

# 压致升温对凝结芽孢杆菌芽孢的影响\*

黄娟, 王标诗, 李汴生, 李琳

(华南理工大学 轻工与食品学院, 广东 广州, 510640)

**摘要** 初步探讨了传压介质(葵二酸二辛酯)的压致升温对凝结芽孢杆菌芽孢的失活和损伤的影响。在 500 MPa、20 min 的条件下, 初温为 80 ℃ 时, 磷酸缓冲液中的凝结芽孢杆菌芽孢的失活率最大达到 -4.37 个数量级, 损伤率最大为 99.998%; 牛奶中失活率最大为 -4.22 个数量级, 损伤率最大为 99.990%。此外在试验条件下, 由于压致升温导致的芽孢失活率的增加均在 30% 以上。因此传压介质的压制升温效应十分显著, 若结合适当的压力、温度和保压时间使该效应得到合理的利用是非常有意义的。

**关键词** 高静压, 压制升温, 凝结芽孢杆菌芽孢, 失活, 损伤

食品高静压处理中, 由于压缩做功产生热量, 使传压介质和食品的温度增加, 即产生所谓压致升温 (compression heating) 现象。压致升温的幅度与多种因素相关: 传压介质的种类、升压的方式、高压腔的容积、升压的速度等<sup>[1]</sup>。在绝热压缩的情况下, 水、油等物质在压力每升高 100 MPa 时的温度升高可达 3 ℃ 以上, 最高的甚至达到 9.2 ℃<sup>[2]</sup>。

许多研究表明, 高静压与热协同处理对耐热细菌芽孢有很好的杀灭效果。一般处理条件为 500~800 MPa, 初温 60~100 ℃ 能达到较好的杀菌效果(条件因芽孢的种类而不同, 高静压设备的承受能力也受到技术的限制)。因此若采用 700 MPa 和 100 ℃ 的条件杀菌, 初温为 100 ℃ 的食品物料, 如果按 3.0 ℃/100 MPa 的温度变化来计, 在不考虑热损失的情况下, 压力升高到 700 MPa 时, 食品物料(各处)的温度可达 121 ℃ (即低酸性食品的标准热杀菌温度)。此时若忽略压致升温的变化, 将会极大地影响实验所得数据的准确性<sup>[3]</sup>。

本文考察了中温情况下, 高静压过程中传压介质的压制升温现象对凝结芽孢杆菌芽孢的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种及培养基

#### 1.1.1 菌种

凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*) IFFI

第一作者: 硕士研究生(李汴生为通讯作者, E-mail: febshli@scut.edu.cn)。

\* 国家自然科学基金重点项目(20436020), 广东省自然科学基金项目(05006597)

收稿日期: 2007-08-15, 改回日期: 2008-02-20

10144, 购自中国科学院菌种保藏中心, 冻干菌种。

#### 1.1.2 培养基

普通营养琼脂培养基: 蛋白陈 5 g、牛肉膏 30 g、NaCl 5 g、琼脂 15 g、蒸馏水 1 000 mL。调 pH 7.0~7.2, 混匀, 分装三角瓶中, 灭菌(121 ℃、15 min, 下同), 备用。

促芽孢生长培养基: 上述普通营养琼脂培养基加入  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (浓度为 50 mg/L), 其余同上。

未损伤芽孢选择培养基<sup>[4]</sup>: 上述普通营养琼脂培养基加入 NaCl (浓度为 0.9%, 处于亚致死-损伤状态芽孢在此培养基不能生长), 其余同上。

## 1.2 试验设备

高静压处理装置: 超高压处理设备 UUPF/3 L/700 MPa (内蒙古包头科发新型高技术食品机械有限责任公司), 高静压腔体内的传压介质为葵二酸二辛酯。腔体容积为 3 L。高压腔外壁为循环水, 压力温度时间等参数可通过计算机设定并能自动记录数据。内置温度探头可自动记录高压腔内传压介质的温度。

其他仪器设备: 冷冻离心机 CR22G (日本 HITACHI 公司) 及微生物常用仪器。

### 1.3 试验芽孢样品的制备

#### 1.3.1 芽孢菌悬液的制备<sup>[4,5]</sup>

① 菌种经活化后, 接入试管斜面营养琼脂培养基上培养, (45±1) ℃, 7 d。② 镜检(芽孢专用染色法), 要求芽孢率达 90%~95% 时在无菌条件下无菌蒸馏水洗脱菌苔; 水浴 30 min, (80±1) ℃ (杀死营养体)。③ 离心: 4 ℃, 7 000 r/min, 15 min, 去上清液, 并用无菌蒸馏水冲洗离心 2~3 次。④ 用无菌蒸馏水制成菌悬液, 调浓度为  $10^8 \sim 10^9$  cfu/mL。4 ℃ 保存, 1 个月内可用。

