

响应面法优化脉冲强光对月饼表皮霉菌的杀菌工艺

王 勃¹, 赵 旭², 马 涛^{1*}, 刘 贺¹, 何余堂¹, 惠丽娟¹

(1.渤海大学化学化工与食品安全学院,渤海大学粮油科学与技术研究所,辽宁锦州 121013;

2.辽宁省粮食科学研究所,辽宁沈阳 110866)

摘 要:采用响应面法分析优化脉冲强光对月饼表面杀菌的工艺参数。在单因素实验基础上,选取闪照次数、闪照距离、闪照能量为因素,霉菌杀菌率为指标,通过响应面优化模型确定脉冲强光杀菌的最佳条件为:闪照次数为34次、闪照距离为10cm、闪照能量为400J,此条件下脉冲强光对月饼表面霉菌杀菌率可达到99.85%。采用上述分析的最佳杀菌条件处理的月饼,在国标规定的霉菌数量范围内,其货架期比空白样品延长了30d,并且其酸价和过氧化值都符合国标规定,说明脉冲强光对月饼油脂稳定性没有显著影响,不会影响月饼品质。

关键词:脉冲强光,月饼,霉菌,杀菌率,货架期

Sterilizing effect of pulsed light on the mould which is on the moon cake surface

WANG Bo¹, ZHAO Xu², MA Tao^{1*}, LIU He¹, HE Yu-tang¹, HUI Li-juan¹

(1.College of Chemistry, Chemical Engineering and Food Safety, Bohai University, Grain and Oil Science and Technology Institute of Bohai University, Jinzhou 121013, China;

2.Grain Science Research Institute of Liaoning Province, Shenyang 110866, China)

Abstract: The pulsed light sterilizing parameters for moon cake surface were optimized by RSM. The impacts of flash times, flash distance and flash energy, sterilization rate were investigated. Results showed that optimal sterilizing conditions were flash times of 34, flash distance of 10cm, flash energy of 400J. Under the optimized conditions, bacteria sterilization rate could reach to be 99.85%. The best sterilizing conditions were optimized by using RSM. In the number range of mold in National Standard, it could be extended 30 days than blank sample. The acid value and the peroxide value were in accordance with the National Standard. The pulsed light had no significant effect on the oil stability and quality of mooncake.

Key words: pulsed light; moon cake; moulds; sterilization rate; shelf life

中图分类号: TS201.3

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2015)04-0255-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.04.047

月饼含有丰富的油脂和糖分,受热受潮都易发霉、变质。中秋节前夕,月饼的市场需求量集中加大,月饼厂商需赶制大批量月饼。以上种种因素使得月饼需要提前一个月甚至更久就生产出来,这其中的制作过程如果杀菌不彻底及包装贮藏不当,都会造成微生物的超标,尤其是烘烤熟制的月饼在冷却、包装过程中更容易受到环境、人为等的二次污染,影响月饼的食用安全,缩短货架期。

脉冲强光杀菌技术是近些年来出现的一种非热杀菌新技术,它利用瞬时、高强度的脉冲能量杀灭食品和包装上各类微生物,有效的保持食品质量,延长食品货架期^[1]。该技术由于只处理食品的表面,从而

对食品的风味和营养成分影响很小,可用于延长以透明物料包装的食品及新鲜食品的货架期^[2]。脉冲强光主要涉及粮油制品、果蔬制品、水产制品等食品杀菌保藏方面^[3-7],在焙烤制品上的应用国内外鲜有报道。本文研究了脉冲强光对月饼表皮霉菌杀菌的效果,为延长月饼货架期应用脉冲强光杀菌技术提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

月饼 实验室自制;月饼皮配料 为53%的面粉,15%豆油,31%糖浆,1%枳水;月饼馅 购自青岛汇丰苑食品公司;冰乙酸、碘化钾、酚酞 天津市北辰方正试剂有限公司;可溶性淀粉 天津市风船化

