

细菌孢子的耐热性

黄福南

(轻工业部食品发酵工业科学研究所)

一、前言

加热是罐头食品杀菌的经典方法。由于这种方法简单易行，而且花费低廉，因此至今仍然是用于罐头食品杀菌的主要方法。

加热杀菌是利用热力使细菌丧失生存的能力。然而细菌对热也有一定的抗性，尤其是细菌孢子对热有异常的抵抗力。虽然细菌孢子本身对食品工业来说并不造成任何危害，但在热杀菌中残存的细菌孢子得以萌发，生长和繁殖的时候，最终将导致食品腐败。因此细菌孢子的耐热性确是罐头食品热杀菌控制的重要因素。

长期以来，人们对细菌的耐热性作了大量的研究，发现不同菌种之间的耐热性有显著差别。即使是同种细菌孢子，甚至同一菌株的孢子，耐热性也不是一个稳定的常数。这种影响因素与细菌孢子的微观结构有关，或者说是细菌孢子热致死机理的某种表现。本文是对细菌孢子的耐热性机理及其影响的综述。旨在为罐头食品的热杀菌控制提供理论基础。

二、影响耐热性的因素

影响细菌孢子耐热性的因素很多。这些因素可以归纳为四个主要类别，即细菌种类；孢子形成的条件和环境；热处理条件和环境；加热后的生长条件。

1. 细菌种类

不同细菌孢子的耐热性差异很大。Warth(1978)表明许多芽孢杆菌属的细菌孢子的耐热性与其营养细菌的最适生长温度有关。最适生长温度高，孢子的耐热性也高。因此，最适生长温度高的芽孢菌，如凝结芽孢杆菌，嗜热脂肪芽孢杆菌具有很高的耐热性。例如，在110℃下E型内毒杆菌的D值不到0.1秒，而嗜热脂肪芽孢杆菌孢子的D值为40分钟。因此，嗜热脂肪芽孢杆菌也通常用作控制热杀菌过程的试验菌(Murrell and Scott 1966)。然而，Z值的测定结果表明，在较高的杀菌温度下(大于140℃)，梭状芽孢杆菌属常常是最耐热的细菌。

应该指出，即使在同种细菌的不同菌株之间，由于遗传变异的原因，耐热性也会有很大的差别。例如，Roberts(1968)发现几株产气荚膜杆菌的 D_{90} 相差达40倍(Z值差4倍)。Bradshaw等(1975)报道两株蜡状杆菌的 D_{121} 相差78倍(Z值差1.2倍)。

菌龄也会影响耐热性，但没有规律。根据Esty和Meyer(1922)的试验结果表明年轻的肉毒杆菌孢子比年老的耐热性大。Sommer(1930)报道经4—8天培养的肉毒杆菌孢子具有最高的耐热性。Curran's(1934)用好氧芽孢菌试验表明当菌龄高达一年时耐热性增加，但

本文1986年6月5日收到

在开始的三个月内耐热性没有变化。Bashford(1942)报道产芽孢杆菌在7至14天的培养时耐热性最高。

2. 孢子形成的条件和环境

1) 孢子培养基对耐热性有很大影响 Williams(1929)报道了培养基成分的变化使孢子的耐热性偏离了正常值。Vinton等(1947)发现在巴氏杀菌或高压杀菌的肉中形成的孢子比添加肉中生长的孢子耐热性大。Mayou(1970)表明牛奶中生长的嗜热脂肪芽孢杆菌的耐热性比添加40ppm磷酸镁的营养琼脂中生长的孢子的耐热性大。Sugiyama(1951)用肉毒杆菌试验表明,产孢子培养基中的二价铁和钙离子的浓度低于某一个值时,孢子的耐热性降低。脂肪酸的存在,特别是长链脂肪酸会增加孢子的耐热性。Amaha和Ordal(1957)表明镁和钙均会增加凝结芽孢杆菌的耐热性,而且只有在足够量的镁和钙的条件下才能获得最高的耐热性。因为Elbisi和Ordal(1956)观察到磷酸盐含量高时,孢子的耐热性降低,因此,他们推断钙盐的利用可能受到培养基中磷酸含量的影响。Levinson和Hyatt(1964)用*B. megaterium*试验发现后加 CaCl_2 ,耐热性增加,但添加L-谷氨酸,L-脯氨酸或磷酸盐,则耐热性降低。

