

### 第三节 影响微生物灭活的各种因素

影响微生物灭活的因素很多，除了压力外，保压时间、温度、加压方式、升压和卸压速率、食品组分、溶剂、微生物的种类、生存状态、初始菌量、介质的pH值和水的活度等。

#### 1 压力对灭菌的影响

压力作为热力学参数是众所周知的，它也可以象温度一样对生物材料产生影响，但在有关研究领域没有受到足够的重视，这主要是人们对压力引起的生物材料特性的变化缺乏了解。随着物理学和生物物理学研究的不断深入，人们可以利用压力对生物分子的功能和生物过程的热力学及动力学进行细致的描述。

与加热灭菌类似，随着压力的升高，灭活率提高。低于某一压力时，微生物不能失活，或者发生可逆性失活，经过一段时间，还会恢复活性。超过这一压力就会发生不可逆失活，这一压力值也称作压力阈值。每一种微生物，在不同的特定条件下，都有一定的压力阈值。随着压力的增大，微生物灭活率提高，直到全部杀灭或大部杀灭。

同一个菌种在不同的条件下，对压力的耐受性也不相同。大肠杆菌在培养基（胰蛋白胨 1，酵母抽提粉 0.5，NaCl 1，pH7.5，琼脂 1.5，121℃20min 灭菌）中，200MPa 既可以灭活。而在 pH6.4，5min 条件下，需用 280MPa 灭活大肠杆菌。大森丘在肉与肉制品植入的大肠杆菌在 200MPa 时数量并未减少，300MPa 以上的超高压才能将其杀灭；崛江(1991)将大肠杆菌接种在苹果酱中，实验结果表明，加压 300MPa、20min 后，可达到商业无菌要求。图 3.2 是大肠杆菌的两个不同超高压灭活实验所得到的结果。

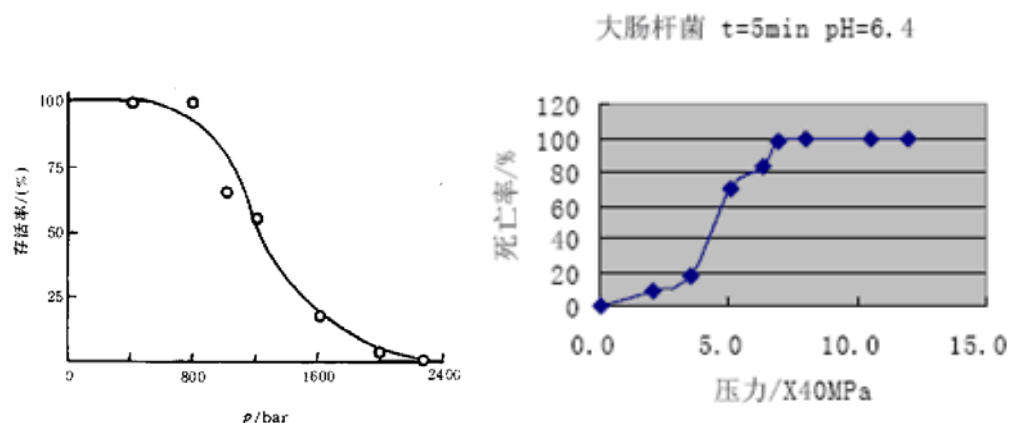


图 3.2 超高压灭活大肠杆菌的实验曲线

由于各种微生物、酶耐压性不同，所以杀死不同微生物、酶需不同层级的压力。一般来说，常温下200MPa—300MPa压力可杀灭细菌、霉菌、酵母菌的营养体及病毒、寄生虫；600MPa以上才能杀死耐压性高的芽孢杆菌属的芽孢。对于酶类，100MPa—200MPa可使一般性酶失活；50—60℃，700MPa以上可使耐压性高的过氧化物酶、果胶酯酶等失活。因此若在不恰当工艺条件下仍可能有微生物、酶存在，与光、氧接触后仍会使食品腐败变质。

压力越高，则处理所需的时间越短。资料表明，在20—25℃下加压处理粘质沙雷氏菌、乳链球菌、荧光假单胞菌和产气气杆菌时，当压力为200—300MPa时，需加压处理60min才能杀死；而在340—400MPa时，只需50min。酵母(低发酵度酿酒酵母和白酵母)在200~240MPa压力下必需处理60min才死灭，而370~400MPa时仅10min，570MPa时5min即可。这种现象类似于加热杀菌中出现的低温长时、高温短时和超高温瞬时杀菌，故也可将超高压杀菌分为低压长时(LPLT)、高压短时(HPST)和超高压瞬时杀菌(UHP)。林力九(1993年)提出的设想是：LPLT杀菌是指在400MPa左右加压处理10—20min；HPST指在600MPa左右加压处理1—2min；UHP指在600MPa以上加压处理几秒至1min以内。

但是对一些芽孢，在某一段压力范围施压，反而促使其生长。例如常温(30℃)下，将嗜热脂肪芽孢杆菌菌数不同的试样分别经超高压处理10min，压力值为100、200、300、400和500Mpa。在上述条件下，压力处于200—400Mpa范围内时，嗜热脂肪芽孢杆菌具有较高的死灭率。随着压力的进一步升高(400Mpa以上)，菌残存率反而升高了。这可能与芽孢菌的特性有关。由于孢子的外层结构有细致紧密而坚硬的双层膜，内含浓缩的蛋白质，营养丰富且处于休眠状态，因而对高温高压等恶劣环境具有很强的抵抗能力。适当的压力(200—400Mpa)可以促使孢子发芽，生成的营养体就很容易被压力破坏。若压力过高(400MPa以上)，则孢子的发芽又会受到抑制，从而在压力环境中保存下来。释压后，孢子经复原培养基的活化，有可能还原成活细胞，使菌残存率增加。因此，压力并非越高越好。尤其对芽孢菌而言，杀死孢子的有效途径之一是提供适当条件促使孢子发芽，然后进行高压灭菌或配合其他协同灭菌作用。

## 2 保压时间的影响

压力一定的条件下，一般随着保压时间的延长，灭菌效果越好。但是存在一

个临界时间。就是说加压到了一定时间，再延长时间，灭菌效果也不会有太明显的提高。另外，保压时间的长短，还取决于施加压力的大小。压力越高，所需要的时间就越短（图 3.3）。

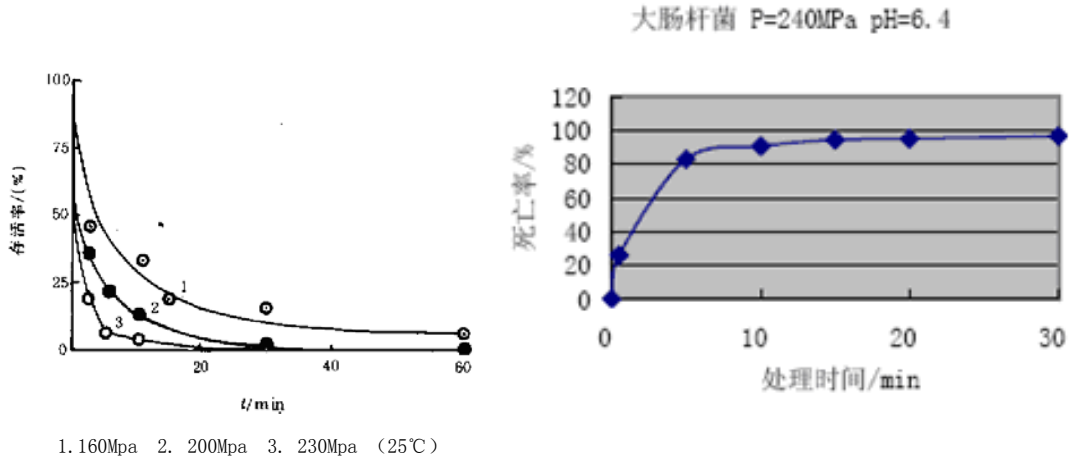


图 3.3 时间对灭菌（大肠杆菌）效果的影响

图b是固定压力240MPa和pH值为6.4时，保压时间与大肠杆菌死亡率的关系。从图中可以看出，随着保压时间的增大，细菌的致死率急剧增大。我们发现瞬时压力的效果不是很好，大概只有20%的死亡率。而保压时间达到10分钟时，死亡达到90.49%，由此可见，保压时间也是影响杀菌效果的一个重要因素。

压力大小与保压时间合理协调使用，可以解决超高压加工工艺中的一些问题，例如在超高压设备的工作压力受限制时，可以通过延长保压时间来弥补，达到灭菌的效果。若从提高效率的角度来看，提高压力则可以增加产量，但是这样会提高超高压设备的造价和投资，两者要综合考虑，才能得到比较经济的合理方案。

另外还有一个现象，高压短时间加压与较低的压力长时间加压相比较，后者比前者的非在位效应显著，即加压后的一段时间内，菌类继续失活的速率比前者高。

### 3 温度的影响

热和压力是决定物质状态代表性的两大因素，可以相互独立而互相转化。将流体强力压缩，则温度升高，在密闭的容器中将气体加热，则压力升高。另外温度和压力两个条件同时影响物质的状态，例如冰点、沸点。

