

研究简报

高密度二氧化碳技术对牛奶杀菌 效果动力学分析

钟 葵¹, 黄 文¹, 廖小军², 胡小松²

¹ 华中农业大学食品科学技术学院, 湖北 武汉 430070;

² 农业部果蔬加工重点开放实验室, 北京 100083)

关键词: 高密度二氧化碳技术; 牛奶; 杀菌效果; 动力学分析

中图分类号: TS 252.41; O 521⁺.9

文献标识码: A

文章编号: 0438-1157 (2010) 01-0146-06

Inactivation kinetics of total bacteria counts in milk exposed to dense phase carbon dioxide

ZHONG Kui¹, HUANG Wen¹, LIAO Xiaojun², HU Xiaosong²

¹ School of Food Science & Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China;

² Key Laboratory of Fruit and Vegetable Processing, Ministry of Agriculture, Beijing 100083, China)

Abstract: Inactivation kinetics of total bacteria counts in the milk exposed to dense phase carbon dioxide (DPCD) was investigated. Stronger inactivation of total bacteria counts was achieved at higher pressure and exposure time ($p < 0.05$). Treatment temperature had synergistic effects with pressure and expose time on the inactivation of total bacteria counts, and $\lg(N/N_0)$ significantly decreased when increasing the temperature ($p < 0.05$). The maximum reduction was 5.082-log at 30 MPa and 50°C for 70 min. The survival curves of total bacteria counts in the milk against pressure or temperature were fitted by the Weibull model with high regression coefficients, and model parameters, a value (scale factor) and b value (shape factor) changed regularly with increasing pressure or temperature.

Key words: dense phase carbon dioxide; milk; inactivation; kinetic analysis

引 言

非热加工技术 (non-thermal processing) 能有效杀菌钝酶, 同时最大限度保留食品原有的新鲜度和风味, 近年来备受关注。目前, 非热加工技术在液体食品上主要应用在果汁等酸性食品上, 对于牛奶等弱酸性食品相对研究较少。因此将非热技术应用到牛奶加工上, 既能有效杀灭微生物, 又能保持

牛奶的风味和营养价值, 是众多研究者较为关注的问题。

高密度二氧化碳 (DPCD) 技术是近十几年研究较多的一种新型非热加工技术, 大量研究结果表明 DPCD 技术在低温条件下能有效杀菌, 同时最大限度地保持食品营养、风味和新鲜度等品质^[1-5]。

杀菌是食品加工首要也是重要的单元操作, 而杀菌效果动力学及数学模型分析是研究杀菌技术的

2009-08-06 收到初稿, 2009-09-28 收到修改稿。

联系人: 胡小松。第一作者: 钟葵 (1979—), 女, 副教授。

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目 (2007AA100405)。

Received date: 2009-08-06.

Corresponding author: HU Xiaosong, huxiaos@hotmail.com

Foundation item: supported by the High-tech Research and Development Program of China (2007AA100405).

理论关键之一,也是目前研究热点。将 DPCD 作用下微生物失活动力学变化用数学模型分析是 DPCD 杀菌技术的研究重点,对 DPCD 技术的实际应用具有理论指导意义。

目前关于 DPCD 杀菌动力学及数学模型分析的研究报道较少,本文以鲜牛奶为原料,研究 DPCD 技术对牛奶中菌落总数影响,并对杀菌效果进行动力学和数学模型分析,旨在为 DPCD 技术在牛奶上的应用提供参考数据和基础理论指导。

1 材料与方 法

1.1 材 料

实验所用牛奶收集自附近奶牛场清晨挤出的新鲜牛奶用 4 层纱布过滤两遍,4℃ 下冷藏待用。经检验,牛奶中初始菌落总数为 $10^5 \sim 10^6$ cfu · ml⁻¹。

1.2 方 法

1.2.1 DPCD 处理牛奶操作流程 将 DPCD 设备的处理釜预热到设定温度,无菌操作取 50 ml 新鲜牛奶于已灭菌塑料试管中,再置于处理釜中进行 DPCD 处理。经过 5~10 min 的升压过程达到设定的压力,再将牛奶置于恒定的压力和温度下进行处理,达到处理时间后,缓慢卸压并将牛奶取出,放置无菌瓶中并迅速冷却,测定牛奶中菌落总数。