Molin和Svenson(1976)测定了培养基成分对枯草杆菌耐干热性能的影响。二十种不同的培养基用于培养枯草杆菌孢子,产孢子量的变化高达 10^6 倍。孢子在干热下的 D_{160} 相差约10倍。但是大部分试验培养基产生的孢子的 D_{160} 在40秒至150秒范围内,相差约为4倍。

培养基的pH值对耐热性有明显影响,一般来说,pH值越低,耐热性越小。因此基质酸化常用作一种预处理方法使孢子对耐热变得敏感化,从而降低杀菌强度。这种热敏感化是由于阳离子浓度的变化引起的。休眠孢子中二价离子的含量很高,主要是钙、镁、锰。这些阳离子主要存在于孢子的核区域,且处于固定状态(Carstensen等,1971)。控制阳离子的含量能从指数级地改变孢子的耐热性。若在低pH下进行长时间培养,阳离子就会逐渐从孢子中移去,从而导致耐热性降低。即使孢子经洗涤后再在中性pH条件下加热也是如此。但是,由酸作用使离子移去而造成的热敏感性增加是可逆的。在碱性pH条件下的高盐浓度下经过长时间的培养。能够部分或完全地恢复正常的耐热性,有时甚至超过原来正常的耐热性(Mrguis等,1981)。

与孢子形成环境密切有关的另一个因素是自然生长的孢子。例如在土壤中生长的孢子比人工培养的孢子具有较高的耐热性。Curran(1935)发现在土壤和燕麦中产生和陈化孢子比人工培养基上产生的孢子的耐热性高得多。Gillespy(1947)发现当土壤加入产孢子培养基时,嗜热厌氧的耐热性有显著增加。Sobernheim和Mundel(1938)观察到土壤原生芽孢的耐热性比同样土壤培养的孢子的耐热性高3倍。他们认为这可能是由于土壤物理化学性质影响的结果。

有许多证据可以说明实验室中测定的人工培养的孢子的耐热性与工厂的实际情况有时有较大的差别。Cameron等(1936)研究了甜菜罐头腐败菌。甜菜的热杀菌条件是 116°C ,20分钟。这个杀菌条件应该是以杀死全部孢子。因为孢子在该温度下的热致死时间为10分钟。但是在实验条件下,在 110°C 下加热5分钟就没有孢子残存。这个研究表明细菌原有的耐热性比实验室测定值高。据推测这可能是由于微生物在实验室条件下繁殖的缘故。

2) 孢子形成时的培养温度 孢子形成时的培养温度对耐热性有明显影响。在高温下的耐热性高(Cook和Gillbert,1968)。Sugiyama(1951)报告肉毒杆菌在 37°C 下形成的孢子

具有最高的耐热性。Lamanna(1942)发现好氧性芽孢菌孢子的耐热性与最高生长温度有关。Lechowich(1959)对枯草杆菌和凝结芽孢杆菌发现有类似的结果,耐热性随着产孢子温度的升高而增加。Lechowich和Ordal(1962)进一步表明孢子的吡啶二酸(DPA)和阳离子含量(Ca^{++} 、 Mg^{++} 和 Mn^{++})也是随着产孢子温度的升高而增加。

3) 化学状态 细菌孢子的耐热性与孢子的化学状态有关。这可以通过将孢子进行某种化学处理使其处于热敏感和耐热两种状态来表明(Alderton和Snell, 1963; Alderton等, 1964)。

细菌孢子具有阳离子可逆交换的机能。当孢子含有阳离子,孢子处于耐热性状态。当孢子含有水合氢离子时则处于热敏感状态(失去耐热性)。这两种状态下的D值相差可达10倍(Alderton等, 1976)。

4) 孢子在加热前的预处理方法对耐热性的影响 据报道,化学处理,如过氧化氢或酸处理能影响孢子的耐热性。物理处理,如声波(Sanz等1982),离子辐射均能影响孢子的耐热性。用热与其它方法共同处理所产生的孢子热钝化的速率和程度比效应叠加要大得多。杀菌效应与处理方法先后次序有很大关系。用中等强度的电离辐射可以大大降低随后孢子加热处理的D值(Gombas和Gomey, 1978)。用热和辐射对孢子进行复合处理,将会产生协同钝化作用(Pallas和Hamdy, 1976)。但是如果加热先于辐照,那么钝化作用只要叠加而已(Farkas和Roberts, 1979)。这在无菌包装设备中,在设计包装材料或包装中容器的杀菌系统时必须考虑这种复合处理的协同效应。

