

ИНАКТИВАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ В ЯБЛОЧНОМ ПЮРЕ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ВЫСОКОГО ДАВЛЕНИЯ

И.Н.Борисенко, Е.В.Ветрова, И.В.Нога, Е.Г.Панфилова, В.М.Шаталов

В последние годы в связи с развитием новой технологии стерилизации продуктов питания высоким давлением проводятся широкие исследования воздействия давления на различные биосистемы: микрофлору, витамины, ферменты и т.д. [1]. В работах [1, 2] было исследовано влияние высокого давления на инактивацию микроорганизмов и деградацию витамина С в вишневом соке. Там же в рамках кинетической модели первого порядка получены значения термодинамических параметров, определяющих константу скорости реакции как функцию давления, температуры и времени выдержки для процесса инактивации мезофильно-аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (МАФМ), плесневелых грибов, а также для деградации витамина С. Знание этих параметров позволяет оптимизировать процесс обработки высоким давлением.

Цель настоящей работы – выяснить насколько и почему меняются при изменении среды параметры, описывающие инактивацию МАФМ. Ответы на эти вопросы позволили бы планировать эксперимент или технологию обработки высоким давлением для неизученных объектов.

С этой целью мы исследовали влияние высокого давления на содержание микроорганизмов группы МАФМ в яблочном пюре, приготовленном из свежих яблок непосредственно перед опытами. Обработка высоким давлением (0-600МПа) проводилась при температуре $T = 30^{\circ}\text{C}$, с выдержкой $t = 20\text{min}$ (серия 1) и при температуре $T = 25^{\circ}\text{C}$; с выдержкой $t = 10\text{min}$ (серия 2), после чего изучался количественный и качественный состав микрофлоры яблочного пюре. Для исследования были приготовлены разведения 1:10, по 1мл которых высевали на МПА. Через 5 суток подсчитывали среднее арифметическое значение количества колоний (числа КОЕ) в 1мл сока. Результаты для двух серий опытов приведены в табл. 1.

Таблица 1. Числа КОЕ в обработанных давлением образцах яблочного пюре

P, МПа	Числа КОЕ, mL-1	
	$T = 30^{\circ}\text{C}$, $t = 20\text{min}$	$T = 25^{\circ}\text{C}$, $t = 10\text{min}$
0	2952	5328
200		3485
300	26,7	503
400	13,3	289
500	0.01	2
600		0.02

По данным серии 1 проведен качественный анализ микрофлоры яблочного пюре, для чего были выделены чистые культуры и описаны их культуральные особенности: форма, профиль, край, размер, поверхность, консистенция, структура и цвет колоний микроорганизмов. Затем изучили морфологические особенности клеток микроорганизмов (форма клеток, наличие жгутиков, способность к спорообразованию), окрасили исследуемые микроорганизмы по Грамму, исследовали потребность в кислороде, что, в конечном итоге, позволило нам идентифицировать выделенные культуры по определителю бактерий Берджи [1].

В результате проведенной работы удалось согласно [4-3] установить принадлежность полученных культур к следующим родам: *Acetobacter*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Zymomonas*, *Acidomonas*. Все

перечисленные микроорганизмы были найдены в контрольном образце яблочного пюре ($P = 0$). В образце, обработанном давлением 300МПа, обнаружено только 3 рода бактерий: *Flavobacterium*, *Zymomonas*, *Acidomonas*. В образце, обработанном 400МПа, выявлен всего 1 род бактерий: *Flavobacterium*. Интересно, что обнаруженные неспорообразующие бактерии выдерживают давление 300-400МПа, а *Bacillus*, который образует споры, чувствителен к этому давлению. Причина устойчивости бактерий родов *Acidomonas*, *Zymomonas*, выдерживающих гидростатическое давление в 300МПа, на наш взгляд, лежит в том, что они принадлежат к ацидофильной микрофлоре. Стойкость *Flavobacterium* обусловлена тем, что среди бактерий этого рода есть представители экстремально-термофильной микрофлоры, а термостойкие бактерии, как правило, более компрессионно устойчивы [5].

Считается, что процесс инактивации обусловлен, в основном, денатурацией белков и потому протекает как химическая реакция первого порядка [3, 4]. Для описания кинетики инактивации нам необходимо было найти предэкспоненциальный множитель A , активационный барьер реакции U_0 и изменение объема ΔV , входящие в уравнение Аррениуса для константы скорости реакции:

$$k = A \exp\left(-\frac{U_0 + P\Delta V}{RT}\right) \quad (1)$$

Эти параметры находились из решения методом наименьших квадратов переопределенной системы уравнений:

$$\ln(A) - \frac{1}{RT_i} U_0 - \frac{P_i}{RT_i} \Delta V = \ln \left[-\ln \left(\frac{C_i}{C_0} \right) \right] - \ln(t_i), \quad i = 1..N_{\text{exp}} \quad (2)$$

где N_{exp} – число экспериментальных точек, для которых измерены давление P_i , температура T_i , время выдержки t_i и относительные значения чисел КОЕ C_i/C_0 . Найденные значения параметров приведены в табл. 2. Как видно из таблицы, параметры для случая яблочного пюре близки к результатам, полученным в [3] для вишневого сока. Обращает на себя внимание небольшое уменьшение активационного барьера U_0 и выигрыша молярного объема – ΔV .

