

食品超高压杀菌技术及其研究进展

邱伟芬 南京经济学院食工系 210003

江汉湖 南京农业大学食品科技学院 210095

摘 要 研究了食品超高压杀菌技术的基本原理及其最新进展,着重讨论了压力的大小和加压时间、施压方式、温度、pH 值、微生物的种类和特性、食物本身的组成和添加物、水分活度等因素对灭菌效果的影响作用,只有优化这些因素才能取得最佳杀菌效果。

关键词 超高压杀菌 原理 杀菌效果

Abstract This paper studied the mechanism and the update research of ultra-high pressure sterilization of foods. Factors that would affect sterilization such as the magnitude and duration of pressure, pressurizing type, temperature, pH value, microorganism, food components, additive and water activity were discussed. The best sterilizing effect could be acquired by optimizing these factors.

Key words High pressure sterilization Mechanism Sterilizing effect

食品超高压技术 (ultra-high pressure processing, UHP) 是当前备受各国重视、广泛研究的一项食品高新技术它可简称为高压技术 (High pressure Processing, HPP) 或高静水压技术 (High Hydrostatic Pressure, HHP)。日本、美国、欧洲等国在高压食品的研究和开发方面走在世界前列,1990 年 4 月,高压食品首先在日本诞生。目前,在全球范围内,食品的安全性问题日益突出,消费者要求营养、原汁原味的食品的呼声也很高,高压技术则能顺应这一趋势,它不仅能保证食品在微生物方面的安全,而且能较好地保持食品固有的营养品质、质构、风味、色泽、新鲜程度。利用超高压可以达到杀菌、灭酶和改善食品品质的目的,在食品超高压技术研究领域的一个重要方向即是超高压杀菌。在一些发达国家,高压技术已应用于食品(鳄梨酱、肉类、牡蛎)的低温消毒,而且作为杀菌技术也日趋成熟。本文着重讨论食品超高压杀菌的原理及其研究进展,旨在推进我国在食品超高压杀菌技术方面的研究和应用。

1 食品超高压杀菌原理

食品超高压杀菌,即将食品物料以某种方式包装完好后,放入液体介质(通常是食用油、甘油、油与水的乳液)中,在 100~1000MPa 压力下作用一段时间后,使之达到灭菌要求。其基本原理就是压力对微生物的致死作用,主要是通过破坏细胞膜、抑制酶的活性和影响 DNA 等遗传物质的复制来实现的。

极高的静压会影响细胞的形态。埃希氏大肠杆菌 (E. coli) 的长度在常压下为 1~2μm,而在 40MPa 下为 10~100μm,1969 年 Kriss 等利用电子显微镜观察 30~45MPa 下的假单胞菌菌株 (Pseudomonas),发现形态发生多方面的变化,包括细胞外形变长、胞壁脱离细胞质膜、无膜结构细胞壁变厚。高压对细胞膜、细胞壁都有影响,在压力作用下,细胞膜双层结构的容积随着每一磷脂分子横切面积的缩小而收缩。300~400MPa 下,啤酒

酵母的核膜和线粒体外膜受到破坏,加压的细胞膜常常表现出通透性的变化,压力引起的细胞膜功能劣化将导致氨基酸摄取受抑制。20~40MPa 的压力能使较大的细胞因受应力的细胞壁的机械断裂而松解,200MPa 的压力下,细胞壁遭到破坏。高压抑菌是由于主要酶类的变性。一般说来,1000~3000atm 的压力引起的酶变性是可逆的,而超过 3000atm 压力引起的变性是不可逆的。酶失活的主要原因是酶分子内部结构的破坏和活性部位上构象的变化,这些效应受 pH 值、底物浓度、酶中脂质的性质、酶亚单元结构和温度的影响。高压能使大肠杆菌的诱导、翻译、转录受到影响,27MPa 下诱导停止,但翻译仍然进行,但在 68MPa 下翻译受到抑制,转录进行,压力减除后,这些过程都将恢复正常。

2 超高压杀菌效果的影响因素

正如食品的热处理效果与许多因素有关,超高压杀菌效果也与诸多因素有关,包括压力大小和加压时间、施压方式、处理温度、微生物种类、食物本身的组成和添加物、pH 值、水分活度等等,现讨论如下:

2.1 压力的大小和加压时间

在一定范围内,压力越高,灭菌效果越好。在相同压力下,灭菌时间延长,灭菌效果也有一定程度的提高。300MPa 以上的压力可使细菌、霉菌、酵母菌消灭,病毒在较低的气压下失去活力。对于非芽孢类微生物,施压范围为 300~600MPa 时有可能全部致死。对于芽孢类微生物,有的可在 1000MPa 的压力下生存,对于这类微生物,施压范围在 300MPa 以下时,反而会促进芽孢发芽。Watanable 等人研究了高压处理菠萝欧文氏菌用于延长食品的保藏期,随着压力的增大,灭菌效果提高。L. A. LUCORE 等人研究了环境条件对抑制大肠杆菌 0157: H7 的作用,用 300、500、700MPa 压力处理,加压时间较长的话,大

肠杆菌 0157: H7 会被抑制 5 个数量级。池元斌等人研究了高压对鲜牛奶中细菌行为的影响,鲜牛奶中细菌菌落尺寸取决于处理压力的高低以及保压时间的长短。保压时间越长,处理压力越高,细菌菌落直径越小。H. CALIK 等人研究了高静水压对牡蛎中副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 的作用,用平皿计数法测定了牡蛎加压前后的副溶血弧菌数,最佳条件是 50kpsi,施压 30sec., 此处理条件能将含菌量从 10^6 cfu/ml 降至 10^1 cfu/ml, 如果压力降低,要取得同样的效果,则加压时间加长,如将上述压力降至 35kpsi,则需要 14.5min. 才能将含菌量降到 10^1 cfu/ml。Mitsumasa Yasumoto 等人研究了 100 ~ 600MPa 的压力对番茄汁中的凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*) 和酵母菌 (*Saccharomyces bailii*) 的灭菌效果,找出了保压时间和施压大小的关系,对于 *Bacillus coagulans* $Z = 512 - 152\log X (5 \leq X \leq 100)$, 对于 *Saccharomyces bailii*: $Z = 354 - 104\log X$, 其中 X 为保压时间 (从一开始到微生物数开始减少的时间), 单位为 min., Z 为压力,单位为 MPa。

2.2 施压方式

超高压灭菌方式有连续式、半连续式、间歇式。G. D. Aleman 研究报道,同持续静压 (static pressure) 处理相比,阶段性压力 (sinusoidal and step pressure pulses) 变化处理可使得菠萝汁中的酵母菌大幅度减少。I. Hayakawa 等人研究了嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*) 的失活情况,得出重复的压力处理比较有效,600MPa 的压力、70℃ 条件下处理 5min., 如此重复 6 次,可使嗜热脂肪芽孢杆菌量为 10^6 /g 的样品全部灭菌。Sojka 和 Ludwig 对枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 进行了研究,使用两组压力,首先是 60MPa, 温度为 60℃, 1min.; 然后 500MPa, 1min., 这样循环 10 次,加压后马上进行微生物检验,37℃ 的试管中培养 10 天,无菌。Wilson 和 Baker 使用两段式加压处理,将含枯草杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、生芽孢梭菌 (*C. sporogenes*) 各为 10^6 /g 的肉乳液,先用 621MPa, 85℃, 30min. 处理,再用 621MPa, 95℃, 5min. 处理,可达灭菌。Mayer 报道了在低酸食物中使用间歇高压来灭菌,初始温度为 90℃, 690MPa, 加压 1min., 然后在大气压下停 1min., 再用 690MPa 的压力加压 1min., 通过这样的处理可使含生芽孢梭菌 10^6 /g 的通心粉和干酪灭菌,用同样的方法处理其中的蜡状芽孢杆菌,也能取得灭菌效果。J. YUSTE 研究了间歇式高压加工对于抑制禽肉中的微生物作用,一种是用 60MPa 的低压处理 30、60、90、120min,再用 450MPa 的高压处理 5、10、15min, 高压处理总时间不超过 15min, 另一种是 450MPa 的压力连续处理 15min, 一天后测定需氧嗜中温微生物和需氧嗜低温微生物,发现间歇式加压处理能抑制微生物。笔者对豆浆进行超高压杀菌处理,发现间歇式处理效果明显好于同等压力的连续处理。对于芽孢菌为什么间歇式加压效果好于连续加压,研究者认为:第一次加压会引起芽孢菌发芽,第二加压则使这些发芽而成的营养细胞杀死。因而对于易受芽孢菌污染的食物用超高压多次重复短时处理,杀灭芽孢效果好。

