

PACS: 81.40.Vw

И.В. Нога

ТЕРМОДИНАМИКА ВОЗДЕЙСТВИЯ ВЫСОКОГО ДАВЛЕНИЯ И ТЕМПЕРАТУРЫ НА МИКРООРГАНИЗМЫ И ВИТАМИНЫ

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

Статья поступила в редакцию 17 мая 2006 года

Измерена степень выживаемости некоторых микроорганизмов и деградации витамина С в вишневом соке, обработанном давлениями от 100 до 600 МПа при температурах 25 и 45 °С и временах выдержки 10 и 20 min. Полученные зависимости степени инактивации микроорганизмов от давления коррелируют с характерным ходом денатурации белков. Сделан вывод об определяющей роли процесса денатурации белков в механизме инактивации микроорганизмов. Проведен термодинамический анализ полученных данных на основе существующих методов описания кинетики денатурации белков под давлением. Предложено использовать найденные наборы термодинамических параметров для стандартизации процедуры обработки давлением. Построены номограммы для выбора оптимальных режимов обработки.

Об инактивации микроорганизмов высоким давлением известно уже давно, со времен пионерских работ *Royer* [1] и *Hite* [2], но лишь в начале 1990-х возник интерес к промышленному использованию этого явления [3]. В настоящее время технология обработки высоким давлением с целью увеличения срока хранения разнообразных пищевых продуктов (мяса, молока, соков, фруктов и др.) получила широкое распространение в ряде развитых стран, с чем связан растущий научный интерес и большое количество публикаций на эту тему [4,5]. Для достижения стерилизации продуктов при сохранении текстуры и пищевкусных качеств новая технология обработки продуктов питания использует давления в диапазоне 100–800 МПа, температуры 20–80 °С, времена выдержки до 30 min. Ее результаты значительно превосходят то, что дают традиционные методы консервации. Но существует ряд проблем, сдерживающих развитие технологии обработки давлением [6].

Первая из них – это неопределенность в выборе физических параметров воздействия, поскольку различные сочетания давления, температуры и времени выдержки могут давать одинаковый конечный результат. Например, имеется множество данных [7] по комбинациям воздействия температуры и

давления на *Escherichia coli* [8,9] и *Listeria monocytogenes* [10], кинетика и механизм инактивации которых достаточно хорошо изучены многими исследователями (широкий разброс данных у разных авторов связан со сложностью объектов и плохой воспроизводимостью [11]). Однако до сих пор отсутствует рецепт для выбора оптимального сочетания различных параметров обработки. Принято считать, что высокое гидростатическое давление приводит к инактивации микроорганизмов через изменения в морфологии клеток, нарушения клеточных мембран и биохимических реакций [12]. В то же время известно, что клетки инактивированных бактерий механически не повреждаются воздействием давления [13,14]. Таким образом, нужна модель, описывающая совместное действие указанных физических факторов и позволяющая уточнить механизм инактивации микроорганизмов.

Другая проблема – до сих пор отсутствуют общепринятые критерии, определяющие обработку того или иного объекта. При традиционной термообработке обычно используют следующие параметры: D – время обработки (min), необходимое для снижения концентрации популяции микробов в 10 раз, Z – температура обработки ($^{\circ}\text{C}$), понижающая значение D в 10 раз. Величины D и Z характеризуют устойчивость того или иного штамма при термоинактивации. При воздействии давлением эти параметры существенно зависят от его величины и не могут определять какой-либо стандарт обработки, поскольку характеризуют не столько объект, сколько внешние условия. Поэтому нужно найти набор параметров, описывающих поведение того или иного объекта (будь то микроорганизм, фермент или витамин) под действием давления и температуры, и использовать полученный стандартный набор для выбора режима обработки. В [15] было предложено использовать для этого известное распределение Ферми–Дирака только на том основании, что наблюдаемый отклик имеет характерный ступенчатый вид. При создании интерполяционной формулы нам хотелось бы опираться на физически оправданную модель.

