

介质酸碱条件对高静压杀菌效果的研究

王琴 曾庆孝 阮征 陈灵洁 陈柏暖 梁隶华

华南理工大学食品工程系 广州 510641

摘 要 在不同 pH 和不同种类的有机酸环境条件, 对嗜热脂肪芽孢杆菌 B. sA1. 99 及啤酒酵母 S. CAs2. 1364 进行超高压杀菌实验。实验结果表明: 上述环境条件对高静压(200 ~ 500Mpa/15min)灭菌效果并无明显促进作用, 主要影响因子是压力因素。

关键词 啤酒酵母 嗜热脂肪芽孢杆菌 超高压 pH 有机酸 杀菌 协同作用

Abstract: *Bacillus stearothermophilus* As 1. 999 and *S. cerevisiae* As 2. 1364 were sterilized high hydrostatic pressure (HHP) with different pH value and different kinds of organic acid. The result, showed that the effects of sterilization by above mentioned enviromental conditions cooperating with HHP yield no notable influence, the main effect on sterilization is the pressure.

Key words *S. cerevisiae* *B. stearothermophilus* High hydrostatic pressure pH Organic acid Sterilization combination

众所周知, 常压下微生物生长、繁殖都有其最适的 pH 值范围, 氢离子浓度对微生物的生命活动影响很大^[1], 高浓度的氢离子可引起菌体表面蛋白质和核酸水解, 并破坏酶类活性。随着高静压应用于微生物灭菌方面, 人们开始研究在高压条件下, pH 值的变化对微生物的影响是否也一样。Kajiyama^[2](1993)以大肠杆菌悬液为对象, 发现加压时间相同时, pH7 ~ 8. 8, 400Mpa 的处理与 pH4. 4 ~ 5, 300Mpa 的处理有相同的致死率。林^[3](1995)检测加压后的瓜花汁, 也发现 pH3. 9 时的灭菌效果强于 pH4. 7。Roberts^[4](1995)报道 pH4 ~ 7 的范围内, 以 pH4 对凝结芽孢杆菌的压力致死效果最好。当然, 也有人得出相反结论。Oxen^[5](1993)用 200 ~ 400MPa 处理鲁伯红酵母, 结果 pH3. 0 ~ 8. 0 的范围内结果差别不大。小川浩史^[6](1989)发现在 pH2. 5、3. 5、4. 5 之间, 对贝酵母和铅色毛霉的加压效果差别几乎没有; 还指出有机酸种类不同

(如苹果酸、酒石酸、乳酸、醋酸的浓度为 0. 7%), 其加压灭菌效果也几乎没有区别。也有人报道^[7, 8]在高静压下, PH3. 6、4. 8、6. 0 条件下, 对啤酒酵母、黑曲霉、乳链球菌杀菌效果没有十分明显的影响。

众说纷云, 究竟 pH 对加压灭菌效果有无影响, 这结论还需做大量工作去论证。本文以啤酒酵母 As2. 1364、嗜热脂肪芽孢杆菌 As1. 999 为研究对象菌, 研究其在常温下, 在不同 pH 值和不同种类的有机酸条件下, 两种菌对超高压的耐性, 并进一步探讨 pH 值和有机酸与高压的协同灭菌效果。

1 实验材料和方法

1. 1 供试菌种

啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* Hansen) As2. 1364

嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus* Donk) As1. 999

上述菌种由广东省微生物研究所菌种中心提供

1.2 培养基与试剂

麦芽汁琼脂、营养肉汁琼脂

磷酸氢二钠(0.2mol/L)、柠檬酸(0.1mol/L)

柠檬酸(分析纯)、乳酸(分析纯)、醋酸(分析纯)