温度是影响微生物生长代谢的重要外部条件，环境温度超出微生物的承受能

力,就会导致微生物死亡。微生物对温度有敏感性,在低温或高温下,高压对微生物的影响加剧。虽然压力与温度对微生物的生命活动,在作用机制、作用效果及影响因素等方面存在差异,但两者对微生物的致死却存在着协同和互补作用。众多的研究结果表明,低温条件下,压力会使冰晶析出而加剧微生物组织破裂的程度;加压条件下,加热又会促进微生物中蛋白质、酶等成分的进一步变性,强化杀菌作用的效果。

一般在微生物最适合繁殖的温度灭菌最困难。降低和提高温度都有助于杀灭微生物(参见图 3.4)。这一点类似于蛋白质变性的椭圆曲线。当温度超过 60℃后,温度就会成为灭菌的主要条件之一。压力和温度协同影响微生物失活的主次关系还很难断定。如果食品的温度高于室温或低于室温,在 UHP 加工处理中,都会提高微生物的失活率。45℃-50℃的温度更容易使食品病原体和腐败微生物失活,因此这就要求优化生产过程,使食品的温度更接近这个范围内它的初始温度。

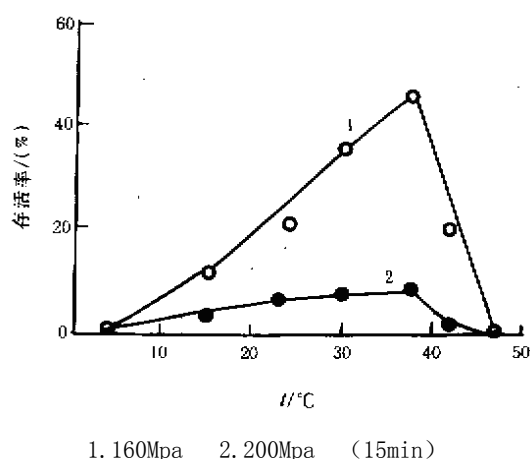


图 3.4 温度对超高压灭菌(大肠杆菌)的影响

有试验表明,果汁在适当温度下加压可以降低酵母、霉菌和一般细菌的致死压力。枯草杆菌等芽孢杆菌的孢子在常温下即使800 MPa以上的高压也很难完全杀死,但升温至45-60℃,加压至600MPa即可杀灭。

Carlez等研究了*Citrobacter freundii* (用于*Salmonella spp*的指示物)在不同温度和压力下的反应,发现在280MPa压力和20℃温度下取得的灭菌效果与230MPa、40℃的灭菌效果相近。芽孢杆菌属和梭状芽孢杆菌属的芽孢对一般加热、杀菌剂和放射线都具较强的抵抗性,同样芽孢对压力的抵抗性也比营养体强得多,如果采用加热和加压合并使用,可以获得良好的杀菌效果,同时也可以相应

降低压力强度。采用单纯加压方式处理不一定是一个有效的途径，而采用温度和压力共同处理则有协同增效作用。因此近几年，随着高压杀菌研究的深入，许多研究者都提出“加压热杀菌”的概念。加压热杀菌可以减少加热时间或降低灭菌所需的高温；同时适当的中温也会减少加压所得的时间和强度。这对于解决孢子的耐热耐压性尤其重要。

P. Rovere进行了高压与热处理灭菌效果的模型和计算，主要找出了高压对模拟体系中芽孢梭菌杆菌的热钝化动力学，指出高压下进行热处理其效果会由于压力作用而放大，如果控制好温度，则可以减少加工时间和加工压力。针对芽孢菌的高耐压性，就现阶段研究来看，结合温度处理则是一种十分有效的杀菌手段。

不同的压力与温度组合所取得的杀菌效果差别很大。枯草杆菌等芽孢杆菌的孢子在常温下即使800MPa的高压也难完全杀灭，但升温至45~60℃，加压至600MPa即可杀灭。Reddy等人使用827MPa与40℃对肉毒芽孢杆菌(在磷酸盐缓冲液中)处理10min，可使芽孢减少5个数量级。单独加热对嗜热芽孢杆菌芽孢没有明显的杀菌效果，但与超高压协同处理有明显的杀菌效果。有报道称，使用700MPa与90℃对嗜热芽孢杆菌处理30s，可使芽孢减少4.5个数量级。Reddy和Palaniappan报道，在55℃和275~827MPa的范围下，对嗜热芽孢杆菌处理5min，能使芽孢减少3~8个数量级。

低温压力协同的效果非常明显。大多数微生物在低温下耐压程度降低，主要是因为压力使得低温下细胞因冰晶析出而破裂程度加剧。蛋白质在低温下高压敏感性提高，致使此条件下蛋白质更易变性，而且人们发现低温下菌体细胞膜的结构也更易损伤。低温对高压杀菌的促进效果特别引人注目，因为低温下高压处理对保持食品品质，尤其是减少热敏性成分的破坏较为有利。高桥现二郎等人对包括芽孢菌等常见致病菌在内的16种微生物的低温高压杀菌研究显示，除了芽孢菌和金黄色葡萄球菌外，大多数微生物在-20℃下的高压杀菌效果较20℃下的好。例如在200MPa，20℃下，微生物只死灭1~2次方，但在-20℃下却几乎全部死灭。也有报道葡萄球菌和玫瑰色八链球菌加压290MPa时，0℃处理的要比37℃下处理死灭得早，而在40~50℃以上的高温却未死灭。沙门氏菌在20℃、200MPa的压力下仍有少量存活，当温度为-20℃时，在相同的压力下则全部杀死。也有人指出在5℃的低温下杂菌数会减少的报告，因此5℃以下的低温区就成为加压杀菌注目

的温度。

最近又有在 200MPa 高压下将食品保存在冰点以下温度，观察到杀菌效果增加。例如，面包酵母在室温时必须加压至 300MPa 以上才能死灭，而在同样条件下，当水相出现冰结晶时，杀菌效果就增强。所以-20~5℃的低温和压力合并应用，同压力与加热合并使用一样有增强作用，而且在-20~5℃的温度下有利于保持食品的风味及其物理性能。

### **温度和压力的拮抗效应**

但是较低的压力有时对温度条件有拮抗作用。Zobel 研究了压力低于 100MPa 时与温度对微生物影响的相互关系，他认为：a. 高压减弱了高温对微生物的致死效应；b. 低温减弱高压对微生物的致死效应。例如，在对大肠杆菌灭菌时，如温度为 46.9℃，压力 0.1MPa，死亡率为 100%，但当压力变为 40MPa 时，死亡率只有 26.6%。即压力增大了反而保护了大肠杆菌。

### **压致升温**

液体在超高压作用下已经不是不可压缩的流体，随着压力的提高，介质被压缩的量增大。液体被压缩过程中会产生热量，形成压致升温。水每提高100MPa，大约可升高3℃。因此在考虑超高压加工的参数时，应该把压致升温计算在内。

与传压介质一样，食品基质同样产生压致升温。若食品基质性质与传压介质的相似，可减少热传递的时间，使基质很快达到传压介质的温度，减少热量的损失。水是大部分食品的主要组分，大部分食品表现出的压致升温与水相似，而油、乙醇表现出的压致升温与水不同。因此，需要通过食品基质的组分含量来研究不同食品的绝热升温的幅度。

在相同的压力条件下，不同的物料因有不同的可压缩性而表现出不同的压致升温。不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸比较表现出较高的压致升温。橄榄油和大豆油含有多于85%的长链不饱和脂肪酸，牛肉脂肪含有多长的链饱和脂肪酸，而亚麻油酸是多不饱和脂肪酸，这些脂肪分子比较大且没有极性，与之对比，水分子小并且存在极性，水分子由于存在氢键而比脂肪分子压缩更紧密。当对这些组分施加压力时，较疏松的结构有更高的压缩性和得到更大的压缩，因此表现出更高的压致升温。

水、脂肪和油的热效应的不同可能是由于它们相应的分子结构和相转变的特

性不同。有报道表明，油表现出最高的压致升温。大豆油、橄榄油和亚麻油酸在增加压力下表现出非线性的变化，在较低压力下，每100MPa温度升高9℃，压力升高，压致升温的值减少。亚麻油酸(不饱和脂肪酸)呈现出最高的压致升温。新鲜的三文鱼、鸡肉呈现出的压致升温接近水(3℃ / 100MPa)，这可能由于它含有大约68% 的水分和4.9% 的脂肪。牛肉脂肪表现出中度的压致升温，为8.3℃ / 100MPa。这可能由于其它组分如水、蛋白质和碳水化合物的影响，牛肉脂肪的压致升温在低压下与油相似，但在大于150MPa的高压下温度会急剧升高、减少、然后持平。丙稀-乙二醇-乙醇，有机化合物，含有羟基功能组分的在分子间能形成氢键，丙稀-乙二醇-乙醇表现出的压致升温幅度在水与脂肪之间。然而，乙醇的压致升温性质与其它研究物料不同，在325MPa下升高17℃ 和在540MPa下，温度会升高一倍。

