

二甲基二碳酸盐联合动态超高压对模拟果汁的杀菌效果研究

程银棋^{1,2}, 余元善², 吴继军², 徐玉娟², 唐道邦², 温靖², 郑欣^{2,3}

(1. 华中农业大学食品科学技术学院, 湖北武汉 430023) (2. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 广东广州 510610) (3. 江西农业大学生物科学与工程学院, 江西南昌 330045)

摘要: 本文研究了二甲基二碳酸盐 (DMDC) 联合动态超高压对模拟果汁中三种挑战污染菌 (大肠杆菌、酿酒酵母、肠膜状明串珠菌) 的杀菌效果。结果表明: 单独动态超高压对三种挑战污染菌的杀菌效果随着压力增大而显著增强 ($p < 0.05$), 其中在相同处理压力下, 对大肠杆菌的杀菌最好, 但即使在 100 MPa 的压力处理下, 大肠杆菌也仅下降 1.2 个对数; 向含挑战污染菌的模拟果汁 (25 °C) 中添加 250 mg/L 的 DMDC 2 h 后, 大肠杆菌和酿酒酵母均被完全杀灭, 而肠膜状明串珠菌对 DMDC 具有很强的耐受性, 仅下降了 1.7 个对数, 且继续延长 DMDC 的处理时间, 其数量下降也不再明显; 当 DMDC (250 mg/L) 与动态超高压联合处理时, 它们对模拟果汁中的肠膜状明串珠菌的杀菌作用具有明显的协同增效效果 ($p < 0.05$)。另外, DMDC 与动态超高压先后处理次序对肠膜状明串珠菌的杀菌效果也有影响。

关键词: 动态超高压; 二甲基二碳酸盐; 杀菌; 果汁

文章编号: 1673-9078(2013)10-2405-2409

Inactivation of Microorganisms in Model Fruit Juice System by Dynamic Ultra-high Pressure Combined with Dimethyl Carbonate

CHENG Yin-qi^{1,2}, YU Yuan-shan², WU Ji-jun², XU Yu-juan², TANG Dao-bang², WEN-Jing², ZHENG Xin^{2,3}

(1. College of Food Science Technology, Hua Zhong Agricultural University, Wuhan 430023, China)

(2. Sericulture & Agri-food Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510610, China)

(3. College of Bioscience & Bioengineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: Inactivation of dynamic ultra-high pressure (DUHP) combined with dimethyl carbonate (DMDC) on *E. Coli*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Leuconostoc mesenteroides* in model juices were investigated. The results showed that the effect of DUHP on inactivation of three strains in model juices gradually increased as the pressure increased ($p < 0.05$). UHP had the best sterilization effect on *E. Coli* under the same pressure. But even under the pressure of 100 MPa, the reduction of *E. Coli* was not more than 1.2 Lg cycles. After 250 mg/L DMDC was added to the model juices, *E. Coli* and *Saccharomyces cerevisiae* were completely inactivation after 2 h, while *Leuconostoc mesenteroides* only decreased 1.7 Lg cycles. No significant reduction was displayed as treatment time increased. DUHP combined with DMDC showed a significantly synergistic effect on the inactivation of *Leuconostoc mesenteroides* ($p < 0.05$), and its sterilization effect was affected by the sequence of DMDC addition.

Key words: dynamic ultra-high pressure; dimethyl carbonate; inactivation; juice;

随着社会经济快速发展, 人们的生活质量和消费观念在不断的提高。新鲜、安全、营养、方便的果蔬汁在饮料市场上越来越受到人们追捧。伴随着人们的这种消费需求, 一些不仅能杀灭果汁饮料中污染微生物, 而且又能有效保持其新鲜度和营养品质的非热杀

收稿日期: 2013-06-04

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目 (2012BAD31B00), 广东省农业科学院院长基金项目 (201216)

通讯作者: 徐玉娟 (1974-), 女, 博士, 研究员, 研究方向为农产品加工

菌技术开始受到重视^[1]。

目前研究较多的非热加工技术有: 高压加工、高压脉冲电场、高密度二氧化碳、臭氧、紫外杀菌、辐照、防腐剂等^[2-4]。随着科学技术的不断提高, 国内外也涌现出一些新的杀菌手段。二甲基二碳酸盐 (dimethyl dicarbonate, DMDC), 又名维果灵, 是我国食品添加剂使用标准中允许使用的一种果汁饮料防腐剂 (INS 号 242), 其防腐作用为杀灭果汁饮料中的微生物, 对微生物的致死作用跟菌体内关键酶蛋白被

