

超高压杀菌及其反应动力学

李汴生 曾庆孝 彭志英 芮汉明 阮征

华南理工大学食品工程系 广州 510641

摘 要 大多数非芽孢微生物的耐压性较低,室温 450MPa 以下压力的杀菌效果良好,微生物的死亡遵循一级反应动力学。低温(0℃以下)或高于室温的温度有利于对这些微生物的超高压杀菌。芽孢菌孢子耐压,杀菌时需要更高的压力,而且往往要结合加热等其它处理才更有效。常中温时,超高压下孢子的死亡一般不遵循一级反应动力学。温度、介质等对微生物超高压杀菌的模式和效果影响很大。间歇性重复高压处理是杀死耐压性芽孢的良好方法。

关键词 超高压 杀菌 动力学

Abstract The pattern of ultra high pressure (UHP) sterilization was studied and summarized in this paper. The pressure tolerance of most non-spore-forming microorganisms were low. They could be inactivated by pressure up to 450MPa at room temperature, and their rates of inactivation followed first order kinetics. Low temperature(sub zero) or above room temperature were benefit to UHP sterilization. It needed higher pressure to inactive sporeformers, and usually also needed heating or other treatments to combine with UHP. The survival curves of spores did not obey first order rate equation. Temperature, medium and other factors affected the pattern and effect of UHP sterilization. Oscillatory and pulsed UHP were effective methods for the sterilization of baroduric spores.

Key words Ultra high pressure (UHP) Sterilization Kinetics

采用 100MPa 以上的超高压处理食品,有杀菌、抑酶和改善食品质构的作用。由于超高压处理在室温或较低的温度下进行,作用均一而迅速,无大小和形状的限制。

应用超高压杀菌技术必须先了解不同微生物的耐压性、超高压下微生物的死亡规律和影响因素以及超高压杀菌方法。

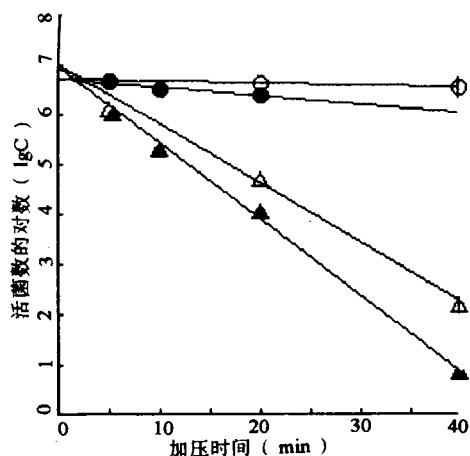
1 压力对超高压的影响

一般看来,酵母菌、霉菌的耐压性比细菌中革兰氏阴性菌的耐压性低,而革兰氏阴性菌的耐压性又较革兰氏阳性菌低,病毒也可在不太高的压力下灭活。芽孢较营养细胞的耐压性强,尤其是革兰氏阳性菌中的芽孢杆菌属(*Bacillus*)和梭状芽孢杆菌属(*Clostridium*)的

芽孢最为耐压。杀死一般微生物的营养细胞,通常只需室温(20~25℃)450MPa 以下的压力,而杀死耐压性的芽孢则需要更高的压力或结合其他处理形式^[6,9~12]。

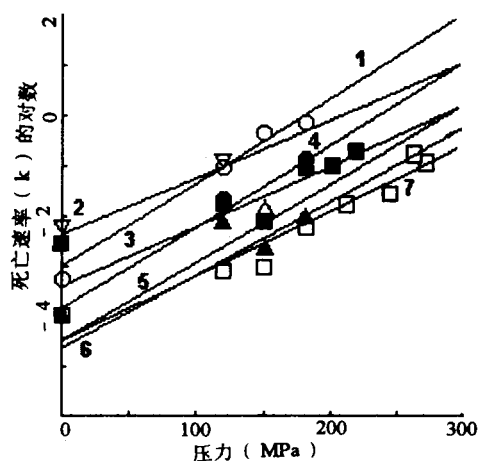
对于大多数不耐压的微生物而言,在恒定的高压下,微生物的死亡遵循一级反应动力学^[1,2,12~14],其压力致死(灭活)曲线在半对数坐标中呈直线(如图 1,图 2),压力愈高,菌体死亡速率愈快,呈线性正比关系^[1,2]。