水、脂肪和油的初始温度对压致升温的影响亦不相同。有研究报道了水、橄榄油、大豆油、鸡脂肪、牛肉脂肪和三文鱼在不同压力(150-600MPa)和不同初始温度下(25~70℃)的升温情况。结果为水的初始温度从25℃升到60℃，它的压致升温值从3℃ / 100MPa升到4℃ / 100MPa。与之对比，油的初始温度对油的压致升温几乎没有影响。

由于压致升温的存在，要想在超高压加压过程保持食品物料-介质-容器系统的温度绝对平衡几乎是不可能的。

在压力杀灭芽孢的过程中，食品基质的组分不但对芽孢菌有保护作用而影响杀灭效果，还由于组分的不同引起压致升温的不同而影响杀灭效果。

压力处理时间包括升压时间、保压时间和降压时间。升压时间由加压速率决定，由于在加压过程中存在压致升温效应，加压的速率就自然影响容器内的热传递。保压时间短，同时又能达到杀灭芽孢是人们追求的目标，一般保压时间小于5min能使生产率跟经济之间取得最佳化。但热交换使得压力容器内存在温度梯度。加压后，样品的温度就会高于超高压容器温度，热量就从产品向容器壁传递，接近容器壁的那部分样品温度较低，容器中心的温度较高。并且，传压介质也会影响样品的温度。因此，当冷的容器壁与热的传压介质包围着样品，加压时样品的实际温度与预计有很大不同。因此，热传递过程中样品温度测量的准确性很难达到。所以，虽然压力传递瞬时、均匀，只需要短时间即可，但是由于热力传

递有一个过度过程，需要适当延长一些加压时间，保证灭菌效果。

由于存在压致升温效应，在超高压加工热敏物质，特别是活性成分时，应该将其温度升高的影响考虑在内。在温度协同灭菌，特别是芽孢时，其温度是否均匀也应仔细考虑。

加压过程产生温度梯度是不可避免的。影响温度梯度的因素很多，如食品的基质、介质的种类、高压容器处理前的温度、保压时间、高压容器的大小、容器是否设置的保温层或恒温套等等。

压致升温对微生物芽孢的灭活有显著的影响。有报道称，在绝热容器内，嗜热芽孢杆菌(*B. stearothermophilus*) 初始为 $10^{10}$  cfu / mL，经超高压处理，一次升压到700MPa，初始温度为90℃，处理时间为3min，能减少10个数量级。若无绝热装置，同样条件下，只减少6个数量级。

在不考虑传压介质时，在827MPa、50℃的条件下，嗜热脂肪芽孢杆菌的芽孢失活小于1个数量级。如果传压介质表现出高的压致升温，那么失活的数据就包含了热的效果。结合WHS7525，在827MPa、70℃下处理10min，大约有6.6个数量级减少。在同样条件下，使用其它两种溶液(W HS2575、WHS5050)，大约有5~6个数量级的减少。而使用WSB9802溶液作为传压介质时，在前述的条件下处理，可观察到有8个数量级的芽孢失活。

压致升温即压力与温度的结合。有压力与温度的协同作用对芽孢杆菌芽孢的杀灭效果；还有报道称，在缓冲溶液中的嗜热芽孢杆菌的孢子经过700MPa、70℃处理3min，减少5个数量级，而在番茄酱的肉丸中的嗜热芽孢杆菌的孢子经过700MPa、90℃处理30s，至少减少4.5个数量级。地衣芽孢杆菌的芽孢悬浮在pH7.0的缓冲溶液中，经过600MPa、60℃、处理20min，芽孢被灭活，而在pH7.0的牛肉汤中，经过700MPa、70℃处理5min，使芽孢减少6个数量级。蜡状芽孢杆菌的芽孢在pH7.0的缓冲溶液中经过690MPa、60℃处理1min后，可使芽孢减少8个数量级，而在牛肉汤中的芽孢经过700MPa、70℃处理5min，可使芽孢减少5个数量级。同样地，枯草芽孢杆菌的芽孢在827MPa、102-107℃范围内处理，可使芽孢减少6个数量级。E型肉毒芽孢杆菌的芽孢在pH7.0缓冲液中，经过758MPa、50℃处理5min，可使芽孢减少4.5个数量级，而经过827MPa、40℃处理10min，可使芽孢减少5个数量级。A型肉毒芽孢杆菌的芽孢在pH7.0的蟹肉中，经过827MPa、



75℃处理20min, 至少可使芽孢减少3个数量级。在不同的基质和介质中灭菌效果的不同, 或许与压致升温不无关系。

不同的压力与温度组合所取得的杀菌效果差别很大。枯草杆菌等芽孢杆菌的孢子在常温下即使800MPa的高压也难完全杀灭, 但升温至45~60℃, 加压至600MPa即可杀灭。Reddy等人使用827MPa与40℃对肉毒芽孢杆菌(在磷酸盐缓冲液中) 处理10min, 可使芽孢减少5个数量级。单独加热对嗜热芽孢杆菌芽孢没有明显的杀菌效果, 但与超高压协同处理有明显的杀菌效果。有报道称, 使用700MPa与90℃对嗜热芽孢杆菌处理30s, 可使芽孢减少4.5个数量级。Reddy和Palaniappan报道, 在55℃和275~827MPa的范围下, 对嗜热芽孢杆菌处理5min, 能使芽孢减少3~8个数量级。

#### 4 加压方式的影响

超高压灭菌有等静水压和动压两种不同的方式。我们所研究的UHP是等静水压。动压或称为超高压动力灭菌, 其原理类似于均质机。

随着技术的进步和工艺条件的提高, 高压均质机的压力越来越高, 目前已经达到200-300MPa。因此, 均质机的功能从均质、乳化扩大到灭菌和细胞破碎。但是超高压动力灭菌的物理过程不同于UHP。它更像一个超高压泵, 不断地输出超高压液体, 然后通过射流元件或控制元件, 使得液流在流出时突然释放压力, 此时液流中产生剧烈的剪切、碰撞、空穴、膨爆等机械力, 破坏微生物的生理结构, 使其失活。超高压动力杀菌的优势是所使用的压力要比UHP低, 而且能连续工作。缺点是耗能大, 而且在喷射出的流体中转化为热能, 这往往是被加工的流体食品所不希望产生的现象。而UHP只在升压过程耗能(一般为几十秒至几分钟), 占据大部分时间的保压过程中并不耗能, 所以节能效果远远优于动力灭菌。另外, 另外动力灭菌仅仅限于流体食品的加工, 不能加工含有固体的食品。

一般UHP的加压过程为: 升压→保压→卸压。如果改为多次加压, 即交变或脉冲加压(图3.5), 灭菌效果更好, 并且可以适当降低所使用的压力。

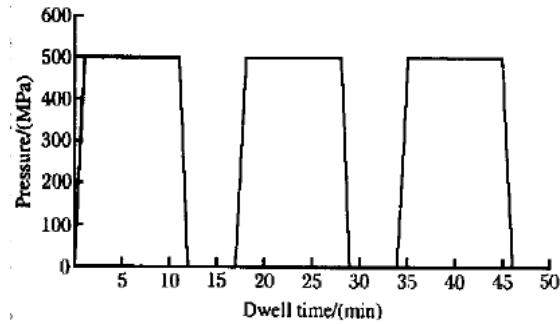


图 3.5 交变加压（脉冲加压）

G. ivanna与D. Aleman研究认为低频脉冲压力可以大大提高超高压杀菌的有效性。与静压处理相比，梯度脉冲高压可以使酵母数在100–300s的时间内大大减少，其中加压处理100s会使菌数减少4个数量级以上。

I. Hayakawa等人研究了嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)在高压下的失活情况，结果表明，间歇式的压力处理比较有效，对需氧嗜温微生物和需氧嗜冷微生物间歇式加压处理更有效地抑制微生物，使细菌降低了4个数量级。

J. Yuste研究了间歇式高压加工对于抑制禽肉中的微生物作用，一种是用60MPa的低压处理30、60、90、120min，再用450MPa的高压处理5、10、15min。高压处理总时间不超过15min。另一种是450MPa的压力连续处理15min，一天后测定需氧嗜中温微生物和需氧嗜低温微生物，发现间歇式加压处理更能抑制微生物。通过对豆浆进行超高压杀菌处理，发现间歇式处理效果也明显好于同等压力的连续处理。

