

文章编号:1673-1689(2008)03-0079-04

欧姆加热对嗜酸耐热菌的电穿孔效应

耿敬章^{1,2}, 仇农学², 丁辉煌²

(1. 陕西理工学院 生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723001; 2. 陕西师范大学 食品工程系, 陕西 西安 710062)

摘要: 探讨了欧姆加热对嗜酸耐热菌的杀灭作用机理。用自行设计的批式欧姆加热装置,对苹果汁中的嗜酸耐热菌进行处理后,利用扫描电镜观察其细胞壁膜结构的变化,利用电导率仪和紫外吸收分光光度计测定菌悬液的成分变化。结果表明:通过环境扫描电镜可观察到嗜酸耐热菌的表面出现凹陷和破损,电导率仪和紫外吸收分光光度计测定细胞内容物的溢出,可以推断出欧姆加热造成了嗜酸耐热菌的“电穿孔”。

关键词: 欧姆加热;嗜酸耐热菌;电穿孔

中图分类号: Q 949.3

文献标识码: A

Electroporation Effect of Ohmic Heating on *Alicyclobacillus acidoterrestris* in Apple Juice

GENG Jing-zhang^{1,2}, QIU Nong-xue², DING Hui-huang²

(1. College of Biological Science and Engineering, Shanxi University of Technology, Hanzhong 723001; 2. Department of Food Engineering, Shanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract: The microbe was treated by a self-made ohmic heating instrument to investigate the sterilization mechanism of ohmic heating on *Alicyclobacillus acidoterrestris*. The sterilization effect of ohmic heating on the microbe was observed by environmental scanning electron microscope (ESEM). Conductometer and ultraviolet spectrophotometer was used to detect the leakage of intracellular contents. ESEM photographs of treated *A. acidoterrestris* showed that crushed and destroyed microbe resulted from the ohmic heating, the increase of electrical conductivity and the OD value indicate that the leakage of intracellular contents. It could be concluded that one of the sterilization mechanisms of ohmic heating on *A. acidoterrestris* was electroporation.

Key words: Ohmic heating; *Alicyclobacillus acidoterrestris*; Electroporation

作为一种新型的食品加工技术,欧姆加热可用于食品物料的烫漂、解冻、蒸发脱水、发酵和巴式杀菌^[1]。目前多数研究工作的目标集中在利用该方

法对含颗粒液态食品进行加热和杀菌。作者曾以苹果汁行业中最难控制的嗜酸耐热菌为目标,首次研究了欧姆加热对嗜酸耐热菌及其芽孢的杀灭效

收稿日期:2007-05-06.

基金项目:国家“十五”重大专项资助课题(2001BA501A21);陕西理工学院引进人才项目(SLGQD0623).

作者简介:耿敬章(1980-),男,河北辛集人,理学硕士,讲师。主要从事食品质量与安全控制研究。

Email:jingz-geng@163.com

果:其杀菌率随电压的升高而增大,随 pH 值的降低而增大,随加热体积的增加而增大,欧姆加热时间对杀菌率几乎没有影响^[2]。在此基础上,进一步探讨欧姆加热的灭菌机理,以期为欧姆加热的杀菌应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

嗜酸耐热菌(*Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM NO. 3922):购自德国,将其接种于 K 氏培养基,4 ℃ 保存。K 氏培养基:按美国库格实验室(Krueger Food Laboratories INC)标准配制^[3]。

1.2 仪器设备

欧姆加热装置:采用自行设计制造的批式欧姆加热装置,由电源、加热装置和控制系统组成。电源由 TDGC-5 型接触调压器及相应电路组成;加热装置包括 4 个加热槽(由聚丙烯板焊接而成)和钛板电极;控制系统由 PT100 型温度传感器及控制反馈电路组成。Quanta 200 型环境扫描电镜:荷兰 Philips-FEI 公司产品。DDSJ-308A 型雷磁电导率仪:上海精密科学仪器有限公司产品。3010 型紫外分光光度计:日本日立公司产品。

1.3 欧姆加热操作方法

将接种有菌悬液的苹果汁置于加热槽中,连接电路,通过 XTD-7000 温控仪预先设定加热温度。在未接通电源前,用无菌移液管吸取 5 mL 菌液测定其初始菌落数。然后接通电源,将电压调到需要的电压值进行加热。当果汁加热到设定温度时,系统自动断电,开始保温,当果汁温度降至低于设定温度 1 ℃ 时,系统自动接通电路,重新进行加热。

