

PACS: 81.40.Vw, 82.40.-g

И.В. Нога, В.М. Шаталов

РОСТ КИСЛОТНОСТИ СРЕДЫ ПОД ДАВЛЕНИЕМ КАК ФАКТОР ИНАКТИВАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Донецкий национальный университет
ул. Щорса, 46, г. Донецк, 83050, Украина
E-mail: nogainna@mail.ru

Установлено влияние кислотности среды на степень деградации витамина С под давлением и на пороговые значения давления, инактивирующего микроорганизмы. Показано, что механизм инактивации микроорганизмов высоким давлением может быть обусловлен сопутствующим ростом кислотности среды. Критические для многих микроорганизмов значения давления ~ 500 МПа (при 25°C) или температуры стерилизации $\sim 60^\circ\text{C}$ (при $P = 0$) вызывают одинаковое уменьшение равновесного рН воды и соответствуют выходу за границы кислотного оптимума.

В настоящее время проводятся широкие исследования эффектов и механизмов действия высокого давления на биосистемы, поскольку оно используется как инструмент обратимой денатурации белков [1], а также в связи с развитием новой технологии стерилизации высоким давлением продуктов питания, которая в отличие от термообработки сохраняет свежесть и другие пищевые качества продуктов [2]. В нашей предыдущей работе [3] было изучено влияние высокого давления на инактивацию микроорганизмов и деградацию витамина С в вишневом соке, получены значения термодинамических параметров, которые определяют константу скорости инактивации как функцию давления, температуры и времени выдержки. В [4] на примере яблочного пюре было показано, что найденные параметры инактивации мезофильно-аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (МАФАМ) можно использовать (при учете изменения кислотности) для оценки эффектов влияния высокого давления в разных средах. Знание этих параметров позволяет оптимизировать процесс обработки высоким давлением.

Цель настоящей работы – изучить возможную роль изменения кислотности в механизме инактивации микроорганизмов под давлением. С этой целью проанализируем имеющиеся сведения о влиянии кислотности среды на инактивацию микроорганизмов, сопоставим наши данные о взаимосвязи критического давления и кислотности среды в процессах инактивации неко-

торых микроорганизмов, экспериментально проверим влияние изменения кислотности на деградацию витамина С под давлением, обсудим физические причины изменения кислотности под давлением и, наконец, сделаем выводы об опосредованном инактивирующем действии на микроорганизмы повышенной температуры и давления через увеличение кислотности среды.

Давно установлено, что концентрация водородных ионов играет роль фактора, определяющего границы существования живой материи [5]. Многие экспериментальные работы показывают, что кислотность пищевой среды существенно влияет на степень инактивации микроорганизмов под действием высокого давления. В [6] приведены результаты исследования баротолерантности *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* и *Staphylococcus epidermidis* в различных средах (агар, бульон, яблочный джем и сок). Показано, что pH среды играет очень важную роль в разрушении микробов: *S. epidermidis* ингибировалась более чем на 90% при 300 МПа за 11.2 min при $pH = 7.2$ и за 4.8 min при $pH = 4.0$. Исследования, проведенные на *B. subtilis* [7], показали, что сопротивление бактерий влиянию давления уменьшалось, когда понижался pH молока, и что выживаемость *B. subtilis* при заданном pH может изменяться с изменением давления и температуры обработки. В [8] показано, что кислотные значения pH среды могут быть причиной инактивации поврежденных давлением клеток. Воздействие на культуру *Escherichia coli* 0157H:7 давления 400 МПа в течение 10 min и последующее ее выдерживание в среде с pH между 7.0 и 3.5 показало, что наиболее заметный рост инактивации наблюдается при $pH = 4.5$ и ниже [9].

В [10] величина внутриклеточного pH была измерена непосредственно в процессе обработки клеток давлением. Были определены внутренние pH *Lactococcus lactis* и *Lactobacillus plantarum* в процессе и после обработки давлением 200 и 300 МПа при величинах pH от 4.0 до 6.5. Инактивация давлением происходила быстрее при pH в интервале от 5 до 4. Авторы высказывают предположение, что гидростатическое давление может воздействовать на внутриклеточный pH микроорганизма через усиление диссоциации слабых органических кислот, увеличение проницаемости цитоплазматических мембран и инактивацию энзимов, необходимых для гомеостаза pH . Как следует из настоящей работы, есть основания считать, что основной причиной изменения кислотности может быть сдвиг равновесного значения pH водной среды под действием высокого давления.