众多的研究结果表明，对于耐压的芽孢菌属，分阶段实施超高压杀菌要优于连续超高压处理，第一次加压可刺激芽孢萌发，第二次加压就可杀死发芽形成的营养细胞。Hayakawa 等研究超高压杀灭嗜热脂肪芽孢杆菌时发现，采用OP加压法，70℃、400MPa重复施压6次(每次处理时间为5min)，可达到采用CP法(Continuous Pressurization)70℃、600MPa 连续施压60min 的杀菌效果；而70℃、600MPa 条件下，OP 法处理6 次可使样品中 $10^6$  个/ml 的嗜热脂肪芽孢杆菌全部死亡。Mayer 等报道，先以90℃、690MPa 处理1min，然后在大气压下停留1min，再用690MPa压力处理1min，依此可将含有生芽孢梭菌(*Clostridium sporogenes*)和蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)的通心粉与干酪灭菌。Wilson

和Baker先用85℃、621MPa 处理30min, 再用95℃、621MPa 处理5min, 也可使含枯草杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、生芽孢梭菌各为 $10^6/g$  的肉乳液达到灭菌要求。Furukawa等还报道, 交互加压RP(Reciprocal Pressurization)法也优于CP法, RP法能在获得相同杀菌效果的前提下, 显著降低使芽孢失活所需的压力与温度, 并由此减少食品营养的热损, 降低高压设备的成本, 将对超高压杀菌技术的工业化应用产生重要影响。因此, 加压方式对超高压杀菌的效果, 特别是芽孢菌的杀灭有重要影响。

对于芽孢菌为什么间歇式加压效果好于连续加压, 研究者认为: 第一次加压会引起芽孢菌发芽, 第二加压则使这些发芽而成的营养细胞杀死。因而对于易受芽孢菌污染的食物用超高压多次重复短时处理, 杀灭芽孢效果好。

但是, 间歇脉冲加压带来的问题是操作复杂, 生产效率低, 机械磨损大。所以是否采取交变加压, 还要综合分析、权衡利弊。

## 5 升压速率和卸压速率的影响

升压速率和卸压速率对微生物失活有些情况会有一定的影响。微生物对压力缓慢变化的耐受性比突然变化的耐受性高。一般认为升压速率对灭菌影响的效果不大。例如图3.6是固定压力300MPa和pH值为6.4时, 升压速率对细菌死亡率的关系。也有些学者认为细菌对升压速度和卸压速度不敏感, 而酵母菌对升压速度和卸压速度敏感, 因为酵母细胞有液泡, 而枯草芽孢杆菌细胞没有液泡, 卸压速率对它们的影响是不同的。据J. P. P. M. Smelt的研究也认为, 细菌细胞尤其是没有液泡的大肠杆菌对升压速度不敏感, 而具有液泡结构的微生物细胞对升压和卸压速度普遍较敏感, 如酵母菌等。

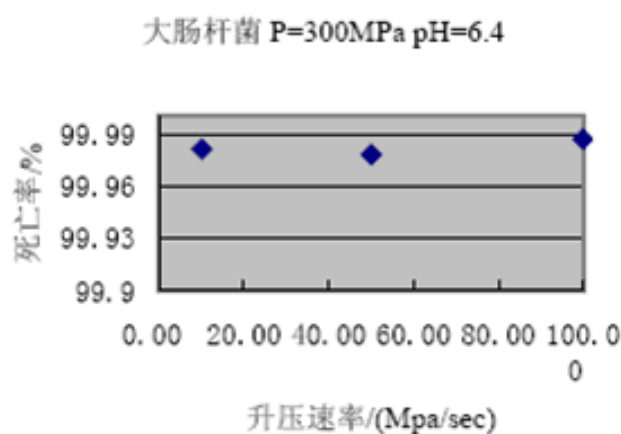


图 3.6 升压速率对灭菌效果的影响

有些研究者认为超高压状态下的瞬间卸压,会加剧静压对微生物生命活动的抑制作用,所以他们试图研究突然卸压的方式达到灭菌效果,这样可以降低加压的压力。突然卸压的设备,一般采用气动和液压相结合的装置。还有的专家从加压室几何形状的设计上解决突然卸压的问题。

## 6 微生物种类和生存状态的影响

不同的微生物有着不同的压力阈值,它们耐压程度是不相同的。一般情况下,菌体越大、结构越复杂,耐压性就越低。另外,与微生物菌体的构造有关。例如无包膜的比有包膜的耐压;病毒颗粒越小越耐压;病毒灭活 200—300 Mpa;酵母、霉菌灭活 300—400 Mpa;细菌、致病菌灭活 300—600 Mpa;芽孢灭活 800—1000 Mpa;酶的情况比较复杂,低压可以激活酶的活性,当超过某一压力,例如 400 Mpa 就会失活。

菌种 G+性菌对于热和压力的抗性要强于 G-性菌。而多数酵母及霉菌的孢子可以很容易的被 400MPa 的压力所杀死。病毒的抗压力是极为不同的。蛋白质 DNA 病毒的数量在 300MPa~400MPa 会大大降低,有磷脂包埋的病毒在温度降到 -20℃,压力为 300MPa~700MPa 仍保留了完整的浸染性。细菌芽孢是食品保藏中最关键的一环,它是食品是否彻底灭菌的标志,即食品安全性的标志,也是食品加工和保藏中最难解决的问题。

超高压对酵母菌比对大肠杆菌更有杀伤力,对葡萄球菌的影响最小。这可从细胞壁的结构上找到原因。酵母菌的细胞壁厚约 1.2 μ m,不及细菌的细胞壁坚韧。而大肠杆菌和葡萄球菌分别属于革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌。阳性菌细胞壁较厚,尤其是肽聚糖含量较高。网络结构紧密,含脂量低。而革兰氏阴性菌的细胞壁的肽聚糖层较薄,含量较少。脂类含量高。当受超高压作用时,细胞壁受到机械损伤更容易些,细胞更易死亡。

另外,微生物耐压性与它的生长期有关。处于最适生长温度条件下的微生物比处于高于或低于最适温度下的微生物对高压抵抗性强;处于对数生长期的微生物,对压力比较敏感,成熟期的微生物,耐压性较强;如果微生物经过某些因素的刺激(如冷休克、亚致死状态)会增强对高压的抵抗力。Smelt认为在高于最适温度下微生物的膜流动性易被破坏,但冷休克或低温会促进微生物改变膜中脂肪

酸的组成，增加不饱和脂肪酸含量和膜的流动性，从而增强对高压的抗性。

## 7 初始菌数对灭菌效果的影响

小川哲郎做了对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli* JCM1649; *Escherichia coli* CR-3)及沙门氏菌(*Salmonella* Enteritidis)在室温100~600MPa, 10min高压处理后杀菌效果的实验, 采用了菌数 $10^3 \sim 10^5$  cfu/ml的菌悬液。实验结果如图3.7所示。

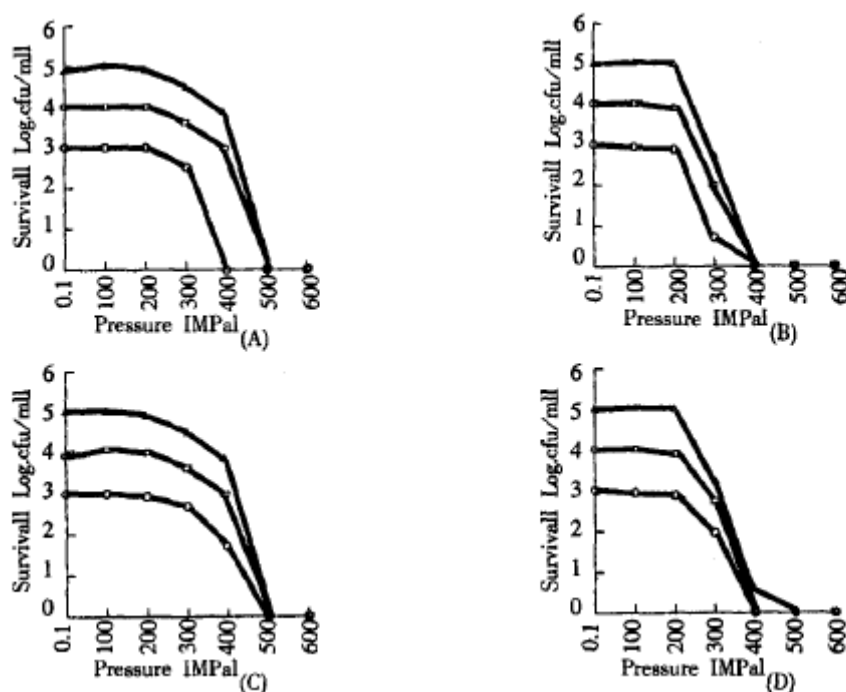


图3.7 高压杀菌效果

从图3.7中可知, 对同一种菌株初始菌数不同, 灭菌所需要的压力大小不同, 但在300~500MPa的压力下, 对4种菌株都有可能灭菌。对E. coli的2菌株比较, JCM1649株与其他E. coli的报告相同, 在400MPa以下有可能杀菌, 与此相比, CR-3株耐压性稍强, 要完全达到杀菌需要500MPa的压力。