1.2.2 微生物数量测定 DPCD 处理前后牛奶中菌落总数的检测遵循 GB 4789.2—2003 所规定的方法。

杀菌效果采用 $\lg(N/N_0)$ 来表示,其中 N_0 和 N 分别为 DPCD 处理前、后牛奶中微生物数量,cfu · ml⁻¹。

1.2.3 微生物杀菌效果动力学模型 实验所用模型是 Weibull 模型,由 Weibull 等^[6]于 1951 年提出

$$\ln(N/N_0) = -\left(\frac{t}{a}\right)^b \quad (1)$$

式中 a 和 b 分别为比例因子和形状因子。

1.3 实验方案设计

实验考察了 DPCD 技术中处理温度(20、30、40、50℃)、处理压力(10、15、20、25、30 MPa)和处理时间(20、30、40、50、60、70 min) 3 个参数对牛奶中菌落总数活性的影响。

1.4 数据统计分析

数据分析采用方差分析(ANOVA),所有实

验均重复 3 次,用 OriginPro7.5 软件统计分析所有数据并制图。

2 实验结果和分析

2.1 DPCD 压力和处理时间对牛奶中菌落总数活性影响

图 1(a) 是处理温度为 20℃ 时,不同压力和处理时间对牛奶中菌落总数活性影响。由图可见,较低压力和较短时间内 DPCD 杀菌效果有限,压力 10 MPa、处理时间为 20 min 时,牛奶中菌落总数仅降低了 0.892 个数量级,随压力和处理时间增加牛奶中菌落总数残存率显著下降($p < 0.05$)。30 MPa、70min 处理条件时,牛奶中菌落总数的数量级值降低最多,达到 3.31 个数量级。

图 1(b)~(d) 是温度为 30、40、50℃ 时不同压力和时间对牛奶中菌落总数活性影响。由图可见,不同温度下,压力和时间对牛奶中菌落总数活性的影响呈现类似的变化趋势,随压力和时间增加,菌落总数的数量级值显著降低($p < 0.05$)。

DPCD 这种随处理时间和压力增大微生物杀灭效果增强的类似效应已有相关报道,大量研究结果表明 DPCD 对食品中微生物有较好的杀灭效果^[7-9]。廖红梅等^[10]研究 DPCD 处理牛初乳得到:20 MPa、37℃ 条件下,处理时间低于 30 min 时 DPCD 杀菌效果不明显,随处理时间进一步延长杀菌效果显著增强($p < 0.05$)。而本实验中在 20~70 min 处理时间内,牛奶中菌落总数的数量级值一直显著下降($p < 0.05$),其原因是牛初乳黏度相对牛奶更高,CO₂ 需要更长时间的扩散过程才能进入细菌细胞内;另一方面,牛初乳中蛋白质含量相对更高,对细菌的保护作用也相对更强^[11]。

2.2 DPCD 不同温度对牛奶中菌落总数活性影响

研究发现,DPCD 处理时,除压力和时间外,温度也会影响到微生物的活性。前期实验结果(数据未列出)表明,温度 20~50℃、时间 20~70 min 时,热处理对牛奶中菌落总数的活性和相关品质指标没有显著影响($p > 0.05$)。因此,本实验选择 20~50℃ 来研究 DPCD 处理时温度对牛奶中菌落总数活性的影响。