DMDC 修饰失活密切相关^[5]。果汁经 DMDC 杀菌处理后, 果汁的营养品质变化很小, 也没有任何异味物质生成, 是一种很有潜力的果汁饮料非热杀菌技术^[6]。但一些研究发现, 某些乳酸菌对 DMDC 具有较强的耐受性, 因此在新鲜果汁中只单独使用 DMDC 杀菌往往效果不理想^[5]。

动态超高压技术 (dynamic ultra-high pressure) 是在传统高压均质设备的基础上发展起来的一种新型食品加工技术。随着高压均质设备生产技术的成熟, 高压均质设备的最高压力可达 400 MPa, 因此称其为动态超高压^[7]。研究表明, 动态超高压能对很多微生物起到杀灭效果, 如植物乳杆菌、酿酒酵母等, 且动态超高压的处理时间短 (一般不到 1s), 对果汁的营养风味几乎没有热破坏作用, 也是一种有潜力的新型非热杀菌技术^[7]。

研究发现, 果汁中污染菌经动态超高压处理后其细胞形态和细胞膜通透性将发生变化, 可能更利于一些杀菌或抑菌剂进入菌体内^[7]。国外一些科研人员进行了动态超高压联合溶菌酶^[8]、植物精油^[9]、Nisin^[10]等一些防腐剂对果汁饮料的杀菌研究, 显著延长了动态超高压产品的微生物货架期。与上述防腐剂相比, DMDC 自身对污染菌有很好的杀菌效果, 且其在果汁饮料中能快速分解, 自身无任何残留。但目前还未见 DMDC 与动态超高压协同对果汁饮料杀菌方面的研究。因此, 本文以果汁饮料中常见的三种致腐或致病污染菌为挑战菌株, 研究 DMDC 联合动态超高压对模拟果汁中三种挑战污染菌的杀菌效果, 验证两者之间是否具有一定的协同增效杀菌作用。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料

二甲基二碳酸盐购自德国朗盛公司; 胰蛋白胨、酵母粉、营养肉汤、孟加拉红培养基、MRS 肉汤培养基、胰蛋白胨大豆琼脂培养基, 购自广东环凯微生物科技有限公司; 挑战污染菌 (大肠杆菌、酿酒酵母、肠膜状明串珠菌), 实验室保藏; 其它化学试剂均为国产分析纯。

1.1.2 主要仪器设备

电热恒温水浴锅 HWS24 型, 上海恒科学仪器有限公司; 恒温振荡培养器 ZHWY-211B, 上海智城分析仪器制造有限公司; 洁净工作台 SW-CJ-2FD, 苏净集团苏州安泰空气技术有限公司; 生化培养箱 SPX-250B, 上海佳胜实验设备有限公司; 动态超高压

设备, 美国 Microfluidics 公司 (处理压力: 3000~18000 psi; 最大流量: 124~270 mL/min), 其作用原理是液流经过加压后被一分为二, 在反应室内两股液流从相反方向撞击, 形成瞬间超高压, 使物料达到均质和杀菌的目的。

1.2 实验方法

1.2.1 挑战污染菌培养物制备

大肠杆菌培养物: 将适量的大肠杆菌接入到 100 mL 灭菌的营养肉汤中, 在 37 °C 的恒温振荡培养器 (200 r/min) 中, 培养 10~12 h, 待用。

酿酒酵母培养物: 取适量的酿酒酵母培养液接到 100 mL 灭菌的液体培养基中 (成分: 10 g/L 葡萄糖, 3 g/L 胰蛋白胨, 5 g/L 酵母粉, 用蒸馏水溶解), 于 30 °C 的恒温振荡摇床 (200 r/min) 中培养 14~16 h, 待用。

肠膜状明串珠菌培养物: 将适量的肠膜状明串珠菌接入到 100 mL 灭菌的 MRS 营养肉汤中, 在 30 °C 的恒温生化培养箱中, 培养 10~12 h, 待用。