当压力升到一定值后随处理时间的延长,半对数坐标上致死曲线中残存菌数的下降趋势变缓^[12,13]。在图 2、图 3、图 4^[13]中,温度对菌体死亡速率和压力的关系有影响,而且不同微生物,其影响也不相同。



○210MPa, ●240MPa, △250MPa, ▲270MPa.

图1 室温(25°C)不同压力下酵母菌



1: ○-20°C, 2: ▽50°C, 3: ■40°C, 4: ●-10°C,
5△: 0°C, 6: ▲5°C, 7: □25°C

图2 不同温度下酵母菌死亡速率和压力的关系

由于具有较强耐压性的芽孢常温超高压处理难以达到理想的杀菌效果,需配合其他处理。对于芽孢杆菌属的孢子,其耐压性与菌体的生长温度呈正比关系,耐热性强的孢子耐压性高^[15]。在25~65°C范围内,耐压性强的孢子的压力致死不遵循一级反应动力学^[17~19],如枯草杆菌(*B. subtilis*)的致死曲线在双对数坐标中呈直线(图5)^[17],凝结芽孢杆菌(*B. coagulans*)^[18]和嗜热脂肪芽孢杆菌(*B. stearothermoph-*

lius)^[19]的孢子的压力致死曲线在双对数坐标中也呈直线。枯草杆菌孢子在90~110°C内的压力致死曲线又呈一级反应形式,压力升高,孢子的死亡速率也增加(图6)^[17]。

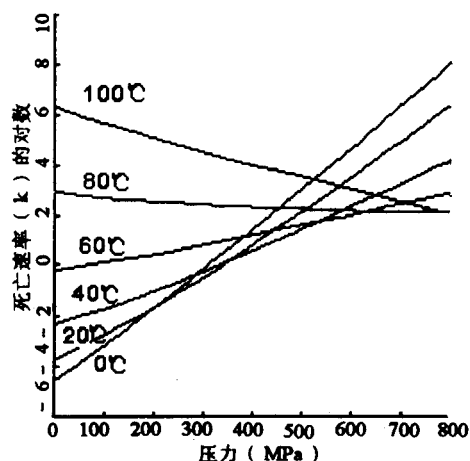


图3 不同温度下乳酸菌(*L. casei*)死亡速率和压力的关系

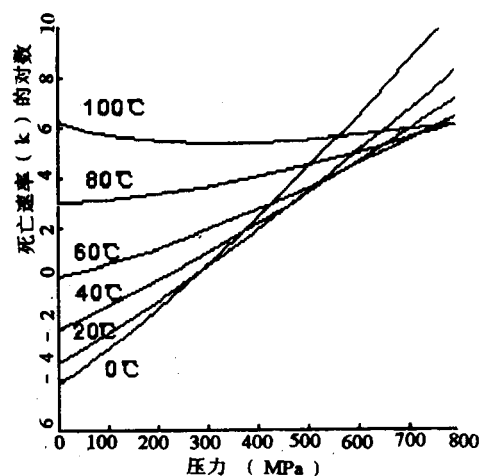


图4 不同温度下大肠杆菌(*E. coli*)死亡速率和压力的关系

从反应动力学上看,一定压力下,致死曲线在半对数坐标上呈直线,遵循(表观)一级反应动力学(apparent first order kinetics),其反应动力学方程可写成:

$$\log C = \log C_0 - \frac{kt}{2.303} \quad (1)$$

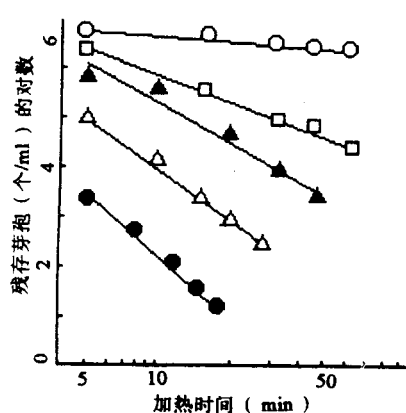
式中: C——微生物(或芽孢)的残存活菌数(个/ml或个/g), C_0 ——初始活菌数(个/ml或