图 2 是 DPCD 处理时温度对牛奶中菌落总数活性影响。由图所见,随温度升高,牛奶中菌落

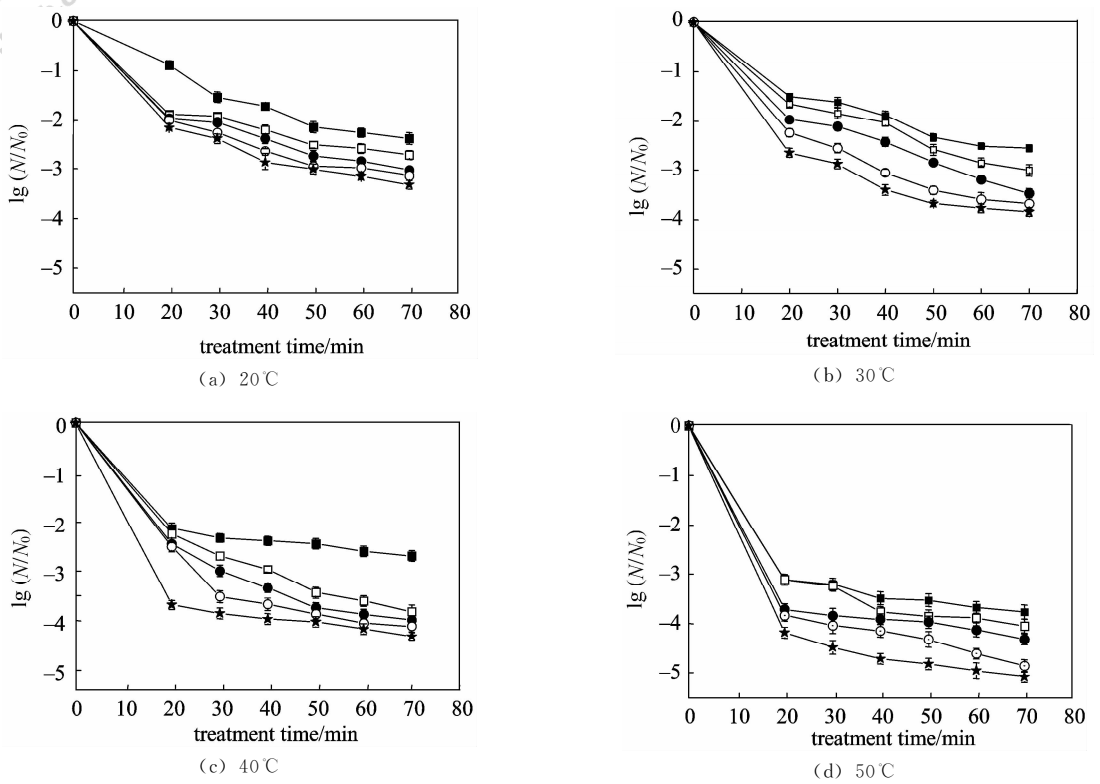


图 1 DPCD 对牛奶中菌落总数活性影响

Fig. 1 Effect of DPCD treatment on inactivation of total bacterial counts in milk

■ 10 MPa; □ 15 MPa; ● 20 MPa; ○ 25 MPa; ★ 30 MPa

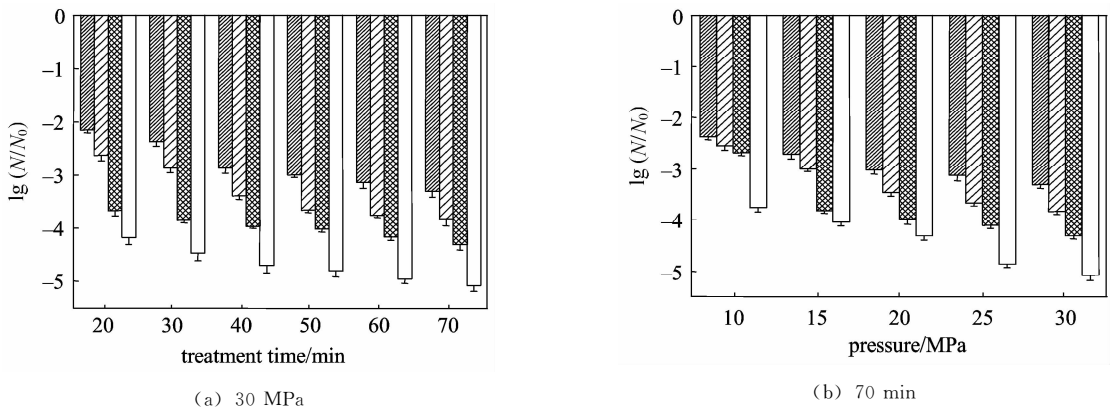


图 2 DPCD 处理时温度对牛奶中菌落总数活性影响

Fig. 2 Effect of DPCD treatment on inactivation of total bacterial counts in milk