1.2.2 含挑战污染菌模拟果汁的制备

配制好的模拟果汁 (成分: 100 g/L 蔗糖, 0.05 mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, pH=4.0) 后, 进行巴氏灭菌处理 (100 °C 处理 1 min), 并冷却至常温; 接着, 在无菌操作条件下向其接入适量的上述三种挑战菌的培养物。三种污染菌在模拟果汁体系中的终浓度为 5.5 Lg(CFU/mL)。

1.2.3 单独的动态超高压处理

在动态超高压处理前, 将含有挑战污染菌的模拟果汁恒温 25 °C; 接着分别采用处理压力为 40、60、80、100 MPa 的动态超高压处理一次, 处理完后取样分析在模拟果汁中三种污染菌的降低的对数。

1.2.4 单独的 DMDC 处理

量取 100 mL 含挑战污染菌的模拟果汁于无菌的带盖玻璃瓶中, 并将其放置在 25 °C 的电热恒温水浴锅中; 待其温度恒定后, 添加 25 mg DMDC 到上述玻璃瓶中, 并用手迅速振荡使之摇匀; 然后, 在添加 DMDC 后的 0.5、1、2、3、4、5 和 6 h 后分别取样, 分析添加 DMDC 后在模拟果汁中三种污染菌的降低的对数。

1.2.5 DMDC 联合动态超高压处理

根据 DMDC 和动态超高压的先后处理次序, 分别设计下面三种联合处理方式:

处理方式 1: 添加 DMDC 一定时间后再采用动态超高压处理

具体为: 向恒温为 25 °C 的含挑战污染菌的模拟果汁中添加终浓度为 250 mg/L DMDC 充分混合放置

一定时间后,分别采用处理压力为40、60、80、100 MPa的动态超高压处理一次,处理完后取样分析在模拟果汁中三种污染菌的降低的对数。

处理方式 2: 添加 DMDC 后立即采用动态超高压处理

具体为: 向恒温为 25 °C 的含挑战污染菌的模拟果汁中添加终浓度为 250 mg/L DMDC 充分混合后,立即采用处理压力分别为 40、60、80、100 MPa 的动态超高压处理一次,并将处理完的样品放置于 25 °C 的电热恒温水浴锅中,保持一定时间后,取样分析在模拟果汁中三种污染菌的降低的对数。

处理方式 3: 动态超高压处理后再添加 DMDC

具体为: 恒温为 25 °C 的含挑战污染菌的模拟果汁分别采用处理压力为 40、60、80、100 MPa 的动态超高压处理一次,并将处理完的样品放置于 25 °C 的电热恒温水浴锅中使其温度平衡到 25 °C 后,接着添加终浓度为 250 mg/L 的 DMDC,快速剧烈摇匀,保持一定时间后,分别取样分析在模拟果汁中三种污染菌降低的对数。

1.2.6 挑战污染菌的检测

将样品采用 0.85% 的 NaCl 溶液进行十倍稀释,取 100 μL 合适稀释度的样品涂布于胰蛋白胨大豆琼脂培养基,置于 37 °C 恒温生化培养箱中培养 2~3 d 后分析大肠杆菌数量;酿酒酵母采用稀释倒平板的方式使用孟加拉红琼脂培养基分析(30 °C, 培养 2~3 d);肠膜状明串珠菌采用稀释倒平板的方式使用 MRS 琼脂培养基分析(30 °C, 培养 2~3 d)。杀菌效果采用残活率对数值表示,其计算公式是^[11]:

$$LgS=Lg(N/N_0)$$

注: N_0 -处理前模拟果汁中目标菌数量(CFU/mL); N -处理后模拟果汁中的目标菌数量(CFU/mL); LgS -处理前后目标菌降低的对数。

1.3 统计分析

所有的不同处理均重复三次,数据结果采用统计软件 SPSS 12.0 进行方差分析,数值以平均值±标准差表示。

2 结果与分析

2.1 单独动态超高压对模拟果汁中三种挑战污染菌的杀菌效果

图 1 是模拟果汁经不同处理压力的动态超高压处理一次后各种挑战污染菌的降低对数。从图 1 可知,

随着压力的增大,模拟果汁中三种挑战污染菌的数量逐渐减少。与其它两个挑战污染菌相比,相同处理压力的动态超高压对大肠杆菌的杀菌效果最好。但在 100 MPa 的动态超高压处理下,模拟果汁中大肠杆菌也仅下降了 1.2 个对数。