Мы исследовали влияние высокого давления на инактивацию МАФМ в вишневом соке [3] с $pH = 6.1$ и в яблочном пюре [4] с $pH = 5.3$. После обработки высоким (0–600 МПа) давлением изучали количественный и качественный состав микрофлоры образцов. На рис. 1 представлены кривые, интерполирующие наши экспериментальные данные для разных температур T и экспозиций t . Как видно, имеет место существенный сдвиг кривых в сторону меньших (примерно на 150 МПа) давлений при увеличении кислотности образца на 0.7 от $pH = 6.1$ в вишневом соке до $pH = 5.4$ в яблочном пюре.

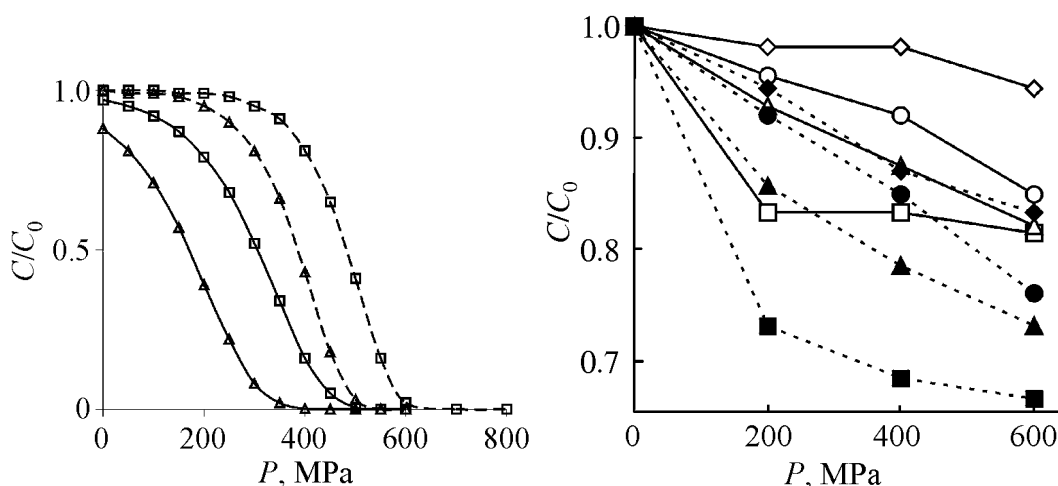


Рис. 1. Выживаемость МАФАМ (относительные числа КОЕ) в зависимости от давления P в вишневом соке [3] (штриховые кривые) с $pH = 6.1$ и в яблочном пюре [4] (сплошные) с $pH = 5.3$ для случаев $T = 30^\circ\text{C}$, $t = 20 \text{ min}$ ($-\Delta-$) и $T = 25^\circ\text{C}$, $t = 10 \text{ min}$ ($-\square-$)

Рис. 2. Зависимость остаточной концентрации витамина С в воде ($-\diamond-$) и растворах различной кислотности ($-\square-$ – $pH = 6$, $-\Delta-$ – 5 , $-\circ-$ – 4) от величины давления и времени обработки (светлые символы – 5 min , темные – 15 min)

Этот результат подтверждает факт роста скорости инактивации микроорганизмов под давлением при понижении pH [11]. Величина сдвига также согласуется с данными [11], согласно которым кислотность пищевых продуктов увеличивается от 0.2 до 0.5 единиц pH на каждые 100 МПа.

В отличие от микроорганизмов витамин С стабилизируется при повышении кислотности среды. Мы исследовали влияние давления на содержание витамина С в средах различной кислотности с целью установить возможный разброс показателей деградации витамина С под давлением в различных пищевых продуктах. В качестве растворителей использовали буферные растворы с $pH = 4, 5, 6$ (цитрат и лимонную кислоту) и воду. Образцы подвергали воздействию высокого давления 200, 400 и 600 МПа с экспозицией 5 и 15 min, после чего проводили измерения остаточной концентрации витамина С согласно [12]. Результаты измерений, представленные на рис. 2, показывают, что воздействие высокого давления на растворы с большим pH приводит к большей деградации витамина С. Тот же эффект дает увеличение времени обработки давлением. При этом кривая, описывающая концентрацию витамина С в воде, для обеих выдержек проходит выше кривой с повышенными значениями кислотности. Можно предположить, что вода под давлением действует как самый кислый буферный раствор.

