

超声非热处理因素对细菌杀菌效果的影响

周丽珍, 李 冰, 李 琳, 张喜梅

(华南理工大学轻工与食品学院轻化工研究所, 广东 广州 510641)

摘 要:本文以大肠杆菌和金黄色葡萄球菌这两种食品中常见的污染菌为研究对象, 考察了超声处理条件、介质、温度对超声非热杀菌效果的影响。结果表明: 超声处理对大肠杆菌有较强的杀菌作用, 金黄色葡萄球菌则对超声非热处理有很强的抵抗力; 超声强度增大、作用时间延长、温度升高都有利于杀菌效果的提高; 在培养基质中的杀菌效果强于蒸馏水质中的情况。结果分析认为, 有利于空化作用提高或使细胞强度变弱的条件都有利于提高杀菌效果。冷藏结果表明, 杀菌处理后的细菌没有出现复活生长的迹象。

关键词: 超声; 非热杀菌; 杀菌; 平板活菌计数

Inactivation of Microbes by Non-thermal Ultrasound Sterilization and the Effects of Ultrasound Treatment Factors

ZHOU Li-zhen, LI Bing, LI Lin, ZHANG Xi-mei

(Institute of Light Industry and Chemical Engineering, College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

Abstract: The non-thermal disinfection of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by ultrasound treatment were investigated. In this study, the effects of the ultrasound treatment factors, the medium properties and the treatment temperature were evaluated. The results showed that *E. coli* was susceptible to ultrasound treatment, while *S. aureus* had great resistance to the treatment. Inactivation of microbes were improved by strengthening power intensity, prolonging irradiation time and increasing temperature. The disinfection of microbes in culture medium was more effective than in distilled water. In a conclusion, everything which could strengthen the cavitation or weaken the cell structure should be effective in disinfection. No cell recovery was found occurring according to the result of viable clone counting after being stored at 4 °C.

Key words: ultrasound; non-thermal sterilization; inactivation; viable plate count

中图分类号: TS205.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)12-0054-04

超声杀菌技术在环境保护、医疗消毒等方面有很多成功的应用, 如生物、生活污水的消毒处理, 医疗器械清洗消毒等^[1-3]。然而超声杀菌作为食品中的非热杀菌技术的研究历史并不长, 目前研究较多的是关于水和饮用水的杀菌消毒研究^[4,5]。超声技术对于食品的非热杀菌作用逐渐引起了人们的兴趣, 近年来有许多研究尝试^{[1][6-8]}。超声杀菌技术的主要优点是设备较成熟易操作, 但是对于在食品非热杀菌中的应用研究目前不够系统和全面, 对于具体的影响因素研究不够深入, 对于具体的食品成分、微生物影响, 及其最终导致的潜在安全性问题等都研究不足, 因此对于大规模应用于液体食品杀菌还有一定距离。

超声杀菌效果主要受三大类因素的影响, 即超声作用条件、介质以及微生物特性。在大量实验的基础上, 本文确定了研究内容: 以两种食品典型的污染细菌, 即大肠杆菌(*Escherichia coli*)G⁻和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)G⁺, 为研究对象, 考察主要超声作用参数(振幅和时间)、介质条件以及温度对这两种细菌的作用效果, 并对超声作用后细菌活性进行考察, 以期阐明超声杀菌重要影响因素的影响特点, 对超声非热杀菌技术在食品中的应用进行初步分析和探讨。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

收稿日期: 2006-09-12

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(20436020); 广东省自然科学基金重点项目(04105934);

广东省博士启动基金项目(05300175)

作者简介: 周丽珍(1977-), 女, 博士研究生, 研究方向为糖类物质及其药物的制备与生物利用、食品生物技术。

金黄色葡萄球菌(CICC10001)购自广州市微生物研究所;大肠杆菌为本研究室保藏菌种;细菌培养基为LB (Luria-Bertani)培养基。

超声发生设备为探头式超声处理器(UP 400S, dr. hielscher GmbH, 德国), 超声波频率固定为24kHz(± 1 kHz), 应用H₂₂探头, 该探头末端直径为14mm, 最大振幅为125 μ m, 对应最大输出功率密度为105W/cm²。振幅由20%至100%连续可调, 相应的是20%至100%连续可变的功率密度。