Таблица 2. Параметры инактивации МАФМ

Объект	$\ln(A \cdot l \text{ sec})$	U_0 , kcal/mol	ΔV , mL/mol
МАФМ в яблочном пюре	13.2	13.4	-25.1
МАФМ в вишневом соке [3]	13.5	15.9	-35.5

На рис. 1 представлены результаты сравнения экспериментальных и расчетных относительных чисел КОЕ для случаев $T = 30^\circ\text{C}$, $t = 20\text{min}$ (серия 1) и $T = 25^\circ\text{C}$, $t = 10\text{min}$ (серия 2), полученных в настоящей работе, а также кривые, рассчитанные по данным [3] для вишневого сока. Из рисунка видно, что имеет место вполне удовлетворительное согласие теории с опытом для обеих серий. Однако в обоих случаях имеется заметный сдвиг в сторону меньших давлений (примерно на 150МПа) относительно кривых для вишневого сока. Как видно, небольшие сдвиги параметров (Табл. 2) приводят к заметным отличиям расчетных кривых, что связано с двойным потенцированием этих сдвигов.

Следует отметить, что набор параметров $\{\ln(A), U_0, \Delta V\}$ дает приближенное усредненное описание процесса инактивации целой группы микроорганизмов, существенно различающихся по чувствительности к давлению. Это возможно лишь в том случае, если в основе инактивации лежит какой-то общий для всех микроорганизмов процесс. Как мы полагаем, таким процессом является денатурация белков под давлением [3]. Процессы денатурации и выживаемость микроорганизмов в целом, при прочих равных условиях, определяются, прежде всего, кислотностью среды. Хорошо известно, что скорость инактивации микроорганизмов давлением растет с понижением рН [5]. В связи с этим наблюдаемый сдвиг кривых в сторону меньших давлений обусловлен, по-видимому, разными значениями кислотности в яблочном пюре (рН=5.3) и в вишневом соке (рН=6.1).

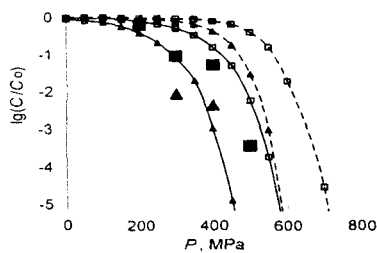


Рис. 1. Логарифм относительных чисел КОЕ в зависимости от давления P для случаев $T = 30^\circ\text{C}$, $t = 20\text{min}$ (\blacktriangle – эксперимент, сплошная линия с треугольниками – наш расчет, штриховая – расчет по [3]) и $T = 25^\circ\text{C}$, $t = 10\text{min}$ (\blacksquare – эксперимент, сплошная линия с квадратами – наш расчет, штриховая – расчет по [3])

Таким образом, мы показали, что набор параметров $\{\ln(A), U_0, \Delta V\}$, описывающих кинетику инактивации микроорганизмов, можно использовать для оценки воздействия высокого давления на микроорганизмы в разных средах, учитывая при этом изменение кислотности. Для сред с меньшими рН таким способом можно получить оценку сверху, а для сред с большими рН – оценку снизу. Величины давления 400 и 500МПа являются критическими для полной стерилизации яблочного пюре при $T = 30^\circ\text{C}$, $t = 20\text{min}$ и $T = 25^\circ\text{C}$, $t = 10\text{min}$ соответственно.

РЕЗЮМЕ

Досліджено вплив високого тиску (0-600МПа) на інактивацію мікроорганізмів в яблочному пюре. Кінетика інактивації описана у межах реакції першого порядку, отримано термодинамічні параметри, що визначають константу швидкості по Ареніусу. Показано, що цей набір можна використовувати за для оцінки впливу високого тиску на мікроорганізми у різних середовищах з урахуванням змін кислотності.

SUMMARY

High pressure (0-600MPa) processing effects on inactivation of microorganisms in pureed apple were investigated. The inactivation kinetics in the first order reaction was applied to get the thermodynamic parameters set. It was shown that the set may be used to estimate the high pressure effects on inactivation of microorganisms in different environment if the current pH is accounted.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРЫ

1. Определитель бактерий Бердже: В 2 т. / Под ред. Хоулта Дж. и др. – М.: Мир, 1997. – 189 с.
2. Жизнь растений. Т.1. Введение. Бактерии и актиномицеты / Под ред. Н.А.Красильникова, А.А.Уранова. – М.: Просвещение, 1974. – 487 с.
3. Жизнь растений. Т.2. Грибы / Под ред. М.В. Горленко. – М.: Просвещение, 1976. – 478 с.
4. Prehoda K. E., Mooberry E. S., Markley J. L. High Pressure Effects on Protein Structure, In Protein Dynamics, Function and Design (O. Jardetzky and J.-F. Lefevre, Eds.), NATO ASI Series, Plenum Press, pp. 59-86 (1998).
5. Heremans K. High pressure effects on biomolecules // Leward D.A., Jonson D.E., Hasting A.P. (eds) High pressure Processing of Foods. – England: Nottingham Univesiti Press, 1995. – P.81-97.

Надійшла до редакції 17.11.2006 р.