

微波杀灭玉米中霉菌的机理研究

徐艳阳, 于静, 仇洋

(吉林大学生物与农业工程学院, 吉林长春 130022)

摘要: 为了探讨微波杀灭玉米霉菌过程中是否存在非热效应, 对烟曲霉、黑曲霉、产黄青霉和桔青霉等四种霉菌微波处理前后的菌体生长情况进行研究。通过霉菌菌体生长量的测定建立了生长模型, 对蛋白质和DNA的吸光度值以及电解质的渗透率进行测定, 同时应用原子力显微镜观察微波处理前后黑曲霉孢子的形态变化以及渗出物情况。结果表明: 与相同温度的水浴加热相比, 微波处理后霉菌生长的延滞期较长、种群容纳量较低, 蛋白质、DNA的吸光度值和电解质的渗透率较高, 说明相同温度下微波处理对霉菌的伤害要大于水浴, 杀菌过程中存在非热效应。应用原子力显微镜观察发现, 微波处理前后黑曲霉孢子的形态差异较大, 未处理的黑曲霉孢子体态饱满且表面较为平整, 处理后孢子表面产生皱缩; 经微波处理后孢子细胞内容物渗出较多, 说明微波处理对孢子细胞膜有一定的破坏作用。

关键词: 微波; 杀菌; 玉米; 霉菌; 生长模型; 非热效应

文章编号: 1673-9078(2014)9-96-101

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.09.017

Exploration on Mechanism of Killing Molds in Corn by Microwave Treatment

XU Yan-yang, YU Jing, QIU Yang

(College of Biological and Agricultural Engineering, Jilin University, Changchun 130022, China)

Abstract: In order to discuss the presence of non-thermal effect during the process of killing molds in corn by microwave treatment, growth situation of *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium citrinum* before and after microwave treatment were studied. The growth models of molds were established through the determination of mold growth amount, the absorbance values of protein and DNA, the permeability of electrolyte, and morphological changes of *A. niger* spore and situation of exudates were observed by atomic force microscope (AFM). Results showed that the lag phases of four kinds of molds became longer, population capacities lessened, and absorbance values of protein and DNA largened after microwave treatment, compared with water bath heating at the same temperature. It was indicated that more damages in molds occurred by microwave than water bath, suggesting non-thermal effects existed in the process of microwave sterilization. AFM examination showed that the morphology of *A. niger* spores' before and after microwave treatment was quite different. The form of spores was full and the surface was relatively smooth before the microwave treatment, but they shrank after the microwave treatment. More cellular content overflowed after microwave treatment, which proved that microwave treatment had damage effect on cell membrane of molds.

Key words: microwave; sterilization; corn; mold; growth model; non-thermal effect

微波是一种频率为300 MHz~300 GHz, 波长在1 mm~1 m之间的电磁波, 其频率比一般的无线电波频率高, 通常也称为“超高频电磁波”^[1]。由于微波杀菌过程中所需要的时间短、温度低, 同时操作过程中易于控制并且节能高效^[2], 除此之外还可以保持食品的营养^[3]和风味^[4], 被广泛应用于食品行业的各个领域

收稿日期: 2014-05-20

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(20120717); 吉林大学基本科研业务费项目(450060487501); 吉林大学本科教学改革研究项目(2013138)

作者简介: 徐艳阳(1972-), 女, 博士, 副教授, 主要从事食品营养与安全研究

当中^[5]。微波杀菌机理的研究主要有热效应和非热效应两个方面。热效应理论认为, 微波的高频特性使其在穿透介质时, 水、蛋白质、核酸等极性分子受到交变电场作用而取向运动, 相互摩擦产生热量、温度升高, 导致微生物体内的核酸和蛋白质等分子的变性或失活, 从而达到杀灭微生物的效果^[6]。在以往的研究中, 人们将大部分的精力致力于研究微波致死的热效应, 目前这方面的研究工作及其应用已基本完善。同时, 有学者提出微波对细菌结构和功能的影响不仅存在着热效应^[7], 还存在非热效应^[8,9], 对菌类的杀灭是二者共同作用的结果^[10]。因此近年来, 人们越来越重