3. 加热过程中的影响因素

1) 水分活性和渗透压 在加热时孢子的耐热性将随着所处环境的水分活性和渗透压而变化。一般认为孢子对干热(水分活性小于0.1)的抗性比对湿热的抗性要大得多(Alderton, Snell, 1970)。枯草杆菌对干热有较大的抗性,而嗜热脂肪芽孢杆菌对干热则比较敏感(Molin, 1977, Murrell和Scott, 1966)。据报道,至少有一种微生物孢子,干嗜热芽孢杆菌对干热有极大的抗性,其 D_{125} 为135小时(Bond和Favero, 1977)。但该菌对湿热仅有中等程度的抗性,其 D_{80} 为61分钟(Bond等, 1973)。钝化温度系数Z值也随加热方式而异,如嗜热脂肪芽孢杆菌孢子湿热时的Z值为 6.4°C (Srimari等, 1980),但干热时Z值则大于 20°C (Molin, 1977)。

Hoffman等表明加热前如将孢子分别在相对湿度11%和85%下平衡,其 D_{160} 相差约为3倍。温度降低,D值的差别增加。研究表明,在高湿度下平衡的孢子在敞开的装置中对干热的抗性通常比在低湿度下平衡的孢子的抗性大。(Hoffman等, 1968; Drummond和pflug, 1970)。

即使在湿热情况下,许多种类的孢子,如果预先在低水分活性的情况下取得平衡,或是悬浮在高渗透压的溶液中时,它们的耐热性也会有明显的增加。据报道,有很多种细菌孢子,包括热敏感的含吡啶二酸(DPA)较少的腊状杆菌孢子的变异株,当它们在各种高浓度溶液中加热时,也会增加耐热性(Bhothipaksa和Bulsa, 1978)。如果产气荚膜杆菌孢子在高渗透压的蔗糖或甘油溶液中加热时,它们对辐射的敏感性将几乎完全被掩盖(Gomez, 1980)。在高渗透压溶液中加热也会掩盖酸析出的敏感性。甚至已萌发的孢子在高渗透压溶液中脱水时,也会恢复其大部分耐热性。不同种类的孢子耐热性相差可达 10^6 倍,但是若将它们在高渗透压溶液中平衡,则不同种类孢子的耐热性将增加到几乎同一个数量级(Harinulv

等, 1977)。

2) 悬浮液的 pH 和离子浓度 悬浮液(即加热基质)的 pH, 缓冲剂, NaCl 和阳离子都会影响细菌孢子的耐热性(Roberts 和 Hitchins, 1969; Russell, 1971)。例如嗜热脂肪芽孢杆菌孢子在 pH 分别为 3.0 和 6.0 的醋酸缓冲溶液中的耐热性, D_{100} 分别为 23 分钟和 14 小时。当 pH 超过 8.0 时, 耐热性又开始下降(Anderson 和 Friesen, 1974)。根据 Lowik 和 Anema(1972)Z 值与 pH 值无关。

磷酸盐通常降低孢子的耐热性(Cook 和 Gillbert, 1968; Adams, 1973; Steinbuch, 1977)。影响程度取决于孢子的种类, Adams(1973)发现三种不同的梭菌属细菌在水中的 D_{100} 比在 pH 为 7.0 的磷酸盐缓冲液的 D_{100} 分别大 1.4, 2.0 和 41 倍。

NaCl 低浓度下对耐热性的影响不大, 甚至没有影响(Roberts, 1966)。但在高浓度下对耐热性有削弱作用。Harnulv 和 Snygy(1972)表明枯草杆菌孢子的 D_{95} 在 26% 的 NaCl 溶液中, $a_w = 0.78$ 。比在相同 a_w 的蒸汽中的 D_{95} 减小 6 倍。

二价阳离子对孢子的耐热性有增加作用(Steinbuch, 1977)。其中尤以钙(Ca^{++}), 锰(Mn^{++})离子对耐热性的影响最为显著。

3) 有机物质 有机物质, 如蛋白质(如血清白蛋白)和碳水化合物(如蔗糖)对孢子耐热性有促进作用(AmahaSa 和 Kaguchi, 1954; Smelt 等, 1977), 甚至加热初期活化孢子的浓度也会影响 D 的测定(Casolari, 1974)。

