

磁感应电场低温杀菌系统的应用案例

张令涛¹, 薛丽萍¹, 郑子涛¹, 王婷¹, 杨哪^{1,2}

(1.江南大学 食品学院, 无锡 214000; 2.英都斯特(无锡)感应科技有限公司, 江苏 无锡 214000)

摘要: 杀菌是液态食品加工中最为关键的一环。磁感应电场作为一种新型物理场技术, 对灭活液态食品中的致病菌具有潜在应用价值。本文应用磁感应电场低温杀菌系统(MIH-S6)对液态食品中的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌进行灭活效果验证和简易机理分析, 对比了不同磁感应电场处理时间下的杀菌效果以及不同液态食品的杀菌应用案例, 并且对磁感应电场灭活两种致病菌的机理进行了简要阐述, 拓展了液态食品杀菌的新技术新方法, 为今后该设备的应用提供技术支持。

关键词: 感应电场; 液态食品; 灭活; 大肠杆菌; 金黄色葡萄球菌

Application case of magnetic induction electric field low-temperature sterilization system

Zhang Lingtao¹, Xue Liping¹, Zhang Zitao¹, Wang Ting¹, Yang Na^{1,2}

(1. School of food science and technology, Jiangnan University, Wuxi 214000, China; 2. Induce-Tech Co., Ltd, Wuxi, 214000, China)

Abstract: Sterilization is the most critical part of liquid food processing. Magnetic induction electric field, as a novel physical field technology, has potential applications for inactivating pathogenic bacteria in liquid foods. In this paper, the magnetic induction electric field low-temperature sterilization system (MIH-S6) is used to verify the inactivation effect and simple mechanism of *E. coli* and *S. aureus* in liquid foods. The sterilization effects of different duration and the sterilization application cases of different liquid foods were compared, and the inactivation mechanism of two pathogenic bacteria under magnetic induction electric field was briefly described. This case expands the new technology of liquid food sterilization and provides technical support for the application of this equipment in the future.

Keywords: Induced electric field; liquid foods; Inactivation; *E. coli*; *S. aureus*

1 仪器设备

磁感应电场低温杀菌系统（MIH-S6）如图 1 所示，其包括：储料罐、泵送系统、电场处理系统、散热系统、冷凝系统以及无菌罐装系统。应用范畴包括：液态食品（牛奶、果蔬汁、茶饮、蛋液等），调味品（酱油、食醋、酱料等）以及酒水（果酒、黄酒、啤酒等）的杀菌处理。

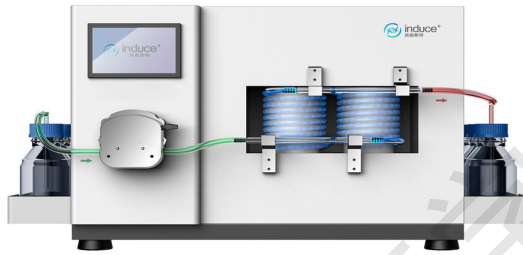


图 1 磁感应电场低温杀菌系统（MIH-S6）

磁感应电场低温杀菌系统（MIH-S6）相关技术参数如表 1 所示，具备激励电压、频率、电场强度、电流密度可调，根据物料特点选择相关处理方式和处理量。

表 1 磁感应电场低温杀菌系统—技术参数

指标	仪器性能
激励电压	0-800 V
频率	30-80 kHz
磁感应电流密度	0-20 A/cm ² （热效应）
磁感应电场强度	0-200 V/cm ² （非热效应）
处理方式	间歇式/连续式
处理量	0-3000 mL/min (0-180 L/h)

2 前处理流程和分析方法

2.1 处理流程

将培养至对数期的大肠杆菌或金黄色葡萄球菌分别接种于无菌液态食品（牛奶、橙汁及生理盐水）中，使得液态食品中的菌浓度在 7-8 Log CFU/mL 范围之内。将上述液态食品注入储料罐，在泵送系统作用下将料液输送至电场处理系统，在其中完成电热双重作用，实现快速低温的杀菌效果；然后液态料液进入冷凝系统完成迅速降温过程，再进入无菌罐装系统，