收稿日期: 2014-05-26

作者简介: 王勃(1986-),男,硕士,实验员,研究方向:粮油科学。

* 通讯作者: 马涛(1962-),男,博士,教授,研究方向:粮油科学。

学试剂有限公司;孟加拉红培养基 北京奥博星生物技术有限责任公司;硫代硫酸钠标准滴定溶液 [$c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)=1.000\text{mol/L}$]、氢氧化钾标准滴定溶液 [$c(\text{KOH})=1.000\text{mol/L}$] 上海晶纯生化科技股份有限公司;三氯甲烷、乙醚 锦州古城化学试剂厂;石油醚、乙醇 天津市天力化学试剂有限公司。

AR224CN电子天平 豪斯仪器(上海)有限公司制造;BPS-100CA恒温恒湿培养箱、DHG-9055A电热鼓风干燥箱、LRH-150生化培养箱、数显恒温水浴锅 上海一恒仪器科学有限公司;EC2菌落计数器 法国梅里埃生物公司;GMSX-280压力蒸汽灭菌器 北京市永光明医疗仪器有限公司;MiniMix 400W拍打均质器 法国Interscience公司;SW-CJ-2FD超净工作台 苏州安泰空气净化有限公司;TDZ4-WS台式低速自动平衡离心机 长沙湘智离心机仪器有限公司;ZWB-I-01 (LA50-800H)脉冲强光杀菌器 宁波中物光电杀菌技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 月饼制作工艺

豆油、糖浆、视水

↓机械搅拌

月饼粉配制→混合→醒发→包馅→压模→烘烤→冷却→包装→成品月饼

1.2.2 样品的处理 实验室自制月饼重量为100.0g,其中月饼皮45.0g,月饼馅55.0g。焙烤好的月饼在焙烤完成之后要迅速移至无菌室内,待月饼表皮温度降至常温后再进行包装,这样的操作使月饼在包装环节中尽可能减少被杂菌污染的概率,确保实验结果的客观准确性^[8]。无菌操作条件下,从包装袋中取出月饼放置于无菌的石英板上,通过调整石英板的高低来实现样品与脉冲氙灯之间的距离,根据单因素实验结果更改操作界面上的脉冲次数和脉冲能量,闪照频次为2次/s。闪照后将月饼皮馅分离,取远离月饼馅的饼皮25.0g,放入盛有225mL无菌水的均质袋中,用拍击式均质器拍打2min,制成1:10的样品匀液,摇匀液进行活菌平板计数。取同等质量的月饼饼皮不做任何处理,培养5d后得到的活菌数即为月饼饼皮样本的原始菌落数。

1.2.3 霉菌的检测 参照国标GB 4789.15-2010食品安全国家标准食品微生物学检验霉菌和酵母计数^[9]。

脉冲强光的杀菌效果依据微生物的杀菌率来评价,杀菌率的计算公式如下:

$$\text{杀菌率}(\%) = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100$$

式中: A_0 : 原始菌落数, A : 处理后的菌落数。

1.2.4 单因素实验 固定闪照距离为10cm,闪照能量为300J,研究闪照次数为20、25、30、35、40次对月饼杀菌效果的影响;固定闪照次数为30次,闪照能量为300J,研究闪照距离为9、10、11、12、13cm对月饼杀菌效果的影响;固定闪照次数30次,闪照距离10cm,研究闪照能量100、200、300、400、500J对月饼杀菌效果的影响。

1.2.5 响应面法优化脉冲强光对月饼表面杀菌效果的影响 以霉菌的杀菌率为响应值进行响应面实验设计,优化脉冲强光杀菌工艺条件^[10-12]。根据Box-Behnken的中心组合设计原理^[13],通过Design Expert 8.0.6软件对实验数据进行分析,预测脉冲强光杀菌的最佳工艺条件。各因素及水平编码如表1所示。

表1 响应面优化实验因素水平表

Table 1 Coded values and corresponding actual values of the optimization parameters used in the response surface analysis

因素	代码		水平		
	编码	非编码	-1	0	+1
脉冲次数(次)	x_1	X_1	25	30	35
脉冲距离(cm)	x_2	X_2	9	10	11
脉冲能量(J)	x_3	X_3	200	300	400