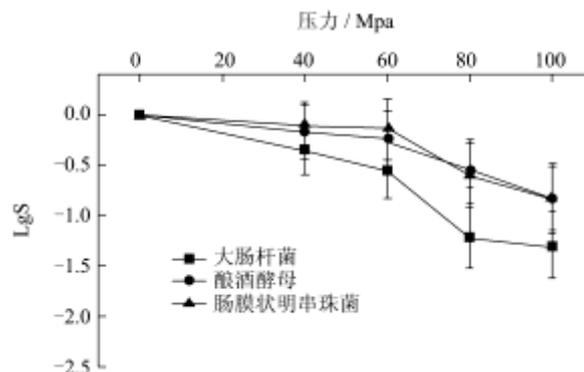


图 1 动态超高压的处理压力对模拟果汁中三种挑战污染菌杀菌效果的影响

Fig.1 Effect of pressure on inactivation of three strains in model juice by DUHP

表 1 动态超高压的处理压力对模拟果汁出口温度的影响

Table 1 Effect of pressure on outlet temperature of model juice by DUHP

动态超高压压力/MPa	进料温度/°C	出料温度/°C
40	25	32±1.5
60	25	37±1.3
80	25	42±1.7
100	25	47±1.9

在动态超高压处理中,由于物料的相互撞击,处理后模拟果汁的出口温度随着处理压力的增加而明显升高(表 1)。在 100 MPa 的动态超高压处理下,模拟果汁的温度从 25 °C 升高到了 47 °C,这个温度一般不会对微生物产生明显的致死作用,因此,上述三种挑战污染菌的死亡主要还是由于动态超高压的撞击或空穴作用导致的。很多研究发现,当动态超高压处理压力增加到 200 MPa 甚至 300 MPa,其杀菌效果能显著增加,但也将导致处理果汁样品的温度升高至 60~70 °C 以上^[8-10],因此,100 MPa 以上的动态超高压处理时,一般需要降低物料进口温度或者在均质阀中增加冷却装置。

2.2 单独 DMDC 对模拟果汁中三种挑战污染菌的杀菌效果

向含挑战污染菌的模拟果汁(25 °C)中添加 250 mg/L DMDC 后,三种挑战污染菌降低对数的变化见图 2。由图 2 可知,添加 DMDC 后,模拟果汁中三种

挑战污染菌的数量快速下降,其中酿酒酵母不到 0.5 h 就已经完全致死,并且添加 DMDC 2 h 后大肠杆菌也已经全部致死。与其它两种菌相比,肠膜状明串珠菌对 DMDC 表现出较强的耐受性,添加 DMDC 2 h 后,肠膜状明串珠菌只降低了 1.7 个对数。DMDC 对三种挑战污染菌的杀菌动力学曲线呈现先快后慢的趋势,添加 DMDC 2 h 后,模拟果汁中肠膜状明串珠菌的数量不再明显下降 ($p>0.05$)。DMDC 是一种很强的亲和试剂,添加到果汁中后,能迅速与果汁中污染菌的酶蛋白反应,同时其也能与果汁中的水或其它一些物质发生反应而降解。随着添加时间的延长,模拟果汁中 DMDC 的浓度逐渐降低,其杀菌效率也将下降^[5-6]。

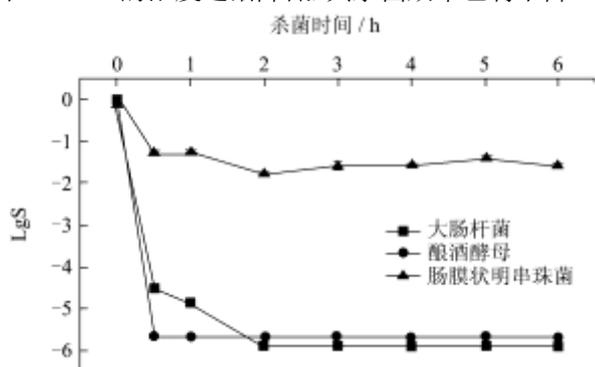


图2 DMDC 杀菌时间对模拟果汁体系中的三种挑战污染菌的影响

Fig.2 Effect of time on inactivation of three strains in model juice by DMDC

研究已经表明, DMDC 浓度显著影响其杀菌效果,随着 DMDC 的添加量的增加,其对污染菌的杀菌效果将明显提高。但是很多国家(包括我国)对果汁饮料中 DMDC 的添加有严格的限量标准,一般不允许超过 250 mg/L^[13-14]。上面的研究表明,单独的添加 250 mg/L 的 DMDC 难以将肠膜状明串珠菌有效杀灭,有必要将 DMDC 与其他一些非热杀菌技术协同使用。