2.3 温度

温度是微生物生长代谢最重要的外部条件,它对超高压灭菌的效果影响很大。由于微生物对温度有敏感性,在低温或高温下,高压对微生物的影响加剧,因此,在低温或高温下对食品进行高压处理具有较常温下处理更好的杀菌效果。

大多数微生物在低温下耐压程度降低,主要是因为压力使得低温下细胞因冰晶析出而破裂程度加剧。蛋白质在低温下高压敏感性提高,致使此条件下蛋白质更易变性,而且人们发现低温下菌体细胞膜的结构也更易损伤。低温对高压杀菌的促进效果特别引人注目,因为低温下高压处理对保持食品品质,尤其是减少热敏性成分的破坏较为有利。高桥观二郎等人对包括芽孢菌等常见致病菌在内的 16 种微生物的低温高压杀菌研究显示,除了芽孢菌和金黄色葡萄球菌外,大多数微生物在 -20℃ 下的高压杀菌效果较 20℃ 下的好。

对一定浓度的糖溶液在不同温度下进行高压杀菌,在同样的压力下,杀死同等数量的细菌,则温度高,所需杀菌时间短。因为在一定温度下,微生物中蛋白质、酶等成分均会发生一定程度的变性。因此,适当提高温度对高压杀菌有促进作用。Havakawa 报道,当压力达到 800MPa, 施压时间 60min., 在 60℃ 条件下,可将嗜热芽孢杆菌的数量从初始的 10^6 个/ml 下降到 10^2 个/ml,而在室温下,施加同样的压力,菌数不会发生变化。Hitoshi Kinugasa 等人研究了高压灭活茶提取物中的微生物时发现,耐热芽孢杆菌孢子在常温下进行加压处理时,不会被灭活,但在较高的温度下,在 300 ~ 700MPa 压力下会被灭活,彻底灭菌条件为 700MPa, 温度为 70℃。Horie 等人发现,鲜草霉中分离出来的平滑假丝酵母 (*Candida parapsilosis*) 和热带假丝酵母的耐性要高于存活在草莓酱中的啤酒酵母,配合 34 ~ 35℃ 的温度对平滑假丝酵母进行施压处理,可将初始数量为 10^6 cfu/g 的该酵母菌迅速灭活,而所有用的时间远远低于单纯使用压力的时间。P. ROVERE 进行了高压与热处理灭菌效果的模型和计算,主要找出了高压对模拟体系中生芽孢梭菌杆菌的热钝化动力学,指出高压下进行热处理其效果会由于压力作用而放大,如果控制好温度,则可以减少加工时间和加工压力。针对芽孢菌的高耐压性,就现阶段研究来看,结合温度处理则是一种十分有效的杀菌手段。

2.4 pH 值

每种微生物都有适应其生长的 pH 值范围,在压力作用下,介质的 pH 值会影响微生物的生命活动。据报道,一方面压力会改变介质的 pH, 且逐渐缩小微生物生长的 pH 范围。例如,在 68MPa 下,中性磷酸盐缓冲液的 pH 值将降低 0.4 个单位,另外,在 0.1MPa 下, pH9.5 时,粪链球菌 (*Streptococcus faecalis*) 的生长受到抑制,而在 40MPa 下, pH9.0 即可使其生长受抑制。另一方面,在食品允许范围内,改变介质 pH, 使微生物生长环境劣化,也会加速微生物的死亡速率,使超高压杀菌的时间缩短,或可降低所需压力。存活于不同浓度的蔗糖溶液中的啤酒酵母,当溶液的 pH 值在 3.5 ~ 6.5 范围时,其灭菌率与 pH 值关系不大^[20], Kanjiro Takahashi 研究了溶液中大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、啤酒酵母的高压灭菌效果,发现常温下高压处理时, pH