视微波非热效应的研究。微波的非热效应又称为生物学效应^[11],是指在没有明显温度变化或者温度处于亚致死的情况下,微生物细胞发生的生理、生化和功能上的变化。

通过前人的研究发现,微波对食品中的细菌^[12,13]和霉菌有杀菌作用的^[14,15],并且效果较好,但微波对菌体致死作用的机理还存在争议。杀菌过程中热效应是肯定的,但非热效应的影响还需要进一步研究。因此本文通过对微波处理前后玉米中霉菌的生长量、细胞膜的渗透性以及霉菌孢子表面形态变化等开展研究,探讨了微波杀灭玉米霉菌过程中的非热效应。

1 材料与方法

1.1 原料

1.1.1 原料及试剂

黑曲霉、烟曲霉、产黄青霉、桔青霉,由玉米分离纯化得到;硝酸钠、磷酸氢二钾、硫酸镁、氯化钾、硫酸亚铁、蔗糖均为分析纯试剂;使用的液体培养基为察氏培养基。

1.1.2 主要仪器设备

Dimension Icon 原子力显微镜,德国 Bruker 公司; BS-IE 震荡培养箱,国华电器有限公司; SW-CJ-1DF 洁净工作台,上海博讯实业有限公司医疗设备厂; JA3003A 电子精密天平,上海精天电子仪器有限公司; TU-1810 型紫外分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司; DSX-280A 不锈钢手提式高压灭菌锅,上海申安医疗器械厂; DDS-307 电导率仪,上海精密科学仪器有限公司; LD4-2A 低速离心机,北京雷勃尔离心机有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 霉菌生长量的测定

将霉菌孢子制成 $10^7 \sim 10^8$ CFU/mL 孢子悬液,微波处理后,取 0.5 mL 菌悬液接种于 50 mL 液体培养基中,接种量为 1%,28 °C 摇床培养 7 d,水浴处理做对照,每天对菌体称重,测定其生长量。

菌体生长量的测定:干重法测定霉菌生长量,将霉菌培养液真空抽提 5 min,然后用无菌水进行洗涤,洗涤三次后收集菌丝,置于 105 °C 烘箱中烘干至恒重,得到干燥菌体,称量重量 (g/50 mL)。

1.2.2 生长模型的拟合

微生物生长曲线表示微生物体生长过程中细胞数量与生长时间的关系。选取可描述种群增长的 Logistic 模型,来预测微波处理、水浴加热和未处理的

霉菌孢子生长情况。采用 Sigma Plot 2000 Demo 软件对生长曲线进行拟合。

1.2.3 霉菌孢子蛋白质和 DNA 吸光度值的测定

蛋白质和 DNA 分别在 280 nm 和 260 nm 波长处有最大吸收峰,其浓度与吸光度值成正比。以无菌生理盐水为参比液,将水浴和微波处理前后的孢子悬液离心,取上清液用紫外分光光度计分别在 280 nm 和 260 nm 波长下测定蛋白质和 DNA 的吸光度值。

1.2.4 霉菌孢子电解质渗透率的测定

将微波处理前后的孢子悬液静置 10 min,用玻璃棒搅动孢子悬液,在 20 °C~25 °C 恒温条件下测定电导率 (k_1)。测试后的菌悬液于 100 °C 沸水浴 15 min,使其组织内部的电解质全部渗出,再次测定其电导率 (k_2)。电解质渗透率的公式如下:

$$K = (k_1/k_2) \times 100\% \quad (1)$$

式(1)中, K 为电解质渗透率(%); k_1 为处理电导率($\mu\text{S}/\text{cm}$); k_2 为煮沸电导率($\mu\text{S}/\text{cm}$)。