Рост кислотности пищевых продуктов с увеличением давления согласуется с хорошо изученным повышением диссоциации молекул воды при росте давления и температуры [13,14]. Данные о диссоциации воды при различных давлениях и температурах можно интерполировать, используя условие термодинамического равновесия нейтральных и ионизированных молекул

воды. В результате для ее водородного показателя получаем формулу, применимую при давлениях до 1000 МПа и температурах до 100°C:

$$pH = -\lg e \frac{1}{RT} (\Delta U + T\Delta S + P\Delta V + P^2\Delta V'), \quad (1)$$

где изменение свободной энергии $\Delta U = 6.4 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, энтропии $\Delta S = 0.0106 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$, объема $\Delta V = 12 \text{ mL}\cdot\text{mol}^{-1}$ и производной объема по давлению $\Delta V' = 0.0055 \text{ mL}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{MPa}^{-1}$. На рис. 3 приведена зависимость равновесного значения pH от давления и температуры. Как видно из графика, подъем давления на 100 МПа уменьшает pH примерно так же, как подъем температуры на 10°C. Исходя из (1), можно получить при нормальных условиях $\left(\frac{\partial pH}{\partial P}\right) \sim 0.002 \text{ MPa}^{-1}$ и $\left(\frac{\partial pH}{\partial T}\right) \sim 0.02 \text{ K}^{-1}$. Эти оценки позволяют

сравнить воздействие давления и температуры на степень ионизации воды. Нам представляется неслучайным совпадение изменений показателя pH в интервалах стерилизующего действия температуры 60–100°C и давления 500–1000 МПа. Можем предположить, что именно изменение pH с ростом как температуры, так и давления приводит к денатурации белков и соответственно к инаktivации микроорганизмов. Наше предположение выглядит вполне оправданным, если вспомнить, что наряду с тепловой существует и «холодовая» денатурация белка при аномальном понижении температуры [15]. Форма температурного оптимума тесно коррелирует с оптимумом кислотным. Отклонения кислотности ΔpH либо температуры ΔT выше или ниже оптимального значения приводят к денатурации. Давление, в отличие от ΔpH и ΔT , трудно сделать отрицательным, однако в области роста P форма кривых выживаемости (см. рис. 1) также коррелирует с формами температурного и кислотного оптимумов.

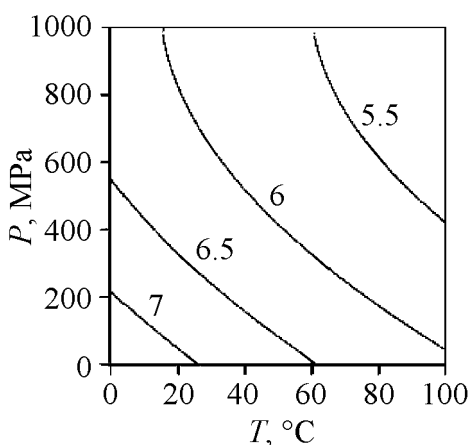


Рис. 3. Равновесные значения pH для воды в зависимости от давления и температуры, рассчитанные по формуле (1)

Итак, белки и ферменты в живых организмах всегда функционируют в определенном интервале pH . Действие многих денатурантов основано на изменении pH среды. При стерилизации продуктов высоким давлением скорость инаktivации микроорганизмов возрастает при повышении кислотности среды, в то же время под давлением замедляется деградация витамина С, что свидетельствует о понижении равновесного pH водной среды под давлением. Поэтому полагаем, что денатурирующее действие высокого давления обусловлено в основном сопутствующим изменением pH среды. Таким образом, смерть

клетки может считаться вторичным эффектом, вызванным изменением pH клетки при повышении давления.

Дополнительные аргументы за или против этого утверждения можно было бы получить, пересчитав полуширину пика кислотного оптимума на соответствующие значения для оптимума по температуре и давлению. К сожалению, для такого сравнения нам пока не хватает опытных данных по конкретным продуктам. Мы можем лишь сделать весьма грубые оценки, ориентируясь на примерно одинаковые для многих микроорганизмов критические значения давления ~ 500 МПа (при 25°C) или температуры стерилизации $\sim 60^\circ\text{C}$ (при $P = 0$). Эти воздействия вызывают примерно одинаковое уменьшение равновесного pH воды (см. рис. 3). Считая происходящую при этом инактивацию микроорганизмов следствием изменения pH , получаем соответствующую полуширину кислотного оптимума порядка 1–2 единицы pH , что согласуется с данными для большинства микроорганизмов.