注:表中各自变量编码值与真实值之间的关系为 $x_1=(X_1-300)/100$, $x_2=(X_2-30)/5$, $x_3=(X_3-10)/1$ 。

1.2.6 月饼货架期的微生物指标测定 无菌操作条件下,选取50个外观良好的月饼对其进行脉冲强光处理,设定杀菌参数为上述响应面分析出的最佳杀菌条件。再选取另50个月饼不做任何处理,一同放入25℃的恒温培养箱中,每天选取一个经过脉冲强光处理的月饼和一个未做处理的月饼作为对照,直到样品霉菌数超过国标规定值,无需再测定。霉菌数的检测方法按照参照国标GB 4789.15-2010食品安全国家标准食品微生物学检验霉菌和酵母计数。每种样品做3次平行实验。

1.2.7 月饼货架期的理化指标测定

1.2.7.1 酸价的测定 称取20.0g月饼饼皮于研钵中磨碎,置于锥形瓶中,石油醚浸泡过夜后离心取上清液倒入三角瓶中,45℃水浴挥去石油醚,放置干燥箱中1min烘干瓶身水分,得到所需油脂^[14]。

称取3.0g混匀的油脂样品,置于锥形瓶中,加入50mL中性乙醚-乙醇(2+1)混合液,放置于恒温振荡器(参数设定为:40℃,5min)使油脂溶解。取出后冷却至室温,加入酚酞指示液2~3滴,以氢氧化钾标准滴定溶液(1.000mol/L)滴定,至出现微红色且半分钟内不褪色为指示终点。每次测定做3次平行实验。

酸价的测定原理以及计算公式均参照国标GB/T 5009.37-2003食用植物油卫生标准的分析方法^[15]。

1.2.7.2 过氧化值的测定 油脂样品的提取参照上述酸价测定的方法进行,过氧化值的测定原理以及计算公式均参照国标GB/T 5009.37-2003食用植物油卫生标准的分析方法。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 闪照次数对杀菌率的影响 由图1可以看出,在闪照次数为25~35次时,杀菌率提升的较为明显,在35~40次时,杀菌率提高趋缓。随着脉冲强光照次数的增加,平板上的菌落数逐渐减少^[16]。当闪照次数为35次时,其杀菌率为99.55%,所残留的微生物菌落数符合国标规定。鉴于节约杀菌成本并综合考虑两

评价指标的最佳闪照次数,选取25、30、35次继续对月饼的杀菌效果做响应面分析以确定最佳的闪照次数。

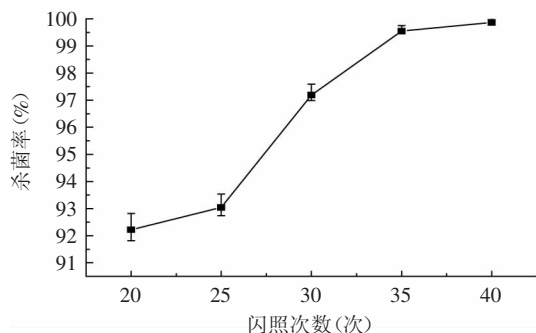


图1 闪照次数对杀菌效果的影响

Fig.1 Effect of flash time on sterilization rate

2.1.2 闪照距离对杀菌率的影响 由图2可以看出,随着闪照距离的增大,杀菌率呈减少趋势。这是因为随着脉冲强光与月饼的距离越远,脉冲强光的能量越弱,杀菌效果也越差。综合考虑两评价指标的最佳闪照距离,选取9、10、11cm继续对月饼的杀菌效果做响应面分析以确定最佳的闪照距离。