1.2.5 原子力显微镜测定黑曲霉孢子的表面结构

原子力显微镜 (Atomic Force Microscope, AFM) 是一种纳米级高分辨率的扫描探针显微镜,其原理是利用微悬臂感受和放大悬臂上尖细探针与受测样品原子其利用原子、分子之间的相互作用来观察物体表面的形态,从而达到检测的目的,具有原子级的分辨率。原子力显微镜既可以观察导体,也可以观察非导体。

将黑曲霉孢子配成约 10^9 CFU/mL 的孢子悬液,在微波功率 119 W、微波时间 6 min、菌悬液 50 mL 情况下进行处理,处理后将孢子悬液滴于玻璃片上,置于无菌环境中自然风干,然后通过原子力显微镜对黑曲霉孢子形态以及基底上物质进行观察。原子力扫描电镜扫描范围为 $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$,扫描速度为 0.977 Hz,扫描点阵为 512。

1.2.6 数据分析

每次试验重复三次,应用 SPSS V17.0 对数据进行方差分析 (ANOVA),组间比较采用 LSD (Least-significant difference) 法, $p < 0.05$ 表示存在显著性差异。

2 结果与分析

2.1 霉菌生长量的测定

生长曲线的测定有利于观察菌株在生长过程中菌体密度的变化,进而掌握菌体活力的变化,由以往研究^[13]可知微波处理玉米黑曲霉时孢子致死率达到

90%，而温度则较低，为 45~50 ℃左右，将水浴温度选择 50 ℃。采用间歇式微波处理，将初始温度 20 ℃的孢子悬液微波处理 1 min（此时孢子悬液的温度为 47±2 ℃），迅速将其置于冰水内（约 30 s）冷却至初始值，然后将菌悬液再次置于微波炉内，反复 6 次。孢子悬液温度控制在 50 ℃以内。

微波和水浴处理对四种霉菌的生长量影响如图 1 所示。

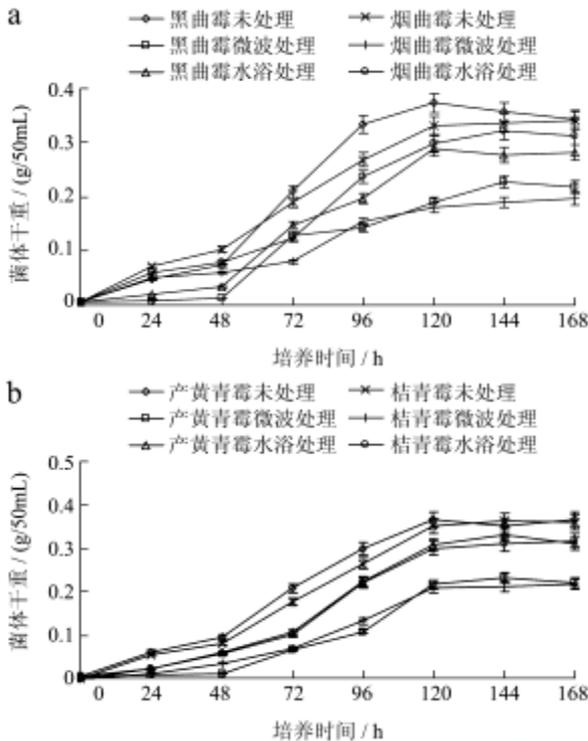


图 1 微波对霉菌生长量的影响

Fig. 1 Effect of mold growth by microwave treatment

由图 1a 可知，经微波和水浴处理后的曲霉孢子悬液，经过 7 d (168 h) 的培养，随着培养时间的延长，烟曲霉和黑曲霉的生长量先是快速增加而后变化缓慢，甚至有所下降；0~48 h 内为延滞期，此期间霉菌的生长较慢；从 48 h 进入对数期，此阶段菌体大量生长，而后菌体生长进入稳定期；144 h 进入衰亡期，霉菌的生长量有所降低。