### 1.3.2 被处理样品的制备

①洗净的实验用袋(复合真空袋或蒸煮袋)在装样品前在紫外下照射至少 1 h;②用磷酸缓冲液(pH6.8)或牛奶(经 UHT 灭菌的纯牛奶,pH6.9)调节菌悬液浓度为  $4 \times 10^6 \sim 8 \times 10^6$  cfu/mL;③吸取菌液 2 mL,尽可能排除袋内的气泡后封袋;后外加 1 层包装袋,真空包装;④封好的样品于 4 °C 保存。

### 1.4 样品的超高静压处理

首先将自制聚四氟乙烯套筒和加入其中的传压介质葵二酸二辛酯(DOS)预热到所需温度,再将预热到相同温度的样品放入其中,然后立即将套筒置于高压腔内,旋紧上盖后进行压力的处理。处理后,将样品立即取出置于冰水混合物中(0 °C)待测,尽可能快地完成微生物检测。

设备施压过程如图 1。本试验采用自制的传压保温套筒(材料为聚四氟乙烯;耐腐蚀、耐高低温,导热系数低,为  $0.256 \text{ W}/(\text{m} \cdot \text{K})$ )。一般条件下可透气而不透水,常作为隔热衬垫材料,尽可能减少传压介质的热损失。传压介质的温度可通过温度探头在线温度测定仪测得。实验中菌体存在的介质为水和牛奶,体积为 2 mL,且经测试 2 种介质在施压过程中的温度变化情况均与套筒内传压介质同步。

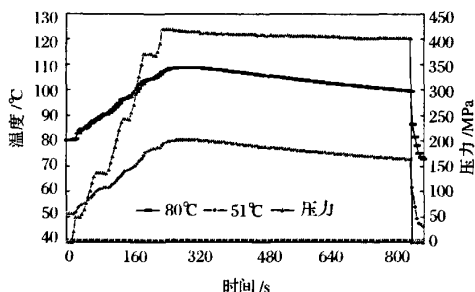


图 1 实验所用高静压设备在目标压力为 400 MPa, 初温分别为 51 °C 和 80.0 °C 时保压 10 min 的过程图例

### 1.5 样品处理后的分析

按《食品微生物检验国家标准》(GB4789—2003),采用平板倾注计数法进行菌数的测定。以磷酸缓冲液作稀释液,平板培养[凝结芽孢杆菌:( $45 \pm 1$ ) °C,48 h]。失活率采用营养琼脂培养基,损伤率采用未损伤芽孢选择培养基。每个样品 3 个平行,结果以平均值±标准误差( $X \pm SD$ )表示。

#### 1.5.1 失活率

$$\text{失活率} = \log \frac{N_{\text{未失活}}}{N_0}$$

其中: $N_0$  为经过任何处理的样品菌落总数(cfu/

mL,下同); $N_{\text{未失活}}$  为经过热压处理后,芽孢在普通营养琼脂培养基上培养的菌落总数。

#### 1.5.2 损伤率

$$\text{损伤率} = \log \frac{N_{\text{未损伤}}}{N_0} \quad [6]$$

其中: $N_{\text{未损伤}}$  为经过热压处理后,芽孢在未损伤芽孢选择培养基(0.9 % NaCl)上培养所可见的菌落总数。通过此指标可大致衡量受损(包括已失活及处于亚致死-损伤状态)芽孢总量。

#### 1.5.3 压致升温效应的计算

实验初始温度(以下简称“初温”)的选择以传压介质的压致升温情况来考虑。压致升温对失活率的贡献根据在相同压力条件下,有无温度补偿 2 种情况下失活率的差值计算。如均在 500 MPa 处理压力和 80 °C 的条件下,因传压介质在初始温度为 45 °C 时,达到 500 MPa 温度可升至 80 °C,故可把压力 500 MPa 和初始温度为 45 °C 的条件下看成有温度补偿的情况,其考虑了压致升温带来的温度变化;而相同压力下初始温度为 80 °C 条件下可看成是无温度补偿的情况,因其没考虑压致升温带来的温度。故这 2 种条件下失活率之差即是压致升温对失活率的贡献。同理在 400 MPa 和 80 °C 的情况亦是如此<sup>[7]</sup>。