完成整个杀菌流程；处理后的料液用于各指标的测定分析。

2.2 处理参数和条件

根据不同液态食品的属性不同，来设置不同的电场处理参数和条件。牛奶的电导率较低但其固形物含量较高；橙汁的电导率较高且属于酸性饮料；生理盐水的电导率最高；三种料液的具体处理参数如表 2 所示：

表 2 不同料液的磁感应电场处理参数

样品	激励电压	频率	占空比	泵速
牛奶	300 V	50 kHz	50 %	20-50 mL/min
橙汁	300 V	50 kHz	50 %	20-50 mL/min
生理盐水	250 V	50 kHz	50 %	20-50 mL/min

2.3 分析方法

2.3.1 平板计数

参考 GB 4789.3-2016 食品安全国家标准-食品微生物学检验-大肠菌群计数，进行大肠杆菌平板计数；参考 GB 4789.10-2016 食品安全国家标准-食品微生物学检验-金黄色葡萄球菌计数，进行金黄色葡萄球菌平板计数。

2.3.2 微生物表面形态及内部结构检测

使用 SEM 和 TEM 评估感应处理对微生物细胞表面形态及内部结构的影响，参考 Wang (2018) 和 Calderón-Miranda (1999) 等所述，并进行了一些修改。取 10 mL 菌液于 15 mL 的离心管中，在 8000 rpm，4 °C 条件下离心 10 min；取出样品，弃上清，加入 5 mL 2.5% 的戊二醛（不透明离心管进行保存）进行固定，吹稀，漩涡震荡 5 min，放在 4 °C 冰箱，黑暗处理 2 h；戊二醛溶液固定 2 h 后，在 8000 rpm，4 °C 条件下离心 10 min；取出样品，弃掉上层戊二醛溶液，加入 10 mL 的生理盐水，漩涡震荡 10 min，在 8000 rpm，4 °C 条件下离心 20 min，弃上清；如此重复清洗 3 次。首先加入 5 mL 30% 的乙醇溶液，漩涡震荡 5 min，然后静置 5 min，在 8000 rpm，室温条件下离心 5 min；依次加入其他体积分数的乙醇溶液（30%、50%、70%、80%、90%、95% 和 100% 的乙醇溶液）进行脱水；把样品放在 200 目的铜网上，进行临界点干燥；然后进行镀膜（喷金）处理，进行 SEM 成像。同上，将梯度乙醇脱水后的样品在混合溶液（乙醇：环氧树脂=1：1）中浸泡 24 h；再用纯包埋液（100% 环氧树脂）浸透过夜，并在 60 °C 下聚合 48 h。用超薄切片机切成约 50 nm 的薄片，再用 3% 醋酸铀酰和 3% 柠檬酸铅进行染色处理，进行 TEM 成像。

2.3.3 微生物酯酶活性及亚致死损伤检测

使用流式细胞仪评估感应处理对微生物细胞内酯酶活性和亚致死损伤的影响, 参考 Li (2017) 等所述, 并进行了一些修改。通过 PI&5-cFDA 双重染色进行 FCM 分析, 染色程序描述如下: 取 1 mL IEF 处理前后的菌液, 在 8000 rpm、4°C 下离心 5 分钟, 并用 0.85% 无菌生理盐水洗涤三次, 然后再次悬浮。将洗涤后的细菌悬液与 100 μ L 5-cFDA 染色剂 (0.1 mg/mL) 混合, 在 37°C 黑暗处孵化 30 min, 并用无菌生理盐水洗涤两次以去除上清液中过量的 5-cFDA 染料。随后进行 PI 染色, 染色过程以及洗涤过程与上述 PI 单一染色过程一致, 最终进行 FCM 分析。将处理好的样品转入流式管中, 5-cFDA 染色的细胞在 516 nm 处发绿色荧光 (FL1), PI 染色的细胞在 647 nm 处发红色荧光 (FL3)。对于数据采集, 每个样本收集了 10000 个细胞事件, 对应于低流速下 400-600 个细胞/秒。流式数据通过 flowJo-V10 软件进行分析。