由图 1b 可知，青霉经微波和水浴处理后，其延滞期要稍长，在 72 h 后进入对数期，此时生长速度较快，生长量增加；122 h 左右进入稳定期，此期间生长量变化不显著 ($p>0.05$)；从 144 h 生长量开始下降。对四种霉菌经水浴和微波处理后的生长量进行方差分析，F 值均大于 F_{α} (7.71)，说明水浴处理四种霉菌的菌体生长量与微波处理差异显著 ($p<0.05$)。同时由于两种处理方法的温度接近，说明在微波对霉菌致死的作用过程中，除热效应外。综上所述，水浴处理四种霉菌的菌体生长量明显高于微波处理，说明在微波对霉菌

致死的作用过程中，除热效应外，还存在非热效应；同时发现四种霉菌孢子的生长量有所不同，说明它们对温度的敏感程度存在差异。

2.2 生长模型的拟合

由于实验中霉菌生长的环境条件是有限的，其不可能无限制的生长，所以采用 Logistic 模型来预测四种霉菌孢子的生长情况。Logistic 种群生长模型方程的形式为：

$$N = \frac{K}{1 + \alpha e^{-rt}} \quad (2)$$

式(2)中 N 为 t 时刻的种群数量； K 在该条件下种群增长达到的最大值； α 是与 y 轴截距有关的参数； r 是自然增长速率。

对其进行求导之后，得到种群数量随时间的变化，即生长速率：

$$\frac{dN}{dt} = rN(1 - \frac{N}{K}) \quad (3)$$

由于上述公式中参数 α 显示的为函数图像与 y 轴关系，自然增长率 r 是在自然条件下菌体的生长速度，其值与菌体本身特性和外界环境条件相关，这两个值都不能直观的表达出种群的生长特性，而生长速率 dN/dt 又是与时间相关的变量，只能说明某一时刻菌体的生长速度，所以引进一个新的参数 t_0 ，将 Logistic 方程变型为：

$$N = \frac{A}{1 + (\frac{t}{t_0})^{-b}} \quad (4)$$

对公式(4)求导得到种群数量随时间的变化：

$$\frac{dN}{dt} = b \frac{N}{t} (1 - \frac{N}{A}) \quad (5)$$

由公式(5)的形式可看出，其与公式(3)的形式类似，式中 dN/dt 依然表示生长速率，其值也是与时间相关的函数， A 表示种群增长的最大值， b 是与自然生长速率相关的参数，并且与菌种类型有关。当 $t=t_0$ 时 $N=A/2$ ，即生长量达到最大值的 1/2，所以 t_0 表示生长量达到 1/2 最大值所用的时间，也称延缓时间或延滞期。通过四种霉菌水浴及微波处理后生长量的测定，对生长曲线进行拟合，其生长拟合曲线见图 2，模型参数见表 1。

由图 2 可看出，与未做处理的霉菌生长情况比较，同一种霉菌经过微波和水浴处理之后，菌体的生长量都明显减少，但依然遵循微生物生长的一般规律，存在停滞期、对数期以及稳定期。当菌体培养达到 144h 后，生长量开始出现下降。在菌体生长环境相同的情况下，经水浴和微波处理后霉菌孢子的生长量未能达