▨ 20°C; ▩ 30°C; ▤ 40°C; ▥ 50°C

总数残存率显著下降 ($p < 0.05$), 表明 DPCD 处理时温度具有协同效应, 能显著增强杀菌效果 ($p < 0.05$)。随 DPCD 时间延长 [图 2 (a)] 和压力增强 [图 2 (b)] 呈现出类似增强效应。50°C、30 MPa 和 70 min 时, 牛奶中菌落总数的数量级降低最多, 为 5.082 个数量级, 达到 FDA 对

非热加工技术所规定的杀菌技术指标要求 (5 个数量级)。

目前关于温度协同增强 DPCD 杀菌效果的解释是: 一方面, 较高温度能促进 CO_2 溶解, 利于其穿透细胞膜, 提高 DPCD 对微生物的杀灭效果; 另一方面, 处于临界点 ($T = 31.1^\circ\text{C}$) 附近的温度

改变能使亚临界状态 CO_2 变为超临界状态, 而超临界状态下 CO_2 的溶解度和密度显著增强, 因此临界点附近的温度能提高杀灭效果。大量相关研究也得到类似结论^[12-13]。但也有相反的研究报道, Hong 等^[14]发现 6.8 MPa、40℃ 时对植物乳杆菌 (*L. plantarum*) 的钝化效果低于 30℃。因此, 关于温度对 DPCD 杀菌效果影响需要进一步研究。

2.3 DPCD 技术对牛奶中菌落总数活性影响动力学分析

微生物杀菌效果动力学及数学模型分析是研究杀菌技术的理论关键之一, 将 DPCD 微生物失活动力学变化用数学模型表示是 DPCD 技术的研究重点。目前杀菌模型中最为经典的杀菌模型是 Bigelow 模型, 最早用于拟合热力杀菌动力学变化曲线, 描述微生物残存率的数量级值和处理时间的线性关系。早期有研究者引入 Bigelow 模型来分析 DPCD 处理下微生物失活曲线, 但随 DPCD 研究不断深入, 研究结果表明 DPCD 作用下微生物存活曲线并不符合一级动力学模型^[3,15]。本实验中图 1 也呈现类似研究结果, 因此 DPCD 对微生物的杀灭效果不符合一级动力学模型。

Weibull 模型是目前常见的分析微生物失活动力学曲线的模型之一, 最初主要应用于热处理后微生物杀灭效果动力学分析, 后有研究者将其应用到非热加工技术之一——高压脉冲电场处理微生物失活曲线分析上并取得较好拟合度^[16-17]。因此, 本实验采用 Weibull 模型分析 DPCD 处理后牛奶中菌落总数的失活动力学变化。Weibull 模型描述了 $\ln(N/N_0)$ 和处理时间 t 之间的相关性。以 $\ln(N/N_0)$ 为 y 轴, 处理时间 t 为 x 轴作图, 根据式 (1), 得到参数 a 和 b 。表 1 列出了 Weibull 模型的动力学参数。由表可见, 不同压力和温度下微生物的 $\ln(N/N_0)$ 和处理时间 t 之间相关系数 R^2 都在 0.864 以上, 表明存在较好相关性。

通常认为 a 因子是速度常数, b 因子代表失活曲线的形状。 $b < 1$ 时失活曲线是凹面; $b > 1$ 时是凸面; $b = 1$ 时是一条直线, 即一级动力学反应^[17]。表 1 列出了不同压力和温度下 a 因子和 b 因子的变化。随压力和温度升高, a 因子逐渐降低, 从最高 6.702 (10 MPa、20℃) 下降为 7.62×10^{-6} (30 MPa、50℃); b 因子小于 1, 表明 DPCD 作用下微生物的失活曲线都是凹面, 与图 1 吻合。随温度升

高, b 值呈现变小的趋势, 表明随温度升高, 菌落总数失活曲线的凹面更加明显。

表 1 Weibull 模型分析牛奶中菌落总数杀灭效果的动力学参数

Table 1 Effect of DPCD treatment on kinetic parameters calculated by Weibull model to inactivation curves of total bacterial counts in milk