1.3 仪器设备

超高压机(常压~600MPa)由本校高压容器研究室提供

超净工作台、超净恒温器、高压杀菌釜、微生物实验常用仪器设备

1.4 实验方法

从斜面培养开始,严格保持相同的培养时间、培养条件,保证每次制备菌悬液的菌株处于基本相同的生长状态,对于芽孢杆菌,使其营养与孢子的比例稳定。

1.4.1 pH和高压的协同灭菌作用实验

用磷酸氢二钠和柠檬酸溶液按一定体积比,配制 pH3.6~7.6 磷酸缓冲液,经严格杀菌在无菌操作条件下,从活化好的菌株中分别接种相同量的菌数。混和、摇匀,使之均匀分散,分装入无菌塑料瓶中,密封制成受试样,在室温(30℃)下,选择压力范围 100~500MPa,时间 15min,进行耐压实验。

2 结果与讨论

2.1 pH与高压协同灭菌效果

2.1.1 不同的 pH 值对啤酒酵母耐压性影响

常温下(30℃),将在 pH3.6、4.6、5.6 和 6.6 不同条件下的受试分别经高压处理 15min,压力值为 200、300、400 和 500MPa,结果见图 1。图 1 所示当时间一定时,随压力的增加,啤酒酵母的残存率曲线呈下降趋势,即压力越高,菌死亡率越高。当压力为 300MPa 时,处理 15min 后,啤酒酵母残存率达 10^{-6} 数量级,基本死灭,通过细胞美蓝染色,我们可以发现其基本为蓝色,细胞碎片多。进一步扫描电镜相片证实,酵母经加压处理后失去了较为光滑饱满的外形,而出现破裂、皱褶、萎缩、内容物外泄。从图 1 可以看到在高静压处理下,即使介质 pH 值不

同,对啤酒酵母的死亡曲线趋势大致相同,且非常接近。

通过显微镜检测,我们发现啤酒酵母在 pH4.6 状态下,其活菌数最多,生长最良好,其个体较大呈卵圆形,经 0.1% 美蓝染色,观察到生命力旺盛的活细胞占 70%~80%。为了进一步考察 pH 与高压的协同关系,我们就常压和 200MPa 压力条件下与不同 pH 的关系作图,如图 2。在同一压力条件下(200MPa),考察常压下 pH 的影响与高压下 pH 的影响关系,为了对比方便,图文中用虚线表示在 pH4.6(啤酒酵母最适生长环境),高压处理(200MPa/15min),我们发现在常压下 pH 值对啤酒酵母的影响,下降幅度可达 62%、30%、20%,而在高压条件下, pH 值变化相对于在 pH4.6 高压处理其下降幅度对应达 24%、7%、3%,即在高压条件 pH 值的影响比在常压下 pH 值的影响要小的多,而且相对于高压处理啤酒酵母残存率下降近三个数量级的情况下,那么,相比较影响就更小。因此,由以上分析可得,对啤酒酵母加压灭菌效果, pH 值的变化并不是主要的灭菌影响因子,压力才是主要影响因素,而且高压下 pH 值的影响比常压下 pH 值的影响要小,所以 pH 在高压条件下的变化对啤酒酵母杀菌效果无明显的影响。

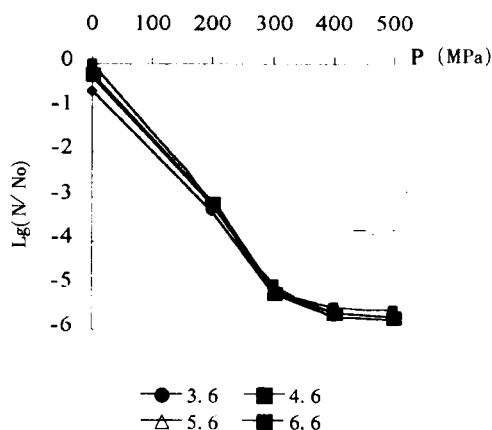


图 1 pH 值与高压对啤酒酵母的协同关系曲线

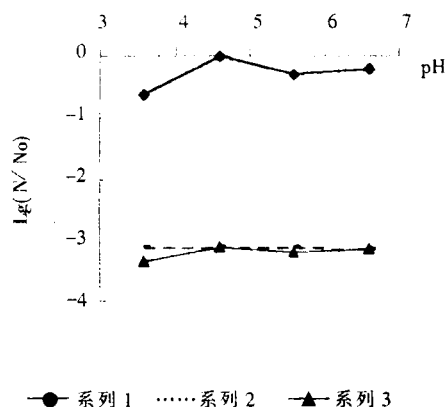


图2 不同pH值与啤酒酵母的耐压性的关系曲线

图中: 系列1表示常压下pH值的影响

系列2—表示高静压处理(pH4.6 200MPa/15min)