В работе [16] была предпринята попытка решения проблемы оптимизации на основе термодинамического описания воздействия давления и температуры на микроорганизмы в вишневом соке. Для сравнения тот же подход использовался при описании деградации витамина С под давлением. Предварительные результаты, полученные в [16] при небольшом числе экспериментальных точек, и дальнейший анализ возможностей кинетической модели [17] показали достаточную гибкость предложенной интерполяционной формулы, ее способность описывать поведение таких существенно различных объектов, как микроорганизмы и витамины.

В настоящей работе, в развитие [16], нам удалось решить обе поставленные задачи на примере обработки высоким давлением вишневого сока. С этой целью были проведены более детальные измерения степени выживаемости некоторых микроорганизмов и деградации витамина С при разных давлениях, температурах и временах выдержки. В результате получены кри-

вые, по форме похожие на зависимость денатурации белков от давления [18], что позволило провести термодинамический анализ наших данных по аналогии с описанием кинетики денатурации–ренатурации белков под давлением. Тем самым обоснована ключевая роль процесса денатурации в механизме инактивации. Предлагается использовать полученные наборы термодинамических параметров для стандартизации процедуры обработки давлением. Построены номограммы для выбора оптимальных режимов обработки.

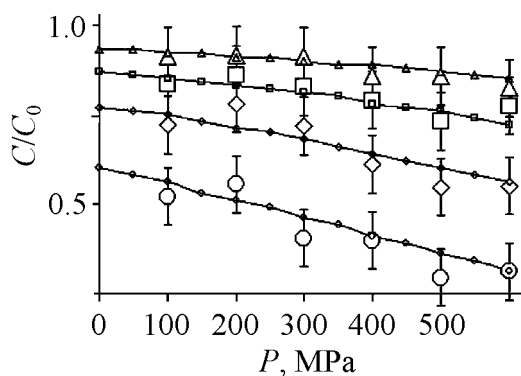
Материалы и методы

Мы исследовали влияние высокого давления на инактивацию мезофильно-аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (МАФAM) и плесени, а также на концентрацию витамина С в промышленном вишневом соке. Обработку исследуемых образцов проводили на экспериментальной установке высокого давления [19] в Донецком государственном университете экономики и торговли им. М. Туган-Барановского, предварительные результаты и схема установки опубликованы в [16]. Измерения осуществляли в интервале давлений $P = 0–600$ МПа с шагом 100 МПа, при температурах $T = 25$ и 45°C и временах выдержки $t = 10$ и 20 min. При обработке данных не учитывали время подъема давления (до 2–3 min) и адиабатический нагрев образцов при сжатии (на $2–3^\circ\text{C}$). Температуру образцов задавали нагревом и стабилизацией температуры камеры высокого давления [19]. Микробиологические исследования и измерения содержания витамина С в обработанных образцах выполняли по стандартным методикам [20–22]. Выживаемость микроорганизмов после обработки высоким давлением определяли по числам колониеобразующих единиц (КОЕ) в посевах, отнесенных к их значениям в контрольных образцах.

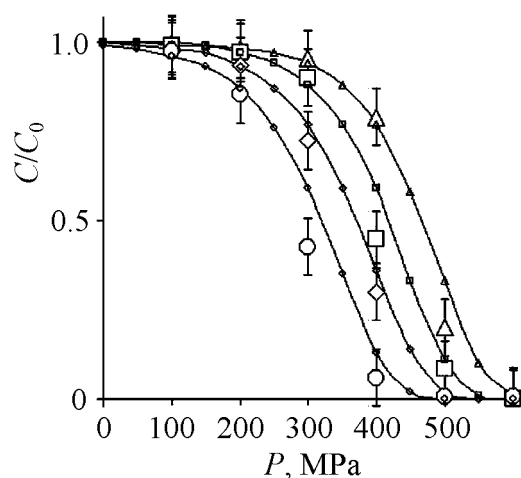
Результаты измерений представлены на рис. 1. Крупные маркеры с границами погрешности отвечают усредненным по трем повторностям экспериментальным значениям. Ошибку измерения оценивали как суммарную аппаратную погрешность плюс средний разброс по трем повторностям.

