

超高静压协同中温对凝结芽孢杆菌芽孢灭活动力学规律的研究

王标诗 李沐生* 黄娟 曾庆孝 阮征 朱志伟 李琳

(华南理工大学轻工与食品学院 广州 510640)

摘要: 研究了超高静压协同中温对凝结芽孢杆菌芽孢在磷酸缓冲液和牛奶(经超高温灭菌)中灭活的动力学规律, 并对超高静压的升压过程及相应的灭活效果进行了研究。结果表明, 升压过程对凝结芽孢杆菌芽孢灭活的影响不能忽略, 且随压力增加这种效果越强, 最高使其下降 1.77 个数量级; 凝结芽孢杆菌芽孢在牛奶中比在磷酸缓冲液中有更高的抗性; 在 3 种拟合模型(线性、Weibull 和 Log-logistic 模型)中, 线性模型不适合模拟这些存活曲线, 而 Log-logistic 模型能更好地模拟这些存活曲线, 其次是 Weibull 模型。

关键词: 超高静压, 中温, 凝结芽孢杆菌芽孢, 灭活动力学

Inactivation Kinetics of *Bacillus coagulans* Spore by the Combination of High Hydrostatic Pressure and Moderate Heat

WANG Biao-Shi LI Bian-Sheng* HUANG Juan ZENG Qing-Xiao
RUAN Zheng ZHU Zhi-Wei LI Lin

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

Abstract: The combination effect of high hydrostatic pressure and moderate heat on the inactivation kinetics of *Bacillus coagulans* spore in phosphate buffer and UHT (Ultra High Temperature) whole milk was investigated. The pressure come-up time and corresponding log-reduction of spore inactivation were considered during pressure-thermal treatment. *Bacillus coagulans* spore had a much higher resistance to pressure in UHT whole milk than in phosphate buffer. Survival data were modeled using the linear, Weibull and log-logistic models to obtain relevant kinetic parameters. The tailing phenomenon occurred in all survival curves, indicating the linear model was not adequate for describing these curves. The log-logistic model produced best fits to survival curves, following by Weibull model.

Keywords: High hydrostatic pressure, Moderate heat, *Bacillus coagulans* spore, Inactivation kinetics

超高静压 (Ultra High Pressure, UHP, High Hydrostatic Pressure, HHP)处理技术是采用 100 MPa~

1000 MPa 静态液压力作用于食品物料,可以在常温或较低温度下达到杀菌、抑酶及改善食品性质的新技术^[1,2]。在超高静压杀菌中,细菌芽孢比营养体更耐压,而且单独的压力处理并不能充分达到杀灭芽孢的效果^[3]。最近很多研究表明,超高静压协同中温能够有效地增加芽孢的灭活效果^[4,5]。在低酸性食品中利用超高静压协同中温杀灭其中的芽孢是非常有效的手段之一,因此对存活曲线的动力学模型的预测也非常重要。

很多研究者常采用一级线性动力学方程来模拟热处理中芽孢灭活效果^[6]。然而,研究表明线性方程在模拟过程中出现很多偏差^[7]。超高静压下芽孢的失活并不符合一级动力学模型,非线性模型如 Log-logistic、Modified Gompertz、Weibull 和 n 级动力学常被用来模拟细菌灭活效果^[8-10]。这些模型的拟合对于评价超高静压灭活芽孢的动力学是非常有效的。

凝结芽孢杆菌是酸性食品中常见的腐败菌,它耐压并且很耐热,是引起罐头腐败的嗜热菌^[11]。此外,这种菌在牛奶和一些奶制品中也经常出现^[12]。很多文献报道了热处理对凝结芽孢杆菌芽孢的影响,但是超高静压对凝结芽孢杆菌芽孢的报道较少。低酸性食品中的芽孢很难灭活,这给人们的食品安全和食品工业带来严峻的挑战。然而,至今仍没有关于凝结芽孢杆菌在超高静压协同中温下灭活动力学的报道。因此,本文的目的是研究在磷酸缓冲液和牛奶中超高静压协同中温对凝结芽孢杆菌芽孢灭活的动力学规律。

1 材料与方 法

1.1 菌种和培养基

凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*) IFFI 10144, 购自中国科学院菌种保藏中心,冻干菌种。