为 7.0 时,灭菌效果最差,而低温下 pH 值高低对灭菌效果无影响^[21],看来,对酵母菌类而言,采用超高压处理时 pH 值并不是重要的因素。Ogawa 等人也发现,高压灭活桔汁中原有的霉菌时,pH2.4~4.5 范围时,灭菌效果与 pH 值无关。当试验无酸果汁时,外加独立的有机酸调度时,它不会成为一种影响因素^[6]。酸性食品的高压杀菌研究较多,而低酸性食品的高压杀菌研究较少,对于中性 pH 的食物进行杀菌处理时,单纯依靠高压处理是不理想的。

2.5 微生物的种类和特性

不同生长期的微生物对高压的反应不同。一般地说,处于指数生长期的微生物比处于静止生长期的微生物对压力反应更敏感。革兰氏阳性菌比革兰氏阴性菌对压力更具抗性,革兰氏阴性菌的细胞膜结构更复杂而更易受压力等环境条件的影响而发生结构的变化。孢子对压力的抵抗力则更强。芽孢类细菌,同非芽孢类的细菌相比,其耐压性很强,当静压超过 100MPa 时,许多非芽孢类的细菌都失去活性,但芽孢类细菌则可在高达 1200MPa 的压力下存活。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^[22]。对于梭状芽孢杆菌属的研究较少,缺少足够的数据来确切评价低酸性食品的超高压杀菌的安全性^[23]。芽孢壳的结构极其致密,使得芽孢类细菌具备了抵抗高压的能力,杀灭芽孢需更高的压力并结合其它处理方式。

2.6 食物本身的组成和添加物

超高压杀菌时,各种食品的物理、化学性质不同,使用的压力要求也不同,例如:用 300MPa 的压力可灭活猪肉糜中腐败菌和食物中毒菌,而且含菌量随着施压时间的延长而逐渐减少,而灭活橙汁中的酵母、霉菌,所需的压力低得多^[6]。在高压下,食品的化学成分对灭菌效果有明显作用。蛋白质、脂类、碳水化合物对微生物有缓冲保护作用,而且这些营养物质加速了微生物的繁殖和自我修复功能。Kanjiro Takahashi 研究了低温下共存物对高压灭菌效果的影响,选用的物质分别为 NaCl、蛋清、葡萄糖、猪油,在不同压力 and 不同温度下处理,均证明这些物质的存在使微生物 (*E. coli*, *S. cerevisiae*) 存活率提高^[21]。食品基质含有的添加剂组分对超高压灭菌影响很大,G. O. ADEGOKE 研究了高压和植物油(单萜)的联合作用对啤酒酵母的作用。如果不使用压力,300 μ g/ml、600 μ g/ml 的单萜对啤酒酵母无效果,但 1250 μ g/ml 的单萜有明显效果,如果使用 1800kg/cm² 的压力,200 μ g/ml、400 μ g/ml 的单萜能使啤酒酵母抑制 3 个数量级^[24]。有些食品在高压杀菌时可考虑使用天然抑菌剂,其协同效应可使处理压力降低。

2.7 水分活度

水分活度 (a_w) 对灭菌效果影响也很大,J. J. Rodriguez 试验了高静水压与水分活度对大肠杆菌的抑制作用, a_w 对杀菌效果有明显影响作用,其影响作用因压力大小而异,当压力为 414MPa 时,当 a_w 从 0.99 降到 0.91 时,杀菌作用减弱,呈二级反应动力学关系,而在较低的压力与 a_w 对接合酵母菌 (*Zygosaccharomyces bailii*) 的杀菌效果,控制 a_w 能降低压力大小

^[26]。根据研究表明 a_w 大小对微生物抵抗压力非常关键^[16],对于固体与半固体食品的超高压杀菌,考虑 a_w 的大小十分重要。

由于超高压杀菌是一个非常复杂的过程,针对特定的食品要选择特定的杀菌工艺,为了获得较好的杀菌效果,必须优化以上过程,只有积累大量可靠的数据才能保证超高压食品的微生物安全,超高压杀菌技术才能实现商业化。