个/g), k ——死亡速率常数 (个/min), t ——压力处理时间 (min)。

微生物的耐压性或菌体死亡速度的快慢可以用指数减菌时间 D 值或死亡速率常数 k 值来表示。 D 值定义为微生物 (或芽孢) 的活菌数减少 90% 所需的时间 (min), 但此时的 D 值或 k 值不反应标明压力值, 也应说明其适应的温度 (范围) 值。

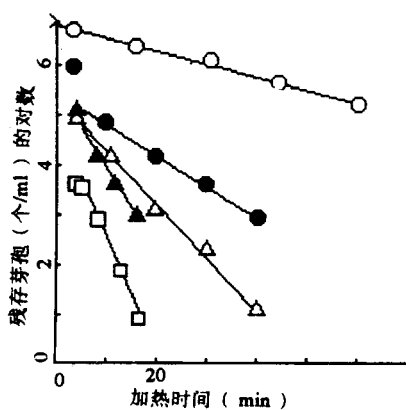
D 值和 k 值的关系仍为:

$$k = \frac{2.303}{D} \quad (2)$$



○: 25°C, □: 35°C, ▲: 45°C, △: 55°C, ●: 65°C

图 5 400MPa 时中温范围内枯草杆菌 (*B. subtilis*) 芽孢于不同温度下的致死曲线



○: 0.1MPa, ●: 100MPa, △: 200MPa, ▲: 300MPa, □: 400MPa, x: 初始芽孢数

图 6 100°C 时枯草杆菌芽孢在不同压力下的致死曲线

对于致死曲线在双对数坐标中呈直线时其反应动力学遵循假一级反应动力学 (pseudo first order kinetics), 其动力学方程可写为:

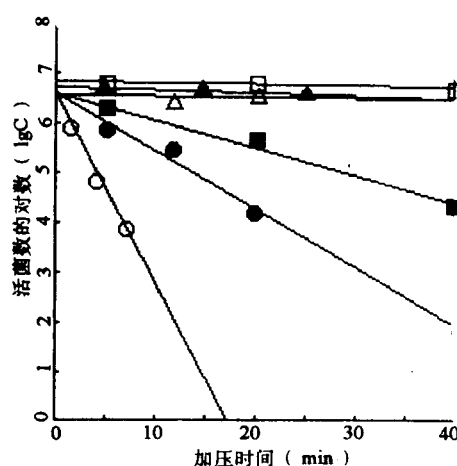
$$\log C = \log C_0 - k' \log t \quad (3)$$

式中: k' ——拟死亡速率常数 (个/min) (写成 k' 以区分于式 (1) 中的 k), 其余各符号意义均同式 (1)。

致死曲线呈假一级反应时, 说明在此条件下, 不能达到完全灭菌。

2 温度对超高压杀菌的影响

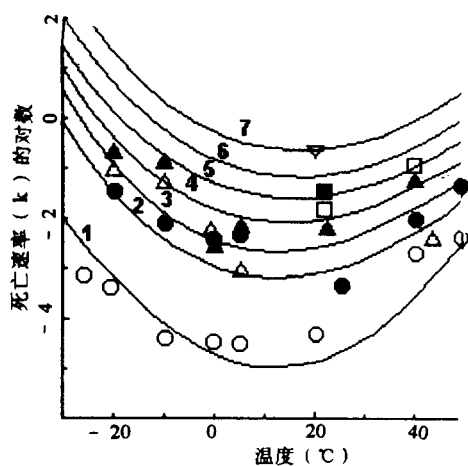
温度对超高压杀菌有明显的影响, 在恒定的高压下, 不同温度下酵母菌的致死曲线均呈一级反应 (图 7); 但不同温度下的杀菌效果相差很大, 温度与菌体死亡速率常数的关系; 呈椭圆形曲线 (图 8)。这表明超高压对酵母菌的杀灭在低温或较高温下均比常温下的效果好。