普通营养琼脂培养基:蛋白胨 5 g、牛肉膏 30 g、NaCl 5 g、琼脂 15 g、蒸馏水 1000 mL。调 pH 7.0~7.2,混匀、分装三角瓶中,灭菌(1×10^5 Pa 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 $MnSO_4 \cdot H_2O$ (使得培养基中 Mn^{2+} 的浓度为 50 mg/L),调 pH 值,灭菌,备用。

1.2 芽孢菌悬液的制备

菌种经活化后,接入试管斜面促芽孢生长培

养基上划线培养, 45 ± 1 , 7 d。镜检(芽孢专用染色法),要求芽孢率达 90%~95% 时,在无菌条件下用经灭菌的蒸馏水洗脱菌苔;水浴 30 min, 80 ± 1 。

离心: $7000 \times g$, 4 , 15 min,倾去上清液,再用经灭菌的蒸馏水冲洗离心,重复 2~3 次,最后用经灭菌的蒸馏水制成菌悬液,浓度调为 10^8 CFU/mL ~ 10^9 CFU/mL。4 保存,一个月内可用。试验前将凝结芽孢杆菌接种到磷酸缓冲液或经超高温灭菌的牛奶中,根据试验条件调整菌种浓度为 10^6 CFU/mL ~ 10^7 CFU/mL。

1.3 样品的热压处理

2 mL 接种到磷酸缓冲液或经超高温灭菌的牛奶中的菌悬液样品放入已杀菌的聚乙烯包装袋中,尽可能排除袋内的气泡后热封;后外加一层包装袋,真空包装备用;然后将自制的聚四氟乙烯套筒和加入其中的传压介质癸二酸二辛酯预热到所需温度,再将预热到相同温度的样品放入其中,再立即将套筒置于高压腔内,将上盖旋紧后进行一定的压力处理,达到压力后立即卸压,卸压时间为 2s~3 s。控制高压腔外壁循环水的温度为 25 。压力和外壁循环水的温度可通过计算机自动记录。处理后,将样品立即取出置于冰水混合物中(0)待测,6 h 内完成检测步骤。

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),传压介质的温度可通过温度探头在线温度测定仪测得。

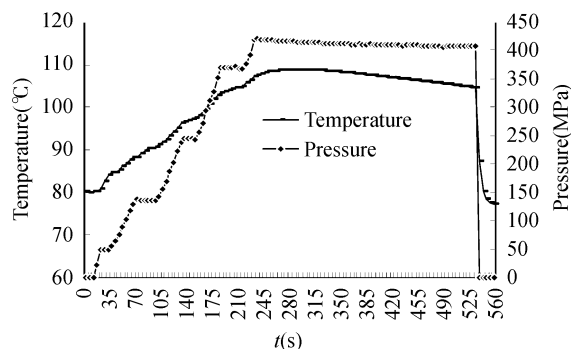


图 1 初始温度 80℃ 压力 400 MPa 条件下典型的压力温度变化曲线图

Fig. 1 Sample pressure-temperature profile for the initial temperature 80 and pressure 400 MPa

1.4 菌落总数的测定

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。以无菌蒸馏水作稀释液, 采用营养琼脂培养基平板培养(凝结芽孢杆菌: 45 ± 1 , 48 h)。

凝结芽孢杆菌芽孢数量减少以 $\log_{10}\left(\frac{N}{N_0}\right)$ 表示,

其中: N_0 为经过任何处理的样品菌落总数(CFU/mL, 下同); N 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。每个样品有 3 个平行样, 结果以平均值 \pm 标准误差($X \pm SD$)表示。

1.5 灭活的动力学模型

在计算失活动力学模型参数时以升至目标压力后作为起始点(除去升压过程的影响), 采用三种模型来计算芽孢失活的动力学规律。

1.5.1 一级动力学模型: 这个模型假定热压处理下芽孢的存活符合线性关系, 可用下式表示:

$$\log_{10} \frac{N}{N_0} = -\frac{t}{D}, \quad N_0 \text{ (CFU/mL) 表示达到目标压力}$$

后芽孢的数量, N (CFU/mL) 表示在压力处理时间 t 后芽孢的存活数量, D 表示使 90% 的芽孢失活所需的时间。

1.5.2 Weibull 模型: 这个模型假定营养体和芽孢具有不同的耐压性, 存活曲线是各种失活因素的累积效应。可用下式表示:

$$\log_{10} \frac{N}{N_0} = -bt^n, \quad n \text{ 和 } b \text{ 是与数据范围和曲线性状}$$

有关的因子。 N_0' 和 N 同上。

1.5.3 Log-logistic 模型: 此模型最初是由 Cole^[13] 提出的, 用来拟合微生物的热失活的非线性方程, 后来 Chen 和 Hoover^[9] 对此进行改进, 将方程中的参数由 4 个减少为 3 个, 表示如下:

$$\log_{10} \frac{N}{N_0} = \frac{A}{1 + e^{4\sigma(\tau - \log t)/A}} - \frac{A}{1 + e^{4\sigma(\tau + 6)/A}}, \quad A \text{ 表示高}$$

