 各因素方差分析表

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	14.16	8	1.77	164.07	<0.0001	***
X ₁	5.06	1	5.06	468.70	<0.0001	***
X ₂	1.88	1	1.88	174.26	<0.0001	***
X ₃	0.078	1	0.078	7.27	0.0139	*
X ₄	4.12	1	4.12	381.71	<0.0001	***
X ₁ X ₂	0.034	1	0.034	3.17	0.0901	
X ₁ X ₄	0.10	1	0.10	9.49	0.0059	*
X ₁ ²	2.89	1	2.89	267.91	<0.0001	***
X ₄ ²	0.049	1	0.049	4.58	0.0448	*
残差项	0.22	20	0.011			
失拟项	0.20	16	0.013	3.68	0.1080	
纯误差	0.014	4	3.430E-003			
总和	14.38	28				

R² = 0.9850 R_{Adj}² = 0.9790 R_{Pred}² = 0.9593 Adeq Precision = 52.256

注: *** 差异极显著, P < 0.001; ** 差异高度显著, P < 0.01; * 差异显著, P < 0.05。

去离子水的离心管中,用漩涡混合器混匀,做成 1:10 的稀释液,如此反复,将菌悬液做多个梯度稀释。取恰当稀释度的菌液进行平板涂布,用移液枪取 1mL 注入营养琼脂平板中,每个稀释度平行涂三个板,以 L 形灭菌玻璃棒将菌悬液涂布于琼脂表面,避免涂到平板边缘,将平板正置直至培养基表面干燥,将平板翻转 (37 ± 1) °C 培养 45~48h,进行菌落计数,计算菌悬液活菌数。

以无菌操作方式用移液枪吸取 1mL 菌悬液,点接在灭菌鸡蛋的蛋壳表面,在超净工作台内干燥 30min,使菌体充分固定。

1.2.3 二氧化氯处理 将固定菌种的鸡蛋浸入一定条件的 ClO₂ 溶液中,处理一段时间后,沥干,用 10mL 灭菌蒸馏水将菌体洗下,制成菌悬液。将菌悬液以 1.2.2 的方法做 2~3 个梯度的稀释,并涂平板计数,计算活菌数。

1.2.4 杀菌量表示 杀菌量用活菌数的对数降低值表示,即 -lgN/N₀。其中 N₀ 为起始活菌数; N 为处理后活菌数,二者单位皆为 cfu/mL。

1.2.5 响应面法实验设计 在单因素预实验基础上,采用 Design Expert7.0 实验设计软件,利用响应面方法(RSM)中的 Box-Behnken 设计(BBD),以溶液 pH、ClO₂ 浓度、灭菌温度、浸泡时间 4 个因素为自变量,分别以 X₁、X₂、X₃ 和 X₄ 表示,每个因素取 3 个水平,以 -1、0、+1 编码,以大肠杆菌杀菌量 Y 为响应值,进行实验设计,实验方案见表 1。

表1 Box-Behnken 设计因素水平表

水平	因素			
	X ₁ 溶液 pH	X ₂ ClO ₂ 浓度 (mg/L)	X ₃ 灭菌温度 (°C)	X ₄ 浸泡时间 (min)
+1	6	60	30	15
0	5	50	25	10
-1	4	40	20	5

2 结果与分析

2.1 蛋壳大肠杆菌杀菌量 BBD 设计实验结果及响应面优化分析

按照 Box-Behnken 设计原理(BBD)的实验方案

进行四因素三水平实验,实验结果见表 2。

表2 Box-Behnken 设计实验结果

实验号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Y
1	-1	1	0	-1	4.79
2	-1	-1	0	0	4.98
3	1	-1	0	0	3.34
4	0	0	1	1	5.88
5	-1	0	0	1	5.68
6	0	-1	1	0	5.02
7	0	1	1	0	5.70
8	0	-1	0	-1	4.70
9	0	0	-1	1	5.71
10	0	-1	-1	0	4.77
11	1	0	1	0	4.12
12	0	1	0	-1	5.01
13	-1	0	1	0	5.28
14	-1	0	-1	0	5.02
15	1	1	0	0	4.33
16	0	0	1	-1	4.68
17	0	1	-1	0	5.36
18	0	-1	0	1	5.51
19	1	0	0	-1	3.11
20	1	0	0	1	4.64
21	1	0	-1	0	4.02
22	0	0	-1	-1	4.53
23	0	1	0	1	6.00
24	-1	1	0	0	5.80
25	0	0	0	0	5.21
26	0	0	0	0	5.36
27	0	0	0	0	5.25
28	0	0	0	0	5.28
29	0	0	0	0	5.32