系列3—表示不同pH下的高静压灭菌效果(200MPa/15min)

2.1.2 不同的pH值对嗜热脂肪芽孢杆菌耐压性的影响

如图3所示, pH值的降低, 芽孢在高静压下的残存率有所下降(即死亡率升高)。在pH值5.6、6.6、7.6条件下, 其灭菌曲线在300MPa以内菌残存率迅速降低, 400MPa残存率又回升, 符合正常的芽孢灭菌规律, 即在适当压力(200~300MPa), 可以诱发表子发芽, 生成的营养体易被压力破坏, 而当超过400MPa时孢子的发芽会受到抑制, 从而在压力条件保存下来, 呈现压力越高, 残存率越高的规律。图4比较了常压下pH值与单纯高静压作用的效果, 及两者协同效果。从图中, 可清楚的看到, 常压下pH的作用对芽孢就有明显的影响。在常压pH3.6条件下, 就可使芽孢活菌数降低三个数量级; 在单纯高静压(200MPa/15min)作用下, 菌数只降低二个数量级; pH值与高压协同作用, 活菌数可降低五个数量级以上, 这仅仅是两者灭菌效率的相加。就我们实验结果而言, pH3.6的残存活菌数比pH7.6的少近三个数量级, 即高酸性环境中高静压灭菌效果好, 其主要应归于高浓度的氢离子的作用。在pH值5.6、

6.6、7.6条件下, 对芽孢的耐压性影响几乎没有区别, 总的来说, 在不同的pH值, 对实验菌芽孢(孢子)的加压灭菌作用无明显促进作用。

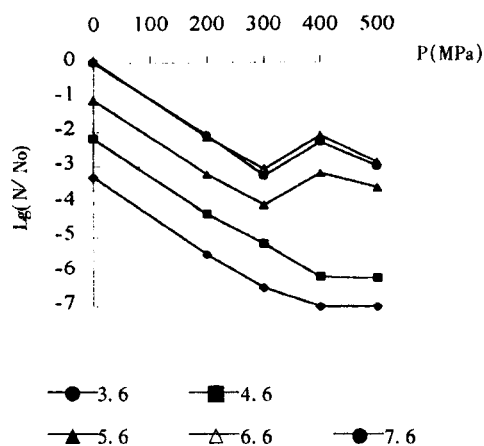


图3 pH值与高压对嗜热脂肪芽孢杆菌的协同关系曲线

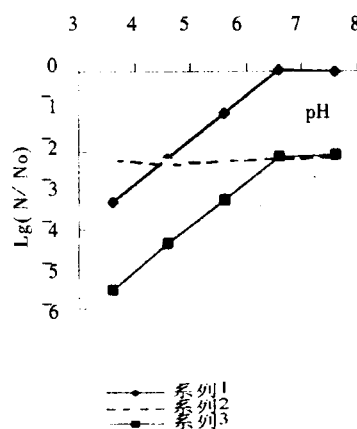


图4 不同pH值与嗜热脂肪芽孢杆菌耐压性的关系曲线

图中: 系列1表示常压下不同pH值的影响

系列2表示高静压处理(pH4.6 200MPa/15min)

系列3表示不同pH下的高静压灭菌效果(200MPa/15min)