到种群可容纳的最大值就减少, 说明水浴和微波处理后菌体的生长动力下降, 对生长环境的利用率不足。相同条件下, 微波处理后的菌体生长量也低于水浴处理。

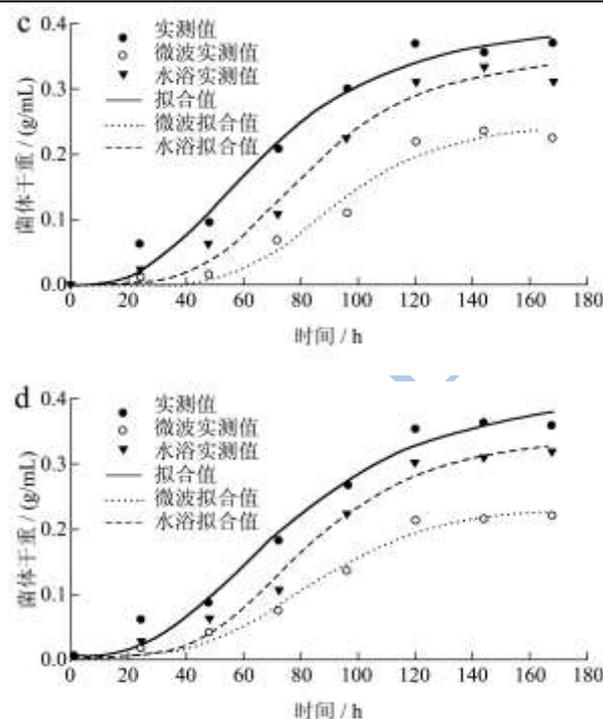
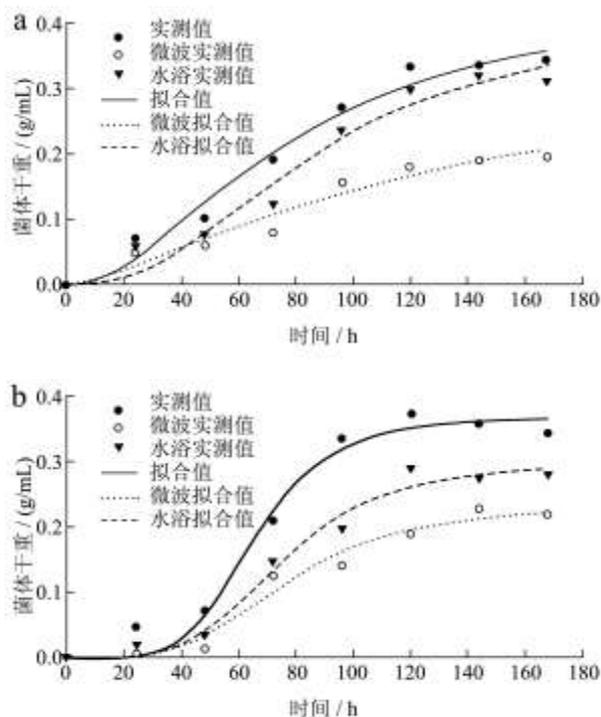


图2 霉菌生长模型

Fig. 2 Growth model of mold

注: a: 烟曲霉, b: 黑曲霉, c: 产黄青霉, d: 桔青霉。

表1 霉菌生长模型的拟合方程参数

Table 1 Simulation equation parameter of molds growth model

	烟曲霉			黑曲霉			产黄青霉			桔青霉		
	对照	水浴	微波	对照	水浴	微波	对照	水浴	微波	对照	水浴	微波
A	0.44	0.40	0.35	0.37	0.30	0.23	0.41	0.38	0.25	0.43	0.35	0.24
b	1.93	2.40	1.43	4.92	4.18	3.72	2.74	3.96	5.08	2.71	3.97	3.95
t_0	78.48	87.23	127.62	65.52	75.23	77.66	68.91	82.90	93.05	78.26	83.87	87.62

从表1可知, 霉菌在不同处理条件的作用下, 生长量最大值A也不同, 未处理>水浴处理>微波处理。说明相同温度的水浴和微波对菌体均有抑制作用。从延缓时间 t_0 可看出, 相同条件下微波处理后菌体的延缓时间长于水浴处理, 同样说明相同温度下微波对霉菌的抑制作用优于水浴处理, 间接说明了微波杀菌过程中存在一定的非热效应。