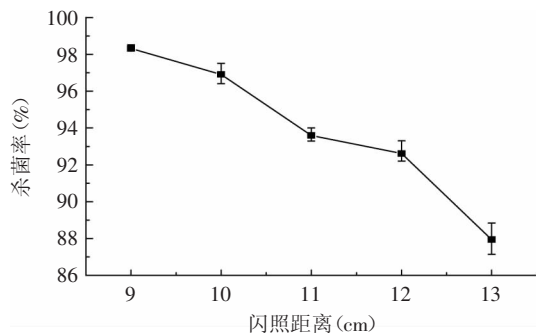


图2 闪照距离对杀菌效果的影响

Fig.2 Effect of flash distance on sterilization rate

2.1.3 闪照能量对杀菌率的影响 由图3可以看出,随着闪照能量的增加,杀菌率呈增加趋势。在闪照能量为100~300J时,杀菌率明显提高,而在400~500J时,杀菌效果提升的并不明显。脉冲强光处理对细胞膜造成了严重损伤并大幅降低了胞内酶的活性,这也可能是霉菌致死的主要原因之一^[7]。综合考虑两评价指标的最佳闪照能量,选取200、300、400J继续对月饼

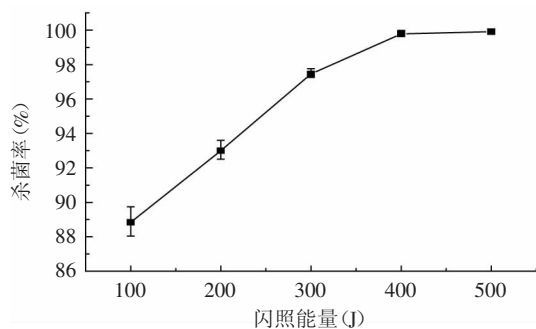


图3 闪照能量对杀菌效果的影响

Fig.3 Effect of flash energy on sterilization rate

的杀菌效果做响应面分析以确定最佳的闪照能量。

2.2 实验模型的建立及显著性检验

应用Design-Expert 8.0.6软件进行Box-Behnken中心组合实验设计,以闪照次数、闪照距离、闪照能量为因素,以微生物杀菌率为响应值(Y),进行三因素三水平共17个实验点(包括5个零点)的响应面实验设计组合,实验设计及结果如表2所示。

表2 Box-Behnken实验设计及结果

Table 2 Box-Behnken experimental design arrangement and corresponding results

实验号	X ₁	X ₂	X ₃	Y 杀菌率 (%)
1	-1	0	1	94.77
2	0	-1	1	99.19
3	0	0	0	96.64
4	0	0	0	96.91
5	0	0	0	96.55
6	1	1	0	99.37
7	0	0	0	97.19
8	1	-1	0	99.81
9	-1	-1	0	93.44
10	1	0	-1	96.98
11	1	0	1	99.73
12	0	0	0	97.46
13	-1	1	0	90.64
14	0	1	1	96.03
15	0	-1	-1	93.03
16	0	1	-1	92.19
17	-1	0	-1	87.04

根据表2的实验结果,将实验数据进行逐步回归拟合,得到以杀菌率(Y)为目标函数的二次回归方程模型为:

$$Y = 96.95 + 3.75X_1 - 0.91X_2 + 2.56X_3 + 0.59X_1X_2 - 1.24X_1X_3 - 0.58X_2X_3 - 0.81X_1^2 - 0.33X_2^2 - 1.51X_3^2$$

对该数学模型进行方差分析,以检验方程的有效性和各因子的偏回归系数。回归模型进行方差分析及可信度分析结果见表3。

根据 $\alpha=0.05$ 显著水平剔除不显著项,简化后的回归方程为:

$$Y = 96.95 + 3.75X_1 - 0.91X_2 + 2.56X_3 + 0.59X_1X_2 - 1.24X_1X_3 - 0.58X_2X_3 - 0.81X_1^2 - 1.51X_3^2$$

根据表3可知,模型 $p<0.0001$,表示模型是极显著的,证明模型成立,本实验方法是可靠的。失拟项不显著($p=0.8609>0.05$),表明回归方程无失拟因素存在,回归方程拟合较好。进一步解释验证在实验范围内可以用来解释和预测实验结果。一次项系数 X_1 、 X_2 、 X_3 的系数都是极显著($p<0.0001$),说明闪照次数、闪照距离及闪照能量对脉冲强光的杀菌率影响有显著作用。交互项 X_1X_2 ($p=0.0069<0.01$),交互项 X_2X_3 ($p=0.0075<0.01$),交互项 X_1X_3 ($p<0.0001$)的交互作用对杀菌率的影响极显著。综上所述,影响因素的主次顺序为: X_1 (闪照次数) $>X_3$ (闪照能量) $>X_2$ (闪照距