1.2 细菌菌悬液的制备

将两菌种分别接种于液体LB培养基中, 于37 (± 1) 摇床中培养至稳定期, 分别以4000 \times g, 10min离心收集菌体, 并用无菌蒸馏水离心清洗一次。根据研究的需要, 将两种菌体沉淀分别用无菌蒸馏水和无菌LB培养基重悬, 分别制成相应的蒸馏水和培养基菌悬液。本研究中, 大肠杆菌悬液起始细胞浓度约为 8.4×10^6 CFU/ml, 金黄色葡萄球菌悬液起始细胞浓度约为 8.9×10^6 CFU/ml。若非特别说明, 菌悬液的介质一般为无菌蒸馏水

1.3 超声非热杀菌处理

每次处理取50ml菌悬液, 置于底径为5cm的圆柱形100ml烧杯中进行处理, 探头置于烧杯中部, 每次处理探头伸入悬液的深度固定但不能触底。烧杯置于冰水浴中以除去超声作用产生的热效应, 通过调节冰水浴的温度控制处理时的悬液温度, 确保杀菌效果主要为非热效应的作用。

1.4 活菌计数法及杀菌效果表示

本研究采用平板菌落计数法计算活菌数^[9]。取一定体积的样品, 用无菌水进行梯度稀释至一定浓度, 取恰当稀释度的菌液进行平板涂布, 所用平板为LB琼脂平板, 每个稀释度平行涂三个板。将涂布好的平板置于37 (± 1) 培养箱中培养48h, 进行菌落计数。

杀菌效果用活菌数的对数降低值表示, 即 $-\lg N/N_0$ 。其中, N_0 为起始活菌数; N 为处理后活菌数, 二者单位皆为CFU/ml。

1.5 处理后细菌存活率检测

处理后的菌悬液取一定量进行稀释涂布后, 余下部分继续保持在隔菌的状态, 于4 保藏一周, 之后再行活菌计数。

2 结果与分析

2.1 不同超声振幅对杀菌作用的影响

将超声总作用时间设定为10min, 占空比(pulse ratio)为0.5, 调节冰水浴温度使处理液温度控制在25 (± 3) , 超声振幅依次设定为20%、40%、60%、80%、100%, 考察不同振幅作用的杀菌效果, 结果见

图1。由图1可以看出, 超声辐照对大肠杆菌杀菌效果明显, 而对金黄色葡萄球菌则影响较弱, 其对数值只有很小的降低(由0.11升高至0.14左右)。对于大肠杆菌, 随着超声振幅的增大, 超声杀菌作用显著增强, 在100%振幅时, 对数降低值高达5.23(约达100%杀菌率)。

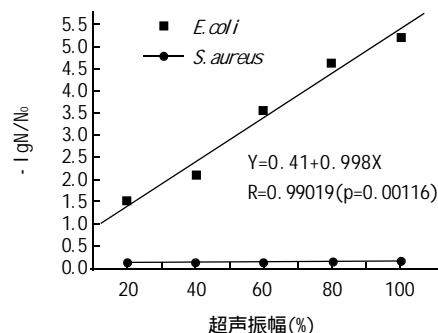


图1 不同超声振幅对超声杀菌效果的影响

Fig.1 Effect of different amplitudes on the inactivation of microbes after ultrasound treatment

2.2 不同超声处理时间的影响

将超声振幅设定为80%, 占空比为0.5, 调节冰水浴温度使处理液温度控制在25 (± 3) , 超声时间依次设定为2.5、5、7.5、10、12.5min, 考察不同超声时间对超声效果的影响, 结果如图2所示。图2具有与图1相似的结果, 超声时间的增强对金黄色葡萄球菌的杀灭作用增强并不明显, 而随着时间的延长, 大肠杆菌的杀灭程度有显著的增大。

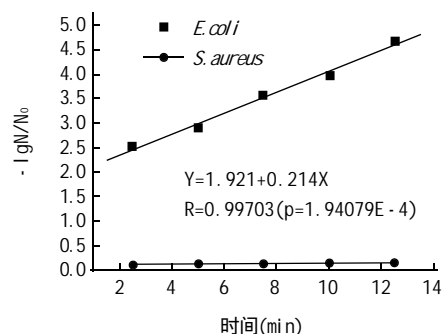


图2 不同超声时间对超声杀菌效果的影响

Fig.2 Effect of different irradiation time on the inactivation of microbes after ultrasound treatment

2.3 介质条件对杀菌效果的影响

分别以无菌蒸馏水和液体LB培养基为介质, 超声条件设定为: 总处理时间为7.5min, 占空比为0.5, 调节冰水浴将处理温度控制在25 (± 3) , 超声振幅依次设置为20%、40%、60%、80%、100%, 对两种细菌在不同介质中的杀菌效果进行了比较(结果见图3)。图3的结果表明, 对于两种细菌都有类似的情况, 即在培养基介质中, 超声杀菌的效果都优于以无菌蒸馏水为介质