四种霉菌孢子经过微波和水域处理后在相同的环境条件下生长, 生长模型参数不同, 这是由于不同菌种的生长特性以及对热处理和辐射的抗性不同造成的。

2.3 蛋白质和DNA的吸光度值测定

图3~4为霉菌孢子细胞内蛋白质和DNA吸光度值。

由图3和4可以看出, 经过水浴和微波处理后的

四种霉菌, 其细胞均有蛋白质和核酸溢出, 水浴处理过的霉菌细胞溢出物相对少 ($p < 0.05$), 说明微波处理对细胞膜的破坏程度大于水浴, 这与微波电穿孔理论中提到的细胞在微波场作用下, 细胞膜较弱部分穿孔而引起细胞内溶物泄露一致。

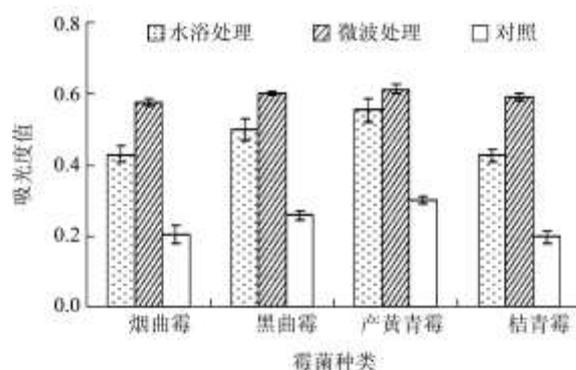


图3 霉菌蛋白质吸光度值

Fig.3 Absorbance value of molds protein

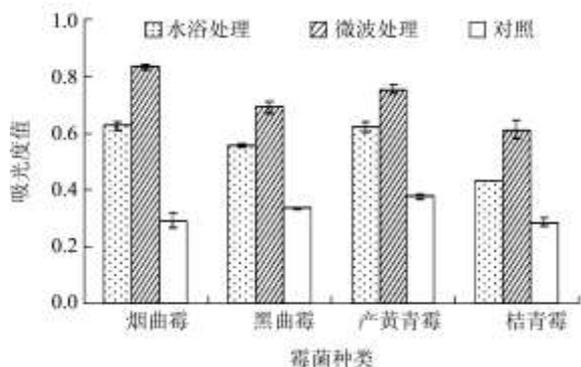


图4 霉菌DNA吸光度值

Fig.4 Absorbance value of molds DNA

2.4 电解质渗透率的测定

细胞膜通透性的增大是膜系统被破坏的表现之一，细胞膜通透性的大小可用电解质的渗透率即电导率来衡量。由图5看出四种霉菌在经微波处理之后的电解质渗透率都高于水浴处理 ($p < 0.05$)，这在一定程度上也可说明微波对霉菌细胞膜的损伤作用大于水浴处理。

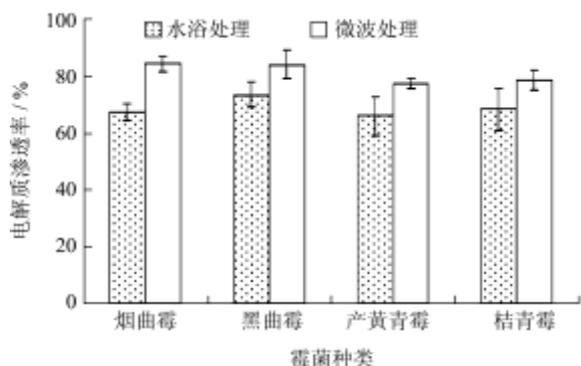


图5 霉菌电解质的渗透率

Fig. 5 Permeability of molds electrolyte

2.5 原子力显微镜观察的结果

应用原子力显微镜观察微波对细胞膜是否有破坏作用。通常霉菌孢子的表面是光滑且完整的，配成孢子悬液后细胞的内溶物质没有或极少渗出，孢子悬液风干后，基底（即承载样品的底片）中杂质较少，表面比较平整；若微波处理对细胞膜有破坏，处理后孢子细胞形态会发生变化，内溶物渗出，菌悬液风干后，细胞的渗出物粘合在基底上，基底上杂质变多，高度起伏明显。原子力显微镜观察结果见图6~7。