脂肪对芽孢的热破坏有极大的保护作用。加热时, 如果有脂肪存在则耐热比在磷酸盐缓冲溶液中加热时要大得多。Russell(1971)提出脂肪的保护作用仅仅是由于降低水分活性的缘故。这个假设曾被孢子在大豆油中加热试验结果所支持(Senhaji, 1977)。但是, 当孢子在不同的脂肪中测定对干热的耐性时, 即孢子控制在相同的水分活性下, 不管孢子是否被脂肪所包围, 测定的结果表明, 孢子在不同的脂肪中的耐热性表现很有规律, 橄榄油 < 甘油三油酸酯 < 大豆油 < 甘油三癸酸酯 < 甘油三月桂酸酯(Molin, 1977)。孢子在甘油三癸酸酯和甘油三月桂酸酯中加热, 其耐热性比对照孢子(干净孢子)的耐热性大。在大豆油中加热, 耐热性与对照孢子相仿。这说明脂肪对孢子的保护作用除了水分活性的因素之外, 还与脂肪的种类有关。应该指出, 上述研究表明, 脂肪对耐热性的影响仅涉及 D 值, 对 Z 值却无影响。

4) 抑制剂 加热基质中如有杀菌剂或抑制剂存在会降低耐热性。Berry 等(1938)和 Coulthard(1939)表明少量的杀菌剂可以提高在低温下的杀菌效应。Pederson 和 Beavens(1940)提出 22ppm 的二氧化硫可以使果汁巴氏杀菌的温度降低 $5.5^{\circ}C$ 。Gillespy(1946)总结早期的研究工作时记载, 由糖带入水果罐头的少量二氧化硫能显著地降低纯黄丝衣霉孢子束孢子的耐热性。例如 2ppm 的二氧化硫可将在 pH 3.0 时杀死 99% 所需要的时间, 从 $85^{\circ}C$ 的 40 分钟减少到 14 分钟。在试验中 Gillespy 发现二氧化硫对耐热性的影响与加热基质的 pH 有关。其影响随 pH 升高而减弱。

Michener 等(1959)深入研究了 650 种物质对产芽孢杆菌耐热性的影响。除抗氧化剂之外, 影响较大的物质有氧化乙烯, 环氧二丁烷, 过氧化氢, 甲醛, 胍十二烷, 氢代溴化物, 三甲基十六烷, 铵, 溴化物, 维生素 K_4 , 和蒜油。

某些香辛料油对细菌耐热性的影响也进行了研究。Kosker 等(1951)研究表明 10ppm 的芥末挥发性油加入缓冲溶液, 苹果和葡萄汁明显地降低了黑曲霉和葡萄酒酵母的耐热性。对

凝结芽孢杆菌的影响较小。蒜油和洋葱油对细菌的影响比芥末挥发性油的影响小。由于在实际的使用上有一定的限量,丁香,玉桂,蒜和莳萝风味油对悬浮在番茄汁里的凝结芽孢杆菌的作用十分有限(Anderson等,1953)。然而玉桂和蒜油对降低酸泡菜腐败酵母的耐热性有显著作用。Anderson等(1951)表明添加蒜油和莳萝海藻油至风味可接受的程度258ppm,芥末油至20ppm,大大地降低了试验酵母在酸化盐水中的热酸死时间。Bose和Roy(1960)研究了一些香辛料对枯草杆菌耐热性的影响,发现辣椒油和芥末油的作用最大。Michener等(1959)发现300ppm的蒜油和500ppm的芥末油可以使悬浮在Anderson嗜肉豌豆培养基中的专性厌氧菌(P. A. 3679)的耐热性降低50%。试验结果可以看出某些香辛油对酵母细胞的热稳定性有很大影响,但对细菌孢子影响不大。

Le Baw和Desrosier(1953)表明许多食用植物抽提原液对微生物的生长有抑制作用。La Baw和Desrosier还表明有些抽提液可以使平酸腐败菌的耐热性降低到中等水平。这些作用将有助于减少微生物在加工食品中的残存时间,也可用于解释微生物在不同的食品中有不同耐热性的原因。

5) 抗菌素 Anderson和Michener(1950)首次报道了结合使用一种抗菌素,如枯草菌素和中等程度的热处理以防止食品腐败菌和有毒梭菌的生长。这一研究激励了很多人探索采用枯草菌素或其他抗菌素以降低低酸罐头食品的杀菌强度。抗菌素中受到最大注意的是枯草菌素,泰绿菌素和乳链球菌肽。O'Brien(1956)和Michener等(1959)发现枯草菌素和乳链球菌肽是当时所有试验的抗菌素中对专性厌氧菌P. A. 3679最有效的抗菌素。Denny等(1961)对泰绿菌素作了一系列的腐败菌抑制试验。