低渐近线之差(\log_{10} CFU/mL), σ 为最大失活速率 $\log(\text{CFU/mL})/\log \text{ min}$; τ 为最大失活速率的对数时间。

1.5.4 模型比较: 使用 SPSS 13.0 for Windows 进行线性和非线性回归并计算相应的参数, 均方差 (MSE) 和回归系数 (R^2) 用来比较不同的模型。 R^2 值越高表明模型拟合试验数据越好。 MSE 值越小, 表明模型拟合试验数据也越好^[14]。

1.6 统计分析

所有的试验至少进行 3 次, 根据 3 次试验结果计算相应的标准偏差。结果以均值 \pm 标准偏差的形式表示。指标内部的均值比较采用最小显著差异法 (Least significant difference, LSD), 取 95% 置信度 ($P < 0.05$)。

3 结果与讨论

3.1 热压处理对灭活的影响

在热处理过程中升热时间很短, 它对芽孢菌的灭活一般不考虑。然而, 在超高静压处理中升压时间有时必须考虑, 它对芽孢灭活的影响不能忽略。在高静压协同中温处理中升压过程对缓冲液和牛奶(经超高温灭菌)凝结芽孢杆菌芽孢的影响见表 1。在本试验条件下, 达到 400 MPa、500 MPa 和 600 MPa 所需的升压时间分别为 3.1 min、3.4 min 和 3.6 min。在 400 MPa 和 80 条件下升压过程对凝结芽孢杆菌芽孢数量下降最低(降低 0.36 个数量级), 而在 600 MPa 和 80 条件下升压时间对凝结芽孢杆菌芽孢数量下降最高(降低 1.77 个数量级)。在相同压

表 1 超高静压协同中温处理中升压过程对芽孢失活的影响

Table 1 Process come-up time log-reduction of spores during high hydrostatic pressure and heat

介质 Media	初始温度(°C) Initial temperature	压力(MPa) Pressure	升压时间(min) Pressure come-up time	$\text{Log}_{10}(N/N_0)^*$
缓冲液 Buffer	70 \pm 0.3	500	3.4 \pm 0.1	-0.51 \pm 0.06 ^a
	70 \pm 0.3	600	4.6 \pm 0.1	-1.23 \pm 0.06 ^b
	80 \pm 0.5	400	3.1 \pm 0.1	-0.36 \pm 0.06 ^c
	80 \pm 0.5	500	3.4 \pm 0.1	-0.62 \pm 0.08 ^a
	80 \pm 0.5	600	4.6 \pm 0.1	-1.77 \pm 0.02 ^d
牛奶 Milk	80 \pm 0.5	500	3.4 \pm 0.1	-0.57 \pm 0.14 ^a
	80 \pm 0.5	600	4.6 \pm 0.1	-1.63 \pm 0.07 ^e

注: *具有不同上标字母表示差异显著($P < 0.05$)

力和温度条件下牛奶中凝结芽孢杆菌芽孢数量下降低于磷酸缓冲液中的芽孢数量下降。Ahn等^[12]报道了700 MPa和105 s条件下升压过程对*C. tyrobutylicum* ATCC 25755(降低2.5个数量级)、*T. thermosaccharolyticum* ATCC 27384(降低2.1个数量级)、*C. sporogenes* ATCC 7955(降低3.3个数量级)等的影响。Rajan等^[15]也报道了在700 MPa和105 s条件下升压时间对接种于蛋饼中的嗜热脂肪芽孢杆菌芽孢的影响(降低于1.5个数量级)。这些研究结果表明升压过程对不同芽孢失活的影响是不同的,随菌种的改变而改变。