Temperature /℃	Pressure /MPa	a	b	R^2
20	10	6.702	0.761	0.938
	15	0.422	0.318	0.931
	20	0.375	0.369	0.944
	25	0.342	0.375	0.976
	30	0.226	0.356	0.973
30	10	1.679	0.480	0.948
	15	1.642	0.512	0.948
	20	0.951	0.475	0.951
	25	0.434	0.427	0.980
	30	0.083	0.328	0.958
40	10	0.503	0.178	0.968
	15	0.457	0.434	0.992
	20	0.252	0.400	0.980
	25	0.136	0.368	0.864
	30	3.14×10^{-7}	0.119	0.967
50	10	7.72×10^{-5}	0.157	0.963
	15	2.951×10^{-3}	0.222	0.924
	20	6.13×10^{-8}	0.109	0.900
	25	1.29×10^{-4}	0.181	0.925
	30	7.62×10^{-6}	0.154	0.995

图 3 是 DPCD 对牛奶中菌落总数杀菌效果的实验值和 Weibull 模型值比较, 由图可见, 20~50℃ 范围内, 模型值和实验值之间数值差异很小, 相关系数都接近 1, 表明该模型拟合度很高, 能较好地反映 DPCD 处理下牛奶中菌落总数的失活曲线变化。

3 结 论

(1) 随压力和处理时间增加, DPCD 对牛奶中菌落总数杀灭效果显著增强 ($p < 0.05$)。处理温度对杀菌效果有协同效应, 随温度增加, 牛奶中菌落总数数量级值显著降低 ($p < 0.05$)。DPCD 处理条件为 50℃、30 MPa 和 70 min 时, 牛奶中菌落总数的残存率最大降低了 5.082 个数量级。

(2) Weibull 模型能较好地拟合 DPCD 处理后

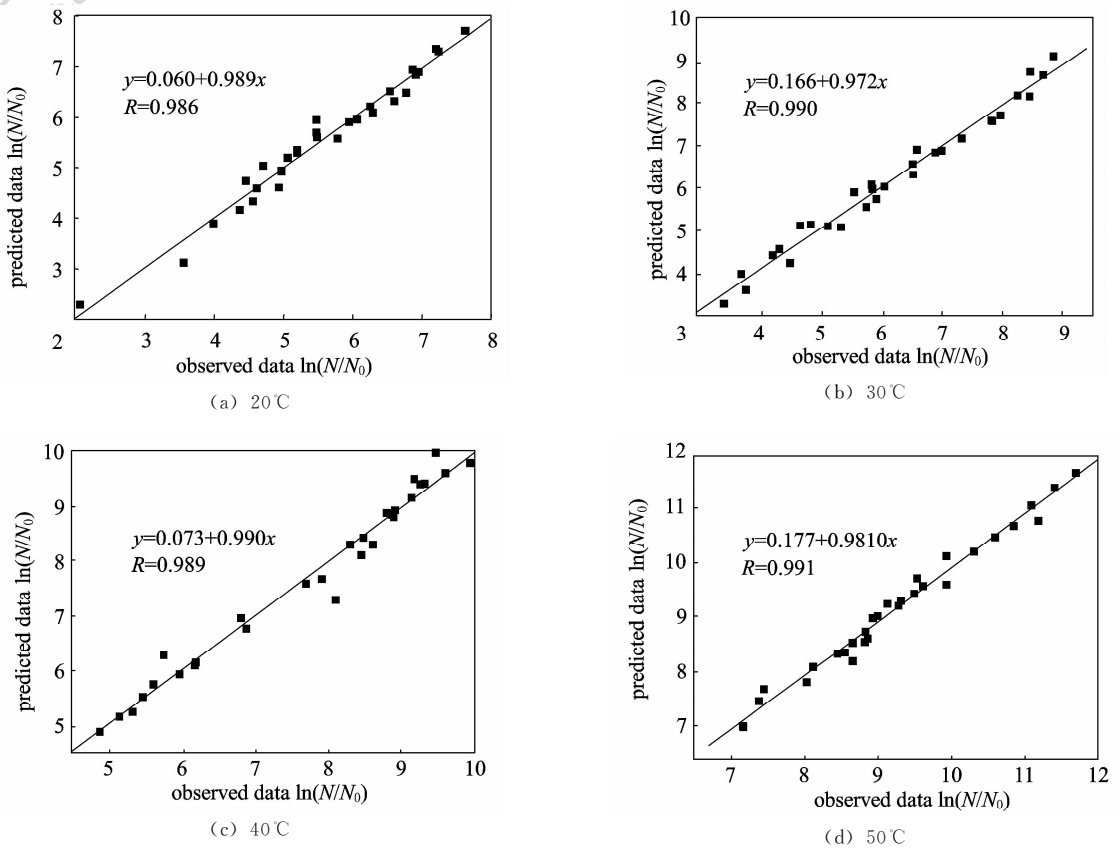


图 3 DPCD 对牛奶中菌落总数杀菌效果实验值与 Weibull 模型值比较

Fig. 3 Correlation between observed data and predicted data obtained with Weibull model of total bacteria counts in milk treated by DPCD