利用 Design Expert7.0 软件对所得数据进行回归分析,得到多元二次回归模型为:

$$Y = 5.28 - 0.65X_1 + 0.40X_2 + 0.081X_3 + 0.59X_4 + 0.093X_1X_2 - 0.040X_1X_3 + 0.16X_1X_4 - 0.052X_2X_3 - 0.048X_2X_4 + 0.005X_3X_4 - 0.65X_1^2 + 0.013X_2^2 - 0.012X_3^2 - 0.085X_4^2 \quad \text{式(1)}$$

利用 Design Expert7.0 软件的 Box-Behnken 模块对方程进行手动优化,去掉部分不显著项,得到多元

表4 优化杀菌参数的验证

序号	因素				Y		相对误差(%)
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	预测值	实测值	
1	4.12	52.88	25.11	5.70	5	5.11	2.20
2	5.35	42.69	20.74	13.43	5	5.21	4.20
3	4.07	40.54	24.28	9.74	5	5.02	0.40
4	5.06	40.80	29.89	10.37	5	5.12	2.40
5	4.07	50.72	21.15	7.06	5	5.13	2.60
6	5.71	55.28	20.22	12.62	5	5.20	4.00
7	5.07	55.22	28.16	6.25	5	5.16	3.20
8	5.21	48.87	25.41	9.41	5	5.17	3.40
9	5.00	59.47	25.07	5.05	5	5.06	0.12
10	4.06	40.83	25.03	9.55	5	5.23	4.60

二次回归模型为:

$$Y = 5.28 - 0.65X_1 + 0.40X_2 + 0.081X_3 + 0.59X_4 + 0.093X_1X_2 + 0.16X_1X_4 - 0.65X_1^2 - 0.085X_4^2 \quad \text{式(2)}$$

对模型(2)进行方差分析,结果见表3。

由表3可知:一次项 X₁、X₂ 和 X₄ 影响极显著, X₃ 影响显著,二次项 X₁² 的影响极显著, X₄² 影响显著;交互项 X₁X₄ 影响显著, X₁X₂ 影响不显著。模型 F = 164.07, P < 0.0001, 说明回归方程描述各因子与响应值之间的非线性方程关系是极显著的,即这种实验方法是可靠的。模型的复相关系数 R² = 0.9850, 修正复相关系数 R_{Adj}² = 0.9790, 而预测复相关系数 R_{Pred}² = 0.9593, 说明该模型能解释 97.90% 响应值的变化, 模型具有较好的回归性; 模型信噪比 (Adeq Precision) 为 52.256, 说明该模型具有足够的信号来响应该设计, 因而该模型拟合度良好, 实验误差小, 模型是合适的, 可以对二氧化氯杀灭蛋壳大肠杆菌进行分析和预测。在所选取的因素水平范围内, 各因素对结果的影响排序为: 溶液 pH > 浸泡时间 > ClO₂ 浓度 > 灭菌温度。

分别将另外两因素固定在 0 水平, 对经手动优化后的回归方程中的 X₁X₂ 和 X₁X₄ 交互项作响应曲面分析, 见图 1、图 2。

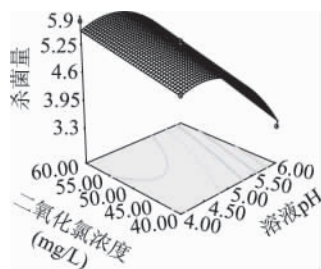


图1 溶液 pH 和二氧化氯浓度的交互影响

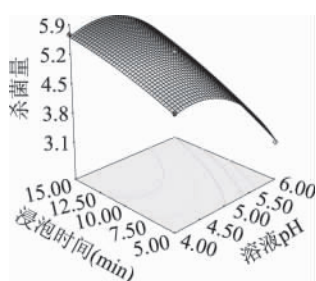


图2 溶液 pH 和浸泡时间的交互影响

从图 1 可以看出, 在 25℃、10min 条件下, pH 保持不变, 随着二氧化氯浓度增加, 杀菌量逐渐增加;