-20°C ○, -10°C ●, 0°C △, 5°C ▲, 25°C □, 40°C ■

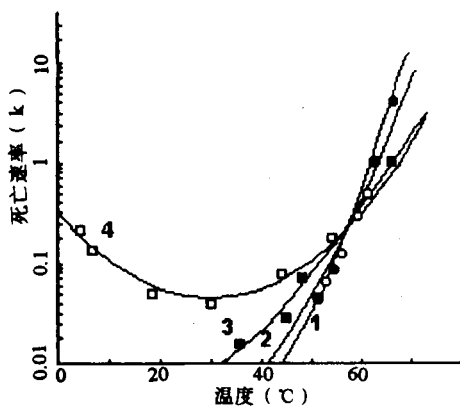
图 7 180MPa 压力不同温度下酵母菌的致死曲线

温度和菌体死亡速率常数的椭圆形关系曲线是在一定的压力下才呈现的, 如乳酸菌 (*L. casei*) 和大肠杆菌 (*E. coli*) 的超高压处理^[13] 中在 0~70°C 范围内, 当压力在常压和较低压力 (0.1~150MPa) 时, 乳酸菌和大肠杆菌的死亡速率因温度愈高, 菌体死亡速率常数愈大, 两者呈直线或近似直线的关系, 但随着压力的继续增加, 低温下 (-20~0°C) 的杀菌效果逐渐增强, 也出现了象酵母菌那样的椭圆形曲线 (图 9, 10)。



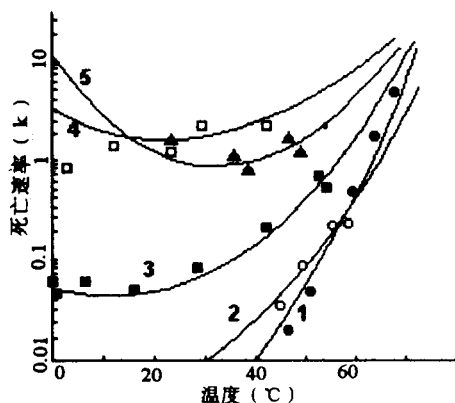
1: 0.1MPa, 2: 120MPa, 3: 150MPa, 4: 180MPa, 5: 210MPa, 6: 240MPa, 7: 270MPa

图8 不同压力下酵母菌致死速率和温度的关系



1: 0.1MPa, 2: 100MPa, 3: 200MPa, 4: 300MPa

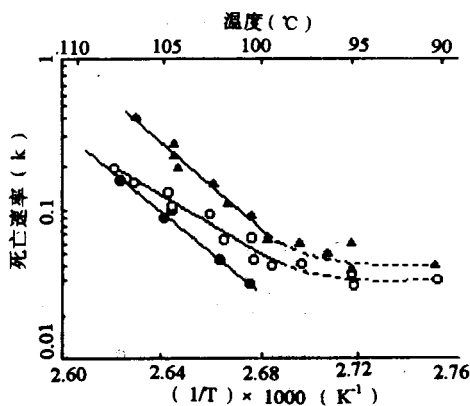
图9 乳酸菌在不同压力下死亡速率和温度的关系



1: 0.1MPa, 2: 100MPa, 3: 200MPa, 4: 300MPa, 5: 400MPa

图10 不同压力下大肠杆菌的死亡速率和温度的关系
低温 (特别是冻结点以下) 时超高压的良

好杀菌效果特别引起了人们的注意, 高桥等人^[20,21]对包括几种常见致病菌和耐热芽孢菌在内的16种微生物在低温(-20℃)下的超高压杀菌效果进行了测定。结果发现, 非芽孢菌中, 除了金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)在-20℃的杀菌效果较常温(20℃)下增加的不明显外, 其它菌在低温下的杀菌效果均较常温下有所增强。但低温对耐压性强的枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)和生芽孢梭状芽孢杆菌(*C. sporogenes*)的超高压杀菌效果无明显的影响, 我们对嗜热脂肪芽孢杆菌(*B. stearothermophilus*)的研究^[19]也显示了类似的结果。