牛奶中菌落总数的失活曲线，随压力增加和温度升高，模型动力学参数比例因子 a 和形状因子 b 呈现规律性变化。

References

[1] Hong S I, Pyun Y R. Membrane damage and enzyme inactivation of *Lactobacillus plantarum* by high pressure CO₂ treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, **63**: 19-28

[2] Karaman H, Erkmén O. High carbon dioxide pressure inactivation kinetics of *Escherichia coli* in broth. *Food Microbiology*, 2001, **18** (1): 11-16

[3] Spilimbergo S, Elvassore N, Bertucco A. Inactivation of microorganisms by supercritical CO₂ in a semi-continuous process. *Italy Journal of Food Science*, 2003, **15** (1): 115-124

[4] Balaban M O, Arreola A G, Marshall M R, Peplow A, Wei C I, Cornell J. Inactivation of pectinesterase in orange juice by supercritical CO₂. *Journal of Food Science*, 1991, **56** (3): 743-750

[5] Spilimbergo S, Mantoan D, Dalser A. Supercritical gases pasteurization of apple juice. *Journal of Supercritical*

Fluids, 2007, **40** (3): 485-489

[6] Weibull W A. Statistical distribution function of wide applicability. *Journal of Applied Mechanics*, 1951, **51**: 293-297

[7] Soo R K, Min S R, Byoung C K, et al. Modeling of the inactivation of *Salmonella typhimurium* by supercritical carbon dioxide in physiological saline and phosphate-buffered saline. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, **70** (1): 132-141

[8] Erkmén O. Antimicrobial effect of pressurized carbon dioxide on *Staphylococcus aureus* in broth and milk. *Lebensm. - Wiss. Technol.*, 1997, **30** (8): 826-829

[9] Liao H M, Hu X S, Liao X J, Chen F, Wu J H. Inactivation of *Escherichia coli* inoculated cloudy apple juice exposed to dense phase carbon dioxide. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, **118**: 126-131

[10] Liao Hongmei (廖红梅), Zhou Linyan (周林燕), Liao Xiaojun (廖小军), Zhang Yan (张燕), Hu Xiaosong (胡小松). Effects of dense phase carbon dioxide on sterilization and physical-chemical properties of bovine colostrum. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering* (中国农业工程学报), 2009, **25** (4): 260-264

- [11] Lin H M, Cao N J, Chen L F. Antimicrobial effect of pressurized carbon dioxide on *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Science*, 1994, **59** (3): 657-659
- [12] Lin H M, Yang Z, Chen L F. Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* by supercritical and subcritical CO₂. *Biotechnol. Prog.*, 1992 (8): 458-461
- [13] Gurbuz G, Lisa K B, Hotchkiss J H. Inactivation of yeasts in grape juice using a continuous dense phase carbon dioxide processing system. *Journal of the Science and Agriculture*, 2005, **85**: 2362-2365
- [14] Hong S I, Park W S, Pyun Y R. Non-thermal inactivation of *Lactobacillus plantarum* influenced by pressure and temperature of pressurized carbon dioxide. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 1999, **34**: 125-130
- [15] Zhang J, Davis T A, Matthews M A, Drews M J, LaBerge M, An Y H. Sterilization using high-pressure carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, 2006, **38**: 354-372
- [16] Álvarez I, Virto R, Raso J, Condón, S. Comparing predicting models for the *Escherichia coli* inactivation by pulsed electric fields. *International Journal of Food Science and Technology*, 2003 (4): 195-202
- [17] Rodrigo D, Ruíz P, Barbosa-Cánovas G V, Martínez A, Rodrigo M. Kinetic model for the inactivation of *Lactobacillus plantarum* by pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, **81**: 223-229