二氧化氯浓度不变, 溶液 pH 在 4~6 的范围内, 杀菌力先增大后减小。

从图 2 可以看出, 在二氧化氯浓度为 50mg/L、温度 25℃ 条件下, pH 保持不变, 随着浸泡时间增加, 杀菌量逐渐增加, 且增加速度先快后慢; 浸泡时间不变, 溶液 pH 在 4~6 的范围内, 杀菌力先增大后减小。

从图 1、图 2 两个曲面看出, 二氧化氯浓度和溶液 pH 交互作用不显著; 浸泡时间和溶液 pH 的交互作用较为显著。

2.2 二氧化氯杀菌条件的优化

经过课题的前期研究发现, 鲜蛋蛋壳大肠杆菌带菌量指数一般不大于 10⁵ cfu/g · mL, 因此由回归模型(2)来预测杀灭大肠杆菌的最优条件。

利用统计软件 Design Expert, 优化出 10 组杀菌工艺参数, 并根据参数进行实验, 结果见表 4, 大肠杆菌的死亡数量级均大于 5, 平均相对误差为 2.71%, 证明响应面法优化二氧化氯杀灭蛋壳大肠杆菌的工艺是可行的。

3 结论

首次将响应面分析法 (RSM) 用于杀灭蛋壳大肠杆菌条件的优化, 获得良好的结果。获得的优化回归模型为: $Y = 5.28 - 0.65X_1 + 0.40X_2 + 0.081X_3 + 0.59X_4 + 0.093X_1X_2 + 0.16X_1X_4 - 0.65X_1^2 - 0.085X_4^2$ 。

经响应面法 (RSM) 优化出的杀灭 5 个数量级大肠杆菌的优化条件见表 4, 经检验证明 10 组杀菌参数均能达到杀菌效果。

利用该模型可以预测二氧化氯对鸡蛋大肠杆菌的杀菌量。生产中, 建议通过数学模型选择合理的二氧化氯溶液浓度和处理时间, 以确保得到理想的杀菌效果, 并避免二氧化氯溶液浓度过高和处理时间过长对鸡蛋品质产生影响。

参考文献

[1] 慕运动. 响应面方法及其在食品工业中的应用 [J]. 郑州工程学院学报, 2001, 22(3): 91-94.
 [2] 杨文雄, 高彦祥. 响应面法及其在食品工业中的应用 [J]. 中国食品添加剂, 2005(2): 68-71.
 [3] LI Q H, FU C L. Application of response surface methodology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein [J]. Food Chemistry, 2005, 92(4): 701-706.
 [4] 高瑞珑, 王允祥, 武宁, 等. 响应面法优化超高压杀灭食品

(下转第288页)

表5 感官评价积分表

时间(h)	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5
感官评价(分)	31	35	39	42	45	51	51	54	55	52

表6 酸辣芥汁三文鱼营养成分表

主要营养成分	固形物	蛋白质	脂肪	不饱和脂肪酸	碳水化合物
含量(g/100g)	37.0	21.1	7.8	2.1	<0.1

鱼肉的水分含量对产品质感和保鲜效果有较大的影响,银鲑鱼成品表面应该干燥,无多余水分。自然晾干银鲑鱼表面的水分需要的时间长,且效果差。温度高又会造成鱼肉的颜色和口感的下降,因此实验中选择低温循环风进行干燥处理。实验中对传统手工加工鲑鱼过程进行记录,食盐的添加量为3%,风干温度设定为20℃。通过单因素实验,选取含盐量2.5%、3%、3.5%三个腌制浓度和16、20、24℃三个风干温度进行感官评价实验。

表4 工业化配方表

配方	食盐	柠檬酸	I+G	白糖	热反应 鸡肉粉	共计
含量 (kg)	27.2	3.6	6.4	9.6	1.2	48

注:可封装8000份。

通过图1可以看出,在风干温度为20℃条件下,不同含盐量的银鲑在进行腌制过程中,含盐量为2.5%和3%的样品和感官评价结果随着腌制时间而提升,3.5%的样品在前4h时上升到最佳感官评价结果,随后又有下降。在腌制浓度为3%条件下分析烘干温度对银鲑样品的感官影响,感官评价呈现一个先升高后降低的过程。为了选择最佳银鲑腌制浓度、烘干温度和加工时间,我们将各个时间点的感官评价分数进行加和。