●: 0.1MPa, ○: 100MPa, ▲: 200MPa

图11 高温范围内枯草杆菌芽孢的死亡速率和温度的关系

在高温(90~110℃)范围内, 枯草杆菌的孢子不仅在不同压力(0.1~400MPa)下的致死曲线符合一级反应动力学(图6), 而且在上述压力、温度范围内, 不同温度下的压力致死曲线也均呈一级反应^[17]。一定压力下, 温度和死亡速率常数呈线性正比关系, 二者符合 Arrhenius 方程(图11):

$$\ln k = \ln k_0 - \frac{E_a}{RT} \quad (4)$$

式中: k ——菌体(或芽孢)的死亡速率常数(1/min), k_0 ——频率因子(1/min), E_a ——反应的活化能(kJ/mol), R ——气体常数(8.314

J/K·mol), T——绝对温度 (k)。

由 (4) 式得到的 E_a 值为致死速率常数 k 的温度相关因子, 不同压力下所得的 E_a 值可能不同, 而且有一定的适应温度范围。

在 (25~65℃) 范围内, 枯草杆菌孢子的死亡虽不遵循一级反应动力学 (图 5), 但其拟反应速率常数 k' 和温度仍呈正比关系。

由此可见, 压力和温度是决定超高压杀菌效果的最主要的两个因素。图 12、13 和 14 分别列出了酵母菌、乳酸菌和大肠杆菌在不同温度——压力组合下杀菌效果的等高线^[1,2,13], 图中每一条曲线代表某一菌体死亡速率常数的对数值 ($\log k$)。

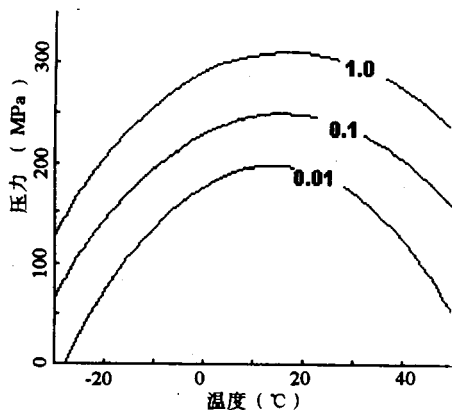


图 12 酵母菌在不同温度—压力组合下死亡速率 ($\log k$) 的等高线

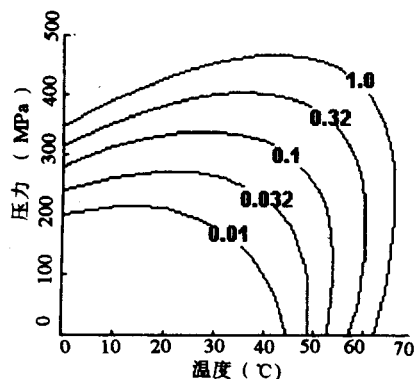


图 13 乳酸菌在不同温度—压力组合下死亡速率 ($\log k$) 的等高线

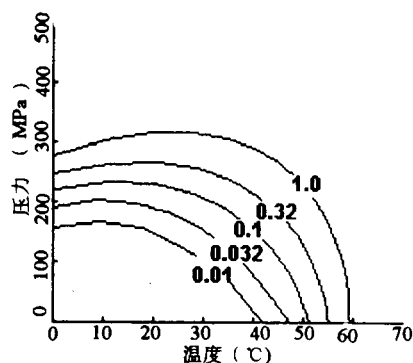


图 14 大肠杆菌在不同温度—压力组合下死亡速率 ($\log k$) 的等高线

描述超高压杀菌动力学的曲线采用同时考虑压力和温度对杀菌效果影响的三维曲线则更为全面^[13], 相应的动力学方程也是双因素的^[1,2]。

$$\log k = \alpha + \beta(p - p_0) + \gamma(T - T_0) + \delta(p - p_0)^2 + \epsilon(p - p_0)(T - T_0) + \Phi(T - T_0)^2 \quad (5)$$