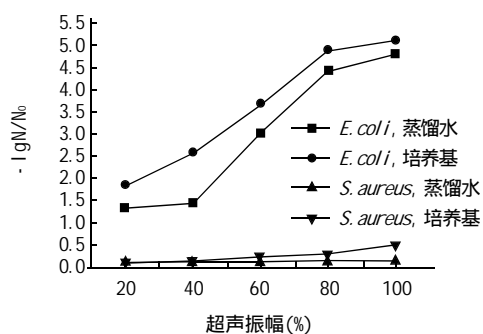


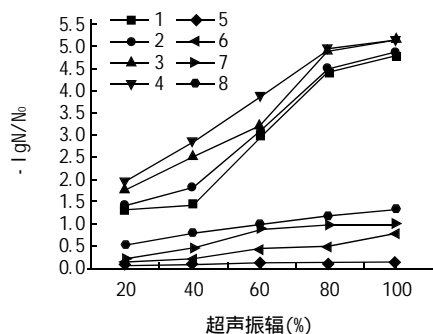
图3 超声介质对超声杀菌效果的影响

Fig.3 Effect of different treatment mediums on the inactivation of microbes after ultrasound treatment

的情况。培养基的组分中含有大量蛋白质、糖类等化学物质，可能是这些成分的作用增强了超声杀菌效果。

2.4 处理温度对杀菌效果的影响

前期试验表明，菌悬液在低于 60 的温度条件下保温 10min 以内，细菌未出现显著的失活。本研究将处理温度控制在 60 的致死温度以下，考察在非致死温度条件下，温度变化对超声杀菌效果的影响。超声处理条件设为：总作用时间 7.5min，占空比 0.5，超声振幅依次设置为 20%、40%、60%、80%、100%，调节冰水浴使处理液温度分别控制在 25 (± 3)、35 (± 3)、45 (± 3)、55 (± 3)，考察不同温度条件下的杀菌效果(结果见图 4)。图中结果表明，温度升高对两种细菌的杀菌效果都有明显的提高。



1、5 为 25 (± 3) 的情况；2、4 为 35 (± 3) 的情况；3、7 为 45 (± 3) 的情况；4、8 为 55 (± 3) 的情况；1、2、3、4 为大肠杆菌；5、6、7、8 为金黄色葡萄球菌。

图4 温度对超声杀菌效果的影响

Fig.4 Effect of temperature on the inactivation of microbes after ultrasound treatment

2.5 处理后细菌存活率检测

处理后的菌悬液取一定量进行稀释涂布后，余下的部分继续保持在隔菌的状态，于 4 保藏一周，之后再继续进行活菌计数，结果见图 5。结果表明超声处理后，在 4 左右的保藏条件下没有细菌的复活情况出现。相反，相对于未处理样，菌数还有一定程度的继续降低，

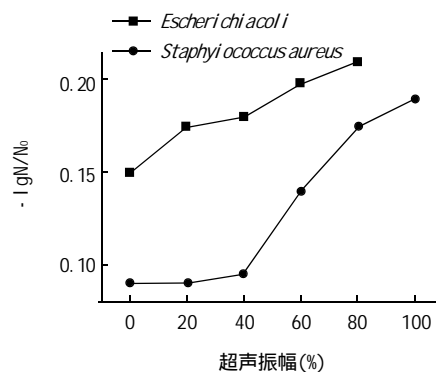


图5 超声处理后细菌在 4 保藏后的存活率变化

Fig.5 Possible survival rate of ultrasound treated microbes after storage at 4

未出现回复情况。

3 讨论

超声波的杀菌效应主要是由于超声波的空化作用(cavitation)^[10]：即超声波在液体中传送时，当达到一定的强度，会产生空化泡，空化泡长大至一定程度或受强烈振荡发生崩塌，会在局部小区域内产生高温高压，产生微射流及高速剪切力，具有强烈的机械扰动、剪切作用。另外超声还引起一定化学反应的产生，如水分子裂解生成有强氧化能力的自由基。如此的超声波作用于微生物细胞，就有可能破坏细胞壁结构，使细胞膜发生不可逆破裂，细胞与外界的渗透平衡被打破，内容物渗出，而使细胞死亡。强氧化力的自由基也可能破坏细胞活性物质的结构，而加速导致死亡，但一般情况产生的量较少。