压致升温对失活率的贡献/% =

$$\frac{\text{失活率 } a \times \text{失活率 } b}{\text{失活率 } a} \times 100$$

其中:失活率  $a$  表示在一定的压力下,不考虑温度补偿时的失活率;失活率  $b$  表示在相同的处理压力下,考虑温度补偿时的失活率。

因此选择实验条件为 400 MPa,初温为 51 °C 和 80 °C;500 MPa,初温为 45 °C 和 80 °C。芽孢分别接种于无菌蒸馏水和 UHT 牛奶中。

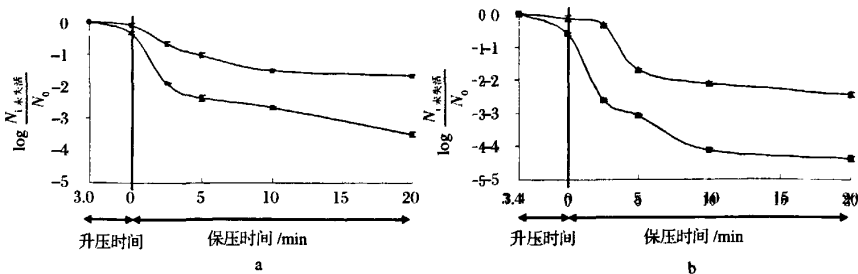
## 2 结果与分析

### 2.1 芽孢的失活和损伤情况

#### 2.1.1 磷酸缓冲液做为传压介质

随着初温和目标压力升高,升压过程所需时间对失活率有一定影响(见图 2)。而在保压初期(0 ~ 10 min),芽孢失活率有大幅度增大,且保压时温度越高,芽孢失活越明显。保压时间增长,芽孢失活速率逐渐缓慢。高静压处理后芽孢死亡趋势呈拖尾的这种现象是研究者们发现的普遍现象。图 3 为损伤情况:较高压力下,当初温升高至一定程度(如 80 °C),升压结束时即能达到较高的损伤率(90%以上);

保压过程的损伤率基本都超过 95%。



(a)400MPa,初温分别为 51 ℃(▲)和 80℃(■);(b)500MPa,初温分别为 45℃(▲)和 80℃(■).

图 2 不同压力和初温下,磷酸缓冲液中凝结芽孢杆菌芽孢的失活率

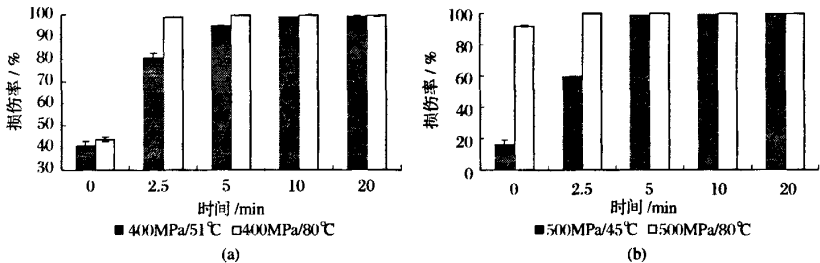


图 3 不同压力和初温条件下磷酸缓冲液中凝结芽孢杆菌的损伤率

2.1.2 牛奶做为传压介质

牛奶中芽孢的失活率较蒸馏水中的略小,尤其在保压初期较为明显(图 4)。比如 500 MPa,初温为 80 ℃时,保压时间 5 min 凝结芽孢杆菌芽孢的失活率仅 -2.23,而在磷酸缓冲液中则达到了 -3.08,相差将近 1 个对数级。而随保压时间增长,牛奶中芽孢失活率逐渐接近磷酸缓冲液中的失活率。但对于损伤情况,则呈现出略有别于失活的现象(图 5)。即在升压过程与保压初期,牛奶中芽孢的损伤率大于磷酸缓冲液中的损伤率。原因可能是牛奶中含有的营养因素(比如氨基酸)有利于诱导芽孢的发芽而导致其受损,但同时牛奶的乳状液体系又有利于保护芽孢,故牛奶中芽孢的失活趋势较为平缓。但随着保压时间的增加,其失活率最终仍逐渐接近磷酸缓冲液中的失活率。不同的菌对于营养诱导因子的敏感性不同,比如腊样芽孢杆菌芽孢对 L-丙氨酸、L-亮氨酸、L-异亮氨酸这些营养发芽诱导因子较为敏感<sup>[8]</sup>,Opstal<sup>[9]</sup>比较磷酸缓冲液中和牛奶中的腊样芽孢杆菌芽孢的高静压效应时发现,牛奶中芽孢的失活率高于磷酸缓冲液。