Обсуждение результатов

Известно, что при повышении давления или температуры в любой системе возникают нарушения или изменения взаимодействий на молекулярном и межмолекулярном уровнях, которые регулируются общими термодинамическими соотношениями. Применительно к интересующему нас диапазону давлений и температур следует говорить прежде всего о нарушениях гидрофильных, гидрофобных, ван-дер-ваальсовых взаимодействий, водородных связей. На следующем, над- или макромолекулярном уровне процессы происходят со скоростями намного меньшими, чем скорости межмолекулярных взаимодействий, что объясняется большими массами этих структурных элементов. Сюда относятся возможные нарушения процессов метаболизма, разрушения клеточной структуры, полимеризация, кристаллизация,

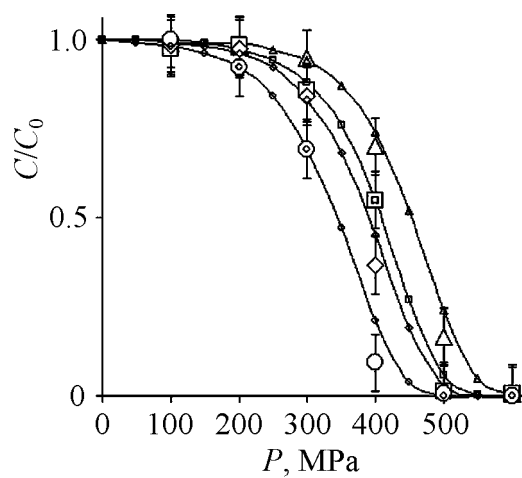


а



б

Рис. 1. Зависимость от давления P концентрации витамина С (а), чисел КОЕ для МАФАМ (б), чисел КОЕ для плесени (в) в вишневом соке для разных температур и экспозиций (в относительных единицах): Δ – эксперимент при $T = 25^\circ\text{C}$, $t = 10$ min; \square – $T = 25^\circ\text{C}$, $t = 20$ min; \diamond – $T = 45^\circ\text{C}$, $t = 10$ min; \circ – $T = 45^\circ\text{C}$, $t = 20$ min. Кривые с соответствующими маркерами – расчет по формулам (3), (4) с параметрами из табл. 1 при тех же наборах T и t



в

т.е. все, что определяет сложность и результирующую реакцию живых систем на внешнее воздействие и не поддается детальному моделированию. Поэтому можно считать, что химическая реакция, обусловленная разрывом указанных связей, протекает вблизи термодинамического равновесия. Поскольку разрыв связей – наименее вероятный процесс в цепи событий, приводящих к инактивации микроорганизма, скорость этой реакции должна определять скорость процесса инактивации в целом. Необратимость инактивации микроорганизмов, в отличие от обратимой денатурации белков, объясняется, по-видимому, существенно большим ростом энтропии. Таким образом, нарушение или искажение межмолекулярных взаимодействий при высоких давлениях определяет результирующую реакцию биосистемы на высокое давление.

Подтверждением химической природы инактивации микроорганизмов служит сопоставление наших результатов с воздействием давления на молекулы белков. Как известно, в интересующей нас области давлений наблюдается обратимая денатурация белков [18]. В последнее время активно развивается методика применения скачка давления для измерения термодинамических параметров белков [23]. Ход денатурации под давлением, подобный изображенному на рис. 2, наблюдался для разных белков во всех работах, использующих эту методику [18]. Легко заметить, что полученная нами степень

