

大肠杆菌在超声场作用下的活性研究

刘丽艳, 张喜梅, 李琳, 李冰

(华南理工大学轻工与食品学院轻化工研究所, 广东广州 510640)

摘要: 作为一种非热物理技术, 超声波杀菌技术具有能耗低、时间短、有效保存食品营养成分和天然色、香、味等特点, 具有广阔的工业化前景。超声波在媒质中传播, 会产生一系列的物理、机械、化学等效应, 可用来杀灭微生物。本文以大肠杆菌为研究对象, 研究超声声强、超声作用时间以及菌液初始浓度等条件对微生物存活率的影响。结果表明, 超声声强、超声作用时间及菌液浓度均影响杀菌效果, 一定的超声作用条件下, 超声处理对大肠杆菌具有较好的杀灭作用。

关键词: 杀菌; 超声波; 空化; 大肠杆菌

文章编号: 1673-9078(2012)6-610-612

Effect of Ultrasonic Treatment on Viability of *E. coli* Cells

LIU Li-yan, ZHANG Xi-mei, LI Lin, LI Bing

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: As a non-thermal physical technique, ultrasonic technology has many advantages, such as short time, low energy consumption, effective conservation of the food nutrients and natural characters of color, smell and taste. Therefore, it would have wide prospect of industrial application. Ultrasound is able to inactivate microbe cells through a number of physical, mechanical and chemical effects arising from acoustic cavitation. The aim of this study was to investigate the effect of ultrasound treatment at different conditions (intensity of ultrasound, treatment time, concentration of microbe solution) on cell viability of *E. coli*. Results showed that sterilization was greatly influenced by the ultrasonic treatment conditions.

Key words: inactivation; ultrasound; cavitation; *E. coli*

“民以食为天”, 食品是人类赖以生存和发展的物质基础。随着生活水平的提高, 人们对食品的要求也不再是解决温饱, 而更注重食品的安全、营养和品质, 尤其危及人类健康、生命的食品安全问题成为人们关注的热点^[1,2], 而食品的腐败变质则是影响食品安全的一个重要因素。

食品腐败变质的主要原因是某些微生物的存在致使食品品质的改变。传统的热力杀菌技术在杀死微生物的同时, 还会破坏食品的营养成分和天然特性, 包括颜色变化、口味改变、香气损失、营养破坏和质构变化。作为一种非热物理技术, 超声波杀菌技术具有能耗低、时间短、有效保存食品营养成分和天然色、香、味等特点, 具有广阔的工业化前景, 作为非热处

理技术在食品杀菌中的应用也越发受到研究人员的重视^[3]。

超声波是频率大于 20 kHz 的声波, 是在媒质中传播的一种机械振动。超声波方向性好、穿透力强, 能引起空化作用和一系列特殊效应, 如力学效应、热学效应、化学效应和生物效应等^[4,5]。一般认为, 在水溶液里, 当超声强度超过某一值时, 会产生空化现象, 即液体中微小的泡核在超声波作用下被激活, 它表现为泡核的振荡、生长、收缩及崩溃等一系列动力学过程^[6]。空气泡绝热收缩及崩溃的瞬间, 泡内呈现 5000 °C 以上的高温及 109 K/s 的温度变化率, 产生高达 108 N/m² 的强大冲击波^[7]。利用超声波空化效应在液体中产生的瞬间高温及温度交变变化、瞬间高压和压力变化, 导致微生物的细胞壁穿孔、破裂, 使液体中细菌致死, 病毒失活。

大肠杆菌是一种食源性肠道致病菌, 可通过食品和饮品, 如牛肉、蔬菜、水果、牛奶及其制品、饮用水等传播, 其具有耐酸性, 可在一些酸性食品, 如发酵香肠、苹果汁、酸奶酪中存在。若被污染的食品未经处理或处理不充分, 食用后人体就会受到感染。本论文以大肠杆菌为研究对象, 主要研究几个重要的超

收稿日期: 2012-03-22

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(20436020); 广东省自然科学基金重点项目(04105934); 广东省博士启动基金项目(05300175); 淀粉与植物蛋白深加工教育部工程研究中心

作者简介: 刘丽艳(1981-), 女, 硕士, 研究方向为糖类物质及其生物利用与药物制备

通信作者: 李琳(1962-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为糖类物质及其药物制备与生物利用