3 不同微生物在磁感应电场中的杀菌案例分析

3.1 橙汁体系中大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的杀菌效果及分析

表 3 显示了不同磁感应电场时间处理后, 橙汁体系中大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的存活情况。两种微生物暴露于感应电场后都发生了显著失活现象, 且随着处理时间的延长, 失活水平越高。磁感应电场处理 14 s 后, 橙汁中的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌分别减少了 7.202 和 6.861 Log CFU/mL, 都处于未检出状态。以上结果表明, 磁感应电场低温杀菌系统对橙汁体系中的两种致病菌都具有显著灭活效果, 在短的时间内和温度较低的情况下即可达到商业无菌的要求。

表 3 橙汁体系中微生物的杀菌效果

实时温度 (°C)	时间 (s)	大肠杆菌 (Log CFU/mL)	金黄色葡萄球菌 (Log CFU/mL)
25	0	7.202 \pm 0.227 a	6.861 \pm 0.166 ^a
62	8.4	5.949 \pm 0.065 b	5.950 \pm 0.129 ^b
64	10.5	3.817 \pm 0.180 c	3.967 \pm 0.108 ^c
66	12	1.962 \pm 0.166 d	1.733 \pm 0.320 ^d
68	14	0.000 \pm 0.000 e	0.000 \pm 0.000 ^e
70	16.8	0.000 \pm 0.000 e	0.000 \pm 0.000 ^e

注: 数据表示三次重复的平均值 \pm 标准偏差。同一列中不同字母的 a-g 表示不同处理之间存在显著差异(P < 0.05)。

3.2 牛奶体系中大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的杀菌效果及分析

表 4 显示了不同磁感应电场时间处理后,牛奶体系中大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的存活情况。两种微生物暴露于感应电场后都发生了显著失活现象,且随着处理时间的延长,失活水平越高。磁感应电场处理 21 s 后,橙汁中的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌分别减少了 7.226 和 6.724 Log CFU/mL,都处于未检出状态。值得注意的是,与橙汁体系相比,牛奶体系中的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌对感应电场更具抗性,这主要是因为牛奶中的蛋白质、脂肪等成分对两种致病菌形成保护作用,因此需要更长的处理时间来达到相同的灭活效果。以上结果表明,磁感应电场低温杀菌系统对牛奶体系中的两种致病菌都具有显著灭活效果,在短的时间内和温度较低的情况下即可达到商业无菌的要求。

表 4 牛奶体系中微生物的杀菌效果

实时温度 (°C)	时间 (s)	大肠杆菌 (Log CFU/mL)	金黄色葡萄球菌 (Log CFU/mL)
25	0	7.226±0.280 a	6.724±0.035 a
62	8.4	6.046±0.147 b	6.396±0.094 b
64	10.5	4.700±0.163 c	5.067±0.071 c
66	12	3.021±0.161 d	4.436±0.054 d
68	14	2.678±0.077 d	2.327±0.028 e
70	16.8	1.603±0.084 e	1.651±0.069 f
72	21	0.000±0.000 f	0.000±0.000 g

注:数据表示三次重复的平均值±标准偏差。同一列中不同字母的 a-g 表示不同处理之间存在显著差异($P < 0.05$)。

3.3 生理盐水体系中大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的杀菌效果及分析

生理盐水作为一种重要的缓冲溶液被用来探究杀菌效果和感应电场致死的简单原理。表 5 显示了不同磁感应电场时间处理后,生理盐水体系中大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的存活情况,两种微生物暴露于感应电场后其失活水平与橙汁、牛奶体系中的趋势相同。而且由于生理盐水中离子浓度较高、电导率增加等原因,导致两种致病菌更容易被灭活。