## 8 食品组分的影响

食品的化学成分对灭菌效果也有明显的影响。蛋白质、碳水化合物和脂类对微生物具有保护作用。食品中的氨基酸和维生素等营养物质, 更增强了微生物的耐压性。Metrick(1989)将鸡肉培养基中的沙门氏菌暴露在340MPa的环境中, 加压90min仍不能完全灭菌。这主要是由于脂肪、蛋白质等大分子有机物具有缓冲保护功能, 且丰富的营养加速微生物的繁殖和自我修复。

微生物的耐压性还与其所处环境的化学组成有关。研究发现,细菌在高浓度蛋白、高油脂、高糖或高盐分的环境中耐压性增高。如大肠杆菌和葡萄球菌随介质食盐浓度的上升而杀菌效果下降;沙门氏菌在鸡肉培养基中比在磷酸缓冲液中耐压;又加在果汁中含糖量越高,加压杀菌的效果就越差。一般而言,向高蛋白和高油脂的食品中添加脂肪酸酯,蔗糖酯或乙醇等添加剂,能提高加压杀菌的效果。以杀灭不同食品中的啤酒酵母为例,就可明显看出(见表 3.2),各种组分在加压环境中具有潜在的保护功能。Kajiyama 等人用大肠杆菌菌悬液作高压试验,发现当基质中有 50%豆油或猪油时,400MPa 灭菌分别需 15 或 10min;当菌种处于油——蛋白质形成的乳浊液中,则加压时间要延长至 30min。将鸡肉培养基中的沙门氏菌暴露在 340 MPa 的环境中,加压 90min 仍不能完全灭菌。这主要是由于脂肪、蛋白质等大分子有机物具有缓冲保护功能,且丰富的营养加速微生物的繁殖和自我修复。所以,针对特定的食品素材选择加压杀菌工艺也是关键课题之一。

表 3.2 高压处理对不同食品中啤酒酵母的杀灭条件

食品	压力 (Mpa)	时间 (min)	温度 (°C)	报道者	年代
桔汁	200	10	45	Ogawa, H	1989
温州蜜桔汁	350	5	室温	Ogawa, H	1990
米酒	300	10	25	Hara, A	1990
果酱	400-600	5	室温	Horie, Y	1991
肉及其制品	400	10	25	Shigehisa, T	1991
伊子柑汁	400	5	室温	Takahashi, T	1993
	100	5	57		
新切菠萝	340	15	38	Aleman, G	1994
杏泥	400	1	20	Rovere, P	1994
白葡萄汁	500	3	室温	Moio, L	1994
杏蜜汁	700	5	室温	Gola, S	1994
意式酱面	300	10	25	Pandya, Y	1995

汤	225	20	45		
瓜花汁	600	10	25	Hsintang, lin	1995
脂肪乳	450	15	20	Patterson	1995
UHT					

利用食品中原有的天然抗菌物质 (Moi0, 1994, Previdi, 1994) 或添加某些抑菌成分, 再与高压和其它手段, 如中温、超临界二氧化碳、交流电、间歇加压、冷冻、辐射、微波等方法协同处理也是高压杀菌研究的重要方向。Kamura (1993) 将煮熟的鹌鹑蛋用氯化钠溶液浸泡, 加有 50ppm 的多聚赖氨酸, 则 500 MPa, 5min 就能杀灭其中的芽孢杆菌孢子。Nakasawa (1994) 在果汁中添加蛋白酶, 200MPa 下加压 10min 就可取得很好的灭菌效果。此外, 加酸 (Ogawa, 1990; Pandya, 1995; Roberts, 1995; Mackey, 1995), 溶菌酶 (Meisei, 1992), 乙醇 (Tamura, 1993), 甘油脂肪酸酯 (Murata, 1993), 脂肪酸糖脂 (Hayakawa, 1994), 壳聚糖 (Knorr, 1994), 乳链球菌肽素 (Roberts, 1995), 山梨酸钾 (Mackey, 1995) 等等, 都因添加物的存在而改变了细菌正常生长的环境, 具有一定的协同灭菌效果。这种协同灭菌工艺有助于杀灭一些耐压性高的营养细胞和孢子。

## 9 介质的影响

不同流体的材料灭活微生物的效果不同。例如牛顿流体 (果汁、奶等液体) 比非牛顿流体 (果酱、膏状等材料) 灭活微生物比较容易; 流体比固体 (肉类、海产品等) 灭活微生物容易; 固体中含水分大的比含水分小的容易灭活微生物。

培养基成分影响高压对微生物的效应, Dring 报道, 在高压作用下, 微生物在 0.85% 的生理盐水中影响较显著, 而营养培养基却保护微生物免于损伤或修复, 因为必要的氨基酸和维生素可供微生物在极端环境中利用, 其极大地影响着微生物的存活。培养基的 pH 影响微生物的生长, 高压改变培养基的 pH, 因此缩小了微生物生长的 pH 范围。

食盐对超高压下的菌体有一定的保护作用, 而且在一定的范围内随盐浓度的增加, 保护作用也加强; 但对酵母菌, 低温 (-20℃) 下, 食盐的加入有利于杀菌。但是当加入 2% 的盐后, 经压力处理的细胞的恢复能力非常差。

碳水化合物一般比盐更具保护作用。糖液浓度愈高, 对菌体的保护作用愈强

(但低温下效果不明显), 当浓度达到 40%以上, 形成高粘度介质时, 高压对微生物的杀菌作用非常微弱。在加压处理糖液杀菌时, 当糖液浓度为 30%时, 用 500 MPa 高压处理时可杀死糖液中的杂菌; 糖液浓度为 40%时杀菌效果减小; 如果糖液浓度达到 50%时则完全没有杀菌效果。糖的种类对高压处理的杀菌效果也不相同, 蔗糖>果糖>葡萄糖>甘油。

蛋白质对菌体也有一定的保护作用, 但这种作用有时不明显。液态油脂对菌体有保护作用, 固态油脂的保护作用则很小。蛋白质和油脂的乳化液对菌体有明显的保护作用。将分别接种在硝酸盐缓冲液(pH 7.2)和消毒牛乳中的对象菌进行耐压实验, 发现在相同条件下(30℃, 300MPa, 20min), 牛乳中的菌残存率高于缓冲液中的菌残存率。显然, 牛乳中的脂肪、蛋白质等大分子有机物具有缓冲保护功能, 从而增加试验菌的耐压性。

添加脂肪酸酯、蔗糖酯或乙醇等添加剂, 则能提高加压杀菌的效果。

## 10 pH 值的影响

每一种微生物生长繁殖所适应的 pH 值都有一定的范围, 在压力作用下, 介质的 pH 值发生变化, 会影响微生物的生命活动。氢离子浓度对其生命活动影响很大。高浓度的氢离子可引起菌体表面蛋白质和核酸水解, 并破坏酶类活性。因此酸性环境不利于多数微生物的正常生长, 这也是第一代高压食品以酸性食品, 如果酱、果汁等为主的原因之一。

pH一直被看作是影响微生物在受压条件下生长的主要因素之一。高桥观二郎认为pH在常温域加压时影响不明显, 而在低温域加压有明显影响。在低pH和高pH环境下, 都有助于杀死微生物。

低 pH 值有利于微生物的灭活, 因此酸性食品(如橙汁、柠檬汁)要比甜度大的食品(如荔枝汁、梨汁)容易灭菌, 因为偏酸的成分本身就有防腐的作用。在 0.1MPa 下, pH9.5 时, 粪链球菌(*Streptococcus faecalis*)的生长受到抑制, 而在 40MPa 下, pH9.0 即可使其生长受抑制。另一方面, 在食品允许范围内, 改变介质 pH, 使微生物生长环境劣化, 也会加速微生物的死亡速率, 使超高压杀菌的时间缩短, 或可降低所需压力。

加压时, 压力可改变介质和食品的 pH 值。Heremans (1995) 指出, 对苹果



汁每加 100MPa 的压力, pH 值就会下降 0.2 个单位。如给中性的磷酸缓冲溶液施加 68MPa 的压力, pH 下降 0.4 个单位。Dring 研究海水的 pH, 结果发现, 0.1MPa, 1°C 海水的 pH=8.1; 100MPa, 1°C 海水的 pH 降低为 7.8。Marquis 也发现, 0.1MPa, pH9.5 抑制 *Streptococcus faecalis* 的生长; 而在 40MPa, pH8.4 时同样会抑制 *Streptococcus faecalis* 的生长。Serrationmarcesce 在 0.1MPa, 其 pH10.0 时停止生长; 而在 40MPa, pH9.0 时停止生长。其原因可能是高压失活细胞膜上的 ATPase, ATPase 对于调节细胞的酸碱平衡具有非常重要的作用, 高压阻碍了阳离子和质子的转移。