Le Blanc等(1953)研究了肉毒杆菌和专性厌氧菌P. A. 3679孢子在豌豆浆中的耐热性。当枯草菌素含量达14ppm时,P. A. 3679菌孢子的耐热性仅为不含枯草菌素的耐热性的47%。在相同的悬浮基质中,肉毒杆菌孢子耐热性仅为正常耐热性的63%。O'Brien等(1956)获得同样的结果,这表明枯草菌素和乳链球菌肽降低了某些肉毒杆菌菌株在豌豆浆中的D值。Le Blanc等(1953)在有限的试验中着重研究了抗菌素在后培养基中的作用,而少量的枯草菌素在后培养基中对孢子萌发没有影响。O'Brien和Titus(1955)做的大量试验清楚地表明后培养基中0.03ppm的枯草菌素,使严重加热的P. A. 3679菌的残存孢子有85%没有生长。Michener(1955)提出的观点认为加热后的孢子能够吸附枯草菌素,且仍能萌发,然而在萌发后被抗菌素所杀死,Campbell和Sniff(1959)和Thorpe(1960)用凝结芽孢杆菌和嗜热脂肪芽孢杆菌试验表明当孢子与乳链球菌肽一起加热时,耐热性显著降低的原因是由于乳链球菌肽与孢子结合阻止了孢子的生长。

一般认为抗菌素的作用是使孢子静止而不是杀死孢子。也就是说,孢子的萌发不受影响而仅仅防止孢子萌发后的营养体的生长。例如,Hitchins等(1963)结论指出乳链球菌肽在孢子萌发时防止了孢子壳的崩溃和溶解,但没有抑制萌发。枯草菌素也有相同的作用模式(Gould,1964)。泰绿菌素也不例外。Denny等(1961)表明泰绿菌素对耐热脂肪芽孢杆菌或肉毒杆菌孢子的耐热性没有影响,但能抑制微生物生长,能够有效地防止腐败。

在利用抗菌素的抑菌作用时必须记住耐抗菌素菌株存在的可能性。事实上,Campbell和Winiarski(1959)分离到了一株耐枯草菌素的肉毒杆菌。这一研究表明抗菌素不能全部满足基本的试验要求,也即不能杀死所有的肉毒杆菌孢子。但抗菌素仍有实用价值例如在pH 4.6以下的酸性食品或接受肉毒杆菌最低安全杀菌强度的低酸性食品,由于不存在肉毒杆菌

的危险,因此,抗菌素可和热处理结合使用以降低热杀菌强度,而又不增加腐败率。当然对这一主观设想做了大量的试验,但获得的结果常常是令人失望的。

Williams和Campbell(1951)发现枯草杆菌素和中等程度的热处理并不能够杀死从腐败罐头食品中分离出来的嗜热菌。Adams等(1952)用碎牛肉和专性厌氧菌做试验发现高剂量枯草菌素和中等程度的热处理并不能够长期抑制牛肉中的厌氧菌孢子,而需要较强的热处理和高剂量的枯草菌素。Spilde(1951)发现枯草菌素不能总是能成功地保藏鱼丸罐头。

另一方面,也有一些文章报道枯草菌素和乳链球菌肽降低了一些腐败菌的耐热性,或在实罐试验和TDT(热致死时间)罐的试验中减少腐败的发生。LeBlanc等(1953)和O'Brien等(1956)的工作也已提到在后来的工作中他们采用乳链球菌肽,枯草菌素嗜热解糖梭菌3814,凝结芽孢杆菌43P和嗜热脂肪芽孢杆菌1518做了试验,发现除嗜热解糖梭菌3814之外,其他试验菌的D值都有显著的降低,特别是乳链球菌肽对凝结芽孢杆菌D值的降低尤为显著。Campbell等(1959)用TDT罐进行试验获得的数据表明枯草菌素和乳链球菌肽有效地降低了食品腐败菌如嗜热脂肪芽孢杆菌1518和凝结芽孢杆菌43p所必须的杀菌强度。

综上所述,抗菌素的作用既不是影响孢子的耐热性,也不是影响孢子的萌发,而是阻碍孢子萌发以后的生长。因此在使用抗菌素降低热杀菌强度时,需要在食品中始终维持一定的含量。这就需要在详细地研究抗菌素在热杀菌过程中以及贮藏过程中的损失情况后,才能决定抗菌素是否能与加热结合使用,以降低加热强度。由于上述原因以及细菌可能对抗菌素产生抗药性,抗菌素在用于低酸性食品时,不能使杀菌强度低于杀灭肉毒杆菌孢子所需要的最低杀菌强度。对于低酸性食品,抗菌素可以与正常的加热杀菌结合使用以控制耐热腐败菌。在pH低于4.6的酸性食品中可用于控制凝结芽孢杆菌。英国在食品保藏规则中已作出规定,在至少接受 F_0 为3.0热杀菌强度的罐头食品,或pH在4.6以下的罐头食品中允许使用乳链球菌肽。