表 5 生理盐水体系中微生物的杀菌效果

实时温度 (°C)	时间 (s)	大肠杆菌 (Log CFU/mL)	金黄色葡萄球菌 (Log CFU/mL)
25	0	7.486±0.007 a	7.104±0.039 a
62	8.4	6.811±0.017 b	6.597±0.045 a
64	10.5	4.130±0.016 c	5.515±0.346 c
66	12	2.097±0.025 d	2.904±0.523 e
68	14	0.000±0.000 e	0.000±0.000 e
70	16.8	0.000±0.000 e	0.000±0.000 e

注：数据表示三次重复的平均值±标准偏差。同一列中不同字母的 a-g 表示不同处理之间存在显著差异(P < 0.05)。

如图 2A 和 B 所示，磁感应电场破坏了大肠杆菌的细胞形态和膜完整性，使得膜表面出现更多不规则的突起和孔洞；同时对细胞质结构和亚显微结构也具有破坏作用。图 2C 和 D 显示了磁感应电场处理后，细胞膜通透性的变化，可以看出磁感应电场处理后绿色荧光及强度降低，而红色荧光及强度显著升高，表明磁感应电场也通过电穿孔效应来灭活大肠杆菌。

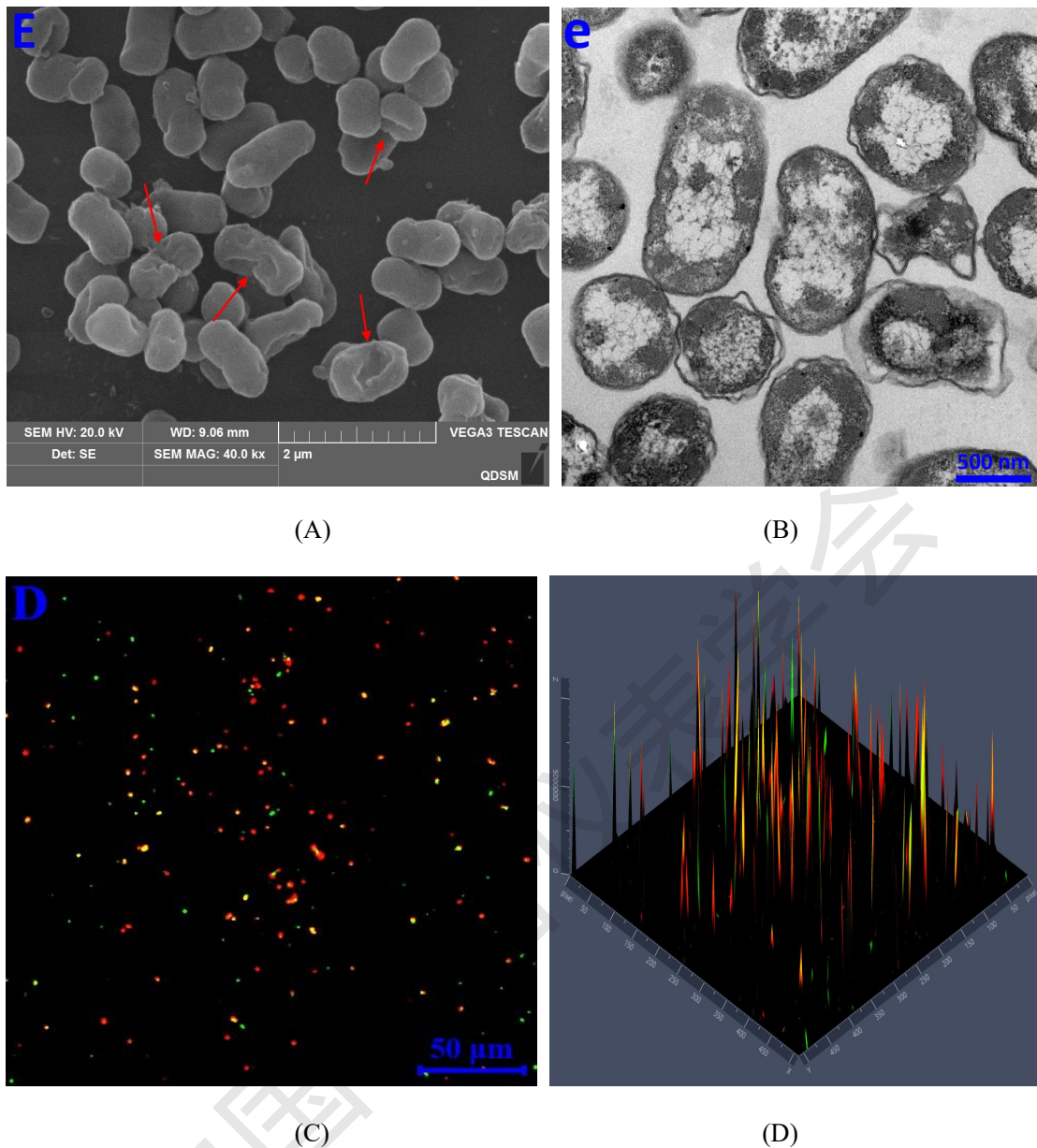


图 2 A: 大肠杆菌的 SEM 成像图; B: 大肠杆菌的 TEM 成像图; C: 大肠杆菌的 CLSM 成像图; D: CLSM 的荧光强度成像。

如图 3A 和 B 所示, 磁感应电场处理后金黄色葡萄球菌的细胞形态和膜完整性遭到严重破坏, 细胞表面出现更严重的破裂、塌陷和不完整, 塌陷的细胞膜上产生许多不规则的孔; 同时细胞边缘结构模糊, 细胞壁膜被溶解, 细胞质混浊, 致密的微结构变得松散, 表明亚显微结构遭到破坏。图 3C 显示了磁感应电场处理后, 细胞膜通透性的变化, 可以看出磁感应电场处理后绿色荧光细胞百分比下降, 红色荧光细胞百分比略有增加, 表明磁感应电场也通过电穿孔效应来灭活金黄色葡萄球菌。图 3D 显示了流式细胞仪分析结果, Q2 区大量细胞的聚集证明了亚致死损伤的存在, 也就是说磁感应电场通过不同的细胞状态使得金黄色葡萄球菌最终走向死亡。