由上述内容可推知，任何可以增强空化作用或弱化细胞结构的条件，如大功率的输入可促进空化强度提高、有利于细胞死亡。例如振幅(对应于声强)的增大，可显著加强杀菌效果，这是由于输入能量增大，可促进空化作用，使由空化导致的一定热效应、空化机械效应增强。一定范围内时间延长也会增强空化效果。而强度和时间的增大延长也都是有一定范围的，强度过大反而使空化泡不易产生。另外，对于以食品杀菌为目的的应用，过长时间在实际生产应用中不现实，而过大的强度和时间引起的过高强度也可能对食品成分产生破坏影响，而失去了非热杀菌的优势；同时对设备也有很大程度的损伤。

培养基介质相对与蒸馏水介质具有更好的杀菌效果，这可能是由于培养基中有大量的蛋白质、糖类物质，这些物质在较宽的范围内有利于泡沫的产生和稳定，因此有利于增强空化效应，从而使得杀菌效果增强。随着温度的升高，超声杀菌效果增强，这可能是

由于温度使细胞膜的磷脂双分子层的流动性增强,使细胞膜容易破裂,从而促进了杀菌作用。

对不同类型微生物的杀菌作用,在相同作用条件下,两种细菌的杀菌效果差别很大(大肠杆菌 G^- 和金黄色葡萄球菌 G^+)。这可能主要是因为二者细胞壁结构的差异,革兰氏阳性细菌的细胞壁厚度大,主要由高强度和致密度的肽聚糖网状结构组成,对机械剪切作用有很强抵抗力。而阴性菌的细胞壁结构中肽聚糖含量少,结构薄而松散,强度弱,因此容易被破坏。可见,超声作用效果也与微生物种类有较大的关联。

4 结 论

由于超声技术在其他许多领域有成熟的应用,因此它具有设备普遍、易实现,且操作简单方便的优点,对大规模生产推广有利。但对于超声杀菌技术在食品中的应用,由于具体的影响因素复杂,容易作用不彻底,然而若加强处理,强度过高又会影响食品品质、造成设备的严重损耗。在进行实际应用时,可考虑与其他方式协同作用,以降低超声的应用强度。

超声非热杀菌技术要真正在食品工业中大规模应用,还有较长的一段路要走,据目前的总体研究状况而言,急需解决以下两方面的问题:一是对于一定的体系,要确定具体的影响因素,找出显著因素及其影响规律,使具体因素的影响完全可控;二是对该技术的生物安全性问题研究不足,这也是各种非热杀菌技术在食品工业中应用的一个限制性问题,这方面的研究尤

其需要加强。本文对超声非热杀菌主要影响因素的影响效果进行了初步的考察,在后续的工作中将进行更深入的研究。

参考文献:

- [1] 赵旭博,董文宾,于琴,等. 超声波技术在食品行业应用新进展[J]. 食品研究与开发, 2005, (1): 3-7.
- [2] T R Bott, Li u T i a n q i n g. Ultrasound enhancement of biocidal efficiency [J]. Ultrasound Sonochemistry, 2004, (11): 323-326.
- [3] T J Mason, E Joyce, S S Phull, et al. Potential uses of ultrasound in the biological decontamination of water [J]. Ultrasound Sonochemistry, 2003, (10): 319-323.
- [4] S S Phull, A P Newman, J P Lorimer, et al. The development and evaluation of ultrasound in the biocidal treatment of water [J]. Ultrasound Sonochemistry, 1997, (4): 157-164.
- [5] K K Jyoti, A B Pandit. Hybrid cavitation methods for water disinfection [J]. Biochemical Engineering Journal, 2003, 14: 9-17.
- [6] M Villamiel, P de Jong. Inactivation of *Pseudomonas fluorescens* and *Streptococcus thermophilus* in Trypticase® Soy Broth and total bacteria in milk by continuous-flow ultrasound treatment and conventional heating [J]. Journal of Food Engineering, 2000, (4): 171-179.
- [7] D U Lee, V Heinz, D Knorr. Effects of combination treatments of nisin and high-intensity ultrasound with high pressure on the microbial inactivation in liquid whole egg [J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2003, (4): 387-393.
- [8] I J Seymour, D Burfoot, R L Smith, et al. Ultrasound decontamination of minimally processed fruits and vegetables [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2002, (37): 547-557.
- [9] 无锡轻工大学. 微生物学(第二版) [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1990. 569-572.
- [10] 涂顺明, 等. 食品杀菌新技术 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2004. 386-397.