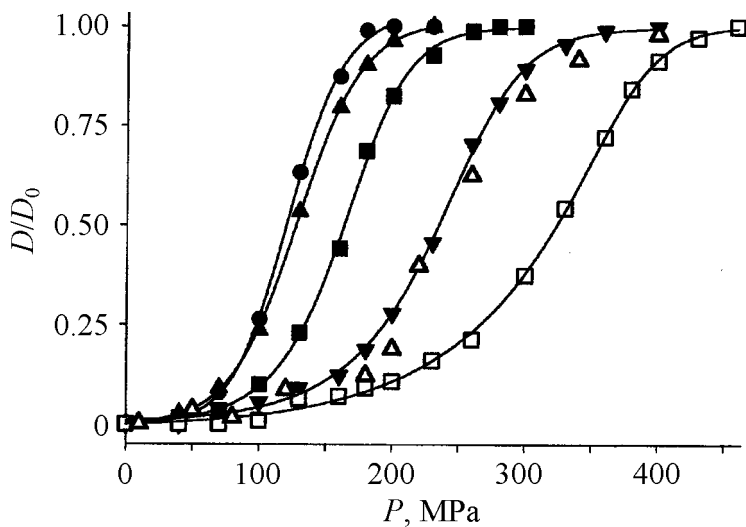


Рис. 2. Степень денатурации D/D_0 белка 33-kDa в зависимости от давления обработки P для различных концентраций сахарозы (по данным [24])

инактивации (см. рис. 1) антикоррелирует со степенью денатурации (рис. 2), что позволяет нам сделать вывод об определяющей роли процесса денатурации в механизме инактивации микроорганизмов.

Моделирование кинетики

По аналогии с описанием кинетики денатурации белков будем рассматривать деградацию макромолекул под действием повышенной температуры и давления как одноступенчатую химическую реакцию [17], когда в системе поддерживаются определенные температура и давление, а внешние потоки вещества отсутствуют. Под концентрацией реагирующего вещества будем понимать число микроорганизмов, выживших после обработки высоким давлением и повышенной температурой. Изменение концентрации в зависимости от времени $C(t)$ описывается уравнением распада, поскольку в отличие от денатурации белков инактивация микроорганизмов, как правило, необратима. Такой подход является изначально приближенным, так как неправильно описывает процесс при нормальных условиях. С этими оговорками имеем:

$$\frac{dC}{dt} = -kC, \quad (1)$$

где k – константа скорости инактивации, определяемая из условий термодинамического равновесия, поскольку процесс инактивации протекает бесконечно медленно по сравнению с характерными временами столкновений между молекулами:

$$\ln \frac{k}{A} = -\frac{\Delta F + P\Delta V}{RT}, \quad (2)$$

здесь A – фактор, имеющий смысл частоты попыток перескочить барьер, разделяющий исходный и распавшийся продукты; ΔF – изменение свободной энергии или активационный барьер реакции на моль; ΔV – изменение молярного объема системы; R – универсальная газовая постоянная; T – абсолютная температура.

Для обработки и анализа экспериментальных данных можно ввести безразмерный параметр x как комбинацию факторов P , T и t , однозначно определяющих величину концентрации

$$C = C_0 \exp[-\exp(x)], \quad (3)$$

где

$$x = \ln \left[-\ln \left(\frac{C}{C_0} \right) \right] = \ln(At) - \frac{1}{RT}(\Delta F + P\Delta V). \quad (4)$$

Концентрация C монотонно падает с ростом x , сама же величина x линейно растет с повышением давления P , обратной температуры $1/T$ и логарифма времени обработки $\ln t$. Уравнение $x(P, T, t) = \text{const}$ представляет собой уравнение плоскости в координатах P/T , $1/T$ и $\ln t$. Пересечение этой плоскости с любой из координатных плоскостей дает нам уравнение прямой линии. Таким образом, неизвестные параметры теории можно получить, «выпрямляя» и анализируя соответствующие экспериментальные кривые.