2.3 DMDC 联合动态超高压对模拟果汁中三种挑战污染菌的杀菌效果研究

上面的研究表明,肠膜状明串珠菌对 DMDC 和动态超高压均表现出较强的耐受性,难以被它们有效杀灭。但当含三种挑战污染菌的模拟果汁经 DMDC (250 mg/L) 联合动态超高压处理时,随着动态超高压处理压力的增加,其对肠膜状明串珠菌的杀菌作用明显增强,且表现出明显的协同增效作用(图 3)。一些研究认为,果汁中污染菌经动态超高压处理后其细胞形态和细胞膜通透性将发生变化,可能更利于一些杀菌或抑菌剂进入菌体内^[8]。但 DMDC 与动态超

压的具体的协同杀菌机制我们正在进一步研究中。由于 DMDC 对酿酒酵母和大肠杆菌的高效致死作用,在所有的协同处理中,均检测不出大肠杆菌和酿酒酵母。

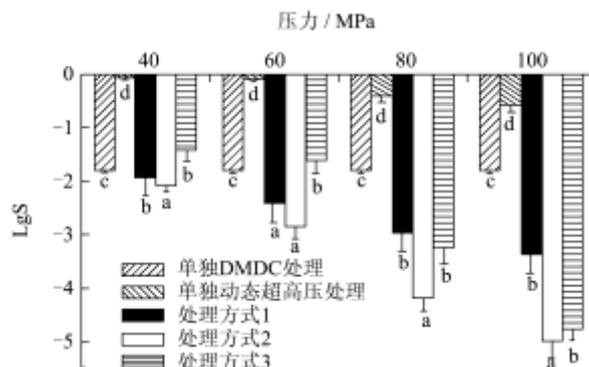


图3 DMDC 联合动态超高压对肠膜状明串珠菌的影响

Fig.3 Effect of DUHP combined with DMDC on inactivation of *Leuconostoc mesenteroides*

注:在所有处理中,添加 DMDC 2h 后取样分析挑战污染菌的残留率对数。图中每组相同字母表示 0.05 水平上的差异未达到显著性水平,不同字母表示 0.05 水平上差异达到显著性水平。

研究也发现, DMDC 的添加顺序也对 DMDC 联合动态超高压的杀菌效果有明显的影响(图 3)。从图 3 可以看出,在相同的动态超高压处理压力下,处理方式 2(添加 DMDC 后立即采用动态超高压处理)的杀菌效果要略高于比其它两种处理方式,可能是由于在处理过程中的瞬间升温提高了 DMDC 与污染菌中酶蛋白的反应速率。一些研究表明,在 DMDC 处理期间,温度的提高能增加 DMDC 与污染菌酶蛋白的反应速率,但也将增加 DMDC 的分解速率。因此,单独温度的升高并不能提高 DMDC 的实际杀菌效果,一般添加 DMDC 的时候,果汁的温度保持在 30 °C 以下^[13]。在处理方式 2 中,由于物料在反应室内碰撞,产生瞬间高温,提高了 DMDC 与菌体酶蛋白的反应速率,虽然那也会导致 DMDC 的分解加快,但很快模拟果汁的温度也降至 25 °C,使其实际杀菌效果有所提高。对于处理方式 1 和处理方式 3,在相同的动态超高压处理压力下,两者的杀菌效果差异不显著 ($p>0.05$)。

3 结论

3.1 单独动态超高压对三种挑战污染菌的杀菌效果随着压力增大而显著增强。在相同的处理压力下,其对大肠杆菌杀菌效果最好,酿酒酵母次之,而肠膜状明串珠菌则较难致死,但是即使在最大压力为 100MPa 处理下,大肠杆菌也仅下降 1.2 个对数。