2.2 传压介质的压致升温导致的失活和损伤的增加效果

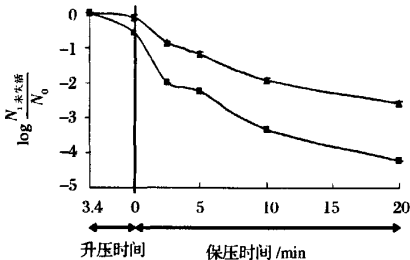


图 4 500MPa 下,牛奶中凝结芽孢杆菌芽孢的失活率  
初温分别为 45℃(▲)和 80℃(■)

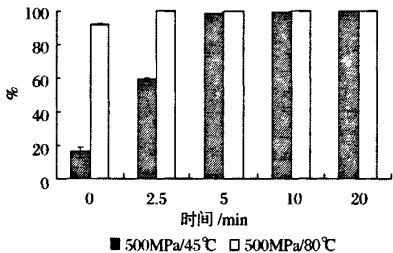


图 5 牛奶中凝结芽孢杆菌的损伤率  
(压力 MPa/ 初温 ℃)

实验所选择的压力下,压致升温导致芽孢的失活率增加的百分比均超过 30%(表 2)。结合图 1 和表

1 中所测得施压过程中保温套筒内传压介质温度的变化分析:保压初期,由于升压过程中的压制温升高(500 MPa 升压结束后的传压介质压致温升达到了约 115℃),传压介质的温度在一定的时间里都保持较高,使得处理的效果更为显著。随保压时间增加,高压腔内的热传递使得套筒内传压介质的温度有一定下降,但处理温度仍处于比较高的状态,加之压力协同效应,故使得芽孢致死效果仍较高。损伤率的增加(表 3)基本随着保压时间的增长而明显减少,因为保压时间越长,之前受损的芽孢继而失活的就越多,但可以发现失活趋势非线型相关。这说明了压力仍是高静压处理的主导,目标压力越高,结合传压介

质的压制升温现象,共同带来的致死效应也越强烈。

菌介质环境对于压致升温的效果也有一定的影响。实验中样品量较少(2 mL),菌悬液的温度变化与套筒内传压介质同步,故压致温升导致的温度变化对于实验中 2 个菌介质(磷酸缓冲液和牛奶)来说是相同的,但实验结果显示牛奶中芽孢的失活趋势相对较为平缓(比较图 2 与图 4)。

此外,实验中同样考察了,0.1 MPa、45℃、80℃ 的热处理 0~20 min 对芽孢失活几乎没有影响(数据不赘述)。这证实了在高静压下,压和热及压致升温共同导致的致死效果有极大的研究潜力。

表 2 由于传压介质的压致升温导致芽孢的失活率增加情况

施压条件(压力 MPa / 保压初温℃)	时间/min				
	0	2.5	5	10	20
400/80(磷酸缓冲液中)	69.44%	64.58%	55.46%	43.66%	52.00%
500/80(磷酸缓冲液中)	94.22%	86.26%	44.48%	48.06%	44.39%
500/80(牛奶中)	77.19%	56.78%	46.64%	42.34%	38.63%

注:表中的数据只是一个相对增幅的百分率,相同施压时间之间可互相比较,但并不能直接与失活率对应比较。

表 3 由于传压介质的压致升温导致芽孢的损伤增加情况

施压条件(压力 MPa / 保压初温℃)	时间/min				
	0	2.5	5	10	20
400/80(磷酸缓冲液中)	2.75%	18.15%	4.85%	1.09%	0.08%
500/80(磷酸缓冲液中)	55.28%	40.66%	0.91%	0.33%	0.19%
500/80(牛奶中)	91.36%	42.30%	7.08%	6.36%	0.53%

注:表中的数据只是一个相对增幅的百分率,相同施压时间之间可互相比较,但并不能直接与损伤率对应比较。

### 3 总结与讨论

实验结果证明了压致升温对芽孢失活率的贡献是重要的:(1)升压过程对于芽孢的失活、损伤都有一定的影响,且随着目标压力和初温的升高,影响增大。(2)保压初期(0~10 min),芽孢的失活率增加较快,随保压时间增长,失活率增加的速度逐渐平缓。故多数学者推荐的商业高压杀菌的时间一般为 5~20 min,压力为 300~700 MPa,处理温度为 35℃ 以上(或至少高于目标菌的最适生长温度)<sup>[5,10]</sup>。(3)芽孢所在的介质环境对于其失活、损伤也有较大的影响。因此,想要有效利用高静压的压致升温效应需要积累不同的菌种的失活规律,不同状态、种类的食品体系的压致升温规律,食品中的一些营养发芽诱导因子对芽孢的杀灭起着辅助的作用等方面相关的基础数据和经验。若能合理的利用这些影响因素将能在一定程度上加强高静压杀菌的应用效果。