1.4 嗜酸耐热菌的环境扫描电子显微镜(ESEM)观察

将载玻片用碱性皂液及蒸馏水清洗至中性,晾干灭菌备用。吸取 0.2 mL 菌悬液均匀涂布在处理过的载玻片上,自然干燥后,用导电胶把载玻片固定在样品台上,放入离子溅射仪内喷金处理,然后在 Quanta 200 环境扫描电子显微镜下进行观察,并拍下扫描图片。样品喷金条件:压力 0.1 mPa,电流 34 mA,时间 100 s。^[4]

1.5 电导率法测定细胞内容物的渗出

取适量菌悬液接种在果汁中,充分混匀,进行欧姆加热处理。无菌移液管吸取 5 mL 菌悬液,用离心机以 4 000 r/min 离心 5 min,用 DDSJ-308A 型电导率仪测定电导率,未经欧姆加热的菌液做空白对照,每个处理平行测定 3 次,然后取平均值。

在电导率测量时,将温度传感器接入仪器,仪器自动按设定的温度系数补偿到 25 ℃ 时的电导率值^[5]。

1.6 紫外吸收分光光度法测定细胞内容物的渗出

取适量菌悬液接种在果汁中,充分混匀。进行欧姆加热处理。无菌移液管吸取 5 mL 菌悬液,用离心机以 4 000 r/min 离心 5 min,用紫外吸收分光光度计测定在 260 nm 和 280 nm 下的 OD 值,未经欧姆加热的菌液做空白对照,每个处理平行测定 3 次,然后取平均值。

2 实验结果

2.1 嗜酸耐热菌的环境扫描电子显微镜观察

以下图 1 和图 2 所示为欧姆加热处理前后嗜酸耐热菌的环境扫描电镜图。

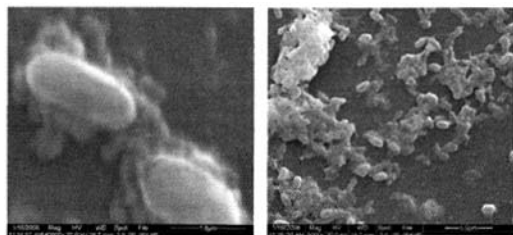


图 1 未处理的嗜酸耐热菌

Fig. 1 *A. acidoterrestris* under ESEM (untreated)

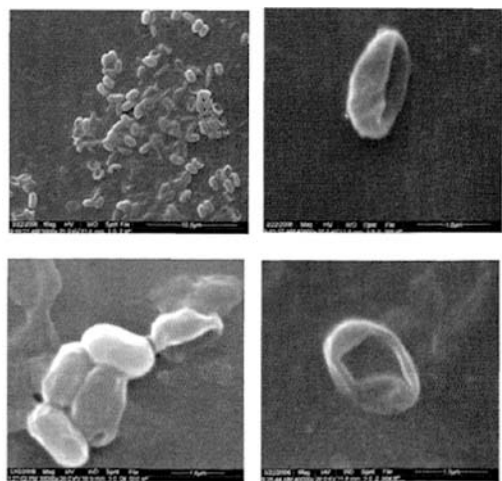


图 2 欧姆加热处理的嗜酸耐热菌

Fig. 2 *A. acidoterrestris* under ESEM (treated by ohmic heating)

从图 1、2 可以看出,未经欧姆加热的嗜酸耐热菌形体饱满,表面光滑无缺损;欧姆加热处理后的嗜酸耐热菌细胞形状发生变化,表面出现一定程度的凹陷和破损,分析其原因可能是由于电场作用下引起细胞跨膜电位增大,从而导致细胞出现“电穿

孔”现象。

2.2 电导率法测定细胞内容物的渗出

将菌悬液用欧姆加热装置进行加热后,测定其电导率。同时以未经处理的菌悬液作为对照,实验结果如表 1 所示。

表 1 欧姆加热对菌悬液电导率的影响

Tab. 1 The effect of ohmic heating on the electrical conductivity

电压/V	电导率/(ms/cm)
对照	1.89
200	1.91
220	1.93
250	1.96

由表 1 可以看出,欧姆加热会使菌悬液的电导率增加,在其它条件相同情况下,随着电压值的增大,欧姆加热处理后菌悬液的电导率也随之增加。电导率增加说明菌液内的离子浓度增大。主要的原因是细胞内离子类物质的渗漏。