从图6可知，微波处理前黑曲霉孢子的形态完整，成球状或近球状，表面比较光滑平缓，没有明显褶皱；微波处理后的孢子表面则出现皱缩，形态变化较大，呈不规则形状，说明微波处理对霉菌孢子的表面形态产生破坏作用。

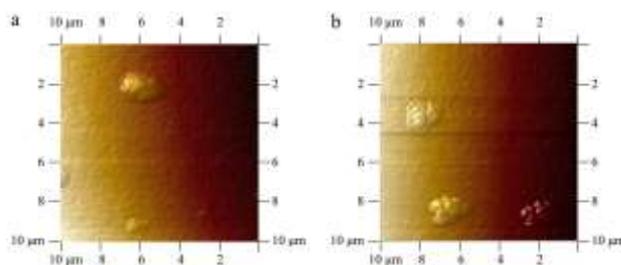


图6 微波处理前后黑曲霉孢子形态

Fig.6 Morphology of *A. nigers* spores before and after microwave treatment

注：a-微波处理前；b-微波处理后。

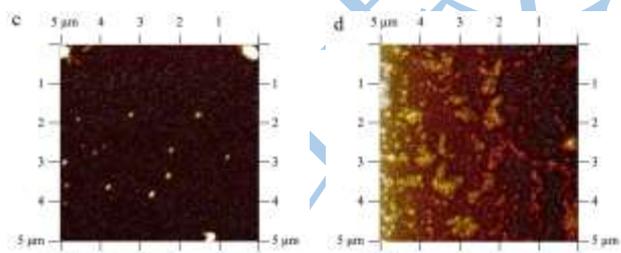


图7 黑曲霉孢子内溶物渗出情况

Fig.7 The situation of *A. nigers* spore content seeping

注：c-微波处理前；d-微波处理后。

由图7对基底的观察发现，微波处理前固定黑曲霉孢子的基底比较光滑平整，杂质较少；微波处理后基底杂质变多，表面起伏较大，可能是由于微波对黑曲霉孢子的细胞膜起到破坏作用，从而导致细胞内溶物的渗出，这与蛋白质、DNA的吸光度值以及电解质渗透率结果一致。

3 结论

对微波的非热效应进行探究，以未处理和50℃水浴处理做对照，分别对四种霉菌进行了生长模型预测，测定霉菌孢子DNA和蛋白质的吸光度值、电解质的渗透率，对霉菌孢子的表面和基底进行原子力显微镜观察，得出以下结论：

3.1 通过对四种霉菌的生长量测定可知，相同温度的水浴和微波处理对四种霉菌孢子的生长均有抑制作用，因菌种不同，抑制效果也有差异，但总体看来微波对霉菌的抑制效果优于水浴，说明微波对霉菌孢子的破坏作用除热效应外还存在非热效应；

3.2 通过微生物预测模型发现，虽然水浴加热和微波处理对菌体有抑制作用，但并未完全致死。菌体依旧遵循Logistic生长模型，存在延滞期、对数期和稳定期，但生长动力明显不足，延滞期增长，种群可容纳的最大值下降。结果还表明微波作用后，四种霉菌的延滞期均长于水浴作用，同时种群可容纳的最大值低

于水浴处理。

3.3 通过对微波和水浴处理前后霉菌孢子悬液的蛋白质、核酸吸光度值以及电导率的测定,发现二者能破坏霉菌细胞膜,导致菌体细胞膜的通透性发生变化,继而细胞内物质泄露,并且微波对细胞膜的破坏作用大于水浴;