参考文献

1. Eley, Esther. Under Pressure. Food Processing, 1992, 4: 23 ~ 25.
2. 高福成等. 现代食品工程高新技术. 北京: 中国轻工业出版社, 1997, 331 ~ 345.
3. Charalambous, George. Shelf Life Studies of Food and Beverages. Elsevier, 1993, 128 ~ 131.
4. Ohmori, Takashi. High pressure effects on biomembranes. 生物と食品の高压科学, ed. by 林 力丸, さんえい出版, 1993, 133 ~ 136.
5. 吴还祥. 高压食品加工. 食品科学, 1996, 12(11): 1 ~ 9.
6. 德力格尔桑. 静态高压处理食品时的生物学效应. 包头: 2000 年全国首届高压食品暨超高压技术应用论文集, 2000, 8 ~ 15.
7. Lucore, L. A. The effect of environmental stress on the barotolerant of *Escherichia coli* O157: H7. 2000 IFT Annual Meeting, USA, 2000, 51H - 23.
8. 池元斌等. 高压对鲜牛奶中细菌行为的影响. 包头: 2000 年全国首届高压食品暨超高压技术应用论文集, 2000, 48 ~ 50.
9. Calik, H. High hydrostatic pressure effect on *Vibrio parahaemolyticus* in oysters. 2000 IFT Annual Meeting, USA, 2000, 51A - 17.
10. Yasumoto, Mitsumasa. Effect of high pressure on the sterilization of tomato juice. 生物と食品の高压科学, ed by 林 力丸, さんえい出版, 1993, 220 ~ 224.
11. Aleman, G. D. Pulsed Ultra High Pressure Treatment for Pasteurization of Pineapple Juice. Journal of Food Science, 1996, 61(2): 388 ~ 390.
12. Hayakawa, I. Oscillatory Compared with Continuous High Pressure Sterilization on *Bacillus stearothermophilus*. Journal of Food Science, 1994, 59(1): 164 ~ 167.
13. Meyer, S. Richard. High - pressure Sterilization of Foods. Food Technology, 2000, 54(11): 67 ~ 72.
14. Yuste, J. Oscillatory high Pressure processing applied to mechanically recovered poultry meat for bacterial inactivation. IFT Annual Meeting, USA, 2000, 86H - 16.
15. 李汴生. 食品的低温高压处理技术及其研究进展. 食品与发酵工业, 2001, 27(1): 59 ~ 64.
16. Hayakawa, I. Application of High Pressure for Spore Inactivation and protein Denaturation. Journal of Food Science, 1994, 59(1): 159 ~ 163.

17. Kinugasa, Hitoshi. Processing and preservation of tea extract by hydrostatic pressure. 生物と食品の高圧科学, ed by 林 力丸, さんえい出版, 1993, 243.
18. Rovere, P. Modelling and calculation of the sterilizing effect in highpressure heat treatment. 1999 IFT Annual Meeting, USA, 1999, 18.
19. Knorr, Dietrich. Effects of High – Hydrostatic – Pressure Processes on Food Safety and Quality. Food Technology, 1993, 47 (6): 156 ~ 161.
20. Horie, Yu. Fruit preparation by pressurization: A high pressure resistant Candida yeast, identification and pressure – sterilization. 生物と食品の高圧科学, ed. by 林 力丸, さんえい出版, 1993, 229 ~ 236.
21. Takahashi, Kanjiro. Sterilization of bacteria and yeast by hydro – static pressurization at low temperature: Effect of temperature, pH, and the concentration of proteins, carbohydrates and lipids. 生物と食品の高圧科学, ed. by 林 力丸, さんえい出版, 1993, 244 ~ 249.
22. 李泮生等. 超高压杀菌及其反应动力学. 食品科学, 1997, 18 (9) : 3 ~ 9.
23. Lechowich, V. Richard. Food Safety Implications of High Hydro – static Pressure as a Food Processing Method. Food Technology, 1993, 47 (6): 170 ~ 173.
24. Adegoke, G. O. Inhibition of Saccharomyces cerevisiae by combination of hydrostatic pressure and monoterpenes. Journal of Food Science, 1997, 62 (2): 404 ~ 406.
25. Rodriguez, J. Combination effect of high hydrostatic pressure and water activity on E. coli inhibition. 2000 IFT Annual Meeting, USA, 2000, 86H – 5.
26. Palou, E. High Hydrostatic Pressure as a Hurdle for Zygosaccharomyces bailii Inactivation. Journal of Food Science, 1997, 62 (4): 855 ~ 857.