1. K.E. Prehoda, E.S. Mooberry, J.L. Markley, in: Protein Dynamics, Function and Design, O. Jardetzky, J.-F. Lefevre (eds.), NATO ASI Series, Plenum Press (1998), p. 59–86.
2. В.А. Сукманов, С.А. Соколов, И.В. Нога, В.М. Шаталов, И.В. Жданов, Проблемы экологии и охраны природы техногенного региона № 3, 238 (2003).
3. И.В. Нога, ФТВД **16**, № 3, 126 (2006).
4. И.Н. Борисенко, Е.В. Ветрова, И.В. Нога, Е.Г. Панфилова, В.М. Шаталов, Вісник Донецького університету, сер. А: Природничі науки № 2, 375 (2006).
5. Жизнь микробов в экстремальных условиях, Д. Кашнер (ред.), Мир, Москва (1981).
6. H.Y. Ye, H. Wang, J.F. Wang, Q. Xu, Y.H. Li, Food Sci. China **17**, 30 (1996).
7. W.J. Timson, A.J. Short, Biotechnol. Bioeng. **7**, 139 (1965).
8. R. Pagan, S. Jordan., A. Benito, B. Mackey, European Conference on Emerging Food Science and Technology, European Federation of Food Science and technology, Tempere, Finland, November 22–24, 1999, p. 531–533.
9. M. Linton, J.M. McClemens, M.F. Patterson, J. Food Protect **62**, 277 (1999).
10. A. Molina-Gutierrez, V. Stipl, A. Delgado, M.G. Ganzle, R.F. Vogel, Appl. Environ. Microbiol. **68**, 4399 (2002).
11. K. Heremans, in: High pressure effects on biomolecules, D.A Leward, D.E. Jonson, A.P. Hasting (eds.), Nottingham University Press, England (1995), p. 81–97.
12. ГОСТ 24556–89 (СТ СЭВ 6245–88), Продукты переработки плодов и овощей. Методы определения витамина С, Изд-во стандартов, Москва (1989).
13. Краткий справочник физико-химических величин, К.П. Мищенко, А.А. Равдель (ред.), Химия, Москва (1974).
14. International Association for the Properties of Steam Standard Reference Data, Release on the ion product of water substance, may 1980, National Bureau of Standards, Washington, D.C. 20234, USA.
15. А.В. Финкельштейн, О.Б. Птицин, Физика белка, КДУ, Москва (2005).

I.V. Noga, V.M. Shatalov

GROWTH OF SOLUTION ACIDITY UNDER PRESSURE AS A FACTOR OF MICROORGANISM INACTIVATION

Influence of acidity of solution on vitamin C degradation degree under pressure and on the threshold values of pressure causing microorganism inactivation is established. It is shown that the microorganism inactivation under high pressure can be caused by accompanying growth of acidity of environment. The critical for many microorganisms value of pressure ~ 500 MPa (at 25°C) or temperatures of sterilization $\sim 60^\circ\text{C}$ (at $P = 0$) cause identical reduction of the equilibrium pH of water that corresponds to going out of the limits of the pH optimum.

Fig. 1. Survival rate for mesophylic-anaerobic and optionally anaerobic microorganisms (relative numbers of colony-forming units) as a function of pressure P in cherry juice [3] (dashed curves) with $pH = 6.1$ and in mashed apples [4] (solid) with $pH = 5.3$, for $T = 30^\circ\text{C}$, $t = 20$ min ($-\Delta-$) and $T = 25^\circ\text{C}$, $t = 10$ min ($-\square-$)

Fig. 2. Dependence of residual concentration of vitamin C in water ($-\diamond-$) and solutions of various acidity ($-\square-$ – $pH = 6$, $-\Delta-$ – 5 , $-\circ-$ – 4) on pressure value and time of treatment (light symbols – 5 min, dark – 15 min)

Fig. 3. Equilibrium pH values calculated by formula (1) for water as a function of pressure and temperature