表3 响应面方差分析

Table 3 Analysis of variance for the fitted mathematical model

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	Prob>F	显著性
模型	194.26	9	194.26	221.73	<0.0001	**
X ₁	112.50	1	112.50	1155.71	<0.0001	**
X ₂	6.55	1	6.55	67.31	<0.0001	**
X ₃	52.43	1	52.43	538.60	<0.0001	**
X ₁ X ₂	1.39	1	1.39	14.30	0.0069	**
X ₁ X ₃	6.20	1	6.20	63.69	<0.0001	**
X ₂ X ₃	1.35	1	1.35	13.82	0.0075	**
X ₁ ²	2.75	1	2.75	28.20	0.0011	**
X ₂ ²	0.45	1	0.45	4.64	0.0682	
X ₃ ²	9.63	1	9.63	98.95	<0.0001	**
误差项	0.68	7	0.097			
失拟项	0.11	3	0.035	0.25	0.8609	
纯误差	0.58	4	0.14			
所有项	194.94	16				
相关系数(R ²)	0.9965					
调整后的(R ² _{adj})	0.9920					

注: *差异显著($p<0.05$); **差异极显著($p<0.01$)。

离)。模型的校正决定系数(Adj R-Square)为0.9920,说明该模型能解释99.20%的响应值的变化,该方程与实际拟合的较好,能有效反应脉冲强光杀菌率与闪照次数、闪照距离和闪照能量之间的关系,因此所得的方程能预测响应值随各参数的变化规律^[18-19]。

2.3 响应面因素水平的优化及验证

将任一因素固定在建立好的回归模型的零水平上,其余交互的两因素的结果也将由此得出,二次回归方程的3D响应面图见图4~图6。下图可反映出脉冲强光杀菌率在各因素的中心点附近可获得最大值。

根据编码公式求出自变量X₁、X₂、X₃的编码值为X₁=0.915, X₂=-0.127, X₃=0.712,对应的真实值为: X₁=33.77, X₂=9.82, X₃=377.45,即闪照次数为33.77次,闪照距离为9.82cm,闪照能量为377.45J,此时预测的杀菌率可达到99.8221%。

为检验响应面的可靠性,在最佳杀菌条件下进行验证实验,考率到实际操作,将最佳条件修正为:闪照次数为34次、闪照距离为10cm、闪照能量为

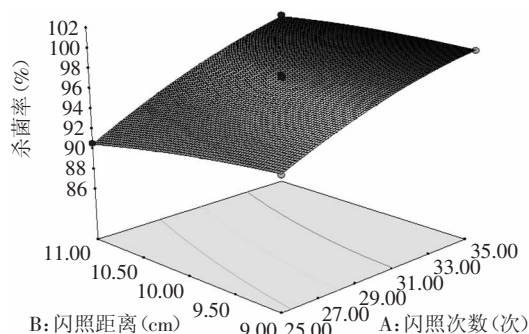


图4 闪照次数、闪照距离及其交互作用的3D响应面
Fig.4 3D response surface plot showing the effects of flash time, flash distance and their mutual interactions

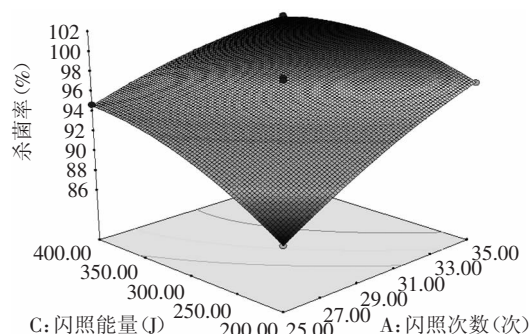


图5 闪照次数、闪照能量及其交互作用的3D响应面
Fig.5 3D response surface plot showing the effects of flash time, flash energy and their mutual interactions