酸度酵母和霉菌在低 pH 值或 pH 值低于 4.0 时压力抗性强, 对压力不敏感。营养细菌对压力、热、低 pH 值都非常敏感。细菌芽孢在中性 pH 值条件下对压力抗性最强, 在经过 50MPa~300MPa 的压力处理发芽后, 芽孢在中性 pH 值条件下对压力最敏感, 这样可以间接的杀死芽孢, 在经过热或压力处理后, 细菌对于非最适 pH 值环境更加敏感, 这种处理过程中的酸性介质使细菌更易被杀死, 而且细菌受到非致死性加热和压力处理后, 其生长受到抑制。但是有机酸对其没有特定的影响。

Linton (1999) 指出, pH 值对埃希氏菌属大肠杆菌 0157H:7 的失活率有显著影响。当 pH 值降低时, 大多数微生物就更容易被失活, 同时被亚致死的细胞也很难复活。在 Garcia Graells (1998)、Pagan 等人 (1999) 的著作中, 曾阐述了 pH 值对压力破坏的微生物残存物的影响。Pagan 等人的著作中, 阐述了一种从稳定阶段培养菌中分离出的耐压菌株—埃希氏菌属大肠杆菌 C9490, 在 pH 值为 7.0 的磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 中, 分别对其加压 100MPa、200MPa、300MPa、400MPa、500MPa、600MPa 10 分钟。处理后的细胞被转移到 pH 3.5 的胰化(蛋白)豚大豆肉汤中并在 37°C 的温度下保存 3 个小时。实验表明, 低于 200MPa 的压力并不能使细胞失活。300-600MPa 压力范围内, 压力越大, 细胞失活率也就越高。实验曾对细胞加压 400MPa 10 分钟, 然后把处理过的细胞放在 pH 7.0~3.5 的介质中, 最后发现, 如果  $\text{pH} \leq 4.5$ , 细胞就会被失活。被压力破坏的细胞内部 pH 值的变化并不是影响细胞存活能力的因素。研究表明酸性 pH 值可以引起被压力破坏的细胞的失活。

Roberb (1995) 报道 pH4~7 的范围内, 以 pH4 对凝结芽孢杆菌孢子的压力致死

效果最好。Kajiyama (1993)以大肠杆菌菌悬液为对象，发现加压时间相同时，pH7~8.8, 400MPa的处理与pH4.4~5, 300MPa具有相同的致死率。Gola等人(1994)对杏蜜中的啤酒酵母施以700 MPa的高压灭菌，有pH3.5优于pH5.0的结论。林(1995)检测加压后的瓜花汁，也发现pH3.9时的灭菌效果强于pH4.7。当然，也有不同结论。Oxen(1993)用200~400MPa处理鲁伯红酵母，结果pH3.0~8.0的范围内结果差别不大。这可能是由于该试验中，水分活度的影响占了主要地位。总的来看，高压酸性食品的研究比较全面，而关于UHP对低酸性食品的作用则需要对更多的实验数据进行评估。

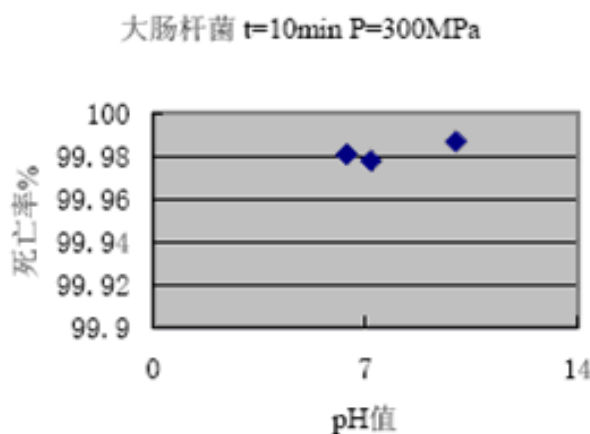


图 3.8 pH 值对灭菌效果的影响

pH值大小似乎对大肠杆菌灭活的影响不大，图3.8是固定压力300MPa和保压时间10分钟时，pH值与细菌死亡率的关系。从图中可看出在酸、碱、中性培养基中的差别不大，或许该实验的pH值都偏高的缘故。但是Kajiyama (1993) 以大肠杆菌悬液为对象，发现加压时间相同时，pH7~8.8, 400MPa的处理与pH4.4~5, 300MPa的处理有相同的致死率，这是否与大肠杆菌的特定结构有关？

林(1995)检测加压后的瓜花汁，发现pH3.9时的灭菌效果强于pH4.7。Roberts (1995)报道pH4~7的范围内，以pH4对凝结芽孢杆菌的压力致死效果最好。当然，也有人得出相反结论。Oxen (1993)用200~400MPa处理鲁伯红酵母，结果pH3.0~8.0的范围内结果差别不大。小川浩史 (1989)发现在pH2.5、3.5、4.5之间，对贝酵母和铅色毛霉的加压效果差别几乎没有；还指出有机酸种类不同(如苹果酸、酒石酸、乳酸、醋酸的浓度为0.7%)，其加压灭菌效果也几乎没有区别。也有人报道在高静压下，pH3.6、4.8、6.0条件下，对啤酒酵母、黑曲霉、乳链球菌杀菌效果没有十分明显的影响。Ogawa等人也发现，高压灭活桔汁中原有的

霉菌时，pH2.4—4.5范围时，灭菌效果与pH值无关。当试验无酸果汁时，外加独立的有机酸调度时，它不会成为一种影响因素。酸性食品的高压杀菌研究较多，而低酸性食品的高压杀菌研究较少，对于中性pH的食物进行杀菌处理时，单纯依靠高压处理是不理想的。存活于不同浓度的蔗糖溶液中的啤酒酵母，当溶液的pH值在3.5—6.5范围时，其灭菌率与pH值关系不大。Kanjiro Takaheashi研究了溶液中大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、啤酒酵母的高压灭菌效果，发现常温下高压处理时pH为7.0时，灭菌效果最差，而低温下pH值高低对灭菌效果无影响，看来，对酵母菌类而言，采用超高压处理时pH值并不是重要的因素。

据报道，曾以啤酒酵母 As2.1364、嗜热脂肪芽孢杆菌 As1.999 为研究对象菌，研究其在常温下，不同 pH 值和不同种类的有机酸条件下，两种菌对超高压的耐性，并进一步探讨了 pH 值和有机酸与高压的协同灭菌效果。其结论是：啤酒酵母最适生长的 pH 为 4.6。此时其形态光滑、饱满，个体较大，呈椭圆形，经 300MPa、15min 处理后，其形态出现破裂、皱褶、萎缩，内容物外泄，酵母基本死亡。在高静压条件下，在 pH 值 3.6、4.6、5.6、6.6 下，pH 的变化对啤酒酵母的灭菌作用无显著促进作用。压力是 pH 与高静压协同灭菌的主要因素。在高静压条件下，在 pH3.6~7.6 之间，pH 的变化对嗜热脂肪芽孢杆菌的耐压性只是简单的相加的协同效果。pH 值越低，高静压杀菌效果越好的原因主要应归于高浓度的氢离子对菌体的破坏作用。在各种有机酸乳酸、柠檬酸、醋酸浓度为 0.5% 的条件下，其种类不同对加压灭菌的效果无明显的区别。由于有机酸的电离程度很低，其杀菌作用不完全是因为氢离子的作用，那么起高效杀菌作用的必然是由于分子的性质。

## 11 水的活度的影响

水分活度主要是通过渗透压影响细胞的生理特性，从而抑制细菌生长甚至使其死亡。一般来说，水分活度低可保护细胞抵抗压力，但微生物一旦经过高压处理后，对水分活度就更加敏感。

Oxen和Knorr (1993) 指出，(在0.1Mpa) 若水活性从0.98~1.0降低到0.94~0.96，食品中微生物的失活速率就会明显降低。但可以预计的是，压力会使微生物呈现亚致死状态，而低水活性可以阻止亚致死的微生物细胞的复活。

Oxen(1993) 实验中，以蔗糖、食盐等调节水分活度。结果表明，水分活度(A<sub>w</sub>)

低于0.94时，室温下400MPa处理红酵母15min所产生的致死作用会受到抑制。30℃， $A_w$ 为0.96时，400MPa，15Min的处理可使酵母细胞减少1个数量级；当 $A_w$ 减至0.94，酵母失活不足两个数量级，当 $A_w$ 低于0.91，几乎没有失活现象。Knorr (1933)认为 $A_w$ 为0.92~0.88时，基质对微生物已有明显的保护作用。这与Osumi (1990)提供的结论相符。他认为高压对酵母细胞结构的影响产生于细胞膜体系，尤其是细胞核膜。低 $A_w$ 产生细胞收缩作用和对生长的抑制作用使更多的细胞在压力中存活下来。当然这不是唯一原因，食品中的各种组分也可能提供不同的保护或抑制功能。但控制 $A_w$ ，无疑对高压杀菌，尤其是固态和半固态食品的保藏加工有重要意义。

HACCP计划包含UHP加工处理过程中对食品水活性的监控和控制。然而，水活性的预测却是十分困难的，至今还未有关于水活性随着压力改变而变化的趋势和方向方面的报告。

## 12 拖尾现象

一般而言，随着压力的升高，微生物的致死率升高。然而，当微生物的致死率达到一定程度以后，其上升趋势趋缓。或者是在一定的压力下，随着加压时间的延长会提高灭活率，但是超过一定的时间，在增加时间，已经没有作用，总是残留一些微生物，这就是所说的拖尾现象。