3.4 利用原子力显微镜对黑曲霉孢子和基底基底观察的结果显示,微波处理后黑曲霉孢子形态发生变化,内容物渗出,与黑曲霉电导率的测定结果一致。

参考文献

- [1] 徐怀德,王云阳.食品杀菌新技术[M].北京,科学技术文献出版社,2005
XU Huai-de, WANG Yun-yang. Novel Technology of Sterilization for food [M]. Beijing, Scientific and Technical Documentation Press, 2005
- [2] Salazar-González C, San Martín-González M F, López-Malo A, et al. Recent studies related to microwave processing of fluid foods [J]. Food and Bioprocess Technology, 2012, 5(1): 31-46
- [3] Stephen N M, Shakila R J, Jeyasekaran G, et al. Effect of different types of heat processing on chemical changes in tuna [J]. Journal of Food Science and Technology, 2010, 47(2): 174-181
- [4] Vadivambal R, Jayas D S. Non-uniform temperature distribution during microwave heating of food materials-A review [J]. Food and Bioprocess Technology, 2010, 3(2): 161-171
- [5] Chandrasekaran S, Ramanathan S, Basak T. Microwave food processing-A review [J]. Food Research International, 2013, 52(1): 243-261
- [6] 李建忠.微波对食品微生物的非热生物效应与微波杀菌技术[J].西南民族大学学报:自然科学版,2006, 32(6): 1219-1222
LI Jian-zhong. Non-thermal biological effect of microwave on food microorganism and technology of microwave sterilization [J]. Journal of Southwest University for Nationalities: Natural Science Edition, 2006, 32(6): 1219-1222
- [7] Zieliński M, Ciesielski S, Cydzik-Kwiatkowska A, et al. Influence of microwave radiation on bacterial community structure in biofilm [J]. Process Biochemistry, 2007, 42(8): 1250-1253
- [8] Fang Y, Huang W, Xia Y. Consecutive microwave irradiation induced substrate inhibition on the enzymatic esterification [J]. Process Biochemistry, 2008, 43(3): 306-310.
- [9] 王萍,肖更生,张友胜,等.五花茶饮料微波杀菌技术研究[J].现代食品科技,2010,26(3):260-266
WANG Ping, XIAO Geng-sheng, ZHANG You-sheng, et al. Disinfection of floral herbal tea using microwave [J]. Modern Food Science and Technology, 2010, 26(3): 260-266
- [10] Vardaxis N J, Hoogeveen M M, Boon M E, et al. Sporidical activity of chemical and physical tissue fixation methods [J]. British Medical Journal, 1997, 50(5): 429-433
- [11] Laurence J A, French P W, Lindner R A, et al. Biological effects of electromagnetic fields-mechanisms for the effects of pulsed microwave radiation on protein conformation [J]. Journal of Theoretical Biology, 2000, 206(2): 291-298.
- [12] Shenga E, Singh R P, Yadav A S. Effect of pasteurization of shell egg on its quality characteristics under ambient storage [J]. Journal of Food Science and Technology, 2010, 47(4): 420-425
- [13] Giuliani R, Bevilacqua A, Corbo M R, et al. Use of microwave processing to reduce the initial contamination by *Alicyclobacillus acidoterrestris* in a cream of asparagus and effect of the treatment on the lipid fraction [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2010, 11(2): 328-334
- [14] 徐艳阳,于静,朱志红,等.微波杀灭玉米黑曲霉工艺优化[J].食品工业科技,2014,35(1):181-185.
XU Yan-yang, YU Jing, ZHU Zhi-hong, et al. Process optimization of killing *Aspergillus niger* isolated from corn by microwave treatment [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(1): 181-185.
- [15] 肖南,何建妹,李婷,等.三华李果糕的微波杀菌工艺研究[J].现代食品科技,2013,29(5):1093-1095
XIAO Nan, HE Jian-mei, LI Ting, et al. Microwave sterilization of Sanhuali cake [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(5): 1093-1095