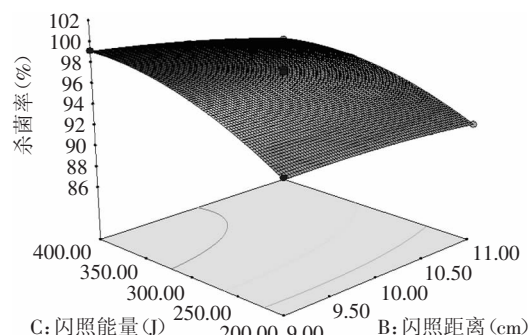


图6 闪照距离、闪照能量及其交互作用的3D响应面
Fig.6 3D response surface plot showing the effects of flash distance, flash energy and their mutual interactions

400J,此条件下进行3次平行实验,脉冲强光杀菌率为99.85%,与预测值相接近,说明回归方程能够较为直观地反映和模拟各因素对脉冲强光杀菌率的影响,结果表明该模型是合理有效的,在实际情况中具有一定的指导意义。

2.4 货架期的理化及微生物指标测定结果

根据《GB 7099-2003糕点、面包卫生标准》进行评价,热加工糕点和面包的霉菌指标是 $\leq 100\text{cfu/g}$,冷加工是 $\leq 150\text{cfu/g}$ ^[20]。酸价(以脂肪计) $\leq 5\text{mg KOH/g}$,过氧化值(以脂肪计) $\leq 0.25\text{g/100g}$ 。

表4 脉冲强光杀菌对月饼微生物和理化指标的影响

Table 4 Effect of intense pulsed light does on the microorganism and physicochemical indexes of moon cake

贮藏时间(d)	微生物和理化指标					
	霉菌数(cfu/g)		酸价(mg KOH/g)		过氧化值(g/100g)	
	空白	处理	空白	处理	空白	处理
0	3	0	0.02	0.02	0.07	0.08
10	19	2	0.41	0.67	0.35	0.12
20	超标	13	0.98	0.71	0.67	0.17
30	超标	36	1.23	1.60	1.15	0.24
40	超标	59	1.47	1.70	1.05	0.18
50	超标	超标	2.01	2.03	1.33	0.16

由表4可知,未做处理的月饼在第20d的时候,霉菌数量已经超过国标规定的 100cfu/g ,而经过脉冲强光杀菌后的月饼在第50d的时候,霉菌数量才超过国标规定,比未做处理的月饼货架期延长了30d。这说明月饼经过脉冲强光杀菌能够延长其货架期,并且微生物霉菌数量在货架期延长期内都符合国标要求。理化指标的测定结果表明,经过脉冲强光杀菌后的月饼在50d内的酸价和过氧化值均符合国标规定。以上结果表明,脉冲强光杀菌能够在符合国标规定的情况下有效地延长月饼的货架期。

3 结论

采用脉冲强光杀菌技术可以有效杀灭月饼表面污染的霉菌,在单因素实验基础上,利用响应面法对脉冲强光在月饼的杀菌条件进行优化,建立了闪照次数、闪照距离、闪照能量3个因素对杀菌率的二次回归方程模型。最佳条件为:闪照次数为34次、闪照距离为10cm、闪照能量为400J,此条件下脉冲强光对月饼表面霉菌杀菌率可达到99.85%。

采用响应面法分析出的脉冲强光杀菌最佳条件,在国标规定的霉菌数量范围内,经过脉冲强光处理的月饼比未作处理的月饼货架期延长了30d,并且其酸价和过氧化值都符合国标规定,证明脉冲强光处理在货架期内对月饼油脂稳定性没有显著影响,不会影响月饼品质。