生物细胞在自然环境中,由一定的感应电荷在自己体内形成平衡电场。这些感应电荷包括自由电荷,极性分子和可溶性离子等。在增加外电场后,极性分子等在电场力的作用下发生位移,若电场力足够大,会造成细胞膜的损伤,使细胞内物质渗漏,导致溶液的电导率增大。

2.3 紫外吸收分光光度法测定细胞内容物的渗出

将菌悬液用欧姆加热装置进行加热后,用紫外分光光度计分别测定其在 260 nm 和 280 nm 下的 A 值,同时以未经处理的菌悬液作为对照,实验结果如表 2 所示。

表 2 欧姆加热对菌悬液 A 值的影响

Tab. 2 The effect of ohmic heating on the OD value

电压/V	$A_{260\text{ nm}}$	$A_{280\text{ nm}}$
对照	0	0
200	0.129	0.045
220	0.13	0.086
250	0.23	0.115

由表 2 可以看出,欧姆加热会使菌悬液的 A 值增加。在其它条件相同情况下,随着电压值的增大,欧姆加热处理后菌液的菌悬液在 260 nm 和 280 nm 的 A 值也随之增加。A 值的增加说明菌液内核酸和蛋白质的浓度增大。主要的原因是细胞内核酸和蛋白质的溢出。

细胞 DNA 和 RNA 在 260 nm 处有最大吸收

峰。嘌呤、嘧啶、核苷、核苷酸或核酸等都有紫外吸收特性;蛋白质中酪氨酸和色氨酸残基的苯环含有共轭双键,在 280 nm 处有吸收峰,其吸光度与含量成正比^[6]。微生物体内含有蛋白质和核酸,当细胞在正常状态下进行新陈代谢时,这些大分子物质无法透过细胞膜和细胞壁,当欧姆加热处理时,会造成细胞膜的损伤,使细胞内物质渗漏,导致溶液的电导率增大。

3 讨论

关于电穿孔机理,人们对高压脉冲电场 (PEF) 研究较多,如图 3 所示,高压脉冲造成了鸡血细胞的电穿孔^[7]。近来发现低强度 ($E < 100\text{ V/cm}$) 电场也能够提高物料的提取率,提高加工效率等,其作用机理目前尚未明确,推测其为电崩解或电穿孔。Lima^[8]等发现低频率欧姆加热处理能显著提高苹果的出汁率。Lakkakula^[9]等发现在其它条件相同的情况下,增加电场强度或降低频率,都能极大地提高米糠油的提取率;Praporsci^[10]研究发现,电场强度为 50 V/cm 时,欧姆加热能提高果汁的出汁率和马铃薯片的干燥速率,效果明显好于对照组。因此,Sastry^[11]等推测低频率欧姆加热过程中,细胞壁更容易积累电荷,在膜上形成孔洞,即造成电穿孔。

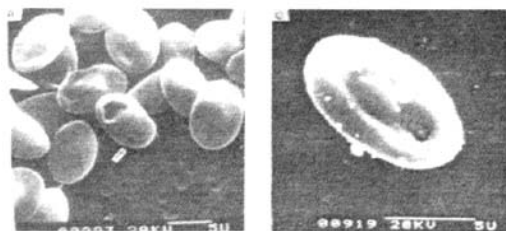


图 3 高压脉冲所致细胞膜的电穿孔

Fig. 3 Cell under ESEM treated by pulse electromagnetic field

现在,越来越多的研究表明,欧姆加热杀菌过程对微生物具有电穿孔作用,从而导致细胞的灭活。例如 Cho^[12]等对 *Lactobacillus acidophilus* 在电场作用下的发酵进行了研究,研究表明:在电场存在下,尽管发酵的延迟期能显著缩短,但同时发酵的产率也会大大降低。这主要是由于欧姆加热产生的轻微电穿孔作用促进了发酵初期底物的转运,从而使发酵的延迟期缩短,加速了发酵过程。Cho^[13]等就欧姆加热对枯草芽孢杆菌的杀灭效果进行了研究,研究表明:与传统水浴加热相比,在相同的温度条件下,欧姆加热处理可以加速孢子的灭

活。若采用一个两级欧姆加热处理装置,可以进一步加快微生物的灭活速率。Lee^[14]等研究表明,与传统的沸水加热相比,欧姆加热会促进 *Saccharomyces cerevisiae* 的胞内物质的渗漏。常雪妮^[15]等利用欧姆加热处理大肠杆菌,认为欧姆加热是通过热力作用和电场作用协同杀菌的,故杀菌效果要优于单纯的热力杀菌。导致欧姆加热产生非热效应主要是由于使用的低频率(50~60 Hz)电场的作