大豆胰蛋白酶抑制子失活方法的研究进展

周春晖 黄惠华 华南理工大学食品与生物工程学院 广州 510640

摘 要 胰蛋白酶抑制子是大豆食品与饲料的主要抗营养因子, 这种抑制子的失活能明显提高大豆食品与饲料的营养价值和食用安全性。大豆胰蛋白酶抑制子的钝化方法有物理、化学、生物还原、酶解、发酵以及天然化合物络合法等。本文介绍了大豆胰蛋白酶抑制子失活诸方法与技术, 并对其发展前景作初步探讨。

关键词 大豆 胰蛋白酶抑制剂 失活

Abstract Trypsin inhibitor is one of the main antinutrition factors in soybean food and fodder. Inactivation of soybean trypsin inhibitor could obviously improve soybean and fodder's food nutritional value and edible security. A review on the advance in the inactivation methods of soybean trypsin inhibitor in recent years was presented in this article.

Key word Soybean Trypsin inhibitor Nactivation

1 豆类食品中胰蛋白酶抑制子的毒性

大豆胰蛋白酶抑制子 (soybean trypsin inhibitor, 简称 STI) 是大豆中的主要抗营养因子, 是一种分子量在 7975 ~ 21500 之间的多肽类或蛋白质。其中组成多肽的氨基酸残基在 72 ~ 197 个。氨基酸残基组成及性质的差异, 决定了大豆胰蛋白酶抑制子的差异。大豆中的胰蛋白酶抑制子约有 7 ~ 10 种。但是迄今为止, 只有两种大豆胰蛋白酶抑制子得到较详细的研究。这两种胰蛋白酶抑制子即 Bowman – Birk 型胰蛋白酶抑制子 (BBI) 和 Kunitz 型胰蛋白酶抑制子 (KSTI)。生大豆中约含 1.4% 的 KSTI 和 0.6% 的 BBI。KSTI 的分子量是 21.384 道尔顿, 内有 181 个氨基酸残基, 含 2 个二硫键。活性中心是精氨酸 63 – 异亮氨酸 64 (Wolf, 1977), 一个 KSTI 分子抑制剂能钝化一个分子的胰蛋白酶。BBI 的分子量为 7861 道尔顿, 有 71 个氨基酸残基, 7 个

二硫键, 分子中有 2 个活性中心: 一个是赖氨酸 16 – 丝氨酸 17, 为胰蛋白酶的结合点; 另一个是亮氨酸 44 – 丝氨酸 45, 是胰凝乳蛋白酶的结合点。通过结合点的作用与胰蛋白酶络合, 可使胰蛋白酶失活, 起到对昆虫、动物及人类的抗营养作用。总的机理为: 大豆胰蛋白酶抑制子的氨基酸残基 (活性部位) 与胰蛋白酶中的氨基酸发生络合作用, 使蛋白酶失去酶解能力, 抑制了该酶的活性。大豆胰蛋白酶抑制子结构中活性部位的氨基酸是具有抑制活性的必要条件, 所以大豆胰蛋白酶抑制子中的二硫键、结构受到破坏时都能使其失活^[1]。

研究表明胰蛋白酶抑制子能抑制昆虫肠道蛋白酶的活性, 使昆虫生长发育不良而死亡, 从而提高大豆的抗虫能力^[2,3]。另外, 大豆胰蛋白酶抑制子抑制了病原菌蛋白酶对寄主细胞的降解, 使病原菌营养不足, 生长增殖受限, 浸染与扩展受阻, 从而达到抗病的目的^[4]。对于动物, 则抑制肠内胰蛋白酶的活性, 妨