参考文献

- [1] 南楠,袁勇军,戚向阳,等.脉冲强光技术及其在食品杀菌中的应用[J].食品工业科技,2010(12):405-408.
- [2] 李玉峰,马涛.食品杀菌新技术[J].农产品加工,2007(1):89-93.
- [3] 袁勇军,戚向阳,曹少谦,等.脉冲强光及抗氧化剂对大豆油过氧化的影响[J].核农学报,2011,25(5):975-979.
- [4] 戚向阳,陈伟,曹少谦,等.脉冲强光及抗氧化剂对动物油脂的影响[J].中国粮油学报,2011,26(9):60-65.
- [5] 马凤鸣,张蕾,李浦.脉冲强光对常见植物油脂品质的影响[J].中国林副特产,2011(5):38-40.
- [6] 江天宝,陆燕,陆则坚.脉冲强光对竹笋制品(玉兰片)杀菌效果及品质的影响[J].中国食品学报,2007(3):101-106.
- [7] 江天宝,曹玉兰,陆燕,等.脉冲强光对烤鳗的杀菌效果及感官品质的影响[J].农业工程学报,2006,22(12):200-204.
- [8] 马涛,周大宇.ε-聚赖氨酸对月饼表皮防腐效果的研究[J].食品科学,2008,29(12):215-218.
- [9] 国家质量监督检验检疫局. GB4789.15-2010食品微生物学检验霉菌和酵母计数[S].
- [10] 蒋静,马涛.营养液培养糙米发芽富集GABA工艺条件优化[J].食品工业科技,2013,34(5):195-199.
- [11] 马涛,陈伟玲.工艺条件对发芽糙米中γ-氨基丁酸含量的影响[J].食品工业科技,2013,34(6):289-295.
- [12] 马涛,陈伟玲.糙米发芽浸泡过程中臭氧对微生物灭菌效果的影响[J].食品工业科技,2013,34(2):245-248.
- [13] JOSHI S, YADAV S, DESAI AJ. Application of response-surface methodology to evaluate the optimum medium components for the enhanced production of lichenysin by *Bacillus licheniformis* R2[J]. Biochemical Engineering Journal, 2008, 41(2): 122-127.
- [14] 白卫东,肖燕清,钱敏,等.广式月饼储存过程中氧化问题的研究[J].食品工业科技,2010,31(8):67-69.
- [15] 国家质量监督检验检疫局. GB/T 5009.37-2003食用植物油卫生标准的分析方法[S].
- [16] 孟宪军,郑凤娥,张琦.纳塔尔链霉菌的脉冲强光诱变育种研究[J].食品科学,2008,29(3):141-145.
- [17] 张佰清,陈丹.脉冲强光对大肠杆菌细胞膜损伤及胞内酶活性的影响[J].食品与机械,2010,26(5):62-83.
- [18] 李侠,张利宽,刘春萌,等.响应面法优化荞麦蛋白酶解工艺[J].食品科学,2012,33(22):145-148.
- [19] 赵延伟,王雨生,陈海华,等.响应面法优化豆粕酶解工艺条件[J].食品科学,2013,34(8):70-75.
- [20] 国家质量监督检验检疫局. GB7099-2003糕点、面包卫生标准[S].

(上接第254页)

- [2] 姚惠源.高科技开发米糠资源的战略意义[J].粮食与食品工业,2012,19(6):1-2.
- [3] 徐杰.贵州黑糯米的稻米表皮中有机成分的分离纯化和结构鉴定[J].华南师范大学学报:自然科学版,1996(4):20-27.
- [4] 李宏睿,麦锦莘,徐明生,等.糯米酶解工艺以及抗氧化活性研究[J].食品研究与开发,2011,32(7):15-18.
- [5] 樊金娟,罗霞,董智.米糠抗氧化肽的提取和纯化工艺研究[J].食品科技,2008,33(12):169-173.

- [6] 王若兰,杨壮,周菲.中性酶从米糠中制取抗氧化性活性肽的研究[J].河南工业大学学报:自然科学版,2008,29(6):1-4.
- [7] 徐亚元,周裔彬,万苗,等.脱脂米糠抗氧化肽的制备工艺研究[J].中国油脂,2014,39(2):28-32.
- [8] 张强,周正义,孙玉军,等.米糠抗氧化肽的分离纯化研究[J].安徽科技学院学报,2008,22(1):29-33.
- [9] 秦垂新,姚松君,唐青涛,等.抗氧化肽及其化学活性测定方法的研究概述[J].食品工业科技,2014,35(1):394-400.