4. 后培养条件的影响

1) 后培养基的影响 后培养基的成分对细菌的热致死时间有很大的影响。Nelson(1943)表明经受低于致死程度的热处理的细菌在生长时比未受热处理的细菌需要更多的激发。此外,业已表明抑制剂对孢子萌发的抑制作用是随着孢子受热强度的增加而增加的。

为了获得最大的复活,培养基的组成应该是①适合于孢子萌发过程的激发,②能刺激和支持营养细胞的生长。许多人表明,一些物质如氨基酸和葡萄糖在激发中有重要作用。另一方面,有些物质起着与激发剂相反的作用(Caraco等,1958)。孢子萌发之后必须有足够的营养支持它们生长。O'Brien和Campbell(1957)表明嗜热脂肪芽孢杆菌孢子可以在葡萄糖金属盐的基质中萌发。但需要氨基酸和生长因子进一步支持生长。一些试验表明孢子对后培养基营养的要求是随着受热强度的增加而增加的。因此当后培养基越趋向完善,表现耐热性将会越大。

厌氧的程度对梭菌孢子复活是一个重要的因素。Amada(1953)表明使用硫基醋酸盐琼脂分层后培养测得的残存时间比使用普通琼脂要大。

2) 后培养温度 热处理孢子的后培养温度对表现耐热性有显著影响。研究表明,肉毒杆菌在24℃,27℃和31℃下进行后培养都比在37℃下的对照培养容易复活,这对罐头食品试验具有特别重要的意义。据此原因,许多人对中温性梭菌通常采用30℃至32℃的后培养温度。

好氧菌孢子也有同样的情况。Cook和Gilbert(1968)发现嗜热脂肪芽孢杆菌的最适后培养温度从50℃~65℃下降到45℃~50℃。Edwards等(1965)注意到高温短时处理后残存的枯草杆菌芽孢在32℃下比在45℃下培养计数更为有效。但对未经加热处理或中等程度加热处理的孢子来说情况正好相反。Prentice和Clegg(1974)对枯草杆菌孢子报道了同样的结果。

Adams和Busta(1972)推测枯草杆菌的最适复活温度从45℃改变到32℃是由于原来的萌发系统被钝化,而为另外一种萌发系统所取代。然而,Prentice和Clegg(1974)认为控制最适培养温度的机理是生长而不是萌发。Adams(1978)通过对细菌孢子热损伤的观察,认为取决于热处理的温度,两者都可能成为复活温度发生改变的原因。因为Adams(1973)早期的工作表明破坏产气荚膜杆菌孢子的萌发和生长系统的温度系数是不同的。

三、细菌孢子的耐热性机理

尽管许多科学家做了长期的坚持不懈的努力,但是细菌孢子对热表现出异常抗性的机理仍不十分清楚。通常认为,耐热性的机理是限制了细胞核中热不稳定成分,如蛋白质和基因物质的流动性。一旦分子运动被阻碍,这些成分的热变性就会减小(Gerhardt和Murrell, 1978)。

热不稳定成分的固定化(或称核固定化)是与孢子的含水量密切有关的。与它们的营养细胞相比,休眠孢子的含水量较少,这是孢子具有较高耐热性的直接原因。业已证明,当细菌细胞被干燥处理或被渗透脱水时,它们可以较好地抵抗高温(Pasteur, 1961; Gibson, 1973)。

然而,孢子又是怎样维持低水分含量状态的呢。尤其是当孢子处在水溶液中时,孢子是怎样防止水分从低盐浓度的水溶液中向高盐浓度的孢子内渗透。因为渗透理论表明,水分总是由低盐浓度向高盐浓度渗透的。

解释水分的这种反向渗透的理论是围绕着皮层展开的,孢子的皮层是由松散的交叉连接的多糖和肽的聚合物构成的。这些分子链含有过剩的游离羧基(Tipper和Ganthier, 1972)它们在合成时是一个坚密状态。而在孢子成熟时期明显膨胀(Gould和Dring, 1975)。皮层膨胀可能是由于游离羧基之间的静电排斥引起的。皮层膨胀产生一个压缩力将水挤出核(Alderton和Snell, 1963, Gould和Dring, 1975)。对核的压缩力越大,挤出的水就越多。这就减少了核中的水含量,使核发生固定化(Lewis等, 1962)。