2.2 有机酸对啤酒酵母和嗜热脂肪芽孢杆菌耐压性的影响

选择食品中常用的有机酸如乳酸、柠檬酸、醋酸, 在0.5%浓度下, 接种相同量菌数

菌,进行耐压实验。图5、图6显示了在各种有机酸浓度为0.5%场合下,对啤酒酵母和嗜热脂肪芽孢杆菌耐压性的影响结果。由图形分析,我们可以发现有机酸的种类不同,但几乎看不到加压灭菌效果的差别,不过,相对而言,醋酸的杀菌效果略强于乳酸和柠檬酸,有机酸的杀菌作用不完全由于氢离子,因为有机酸的电离程度较低,因此,它们中某些具有高效作用的必然是由于分子的作用。

有关这方面机理还不是很清楚,还需要对有机酸分子结构、分子性质做进一步研究。

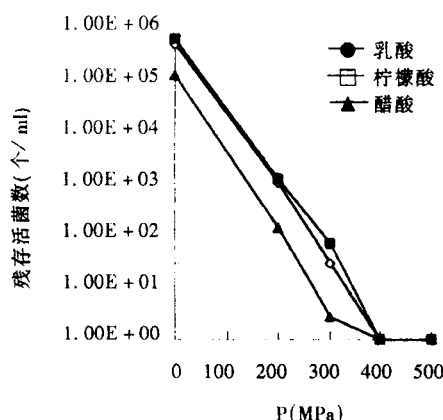


图5 不同有机酸与啤酒酵母的耐压性的关系曲线

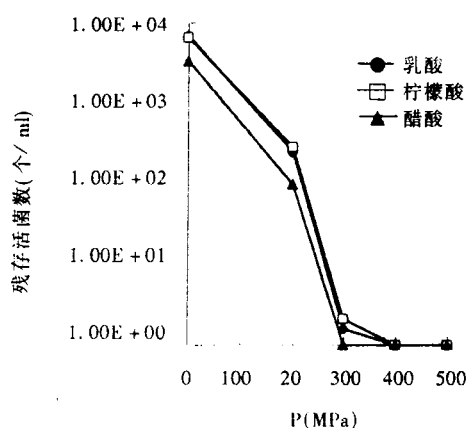


图6 不同有机酸与嗜热脂肪芽孢杆菌耐压性的关系曲线

3 结论

3.1 在本实验条件下,啤酒酵母最适生长的pH为4.6。此时其形态光滑、饱满,个体较大,呈椭圆形,经300MPa、15min处理后,其形态出现破裂、皱褶、萎缩,内容物外泄,酵母基本死亡。

3.2 在高静压条件下,在pH值3.6、4.6、5.6、6.6下,pH的变化对啤酒酵母的灭菌作用无显著促进作用。压力是pH与高静压协同灭菌的主要因素。

3.3 在高静压条件下,在pH3.6~7.6之间,pH的变化对嗜热脂肪芽孢杆菌的耐压性只是简单的相加的协同效果。pH值越低,高静压杀菌效果越好的原因主要应归于高浓度的氢离子对菌体的破坏作用。

3.4 在各种有机酸乳酸、柠檬酸、醋酸浓度为0.5%的条件下,其种类不同对加压灭菌的效果无明显的区别。由于有机酸的电离程度很低,其杀菌作用不完全是因为氢离子的作用,那么起高效杀菌作用的必然是由于分子的性质。

参考文献

- 1 武汉大学、复旦大学生物系微生物教研室编. 微生物学. 高等教育出版社.
- 2 Kajayama, Journal of Japanese Society of Food science and Technology, 1993, 39(7): 641
- 3 林欣榜等. 中国农业化学杂志, 1995, 33(1): 18.
- 4 Roberts · C · M, et al. Presented at IFT Annual Meeting, 1995.
- 5 Oxen, P. et. al. Journal of Food Science & Technology. 1993.
- 6 小川浩史等. 柑桔类果汁的高压灭菌. 食品工业, 1989, 34(10): 20~26.
- 7 阮征. 华南理工大学食品工程专业硕士学位论文. 1997.
- 8 邱海平. 华南理工大学食品工程专业学士学位论文. 1994.