声作用参数对微生物致死效果的影响,为以后对超声杀菌作用的深入探讨提供依据。

1 材料及设备

菌种:大肠杆菌(ATCC25922),购自中国工业微生物菌种保藏管理中心;超声发生器,UP400S,德国Dr.Hielscher;台式高速离心机,TG16-WS,长沙湘仪离心机有限公司;PC型紫外可见分光光度计,UV-2102,上海尤尼柯有限公司;精密电子天平,BS300S,德国塞多利斯。

2 实验方法

2.1 菌悬液的制备

取适量的大肠杆菌置于装有无菌培养基的三角瓶中,在37℃的水浴摇床中振荡培养16h。培养扩增后的菌液用台式离心机在5000 r/min的速度下离心5 min。弃去上清液,用无菌水重悬离心管底部的沉淀,再用无菌水稀释,在可见光分光光度计上测量菌悬液的 A_{600} ,保证其菌液浓度在一定范围内,待用^[9,10]。

2.2 超声作用装置

本研究中所用的超声波发生装置参数为:变幅杆式超声波发生系统,超声波频率固定为24 kHz,功率输出连续可调。脉冲占空比(表示超声场的工作方式,即超声工作时间与间歇时间之比,如为0.5时表示1 s内超声作用0.5 s,停歇0.5 s),由0.1至1连续可调,可调步长为0.1。

2.3 超声处理方法

以直径为5 cm,100 mL的圆柱形小烧杯盛50 mL菌悬液于冰水浴中进行超声处理。探头处于烧杯中部,不能触底,每次处理时探头在细胞悬液中的深度固定。分别改变超声处理时间、声强以及菌液初始浓度,考察大肠杆菌在不同处理条件下的活性。其中,占空比为0.5,容器直径为5 cm。

2.4 微生物检验

菌落计数:用牛肉膏蛋白胨培养基,37℃培养24 h后计数。

3 结果与讨论

3.1 菌液浓度对大肠杆菌活性的影响

图1是在不同大肠杆菌悬液初始浓度下,超声场声强为63 W/cm²作用10 min后大肠杆菌的活性变化。

如图1所示,菌液浓度在10⁴~10⁶ cell/mL范围内,相同超声场条件下,随着待处理菌液初始浓度的提高,超声处理后其存活率随之提高,其原因可能是在较浓的细菌悬液中,菌体细胞成团簇状存在,其相互间存

在保护作用,在相同的作用时间内,超声波的作用主要表现在对此团簇的分散;在浓度相对较低的菌悬液中,可以近似认为微生物细胞单个存在,则超声的空化作用导致其存活率降低。