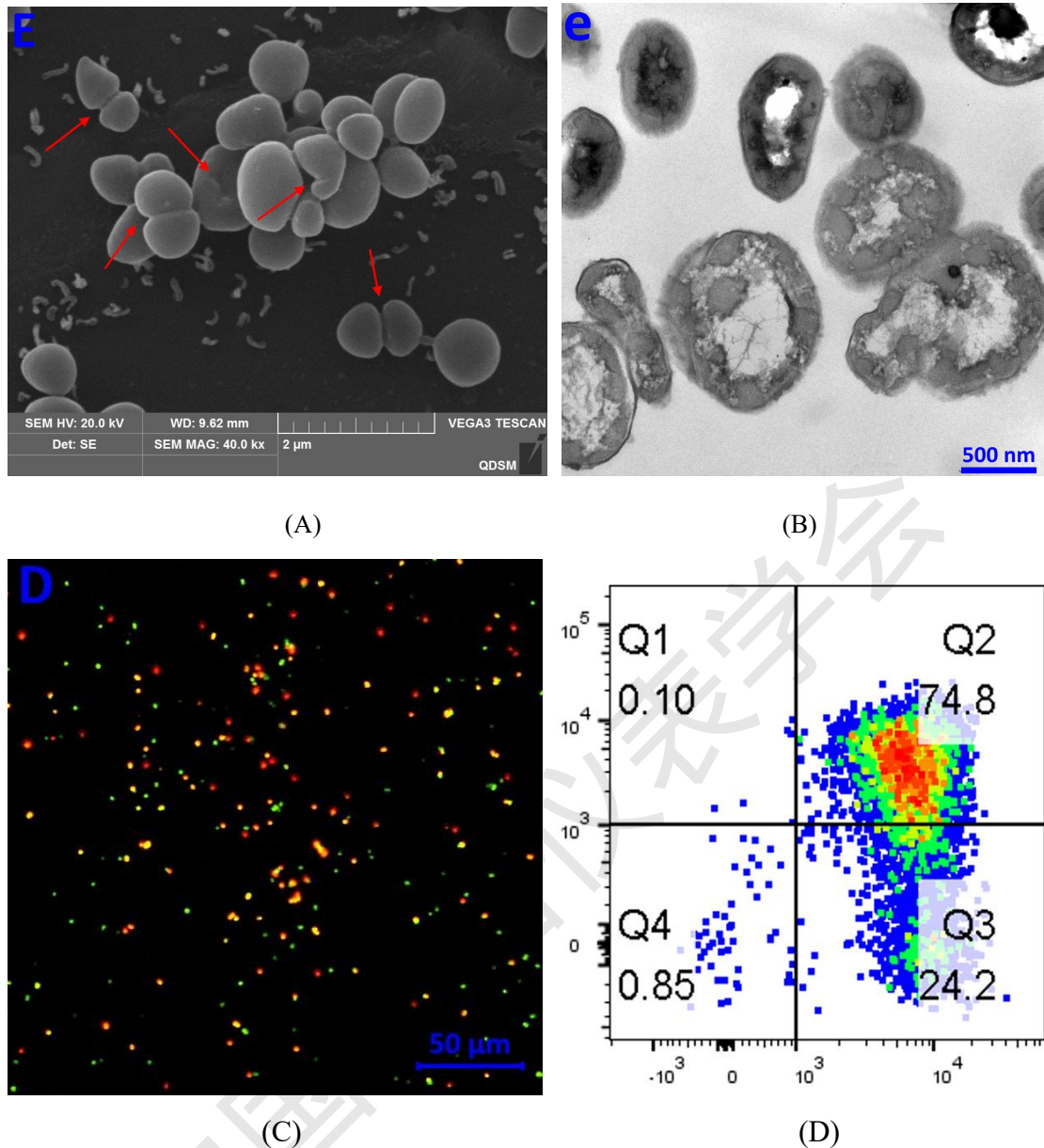


图3 A: 金黄色葡萄球菌的 SEM 成像图; B: 金黄色葡萄球菌的 TEM 成像图; C: 金黄色葡萄球菌的 CLSM 成像图; D: 金黄色葡萄球菌的 FCM 结果;

参考文献:

- [1] GB/T 4789.3-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群计数[S]
- [2] GB/T 4789.10-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验[S].
- [3] Wang, L.-H., Zeng, X.-A., Wang, M.-S., Brennan, C. S., & Gong, D. Modification of membrane properties and fatty acids biosynthesis-related genes in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*: Implications for the antibacterial mechanism of naringenin[J]. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 2018, 1860(2), 481–490.

- [4] Calderón-Miranda, M. L., Barbosa-Cánovas, G. V., & Swanson, B. G. Transmission electron microscopy of *Listeria innocua* treated by pulsed electric fields and nisin in skimmed milk[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1999, 51(1), 31–38.
- [5] Li, J., Ding, T., Liao, X., Chen, S., Ye, X., & Liu, D. Synergetic effects of ultrasound and slightly acidic electrolyzed water against *Staphylococcus aureus* evaluated by flow cytometry and electron microscopy[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2017, 38, 711–719.

中国仪器仪表表学会