Записывая для каждой экспериментальной точки равенство (4), получаем систему линейных уравнений с тремя неизвестными $\ln A$, ΔF и ΔV . Число уравнений определяется числом экспериментальных точек для выбранного объекта с учетом всех повторностей за вычетом ошибочных точек, всего ~ 70 . Результаты решения этой системы методом наименьших квадратов представлены в табл. 1, где A измеряется в обратных секундах, σ – дисперсия отклонений теории от эксперимента, r – обусловленность найденного решения, равная произведению евклидовых норм прямой и обратной матриц системы линейных уравнений метода наименьших квадратов. Если значения дисперсии σ можно считать вполне удовлетворительными, то обусловленность r , определяющая чувствительность подгонки к случайным ошибкам, оказывается довольно большой для всех изучаемых объектов. Другими словами, получаемые в этой модели термодинамические параметры могут содержать непредсказуемую ошибку. Причина такой высокой чувствительности кроется в физике процесса, согласно которой реакция среды связана двойным потенцированием с изменением параметров системы (3). Исправить эту ситуацию нельзя в принципе, можно лишь двигаться в направлении стандартизации условий опыта и накопления экспериментальных результатов. Так, для отделения неучтенных эффектов среды нами была предложена концепция модельных экспериментов, в которых пищевая среда имитируется буферным раствором с заданным рН [25]. Этот подход будет реализован в дальнейших работах.

Таблица 1

**Термодинамические параметры процессов деградации витамина С
и инактивации микроорганизмов в вишневом соке**

Объект	$\ln A$	ΔF , kcal/mol	ΔV , mL/mol	σ	r
Витамин С	12.03	12.4	-3.61	0.02	8820
МАФАМ	13.52	15.9	-35.5	0.08	8810
Плесень	7.91	12.9	-38.7	0.08	9100

Косвенным подтверждением правильности полученных параметров может служить близость изменений молярного объема ΔV МАФAM и плесени (табл. 1) к известным характерным значениям для различных белков (табл. 2). В то же время для небольшой молекулы витамина С этот параметр по модулю получился на порядок меньше, что представляется вполне разумным, поскольку при разрыве однотипных связей $|\Delta V|$ будет меньше для молекул с меньшим числом связей. Обращает на себя внимание близость изменения энергии ΔF для всех трех объектов к характерной величине энергии возбуждения водородных связей (~ 11 kcal/mol). Дальнейший анализ причин такого совпадения может привести нас к пониманию природы молекулярных конформаций, вызывающих как деградацию витамина С, так и инактивацию микроорганизмов.

Таблица 2

Наблюдаемые изменения объема белков при денатурации под давлением [18]

Белок	ΔV , mL/mol
<i>Ribonuclease A</i>	-6, -46, -56
<i>Staphylococcal nuclease</i>	-85
<i>Chymotrypsinogen</i>	-14
<i>Lysozyme</i>	-26
<i>Metmyoglobin</i>	-60
<i>Flavodoxins</i>	-64

Как видно из рис. 2, наша кинетическая модель хорошо описывает эксперимент. В частности, кривые передают правильный ход концентрации в зависимости от давления для МАФAM, плесени и витамина С, а также правильно отображают тенденции изменения этих зависимостей при изменении температуры и времени обработки. В рамках одной и той же интерполяционной формулы получаются плавно спадающие почти линейные зависимости для витамина С и ступенчатые кривые – для МАФAM и плесени. Тем самым наши расчеты, с одной стороны, подтверждают правильность выбранной модели, а с другой – дают возможность планировать эксперимент и выбирать оптимальные значения параметров обработки с точки зрения максимальной стерилизации обработанных продуктов при наилучшей сохранности витамина С.

Таким образом, полученные данные по инактивации микроорганизмов под давлением коррелируют с результатами экспериментов по денатурации белков под давлением. Значения термодинамических параметров для различных белков [18] и по порядку величины совпадают с нашими значениями (см. табл. 1). Все это подтверждает предположение о химической природе процесса инактивации микроорганизмов, ключевым звеном которого является денатурация белков.

Практические рекомендации

Наша модель позволяет предсказывать поведение изучаемых объектов при различных сочетаниях параметров обработки: давления, температуры и

времени выдержки. Находя параметры модели (см. (3), (4)) и задавая нужную целевую функцию, легко определить оптимальный набор параметров стерилизации высоким давлением. Для решения подобных задач можно также использовать номограммы (рис. 3).