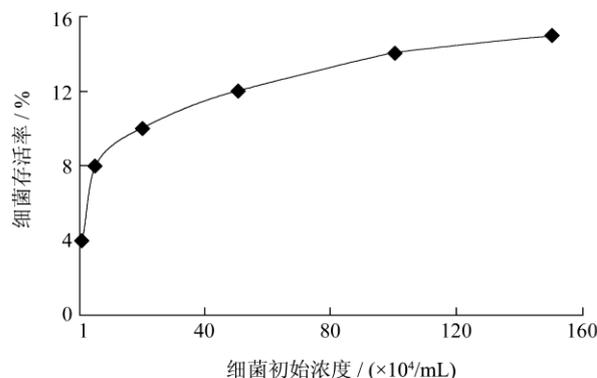


图1 细菌悬液初始浓度变化对其存活率的影响

Fig. 1 Effects of initial cell concentration on the inactivation of *E. coli*

3.2 超声作用时间对大肠杆菌活性的影响

在大肠杆菌悬液的初始浓度为6.5×10⁵ cell/mL,超声场的声强为84 W/cm²,脉冲占空比为0.5时,超声作用时间对大肠杆菌活性的影响如图2所示。

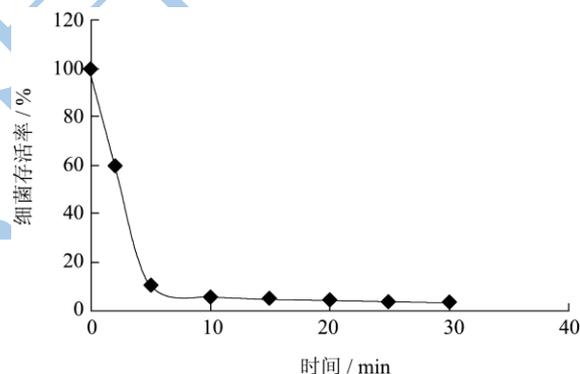


图2 总超声作用时间对大肠杆菌存活率的影响

Fig. 2 Effects of total irradiation time on the inactivation of *E. coli*

如图2所示,随着杀菌时间增加,杀菌效果大致成正比增加,在5 min之内,细菌存活率显著下降,降至10%。随着处理时间的延长,细菌存活率总体呈下降趋势,但幅度较缓。当超声处理10 min时,细菌存活率低于5%。可见,超声场具有较好的抑菌效果。

3.3 声强对大肠杆菌活性的影响

声强是声波在单位时间内通过单位面积所携带的能量。声强的改变可通过以下两种方式:在输出功率一定的情况下,通过改变变幅杆,即改变超声的作用面积,改变超声作用的声强;或者在变幅杆一定的条件下,改变超声的输出功率,达到改变超声作用的声强。

首先在较大范围内研究声强对大肠杆菌的活性影

响,即通过改变变幅杆改变声强,总超声时间为 10 min,研究不同声强下,大肠杆菌存活率的变化。结果如图 3 (a),其中超声频率为 24 kHz,输出功率为 300 W。然后,在超声场影响较大的条件下固定变幅杆,通过改变超声的输出功率,在较小范围内研究声强对大肠杆菌活性的影响,结果如图 3 (b)。所有研究的待作用菌液体积为 50 mL,菌液初始浓度为 7.9×10^5 cell/mL,超声作用 10 min。

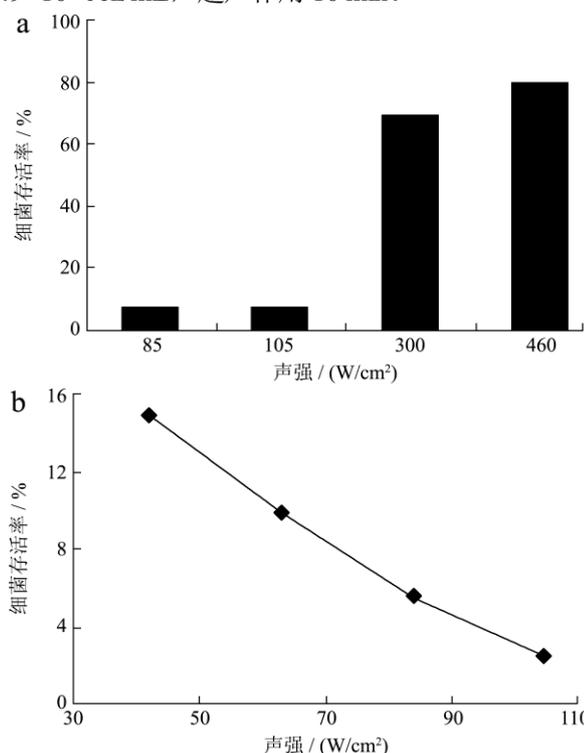


图 3 声强变化对大肠杆菌存活率的影响

Fig.3 Effects of ultrasound irradiation power on the inactivation of *E. coli*

从图 3 (a) 中可知,当声强为 85 W/cm² 或 105 W/cm² 时,超声对大肠杆菌活性的影响较大。当声强在 300 W/cm² 和 460 W/cm² 时,声强的影响效果不显著。这是由于当声强超过某一界限时,空化泡在声波的膨胀相内可能增长过大,以至它在声波的压缩相内来不及发生崩溃,使空化效应反而减弱,影响效果下降,且声强增大所引起的非线性附加声衰减亦随之增大,因而为取得同样的影响效果所付出的功率消耗增加。

由图 3 (b) 可知,当输出声强在 40~100 W/cm² 范围内,随着声强增大,细菌存活率显著下降,声强在 100 W/cm²,超声波处理 10 min,细菌存活率不到 5%,对微生物的杀灭作用较好。