超高静压协同中温对磷酸缓冲液中的凝结芽孢杆菌芽孢的灭活并不遵循一级线性动力学规律,呈现出非线性的规律。详见图2。在保压时间150 s内,凝结芽孢杆菌芽孢数量迅速降低,然而,更长的保

压时间有相对较小的灭活效果,特别是在15 min后芽孢数量减少非常有限。主要是因为保压时间150 s内,传压介质的温度与周围环境的热交换较小,热损失较少。Rajan等^[15]也有类似的报道(保压前100 s致死率较高)。在相同的温度下,随着压力的增加芽孢数量降低也越大。在400 MPa和80 s保压30 min下,芽孢数量的下降都不超过4个数量级,而在500 MPa和80 s保压20 min芽孢数量下降就达到4个数量级;在600 MPa和80 s条件下,保压时间20 min芽孢数量下降高于5.0个数量级。Islam等^[3]报道了中温协同低静压和热处理对调味番茄酱和肉汁中凝结芽孢杆菌芽孢灭活效果。在中温协同低静压和85 s保压12 h肉汁中(pH值为7)凝结芽孢杆菌芽孢降低了4个数量级;然而,在相同条件下调味番茄酱中凝结芽孢杆菌芽孢却没有降低。

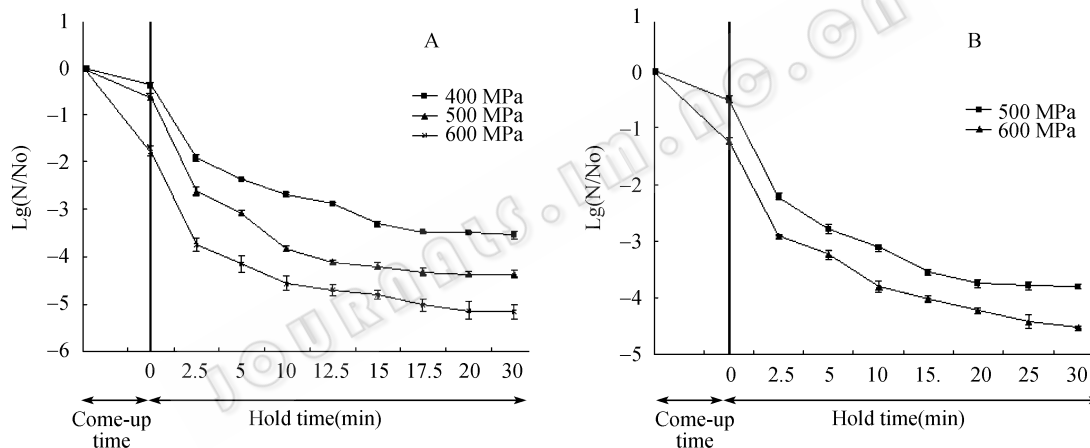


图2 超高静压协同中温对磷酸缓冲液中凝结芽孢杆菌芽孢的灭活曲线

Fig. 2 Survivor curves for *Bacillus coagulans* spore in phosphate buffer by high hydrostatic pressure and moderate heat

Note: A: 80°C; B: 70°C

3.2 牛奶对灭活的影响

超高静压协同中温对凝结芽孢杆菌芽孢在磷酸缓冲液和牛奶(经超高温灭菌)中的灭活效果如图3所示。在相同条件下升压时间内牛奶中的凝结芽孢杆菌芽孢的灭活效果低于磷酸缓冲液中的灭活效果,在保压时间内的情况与此相似。在600 MPa和80 s条件下保压10 min磷酸缓冲液和牛奶中的凝结芽孢杆菌芽孢均下降了4个数量级以上,但是更长的保压时间有相对较小的失活效果。在磷酸缓冲液和牛奶中凝结芽孢杆菌芽孢数量下降之间的差异在500 MPa和80 s的条件下比在600 MPa和80 s的条件下更

著($P < 0.05$),可能更高的压力降低了牛奶对凝结芽孢杆菌芽孢的保护作用。500 MPa和80 s保压10 min磷酸缓冲液中的凝结芽孢杆菌芽孢下降高于4个数量级,而在上述条件下在牛奶中下降低于3.5个数量级。Styles等^[16]和Simpson等^[17]也报道了*L. monocytogenes*在牛奶中比在缓冲液中对压力的抗性更强。这些结果都与我们的试验结果相类似,这主要是由于牛奶中脂肪和蛋白质的保护作用所致。Ananta等^[5]的研究表明在脂肪含量高的介质中的保护作用并不是仅仅由于高脂肪的原因,也取决于其介质中低的水分活度。牛奶中水分活度高于0.9,这