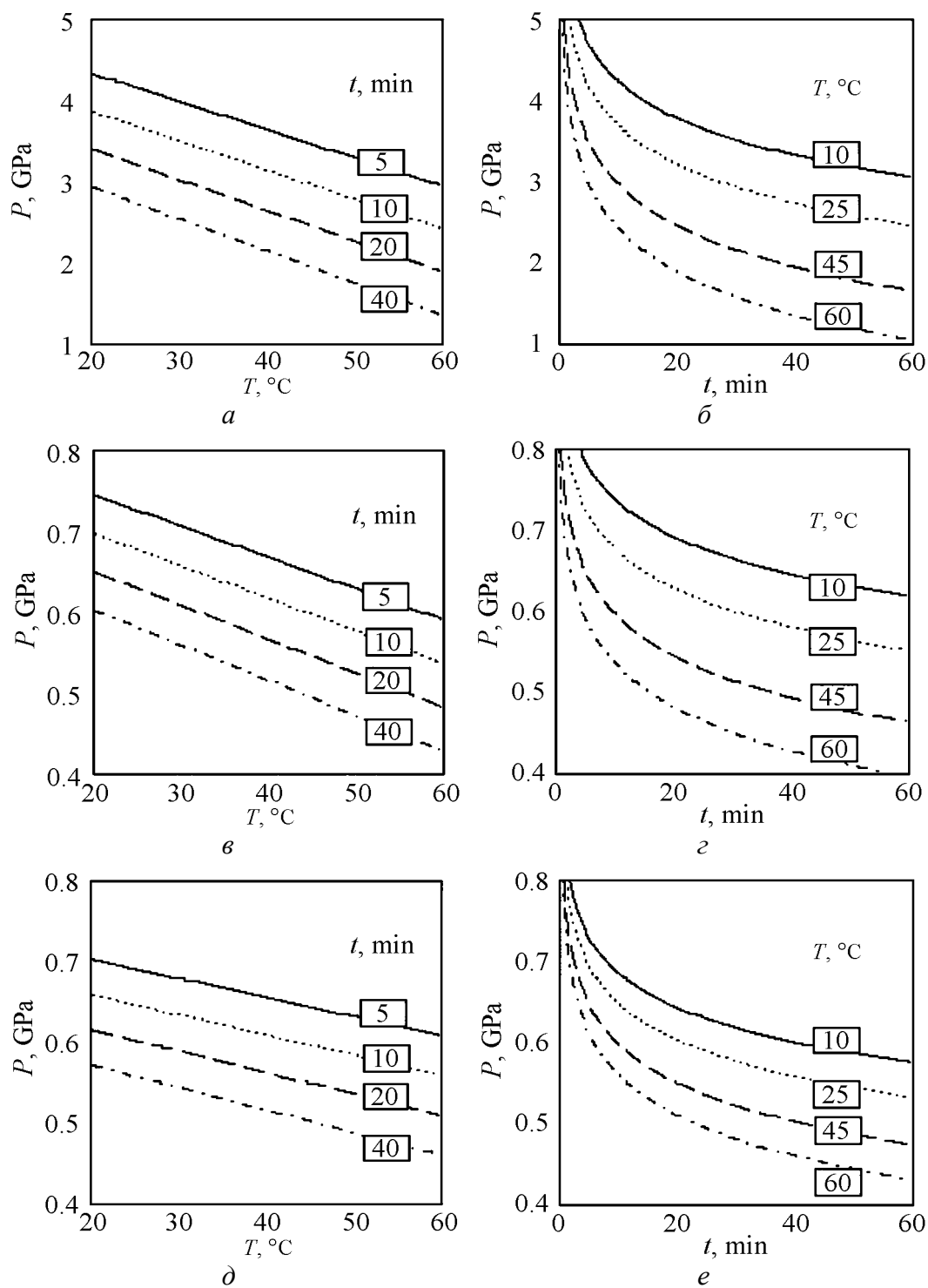


Рис. 3. Номограммы для выбора параметров обработки вишневого сока, уменьшающих в 10^6 раз концентрацию витамина С (*a*, *б*), МАФАМ (*в*, *з*), плесени (*д*, *е*)

На рис. 3 приведен ряд номограмм, рассчитанных нами для выбора параметров воздействия на вишневый сок, уменьшающих в 10^6 раз концентрацию МАФАМ (рис. 3,в,г) и плесени (рис. 3,д,е). Видно, что для сопоставимого уменьшения концентрации витамина С величина давления должна быть на порядок выше (рис. 3,а,б). Номограммы на рис. 3,а,в,д предназначены для выбора давления P и температуры T при временах обработки t , указанных на кривых, а рис. 3,б,г,е помогут выбрать давления P и время обработки t при заданных температурах T .