式中: k ——菌体死亡速率常数 (个/min), p ——压力 (MPa), p_0 ——0.1MPa, T ——温度 (K), T_0 ——273.15K, $\alpha \sim \Phi$ ——常数。

采用此方程对酵母菌的回归分析结果为: $\alpha = -4.26$, $\beta = 1.25 \times 10^{-2}$, $\gamma = -3.37 \times 10^{-2}$, $\delta = 8.55 \times 10^{-6}$, $\epsilon = -7.55 \times 10^{-5}$, $\Phi = 1.42 \times 10^{-3}$ ($R = 0.927$)。

3 其它因素对超高压杀菌的影响

3.1 食品 (介质) 成分

超高压杀菌时, 食品 (介质) 成分对杀菌效果有较大的影响, 许多研究都表明微生物 (营养细胞和芽孢) 在营养性基质中比在非营养性基质中耐压性更强^[18,21,23~26]。总体看来, 可归纳以下几点: ①酸性条件下较中性下更有利于超高压杀菌。②糖类对超高压下的菌体有保护作用。糖液浓度愈高, 对菌体的保护作用愈强 (但低温下效果不明显), 当浓度达到 40% 以上, 形成高粘度介质时, 高压对微生物的杀菌作用非常微弱。③食盐对超高压下的菌体有一定的保护作用, 而且在一定的范围内随盐浓度的增加, 保护作用也加强; 但对酵母菌, 低温

采用抑菌剂和超高压协同作用在低的抑菌剂浓度时较为明显^[19,28,31]，而且不同的抑菌剂混合使用时，互相又有增效作用。

- 3 吴怀祥・高压食品加工・食品科学, 1996, 17 (11): 3~9.
- 4 林力丸・加圧杀菌とその周辺技術・食品と容器, 1993, 34 (9): 492~500.
- 5 陈祥奎・超高压杀菌新技术・食品与发酵工业, 1995, 4: 69~79.
- 6 Alem'en G. D. et al. Pulsed ultra high pressure treatments for pasteurization of pineapple juice. J. of Food Sci., 1996, 61 (2): 388~390.
- 7 玉川浩司等・とうろの杀菌, 粘度, 褐変に及ぼす高压処理の影響・日本食品科学工学会志, 1996, 43 (2): 194~202.
- 8 宮尾茂雄等・高压処理がすりみ由来微生物の生育におよぼす影響・日本食品工業学会志, 1993, 40 (7): 478~484.
- 9 Hoover, D. G. et al. Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. Food Technol., 1989, 43 (3): 99~107.
- 10 Alemen, G. D. et al. Ultra-high pressure pasteurization of fresh cut pineapple. J. Food Prot., 1994, 57: 931-934.
- 11 Styles, M. F. et al. Response of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* to high hydrostatic pressure. J. Food Sci. 1991, 56: 1404~1407.
- 12 Metrick, C. et al. Effects of high hydrostatic pressure on heat-resistant and heat-sensitive strains of *Salmonella*. J. Food Sci., 1989, 54: 1547~1549, 1564.
- 13 园池耕一郎・加圧処理の杀菌力とシルク成分への影響・食品と容器, 1994, 35 (5): 256~264.
- 14 Raffali, J. et al. High pressure stress and inactivation of *Listeria innocua* in inoculated dairy cream. Sciences des Aliments, 1994, 14 (3): 349~358.
- 15 光浦畅洋・高压による微生物コントロール技術・食品と開発, 1989, 24 (12): 62~67.
- 16 Fornari, C. et al., . Inactivation of *Bacillus endospores* by high pressure treatment. Industria Conserva, 1995, 70 (3): 259~265.
- 17 西崎尚等・加圧・加熱の并用処理による耐熱性細菌胞子の杀菌・日本食品工業学会志, 1994, 41 (8): 536~541.