超声波是频率大于 20 kHz 的机械波。在液体传播过程中,产生空化作用,在局部产生一个极短暂的强压力脉冲,同时伴有短暂的高温,形成局部热点,其

温度可达 5000 K,压力可达 50 MPa,脉冲持续时间为数微秒。瞬间崩溃之后,热点急剧冷却,冷却速率可达 109 K/s,并伴有强烈的冲击波和时速达 400 km/s 的微射流。这种局部瞬间高温高压及其微射流作用,对微生物具有破坏作用,使细胞壁和细胞膜产生了严重损伤或破裂,细胞质收缩,细胞器结构破坏,细胞质内结构紊乱,甚至还出现了细胞内容物核酸和蛋白质泄漏的现象,发生了细胞结构开放型的不可逆损伤、甚至是细胞结构的崩溃,导致微生物死亡。

4 结论

4.1 经实验发现:菌液初始浓度、处理时间以及声强均影响超声场对大肠杆菌的杀灭效果。在较浓的细菌悬液中,菌体细胞成团簇状存在,其相互间存在保护作用,超声波作用主要表现在对此团簇的分散作用,对大肠杆菌的活性影响不大。在浓度相对较低的菌悬液中,可以近似认为微生物细胞单个存在,则超声明显影响其活性。

4.2 随着超声作用时间的延长,大肠杆菌的存活率总体呈下降趋势。当超声处理 10 min 时,大肠杆菌存活率不到 5%;处理时间超过 10 min 时,大肠杆菌存活率下降幅度较缓。

4.3 当输出声强在 40~100 W/cm² 范围内时,随着声强增大,大肠杆菌存活率显著下降,声强在 100 W/cm²,超声波处理 10 min,细菌存活率不到 5%。但当声强在 300 W/cm² 和 460 W/cm² 时,声强对大肠杆菌的活性影响不显著。

4.4 超声波对微生物的杀灭作用在理论上已得到深入的研究,但超声波杀菌在实际应用上还不广泛,目前主要作为辅助消毒^[1],要使超声波杀菌技术得到更加广泛和充分的利用,必须首先具有高频率、高强度的超声波源。所以,今后还应着重探索能简便产生超声波且价格低廉的方法。

参考文献

- [1] Manas P, Barsotti L, Claude CP. Microbial inactivation by pulsed electric fields in a batch treatment chamber: effects of some electrical parameters and food constituents [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2001, 2: 239-249
- [2] Piyasena P, Mohareb E, Mckellar RC. Inactivation of microbes using ultrasound: a review [J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 87: 207-216
- [3] Villamiel M, Jong PD. Inactivation of *Pseudomonas fluorescens* and *Streptococcus thermophilus* in Trypticase soy

- Broth and total bacteria in milk by continuous-flow ultrasonic treatment and conventional heating [J]. *Journal of Food Engineering*, 2000, 45: 171-179
- [4] 宋国胜,胡松青,李琳.超声波技术在食品科学中的应用与研究[J].现代食品科技,2008,24(6):609-612
- [5] 栗星,包海蓉.超声波在食品杀菌中的研究现状[J].技术装备,2008,13(6):26-28
- [6] TJ Mason, E Joyce, SS Phull, et al. Potential uses of ultrasound in the biological decontamination of water [J]. *Ultrasonic Sonochemistry*, 2003, 10: 319-323
- [7] 李儒荀,袁锡昌,工跃进,等.超声波-激光联合杀菌的研究[J].包装与食品机械,2002,16(3):11-12
- [8] M Funta, M Yamaguchi, T Tsukamoto. Inactivation of *Escherichia coli* by ultrasonic irradiation [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2004, 11: 57-60
- [9] Inez Hua, John E Thompson. Inactivation of *Escherichia coli* by Sonication at Discrete Ultrasonic Frequencies [J]. *Elsevier Science*, 2000, 15: 3880-3893
- [10] I Tsukamoto, B Yim, CE Stavarache. A Inactivation of *Saccharomyces Cerevisiae* by Ultrasonic Irradiation [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2004, 11: 61-65
- [11] Gennaro LD, Cavella S, Romano R, et al. The use of ultrasound in food technology I: inactivation of peroxidase by thermosonication [J]. *Food Engineering*, 1999, 39: 401-407