用,使得场强增加,使细胞壁达到击穿电压,从而形成微孔。

在本研究中,嗜酸耐热菌经欧姆加热处理后,通过环境扫描电镜(ESEM)可观察到菌体细胞表面发生凹陷和破损,电导率仪和紫外吸收分光光度计可检测到菌悬液的电导率和吸光度值增加,据此推测欧姆加热处理造成了嗜酸耐热菌细胞膜的“电穿孔”,导致细胞内容物的逸出,进而引起菌体死亡。

参考文献(References):

- [1] Castro I, Teixeira J A, Salengke S, et al. Ohmic heating of strawberry products; electrical conductivity measurements and ascorbic acid degradation kinetics[J]. *Innovative Food Science Emerging Technologies*, 2004, 5(1):27-36.
- [2] 耿敬章, 仇农学. 欧姆加热对苹果汁中酸土脂芽孢杆菌的杀灭作用[J]. 浙江林学院学报, 2006, 23(2):145-148.
GENG Jing-zhang, QIU Nong-xue. Sterilizing effect of ohmic heating on *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice[J]. *Journal of Zhejiang Forestry College*, 2006, 23(2):145-148. (in Chinese)
- [3] Chang Su-Sen, Kang Dong-Hyun. *Alicyclobacillus* spp in the fruit juice industry: History, characteristics, and current isolation/detection procedures[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2004, 30(2):55-74.
- [4] 张振飞, 吴伟坚, 梁广文. 越北腹露蝗触角传感器的扫描电镜观察[J]. 昆虫知识, 2005, 42(4):431-434.
ZHANG Zhen-fei, WU Wei-jian, LIANG Guang-wen. The ultra-structure of sensilla in antennae of *Fruhstoferiola tonkinensis*[J]. *Entomological Knowledge*, 2005, 42(4):431-434. (in Chinese)
- [5] 许喜林, 李琳, 郭祀远, 等. 静态磁场对细菌存活率的影响[J]. 微生物学通报, 2005, 32(5):1-4.
XU Xi-lin, LI Lin, GUO Si-yuan, et al. Effect of static magnetic fields on the survival probability of bacteria[J]. *Microbiology*, 2005, 32(5):1-4. (in Chinese)
- [6] 杨建雄. 生物化学与分子生物学实验技术教程[M]. 北京:科学出版社, 2002.
- [7] 孙敬儒, 王子淑, 郭聪, 等. 强电场脉冲致细胞膜电穿孔的观察[J]. 四川大学学报:自然科学版, 2001, 38(5):748-751.
SUN Jing-ru, WANG Zi-shu, GUO Cong, et al. Observation of electroporation of cell membrane induced by pulse electromagnetic field of high-intensity[J]. *Journal of Sichuan University (Natural Science Edition)*, 2001, 38(5):748-751. (in Chinese)
- [8] Lima M, Sastry S K. The effect of ohmic heating frequency on hot-air drying rate and juice yield[J]. *J Food Eng*, 1999, 41(2):115-119.
- [9] Rao Lakkakula N, Marybeth Lima, Terry Walker. Rice bran stabilization and rice bran oil extraction using ohmic heating[J]. *Bioresource Technology*, 2004, 92(2):157-161.
- [10] Praporscic N I, Lebovka S Ghnimi. Ohmically heated, enhanced expression of juice from apple and potato tissues[J]. *Biosystems Engineering*, 2006, 93(2):199-204.
- [11] Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies ohmic and inductive heating. U. S. food and drug administration center for food safety and applied nutrition[EB/OL]. (2000-06-02) <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/ift-ohm.html>.
- [12] Cho H Y, Sastry S K, Yousef A E. Growth kinetics of *Lactobacillus acidophilus* under ohmic heating[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1996, 49(3):334-340.
- [13] Cho Hyung-Yong, Ahmed E Yousef, Sudhir K Sastry. Kinetics of inactivation of *Bacillus subtilis* spores by continuous or intermittent ohmic and conventional heating[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1999, 62:368-372.
- [14] Lee C H, Yoon S W. Effect of ohmic heating on the structure and permeability of the cell membrane of *Saccharomyces cerevisiae*[C]. Chicago:1999 IFT Annual Meeting. 1999.
- [15] 常雪妮, 程玉来. 欧姆加热杀菌机理的初步研究[C]//中国农业机械学会成立 40 周年庆典暨 2003 年学术年会论文集. 北京:中国农业机械学会, 2003.

(责任编辑:杨萌)