可能牛奶中凝结芽孢杆菌芽孢失活效果低于磷酸缓冲液中的原因。

3.3 灭活的动力学模型

在线性、Weibull 和 Log-logistic 模型参数的估计及曲线拟合中, 以升至目标压力后作为灭活的起始点。通过均方差和回归系数来比较线性、Weibull 和 Log-logistic 模型的拟合效果(见表 2)。线性模型有最高的均方差值和最低的回归系数表明它的拟合最差。而非线性的模型能更好的拟合这些灭活曲线。在非线性的模型中, 除了在 600 MPa 和 70 条件下 Log-logistic 模型都比 Weibull 模型有更好的拟合效

果, Weibull 模型对 600 MPa 和 70 下的拟合效果最好, 这可能是因为在在此条件下的抗性有所改变。各种条件下相应的动力学模型参数详见表 2。在 Weibull 模型中, 灭活模型随处理条件而改变, 主要有 3 种情况, 向上凹($n < 1$)、向下凹($n > 1$)和线性($n = 1$)。所有条件下的 n 值不超过 1 表明灭活曲线是向上凹的^[8]。相同条件下在 Weibull 模型中的 n 值和 Log-logistic 模型中的 τ 值在磷酸缓冲液中都高于在牛奶中的情况。与我们的研究结果相反, Rajan 等^[18]报道 n 值和 D 值随压力的变化具有相同的变化规律。这可能是由于研究条件不同所致。

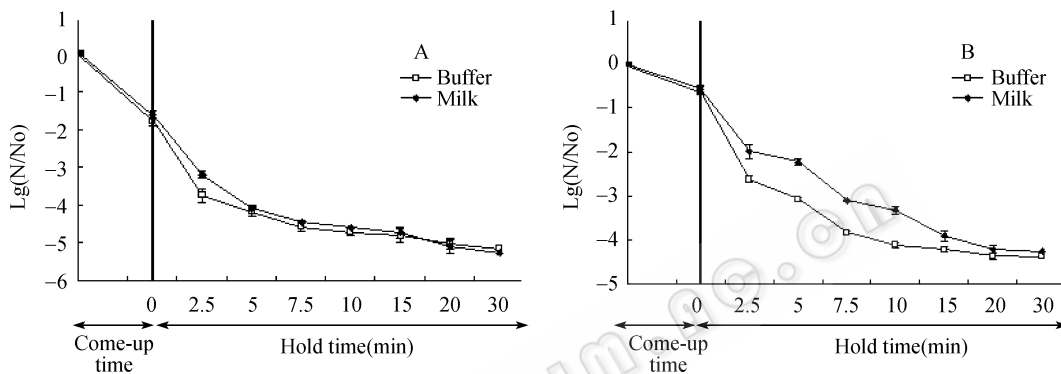


图 3 超高静压协同中温对磷酸缓冲液和牛奶中凝结芽孢杆菌芽孢的灭活曲线(A: 600 MPa 和 80°C, B: 500 MPa 和 80°C)
Fig. 3 Survivor curves for *Bacillus coagulans* spore in phosphate buffer and UHT whole milk by high hydrostatic pressure and moderate heat.(A: 600 MPa and 80 ; B: 500 MPa and 80)

表 2 线性、Weibull 和 Log-logistic 模型在各种处理条件下的模型参数
Table 2 Model parameters of linear, Weibull and log-logistic models under various treatment conditions

介质 Media	初始 温度 Initial temper- ature (°C)	压力 Pre ssure (MPa)	Linear			Weibull			Log-logistic					
			D	MSE	R ²	b	n	MSE	R ²	A	σ	τ	MSE	R ²
缓冲液 Buffer	80	600	6.410	1.733	0.824	-1.766	0.201	0.013	0.955	3.935	-1.692	0.400	0.004	0.989
	80	500	5.263	2.116	0.831	-1.840	0.235	0.074	0.856	-4.079	-2.824	0.446	0.024	0.961
	80	400	6.494	0.940	0.884	-1.240	0.298	0.030	0.929	-5.107	-1.743	1.023	0.029	0.942
	70	600	7.092	1.166	0.866	-1.146	0.240	0.007	0.981	-16.506	-2.663	3.620	0.009	0.979
	70	500	6.289	1.222	0.865	-1.518	0.245	0.018	0.943	-3.983	-0.868	0.557	0.007	0.981
牛奶 Milk	80	600	5.882	1.713	0.829	-1.496	0.275	0.051	0.913	-3.868	-2.539	0.527	0.012	0.983
	80	500	5.848	1.179	0.876	-1.090	0.384	0.084	0.916	4.638	-2.760	0.825	0.049	0.961