Выводы

При стерилизации высоким давлением витамины сохраняются лучше, чем при термообработке. Давление порядка 500 МПа является пороговым для инактивации большинства микроорганизмов. При этом содержание витамина С меняется незначительно – потери составляют от 10% при $T = 25^\circ\text{C}$ и $t = 10$ min до 50% при $T = 45^\circ\text{C}$ и $t = 20$ min, тогда как в результате тепловой стерилизации при $T = 100^\circ\text{C}$ продолжительностью 10 min потери витамина С составляют более 80%.

Кинетика инактивации микроорганизмов, как и деградация витамина С, удовлетворительно описывается в рамках химической реакции первого порядка. Химическая природа инактивации давлением обусловлена денатурацией белков. Параметры кинетической модели – предэкспоненциальный множитель A , активационный барьер реакции ΔF и изменение удельного объема ΔV – характеризуют ответ биосистемы на всевозможные сочетания давления P , температуры T и времени обработки t . Эти параметры могут использоваться для стандартизации и нормирования обработки.

Таким образом, на примере изучения данных по обработке вишневого сока сверхвысокими давлениями продемонстрирован способ определения термодинамических параметров сложной биологической системы. Доказана ключевая роль денатурации белков в процессе инактивации микроорганизмов. В рамках одной модели удалось объединить действие факторов давления, температуры и времени выдержки. Показан возможный путь стандартизации и оптимизации параметров обработки пищевых продуктов высоким давлением и температурой.

Автор выражает глубокую благодарность профессорам С.В. Беспаловой и В.М. Шаталову за плодотворные обсуждения и помощь в работе.

1. *H. Royer*, Arch. Physiol. Normale Pathol. № 7, 12 (1895).
2. *B.H. Hite*, Morgantown. Bull. WV. Univ. Agric. (Exp. Stat Morgantown) № 58, 15 (1898).
3. *D. Robert*, New Technology № 9, 39 (1993).
4. *C.E. Leadly, A. Williams*, New Technologies Bull. № 14, Mar., CCFRA, Chipping Campden, Glos, UK (1997), p. 39–45.
5. *A report of the Ins. of Health and Human Services*, U.S. Food and Drug Admin. Center for of Food Technologists, U.S. Dep. Food Safety and Applied Nutrition, June 2 (2000).