要想再增大致死率，可采用在一定压力条件下增大处理次数，或采取其它协同措施。如图3.3所示，大肠杆菌在保压时间5分钟，pH值6.4时。当压力达到280MPa时，大肠杆菌的死亡率已经达到97.5%，仍存在些许没有失活的菌体，出现拖尾现象。当压力达到400MPa时，细菌的死亡率达到99.88%，基本消除了拖尾现象。

400MPa，50℃，18 min 以内随保压时间延长多酚氧化酶活性下降速率较大，从2 min 保压时间的89.6 %下降到10 min 的81.3 %和18 min 的75.8 %；保压时间超过18 min 后，酶活性随时间增加下降很慢，多酚氧化酶的活性趋于稳定，保压时间26 min时酶的相对活性为72.5 %，34 min 时仍为70.7 %。

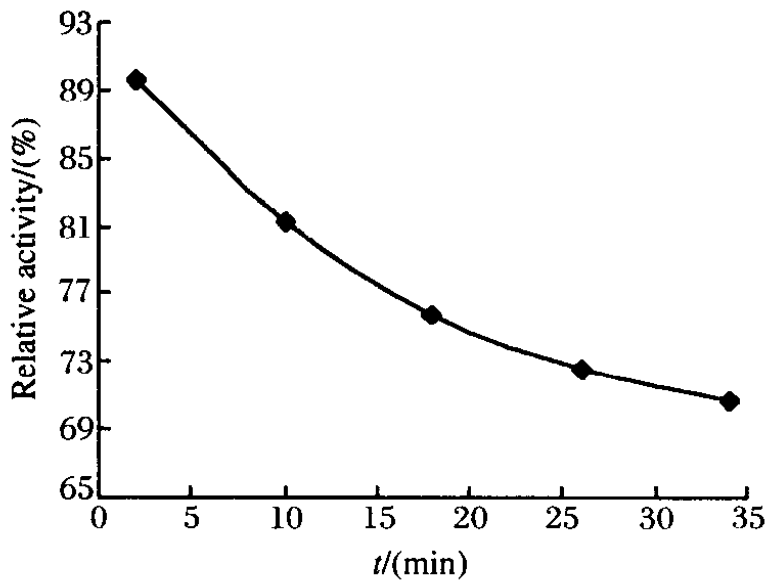


图3.9 保压时间对PPO 酶活性的影响

### 13 修复与再生

超高压处理后,有时微生物能够自动修复和再生。其原因可能是残留的微生物仍保留活性,或者一部分微生物,在压力下损伤,但还没有彻底死灭,一旦条件适合,就会修复恢复活性。Metrick (1988) 发现,细菌在压力损伤后,在37℃条件下,在鸡肉培养基中几个小时培养便可复原,但在缓冲液中则完全不行。Nelson的研究也有类似的发现,将鸡肉培养基中的沙门氏菌暴露在高达340MPa的环境中,加压90分钟仍不能完全杀灭 $10^7$ 个/ml的细菌。这主要是由于脂肪等组分具有缓冲、保护功能,且丰富的营养加速微生物的繁殖和自我修复。

为了检验受到超高压破坏的细菌的恢复和存活能力,Patterson等做了如下试验:将大肠杆菌0157:H7 给予不同的压力,15分钟,再分别接种到TSAYE(胰蛋白胨大豆琼脂+0.6%酵母浸膏)和TSAYE+3%NaCl平板上(NaCl抑制细胞膜损伤细胞生长),他们观察到:在300MPa以下,两个平板上的菌落数没有明显差别;在400MPa以上,含盐平板上的菌落数明显降低,表明NaCl进入细胞膜损伤的细菌,引起细菌死亡。Paul等通过类似的试验也得到相同的结论,他们还认为细菌的细胞外膜在某种程度上可以自发地修复,而细胞内膜却不能,它需要细胞内生物合成如蛋白质、ATP、RNA和肽聚糖等的合成。

因此,为了抑制微生物高压处理后的修复和再生,一般超高压加工的食品最

好在 5℃ 以下低温保存。

#### 14 非在位效应

很多专家发现了超高压处理后微生物的非在位效应,这与修复与再生的情况恰恰相反。通过对脱脂牛乳粉溶液进行超高压处理,对不同储存期的观测,其总菌在不断下降,

表3.3 压力——保存时间对总菌的影响

处理组	1	2	3	4	5	6	7
压力 (Mpa)	200	240	280	320	360	380	420
时间 (min)	11	5	15	9	3	13	7
第一天	11400	10200	3700	3600	4600	1600	1380
第三天	4700	6200	1850	3000	1570	1040	840
第五天	2400	6050	1590	520	1470	380	310

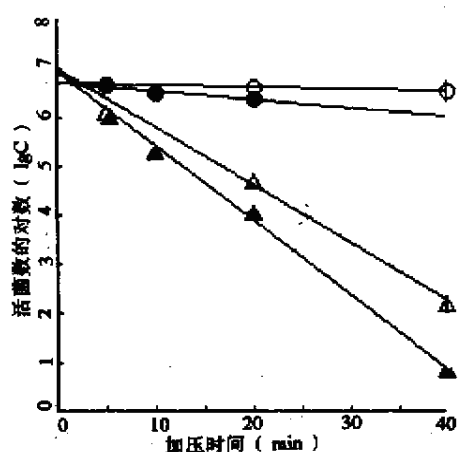
从表 3.3 可见,随着保藏时间的延长,0 组(对照组)的菌数急剧上升,而各压力组的总菌数却持继下降。可见压力的杀菌作用是非在位的,即压力撤掉以后,杀菌的作用仍然存在。高压可以在作用后一段时间内抑制细菌的生长和繁殖。关于压力杀菌是一种非在位效应,还有学者发现,以 20MPa、60MPa、80MPa、100MPa、120MPa 分别处理生鲜牛乳 5min(4℃)卸压 95 小时后,与天然牛乳相比,培养基培养的菌落数目没有减小;与市售消毒牛乳和天然牛乳相比,菌落面积显著减少,直径分别为 1mm、3.5mm 和 4mm;说明 120MPa 以下的静水压不能杀死鲜牛乳中的细菌,但是 20MPa 以上的静水压能显著降低牛乳中细菌的生理活性,使细菌的生长繁殖能力在一定时间内受到强烈抑制、而且是一种卸压后仍能维持的非在位效应。

#### 15 超高压灭菌反应动力学

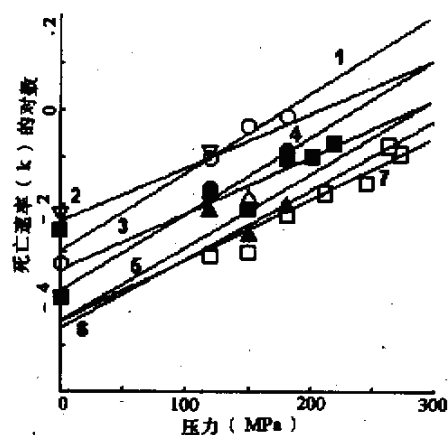
应用超高压杀菌技术必须先了解不同微生物的耐压性、超高压下微生物的死亡规律和影响因素。通常经过优化实验和数据的处理,归纳成动力学公式来表述

超高压灭活微生物的规律，以下通过几个典型实例阐述灭活反应动力学的规律。

对于大多数不耐压的微生物而言，在恒定的高压下，微生物的死亡遵循一级反应动力学，其压力致死(灭活)曲线在半对数坐标中呈直线，压力愈高，菌体死亡速率愈快，呈线性正比关系，如图3.10、3.11。



○210MPa, • 240MPa, △250MPa, ▲: 270MPa.