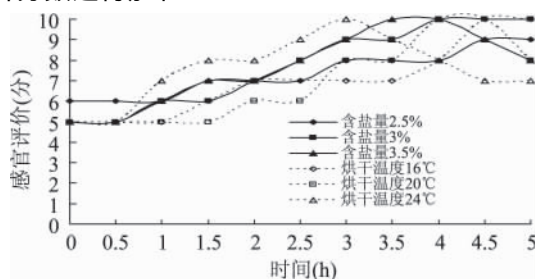


图1 不同实验条件下的感官评价结果

由表5可以看出,当加工时间为4.5h时,可以达到最佳的感官评价,但是通过分析可以发现,4h和4.5h的加工时间相差0.5h,而感官评价分数只相差1分;3h和3.5h的感官评价结果相同,从工业化生产的角度考虑,可以选择加工时间4h或3h的银鲑产品。

(上接第285页)

中枯草芽孢杆菌工艺[J].食品科学,2004,25(3):101-106.

[5]刘慧.现代食品微生物学实验技术[M].北京:中国轻工业出版社,2006:143-163.

[6]江汉湖.食品微生物学[M].北京:中国农业出版社,2002:450-451.

[7]王红宁,马孟根,魏永,等.规模化鸡场种蛋蛋壳、蛋内容物的总菌数、大肠杆菌数、沙门氏菌数测定[J].中国家禽,2001,

2.4 包装

分别将辣椒包5g、调味料包6g、芥汁包4g进行单独封装后,与150g真空包装银鲑鱼一起进行封装。

2.5 产品检验

常温放置10d(冷藏放置30d),无破损、胀袋现象,银鲑鱼肉质色泽橙红,气味正常,肌肉组织质地紧密、有弹性^[3]。

2.6 产品主要营养成分分析

试制产品主要营养成分见表6。

由表6可以看出,产品的固形物含量、蛋白质及脂肪的含量较高,与淡水鱼相比,其不饱和脂肪酸含量相对较高,产品具有较高的营养价值和保健功效。

2.7 食用方法

将调味料包和芥汁包加入80~100mL冷开水调匀后,加入辣椒包一起浇到银鲑鱼上直接食用。

3 结论

实验中银鲑通常作为鱼片刺身等生食调理中的原料,由于其加工处理相对复杂,对新鲜度要求较高,普通消费者通常只能在餐厅中食用,而在家庭中食用的机会相对较少。食用这一类食材时,通常的蘸料为辣根或复制辣根,口味较为单一,本实验中研制的酸辣芥汁结合传统调味技术,对酸辣芥末复合味汁进行工业化设计,确定最佳的实验工艺和配方,并应用复合调味包技术,较以往的刺身类产品颜色搭配更加美观,不仅丰富了银鲑鱼的产品类型,而且应用范围广泛,适应市场的要求,为冷水鱼的养殖和深加工提供一条可供参考的途径。

参考文献

[1]王庆文.利用山涧溪水养殖冷水鱼[J].黑龙江水产,2006(6):23-25.

[2]陈祖明,辛松林,蔡焱.国产养殖银鲑美食菜肴的研发[J].四川烹饪高等专科学校学报,2010(3):19-22.

[3]祁兴普,夏文水.白鲑鱼肉粒干燥工艺的研究[J].食品工业科技,2007(2):166-169.

[4]辛松林,陈祖明,陈应富,等.椒麻味型标准化制作工艺研究[J].四川烹饪高等专科学校学报,2011(4):20-22.

24(23):9-11.

[8]李晴云,杜华锐,蒋小松,等.鸡蛋微生物测定与分析[J].四川畜牧兽医,2003,30(5):22-23.

[9]王灵昭,邓家权.微波法提取雨生红球藻中虾青素的工艺研究[J].食品研究与开发,2007,28(12):96-100.

[10]王世磊.Design-expert软件在响应面优化中的应用[J].郑州大学学报,2008(10):98-104.