4 结论

总之, 超高静压协同热处理对于凝结芽孢杆菌芽孢的灭活是非常有效的。超高静压下升压过程对芽孢的致死效果不能忽略。牛奶对凝结芽孢杆菌芽

孢的灭活有一定的保护作用。在升压时间 150 s 内, 凝结芽孢杆菌芽孢数量迅速下降, 更高的保压时间有相对较小的降低。在超高静压协同中温处理过程中 log-logistic 模型有最好的拟合效果。在预测芽孢的灭活中使用数学模型可能有助于食品工业发展

和优化加工条件,从而生产出质量好、安全性高的食品。

参 考 文 献

- [1] 李汴生, 阮 征. 非热杀菌技术及应用. 北京: 化学工业出版社, 2004, p.121.
- [2] 王标诗, 曾庆孝, 李汴生, 等. 食品超高静压处理中热效应问题的研究进展. 农业工程学报, 2007, 23(6): 285–290.
- [3] Islam MS, Inoue A, Igura N, *et al.* Inactivation of *Bacillus* spores by the combination of moderate heat and low hydrostatic pressure in ketchup and potage. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 107(2): 124–130.
- [4] Okazaki T, Kakugawa K, Yoneda T, *et al.* Inactivation behavior of heat-resistant bacterial spores by thermal treatments combined with high hydrostatic pressure. *Food Science and Technology Research*, 2000, 6: 204–207.
- [5] Ananta E, Heinz V, Schlüter O, *et al.* Kinetic studies on high pressure inactivation of *Bacillus stearothermophilus* spores suspended in food matrices. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2001, 2(4): 261–272.
- [6] Peleg M, Cole MB. Reinterpretation of microbial survival curves. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1998, 38(5): 353–380.
- [7] Rajan S, Ahn J, Balasubramaniam VM, *et al.* Combined pressure-thermal inactivation kinetics of *Bacillus amyloliquefaciens* spores in egg patty mince. *Journal of Food Protection*, 2006a, 69: 853–860.
- [8] Xiong R, Xie G, Edmondson AS, *et al.* Comparison of the Baranyi model with the modified Gompertz equation for modeling thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Food Microbiology*, 1999, 16: 269–275.
- [9] Chen H, Hoover DG. Modeling the combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on the inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* Scott A in whole milk. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2003, 4: 25–34.
- [10] Ahn J, Balasubramaniam VM, Yousef AE. Inactivation kinetics of selected aerobic and anaerobic bacterial spores by pressure-assisted thermal processing. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 113(3): 321–329.
- [11] Lucas R, Grande MJ, Abriouel H, *et al.* Application of the broad-spectrum bacteriocin enterocin AS-48 to inhibit *Bacillus coagulans* in canned fruit and vegetable foods. *Food and Chemical Toxicology*, 2006, 44(10): 1774–1781.
- [12] Cosentino S, Mulargia AF, Pisano B, *et al.* Incidence and biochemical characteristics of *Bacillus flora* in Sardinian dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 1997, 38: 235–238.
- [13] Cole MB, Davies KW, Munro G, *et al.* A vitalistic model to describe thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Industrial Microbiology*, 1993, 12: 232–237.
- [14] Chen H, Hoover DG. Use of Weibull model to describe and predict pressure inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A in whole milk. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2004, 5: 269–276.
- [15] Rajan S, Pandrangi S, Balasubramaniam VM, *et al.* Inactivation of *Bacillus stearothermophilus* spores in egg patties by pressure-assisted thermal processing. *LWT*, 2006b, 39: 844–851.
- [16] Styles MF, Hoover DG, Farkas DF. Response of *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus* to high hydrostatic pressure. *Journal of Food Science*, 1991, 56: 1404–1407.
- [17] Simpson RK, Gilmour A. The resistance of *Listeria monocytogenes* to high hydrostatic pressure in foods. *Food Microbiology*, 1997, 14: 567–573.