6. *G. Tewari, D.S. Jayas, R.A. Holley*, Science des Aliments **19**, 619 (1999).
7. *G. Prestamo, P.D. Sanz*, Lett. Appl. Microbiology **28**, 313 (1999).
8. *R. Gervila, X. Felipe, V. Ferragut, B. Guamis*, J. Dairy Sci. № 80, 2297 (1997).
9. *V. Garcia-Graells, E.J. Hauben, C.W. Michiels*, Appl. Environ. Microbiol. № 64, 1566 (1998).
10. *D.M. Mussa, H.S. Ramaswamy, J.P. Swith*, J. Food Protect. **31**, 343 (1998).
11. *J.P. Smelt*, Trends Food Sci. Technol. № 9, 152 (1998).
12. *A. Carlez, J.C. Cheftel, J.P. Rosec, N. Richard; N.L. Saldana, C. Balny*, in: High Pressure and Biotechnology, C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans, P. Mason (eds.), (1992), p. 365–368.
13. *P. Butz, J. Ries, U. Traugott, H. Weber, H. Ludwig*, Die Pharmazeutische Industrie **52**, 487 (1990).
14. *А.Н. Трефилова, В.П. Пулюгин*, ВНКФС-11 (24–30 марта 2005г., Екатеринбург, Россия), Тез. докл., Уральский гос. ун-т им. Горького, Екатеринбург (2005).
15. *E. Palou, A. Lopez-Malo, G.V. Barbosa-Canovas, J. Welti-Chanes, P.M. Davidson, B.G. Swanson*, J. Food Prot. **61**, 1657 (1998).
16. *В.А. Сукманов, С.А. Соколов, И.В. Нога, В.М. Шаталов, И.В. Жданов, А.В. Волкова*, Проблемы экологии и охраны природы техногенного региона, Межведомственный сборник научных работ ДонНУ № 3, 238 (2003).
17. *И.В. Нога, В.М. Шаталов, В.А. Сукманов*, ФТВД **14**, № 2, 74 (2004).
18. *K.E. Prehoda, E.S. Mooberry, J.L. Markley*, High Pressure Effects on Protein Structure, in: Protein Dynamics, Function and Design, O. Jardetzky, J.-F. Lefevre (eds.), NATO ASI Series, Plenum Press (1998), p. 59–86.
19. *В.А. Сукманов, І.Б. Левіт, Ю.М. Петрова*, Тематичний збірник наукових праць, ДУЕТ, Донецьк (2002), вип. 7, с. 284–291.
20. ГОСТ 10444.15–94. Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, Госстандарт Украины, Киев (1996).
21. ГОСТ 10444.12–88. Продукты пищевые. Метод определения дрожжей и плесневелых грибов, Изд-во стандартов, Москва (1988).
22. ГОСТ 24556–89 (СТ СЭВ 6245–88). Продукты переработки плодов и овощей. Методы определения витамина С, Изд-во стандартов, Москва (1989).
23. *Cui-Yan Tan, Chun-He Xu, Jun Wong et al.*, Biophysical Journal **88**, 1264 (2005).
24. *K. Ruan, C. Xu, T. Li et al.*, Eur. J. Biochem. **270**, 1654 (2003).
25. *И.В. Нога, В.М. Шаталов, В.А. Сукманов*, Тези доп. І Української наукової конф. «Проблеми біологічної і медичної фізики», 20–23 вересня 2004 р., Харків, Вид-во Харк. нац. ун-ту (2004), с. 197.

I.V. Noga

THERMODYNAMICS OF THE HIGH PRESSURE AND TEMPERATURE IMPACT ON MICROORGANISMS AND VITAMINS

Inactivation of some microorganisms and degradation of vitamin C were measured in cherry juice at the pressures from 100 to 600 MPa, temperatures of 25, 45 and 60°C and expositions of 10 and 20 min. On the base of the well-known protein denatura-

tion–renaturation kinetics under pressure a thermodynamic analysis of the data was carried out and a correlation of microorganism inactivation with typical shape of denaturation under pressure was outlined. That fact was believed to prove the leading role of the denaturation processes in the inactivation mechanism. It was proposed to use the obtained set of thermodynamic parameters like a kind of standard for the high-pressure processing. The sets were used to plot curves giving out optimal conditions of the high-pressure processing of food.

Fig. 1. Effect of pressure P on vitamin C concentration (a), numbers of colony-forming units (CFU) for mesophylic-anaerobic and optionally anaerobic microorganisms (MAOAM) (δ), CFU numbers for mould (ϵ) in cherry juice for various temperatures and expositions (in relative units): Δ – experiment for $T = 25^\circ\text{C}$, $t = 10$ min; \square – $T = 25^\circ\text{C}$, $t = 20$ min; \diamond – $T = 45^\circ\text{C}$, $t = 10$ min; \circ – $T = 45^\circ\text{C}$, $t = 20$ min. Curves with the markers – calculation by formulae (3), (4) with parameters from Table 1 with the same sets of T and t

Fig. 2. Degree of protein 33-kDa denaturation D/D_0 as a function of processing pressure P for different concentrations of saccharose (by data of [25])

Fig. 3. Nomographs for selection of cherry juice processing parameters giving a 10^6 times decrease of vitamin C concentration (a , δ), MAOAM (ϵ , ζ), mould (ϑ , e)