解释孢子维持脱水状态的另外一个机理认为皮层起着渗透泵的作用(Gould和Dring, 1975)。因为皮层中的羧基带有负电,能结合阳离子。据推测,这些结合疏松的阳离子使皮层内获得高渗透压。核中高浓度阳离子大多数是以低溶解盐的状态存在的(Gould, 1977),而这些不溶解盐类所产生的渗透压很小。为了使核与外围的皮层间保持渗透压的平衡,因此水被吸出核,进入皮层直到压力平衡为止。这样通过机械压缩或通过渗透压作用有选择地阻止了核的水合作用,从而使核保持在相当干燥的状态。

皮层与孢子耐热性的关系已为一些实验所证实。有些变异菌株在合成皮层时需要非还原性二氨基庚二酸(DAPA)。用这样的变异株实验表明,在产孢子过程中耐热性随DAPA吸收量的增加而增加(Imae和Strominger, 1976)。其他一些研究人员采用电子显微镜测量技术测定了皮层和核的体积比例与孢子耐热性的关系,发现皮层和核的体积比与耐热性成正比。这种相关性不仅存在于不同的菌种之间,也存于同种细菌的不同菌株之间(Beaman等,

1981; Algie 和 Tisa, 1981; Waites 等, 1979)。

皮层理论也为孢子中阳离子酸析出后孢子耐热性的丧失提供了解释。降低 pH 的结果是使多糖肽游离羧基质子化, 从而导致排斥电荷消失, 同时置换了渗透性活泼离子, 这样皮层倒塌, 而核却膨大起来, (Gould 和 Dring, 1975)。

皮层理论的本质是通过机械和渗透压的作用使核内的水分减少到自由水分的水平以下而影响耐热性的。但是, 有时所测得的孢子的水含量(50—80%)与热稳定的营养细胞没有很大的差别(Marshall 和 Murrell, 1970)。这可用第二个理论, 即皮层渗透调节理论来解释。这个理论认为, 虽然孢子总的水分含量很高, 但是皮层的高渗透压将导致皮层内水的局部化。因此核干燥的假设与所测得的孢子高水分含量仍然是一致的。Beaman(1983)在成功地除去了孢子皮层后测定了含水量, 发现水在孢子内部确实是分隔的。而且, 在孢子结构中, 皮层的水分含量最高, 原生质中的水分含量最低。这与皮层理论是一致的。

还有一种理论认为, 耐热性与低分子量溶质与核中热不稳定成分的非共价键结合有关(Bradbury 等, 1981)。核中的物质如吡啶二酸(DPA), 肽, 有机酸及其钙盐和其它多价物能与蛋白质以及多核苷酸形成非共价静电结合, 从而降低了这些热敏感分子的水合作用, 增强了它们的坚硬度, 减少了它们的变性趋势(Bradbury 等, 1981)。关于这些溶质对核内成分的稳定程度说法不一。Warth(1981)发现, 当孢子酶在粗制的原生质提取物中进行浓缩时, 只有相当小的稳定性。然而其他人的研究(Murrell, 1982)表明有两种孢子酶在与盐共结晶时随着吡啶二酸钙盐浓度的增加而耐热性明显增加。有些证据表明, 休眠孢子中的脱氧核糖核酸可能与吡啶二酸及低分子量的蛋白质基体是紧密联系着的(Lindsay 和 Murrell, 1981)在产孢子期间, 原生质体中发生的一些变化, 如核糖体的紧密化, 脱氧核糖核酸的纤维状排列(Baillie 等, 1974)和磷酸甘油酸及其它核溶解物流动性的失去都与这个理论是一致的。这种核成分的重新排列, 将增加分子间氢键和静电结合的能力, 减少结合水的含量。自由水通过脱水收缩作用而失去, 以减少原生质的体积。在这个理论中, 皮层的作用是不突出的。皮层的作用可能是简单的, 它仅仅是起到维持核的重新排列的作用。