3.2 单独添加 250 mg/L 的 DMDC 后,模拟果汁中三种挑战污染菌的数量快速下降,其中酿酒酵母不到 0.5h 已经完全致死,并且添加 DMDC 2 h 后大肠杆菌也已经全部致死。与其它两种菌株相比,肠膜状明串珠菌对 DMDC 表现出较强的耐受性,添加 DMDC 2 h 后,肠膜状明串珠菌仅降低了 1.7 个对数。

3.3 DMDC 与动态超高压对模拟果汁中的肠膜状明串珠菌的杀菌作用具有明显的协同增效效果 ($p<0.05$)。随着动态超高压处理压力的增大,其与 DMDC 的协同增效作用也明显加强 ($p<0.05$)。并且,DMDC 与动态超高压先后处理次序也对肠膜状明串珠菌的杀菌效果有影响。

参考文献

- [1] Moody G, Marx A, Bermúdez-Aguirre D. A comparative study on the structure of *Saccharomyces cerevisiae* under nonthermal technologies: High hydrostatic pressure, pulsed electric fields and thermo-sonication [J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 151(3): 327-337
- [2] 夏远景,李志义,薄纯智,等.超高压灭菌效果实验研究[J].现代食品科技,2007,23(2):20-22
Xia Y J, Li Z Y, Bo C Z, et al. Experimental Investigation of the Ultra-high Pressure Sterilization [J]. Modern Food Science and Technology, 2007, 23(2):20-22
- [3] 刘凤霞,孙建霞,李静,等.高压脉冲电场技术在食品加工中的应用研究新进展[J].食品与发酵工业,2010,36(4):138-141
Liu F X, Sun J X, Li J, et al. Review on Novel Application of Pulsed Electric Fields in Food Processing [J]. Food and Fermentation Industries, 2010, 36(4): 138-141
- [4] 刘文营,黄丽燕,卢晓明,等.高密度二氧化碳技术在食品加工中的应用研究[J].食品工业科技,2011,32(12):509-512
Liu W Y, Huang L Y, Lu X M, et al. Research of the Application of Dense Phase Carbon Dioxide in Food Processing [J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(12):509-512
- [5] Costa A, Barata A, Malfeito-Ferreira M, et al. Evaluation of the Inhibitory Effect of Dimethyl Dicarbonate (DMDC) Against Wine Microorganisms [J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 25: 422-427
- [6] Basaran-Akgul N, Churey J J, Basaran P, et al. Inactivation of different strains of *Escherichia coli* O157:H7 in various apple ciders treated with dimethyl dicarbonate (DMDC) and sulfur dioxide (SO₂) as an alternative method [J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 26: 8-15
- [7] Campos F P, Cristianini M. Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* in orange juice using ultra high-pressure homogenization [J]. Food Science and Emerging Technologies, 2007, 8(2):226-229
- [8] Alline A L, et al. Ultra-high pressure homogenization treatment combined with lysozyme for controlling *Lactobacillus brevis* contamination in model system [J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2008, 9: 265-271
- [9] Bevilacqua A, et al. Use of natural antimicrobials and high pressure homogenization to control the growth of *Saccharomyces bayanus* in apple juice [J]. Food Control, 2012, 24:109-115
- [10] Panchalee P T, et al. Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in apple and carrot juices using high pressure homogenization and nisin [J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 129: 316-320
- [11] 王小情,刘忠义,余元善,等.叶绿素镁钠盐对液态食品中 *Staphylococcus aureus* 的光动力杀菌研究[J].现代食品科技, 2013,29(3):463-466
Wang X Q, Liu Z Y, Yu Y S, et al. Photodynamic Sterilization of *Staphylococcus Aureus* in Liquid Food by Na-Chlorophyllin [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(3): 463-466
- [12] Stephanie B, Juergen B, Peter E. Can Protein Functionalities be Enhanced by High-pressure Homogenization ?-A Study on Functional Properties of Lupin Proteins [J]. Journal of Food Science, 2011, 1: 1359- 1366
- [13] Willams R C, Sumner S S, Golden D A. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in apple cider and orange juice treated with combinations of ozone dimethyl dicarbonate and hydrogen peroxide [J]. Journal of Food Science, 2005, 70: 197-201
- [14] 中华人民共和国国家标准.食品安全国家标准食品添加剂使用标准[S].北京:中国标准出版社,2011
The national standard of the people's Republic of China. The national food safety standards of food additive use standard [S]. Beijing: China standard publishinghouse, 2011