- 18 石黑幸雄等. 抗菌性物质存在下での高压处理がトマトジュース中の菌の挙動に与える影响について. 日本农芸化学会志, 1993, 67 (12): 1707~1711.
- 19 阮征. 微生物对高静压的耐性研究及其初步动力学表征. 华南理工大学硕士学位论文, 1997.
- 20 高桥观二郎. 低温域ごの高压杀菌. 食品と开发, 1990, 25 (12): 13~16.
- 21 高桥观二郎等. 低温域における高压杀菌技术与システムの研究开发. 食品と容器. 1994, 35 (12): 682~690.
- 22 Hayakawa, I. et al. Application of high pressure for spore inactivation and protein denaturation. J. of Food Sci., 1994, 59 (1): 159~163.
- 23 梶山昇等. 高压による大肠杆菌の杀菌. 日本食品工业学会志, 1993. 40 (6): 406~413.
- 24 吉岡薫等. 高粘物质への高压处理の应用(2). 食品と容器, 1994, 35 (11): 608~615.
- 25 Pandya, Y. et al. Concurrent effects of high hydrostatic pressure, acidity and heat on the destruction and injury of yeasts. J. of Food Protection. 1995, 58 (3): 301~304.
- 26 木村郁夫. 水产食品への高压处理と应用, 食品と容器, 1994, 35 (8): 428~435.
- 27 Heinz, V. et al. Inactivation of *Bacillus subtilis* endospores by ultra-high-pressure in combination with other treatments. IFT Annual Meeting, 1995, 268.
- 28 Hayakawa, I. et al. Oscillatory compared with continuous high pressure sterilization on *Bacillus stearothermophilus* spores. J. of Food Sci., 1994, 59 (1): 164~167.
- 29 西贤司等. *Bacillus* 属芽胞の压力による活性化と杀菌. 日本食品工业学会志, 1994, 41 (8): 542~549.
- 30 Maggi, A. et al. Use of high pressure for inactivation of butyric clostridia in tomato serum. *Industria conserva*, 1995, 70 (3): 289~293.
- 31 齐藤义行. 食品用フィルムの高压处理による影响と高压处理适性静菌剂の探索. 食品と容器. 1994, 35(7): 368~373.

菠萝汁对鲜豆浆酶解作用的研究

黄惠华 高孔荣 张少兰

华南理工大学食品科学与工程系 广州五山 510641

摘 要 利用菠萝汁对鲜豆浆进行酶解。测定和电泳分析结果表明, 在 pH8.0, 温度 60℃, 反应时间 60min 的条件下, 菠萝蛋白酶能使豆浆中大分子量 (M_r 1 096 478) 的蛋白组份降解成 5 种分子量为 7, 586, 83 176, 190, 546, 319, 890, 524, 807 的小分子蛋白质和多肽类分子, 其等电点也由 pH5.9、6.0 变为 pH5.3、5.5。酶解后的游离氨基酸在种类和数量上没有变化, 产物是多肽或小分子量的蛋白质。

利用菠萝蛋白酶进行蛋白质的酶法改性和水解, 最经济和最简便的方法就是将菠萝汁添加到富含蛋白质的食品如豆浆中, 通过控制适当的条件获得需要的酶解产物。本研究利用菠萝汁对大豆浆进行酶解, 通过分析大豆蛋白在酶解前后的变化, 探讨将菠萝汁应用于开发大

豆保健食品的可能性。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 大豆及豆浆制备: 大豆购自农贸市场, 为当年收获的种子, 颗粒饱满、色泽黄亮。豆浆制备过程: 大豆预处理(烘干、除杂、清