### 参 考 文 献

- 1 Patazca E, Koutchma T, Balasubramaniam V M. Quasi-adiabatic temperature increase during high pressure processing of selected foods[J]. Journal of Food Engineering, 2007, 80(1): 199~205
- 2 Rasanayagam V, Balasubramanian V M, Ting E. Compression heating of selected fatty food materials during high-pressure processing [J]. Journal of Food Science, 2003, 68(1): 245~259
- 3 钟秀霞,李汴生,李琳,等. 压致升温及其对超高压下微生物失活的影响[J]. 食品工业科技, 2006, 27(6): 179~186
- 4 Florence E F, Donald T M, Durwood B R. Thermal Inactivation and Injury of *Bacillus stearothermophilus* Spores [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1987, 53(2): 365~370
- 5 Ahn J, Balasubramaniam V M, Yousef A E. Inactivation kinetics of selected aerobic and anaerobic bacterial spores by pressure-assisted thermal processing[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 113(3): 321~329
- 6 Periago P M, Fernández P S, Salmerón M C, et al. Predictive model to describe the combined effect of pH and

- NaCl on apparent heat resistance of *Bacillus stearothermophilus*[J]. International Journal of Food Microbiology, 1998,44(1):21~30
- 7 Balasubramaniana S, Balasubramaniamb V M. Compression heating influence of pressure transmitting fluids on bacteria inactivation during high pressure processing[J]. Food Research International, 2003,36(7):66~668
- 8 Agata N, Ohta M, Mori M, et al. Growth conditions of and emetic toxin production by *Bacillus cereus* in a defined medium with amino acids[J]. Microbiology and Immunology, 1999,43(1):15~18
- 9 Opstal I V, Bagamboula C F, Vanmuysen S C M, et al. Inactivation of *Bacillus cereus* spores in milk by mild pressure and heat treatments[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004,92(2):227~234
- 10 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(3):257~270

## The Effects of Compression-heating on *Bacillus coagulans* Spores

Huang Juan, Wang Biaoshi, Li Biansheng, Li Lin

(College of Light Industry and Food Technology, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**ABSTRACT** In high pressure processing, the pressure-transmitting fluid can produce compression-heating because of compression. In this paper, the effects of the compression-heating of pressure-transmitting fluid on inactivation and injury of *Bacillus coagulans* spores were discussed. Under the condition of pressure at 500 MPa, pressure hold time of 20 min, at the initial temperature of 80 °C, the maximal inactivation rate of *Bacillus coagulans* spores in potassium phosphate buffer was -4.37 log and the maximal injury rate is 99.998%; in UHT milk, the maximal inactivation rate was -4.22 log and the maximal injury rate is 99.990%. In addition, at the above described experimental condition, the increase of the inactivation rate was 30%. The conclusion is that the effect of compression-heating of the pressure-transmitting fluid is notable, and is significant in application development provided appropriate combination of relevant pressure, temperature and hold-time.

**Key words** high hydrostatic pressure, compression-heating, *Bacillus coagulans* spores, inactivation, injury

(上接第 48 页)

## Study on Transformation of Phytosterol into Androst-4-ene-3,17-dione in Two-phase Systems

Jiang Shaotong<sup>1</sup>, Zhao Junping<sup>1</sup>, Yang Ying<sup>1,2</sup>, Hu Jinyan<sup>1</sup>, Cui Lijuan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(College of Food and Biological, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

<sup>2</sup>(Department of Environment Engineering, Anhui Institute of Architecture, Hefei 230022, China)

**ABSTRACT** Compared with general system for fermentation, two-phase systems can improve the solubility of phytosterol and transformation rate in the process of the transformation of phytosterol into androst-4-ene-3,17-dione. The variety of organic-phase, the quantity of phytosterol, and the rate of organic-phase in fermentation system on the transformation rate were discussed. The best processing technology was obtained. When the organic-phase is soybean oil, the rate of organic-phase in fermentation system is 22%, the quantity of phytosterol is 4g/L, the transformation rate of phytosterol reached 85.7%.

**Key words** androst-4-ene-3,17-dione, two-phase systems, transformation rate, phytosterol