1: ○-20℃, 2: ▽50℃, 3: ■: 40℃, 4: ●: -10℃, 5△: 0℃, 6: ▲: 5℃, 7: □25℃

图3.10 不同压力下的酵母菌(室温)

图3.11 不同温度下酵母菌死亡率和压力的关系

一级其反应动力学方程可写成:

$$\log C = \log C_0 - kt / 2.303 \quad (3-1)$$

式中: C——微生物(或芽孢)的残存活菌数(个/ml或个/g),  $C_0$ ——初始活菌数(个/ml或个/g), k——死亡速率常数(个/min), t——压力处理时间(mLn)。

微生物的耐压性或菌体死亡速度的快慢可以用指数减菌时间D值或死亡速率常数k值来表示。D值定义为微生物(或芽孢)的活菌数减少90%所需的时间(min), 但此时的D值或k值不反应标明压力值, 也应说明其适应的温度(范围)值。

D值和k值的关系仍为:

$$k = 2.303/D \quad (3-2)$$

对于致死曲线在双对数坐标中呈直线时其反应动力学遵循假一级反应动力学, 其动力学方程可写为:

$$\log C = \log C_0 - k' \log t \quad (3-3)$$

式中:  $k'$ ——拟死亡速率常数(个/min)(写成  $k'$  以区别于式(3-1)中的k), 其余各符号意义均同式(3-1)。

当压力升到一定值后随处理时间的延长,半对数坐标上致死曲线中残存菌数的下降趋势变缓,有时还会出现拖尾现象。

温度对超高压杀菌有明显的影响,而且不同微生物,其影响也不相同。在恒定的高压下,不同温度下酵母菌的致死曲线均呈一级反应(图3.12),但不同温度下的杀菌效果相差很大,温度与菌体死亡速率常数的关系;呈椭圆形曲线(图3.13)。这表明超高压对酵母菌的杀灭在低温或较高温下均比常温下的效果好。

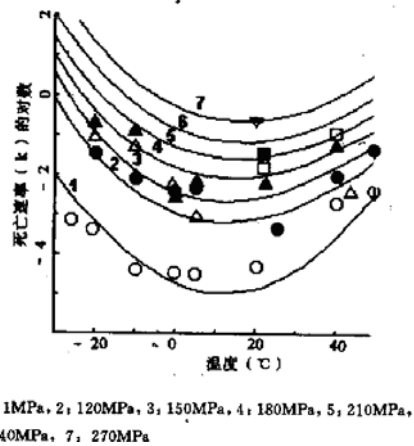
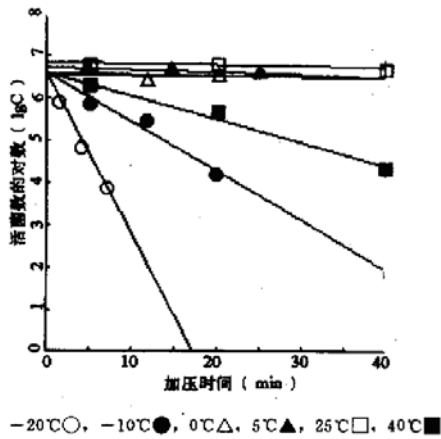


图3.12 180Mpa压力不同温度下酵母菌的致死曲线 图3.13 不同压力下酵母菌致死速率和温度的关系

在25—65℃范围内,耐压性强的孢子的压力致死不遵循一级反应动力学,如枯草杆菌的致死曲线在双对数坐标中呈直线(图3.14),凝结芽孢杆菌和嗜热脂肪芽孢杆菌的孢子的压力致死曲线在双对数坐标中也呈直线。枯草杆菌孢子在90—110℃内的压力致死曲线又呈一级反应形式,压力升高,孢子的死亡速率也增加(图3.15)。

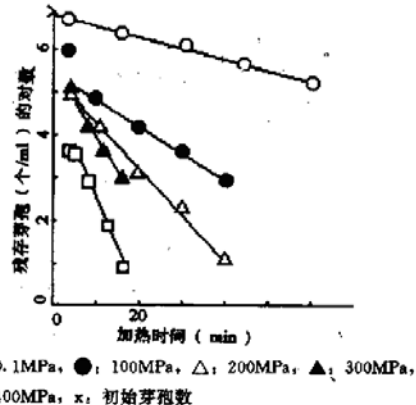
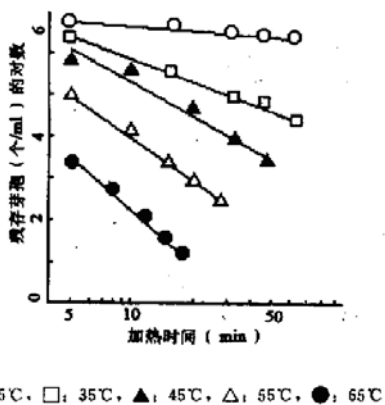
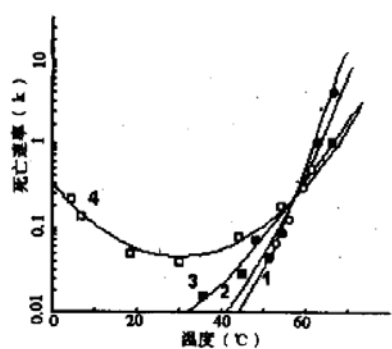


图3.14 400Mpa 时中温范围内枯草杆菌 (*B. subtilis*) 芽孢于不同温度下的致死曲线

图3.15 100℃时枯草杆菌芽孢在不同压力下的致死曲线

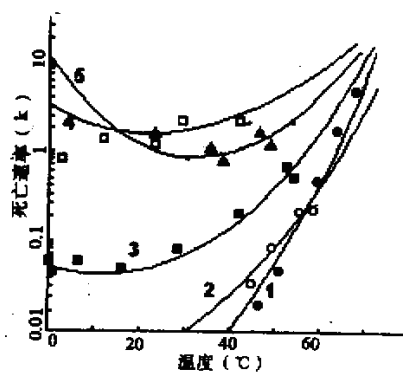


温度和菌体死亡速率常数的椭圆形关系曲线是在一定的压力下才呈现的,如乳酸菌(L. casei)和大肠杆菌(E. coli)的超高压处理在0—70℃范围内,当压力在常压和较低压力(0.1—150MPa)时,乳酸菌和大肠杆菌的死亡速率因温度愈高,菌体死亡速率常数愈大,两者呈直线或近似直线的关系,但随着压力的继续增加,低温下(-20—0℃)的杀菌效果逐渐增强,也出现了象酵母菌那样的椭圆形曲线(图3.16、3.17)。



1: 0.1MPa, 2: 100MPa, 3: 200MPa, 4: 300MPa

图3.16 乳酸菌在不同压力下死亡速率和温度的关系



1: 0.1MPa, 2: 100MPa, 3: 200MPa, 4: 300MPa, 5: 400MPa

图3.17 不同压力下大肠杆菌的死亡速率和温度的关系

为了同时考虑压力和温度对杀菌效果影响,更好地描述超高压杀菌动力学的曲线,可以采用的三维曲线(曲面)。国内外经常采用的先进试验设计法—Box-Behnken 设计法,这是国际上较为常用的一种响应曲面法(response surface methodology, RSM)。它以回归方法作为函数估计的工具,将多因子试验中因素与试验结果(响应值)的关系用多项式近似,把因子与试验结果的关系函数化,依次可对函数进行面分析,定量地分析各因素及其交互作用对响应值的影响。由于采用了合理的试验设计,能以最经济的方式,用较少的试验次数和时间对试验进行全面的研究所。

图3.18是考察温度、压力和保压时间对超高压杀灭大肠杆菌的影响,采用响应曲面法(response surface methodology, RSM)建立了超高压杀灭大肠杆菌的二次多项数学模型,通过优化试验参数,绘制的实验曲线(曲面)。

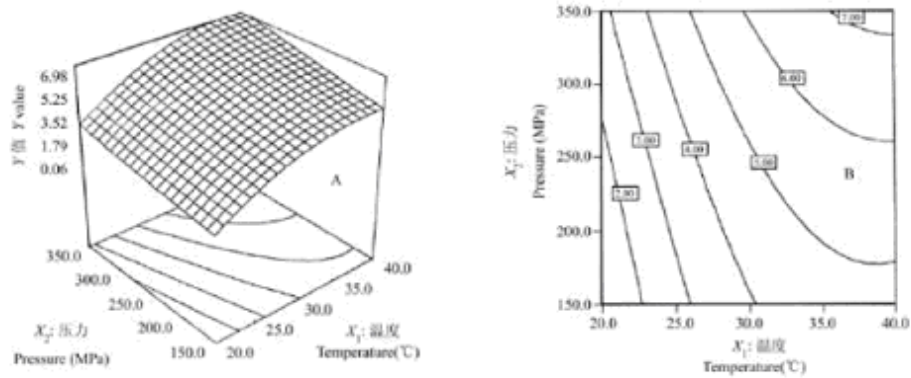


图3.18 温度压力及其交互作用对超高压杀灭大肠杆菌影响的响应面 (A) 和等高线 (B)

对于由压力、温度双因素影响超高压灭菌的动力学方程，可以用下式表达

$$\log k = \alpha + \beta(P - P_0) + \gamma(T - T_0) + \delta(P - P_0)^2 + \varepsilon(P - P_0)(T - T_0) + \Phi(T - T_0)^2 \quad (3-4)$$

式中：

k——菌体死亡速率常数(个 / min)，

P——压力(MPa)，P<sub>0</sub>——0.1MPa，

T——温度(k)，T<sub>0</sub>——273.15k，

$\alpha \sim \Phi$ ——常数。

例如通过实验得出数据，并采用此方程对酵母菌的回归分析结果为：

$$\alpha = -4.26, \beta = 1.25 \times 10^{-2}, \gamma = -3.37 \times 10^{-2}, \delta = 8.55 \times 10^{-6}, \varepsilon = -7.55 \times 10^{-5}, \Phi = 1.42 \times 10^{-3} (R = 0.927)。$$