最近提出, 核脱水是由渗透引起的。刚产生的孢子与周围的母细胞(孢子束)之间有不同的离子含量。而皮层并非是一个高渗透压源。对未成熟的 *B. megaterium* 菌孢子的电导率测定和元素分析表明, 孢子中可渗透的活泼离子的含量比孢子束中低得多。因此, 运用与皮层渗透调节理论同样的方法可以推测, 孢子束内相对渗透压力将导致孢子的细胞质脱水(Margulis 等, 1983)。这与所观察到的吡啶二酸的吸收及皮层合成时核已缩小的现象是一致的(Murrell, 1978)。如果情况确实如此, 那么先前所描述的理论将不再适用于在核中获得低水分含量的解释。那些理论只能用于解释维持核的脱水或最多用于解释核成分固定化。

总而言之, 至今还没有一份单独的理论能够解释所有观察到的孢子的耐热性质。核成分对热的稳定化可归因于热不稳定成分的重新排列, 变成非共价的内部稳定的基质。在这些基质中, 溶剂水被肽, 吡啶二酸, 离子等取代。核成分的热稳定作用也可归因于孢子的结构。由于机械的或渗透压力, 或胶体脱水收缩作用, 使孢子内的水含量降低到自由水的水平以下。

四、细菌孢子的热损伤和恢复

加热后的孢子处于休眠状态而延缓萌发这是罐头食品微生物学的一个具有实际意义的问题。接受非致死程度的热处理的孢子在适宜的基质中可以保持很长时期的休眠状态。Dickson

(1928)记载了加热后的肉毒杆菌孢子的萌发延缓了6年多。Esty和Meyer(1922)报道经热处理的肉毒杆菌孢子的悬浮液在36℃至37℃下保持了378天的休眠期。Mossel和Mole(1956)报道了由于凝结芽孢杆菌延迟腐败引起的蔗糖—咖啡牛奶的质量事故。这些例子可能代表了一些特殊的情况。但是几个星期休眠期在罐头食品的常规试验中是经常会遇到的。

造成休眠的原因与孢子的热损伤有关。热损伤能恢复。然而恢复需要时间和条件。热损伤的典型表现是在一个环境中孢子丧失增殖能力,但在另一个环境中这种能力不受妨碍。因此,在测定耐热性或评价罐头食品的热杀菌效果时,必须考虑热损伤。许多研究表明,有此培养基在计数未受加热或轻微受到加热的孢子时,可能是相当有效果的。但在计数受强热的孢子时,结果会有很大差别。通常这个原因可归因于,①对有些成分如NaCl或抗菌素的抗性减小②增加对营养素的需要(Labbe, 1979)。③存在保护因子如淀粉或活性炭(Roberts, 1973)。如Wynne和Foster(1948)在研究肉毒杆菌孢子的萌发中观察到添加0.1%的可溶性淀粉对萌发过程有明显的影响。据信淀粉主要起着吸附的作用而削弱了抑制剂的作用。他们还发现少量二氧化碳对肉毒杆菌孢子的萌发是必需的。Reynolds等(1952)报道在培养基中加入碳酸氢钠可以获得P. A. 3679菌较高的计数。Anderson(1951)证实在培养基中加入碳酸氢盐对肉毒杆菌的计数是很有必要的。

热损伤的孢子对培养温度也有严格的要求。这已在耐热性的影响因素一节中作了详述。休眠孢子在向能够生长发育的营养细胞转变的过程中,孢子的损伤可表现为以下几个方面:①被加热的孢子不能萌发,仍然保持超休眠状态②孢子可能萌发,但不能生长。例如,脱去外皮并膨大成一个正常细胞③已经萌发生长,但不能繁殖。这些孢子是否将获得完全的生命力需要由杀菌后的环境所决定。因为典型的耐热性测定方法是测定加热后残存和繁殖的孢子数。因此,杀菌后的环境由于对损伤孢子的修复和菌落形成有影响,所以也就影响了耐热性。

热损伤是通过两个途径阻止孢子萌发的:①损伤启动机制,②损害皮层细胞溶质再生系统。两者都被恢复,从而孢子呈现休眠,延缓萌发。也能被中止,从而孢子呈现死亡。触发是孢子萌发的第一步(Rossigno和Vary, 1979)。此过程包含着孢子与各种在代谢上并非必需的萌发剂之间的生物化学或生物物理的反应。据报道,不少化合物是有效的萌发诱导物,包括一些氨基酸,葡萄糖,在某些情况下,还有无机盐。触发机制的热钝化将导致延缓或阻止萌发,或需要另外的诱导物才能萌发。例如对枯草杆菌的诱导启动机制的研究表明,用葡萄糖作为诱导物比用L-丙氨酸在高温度下有更高的耐热性(Adams和Busta, 1972)。可以推断,对受过热冲击的孢子来说,葡萄糖诱导萌发通常是需要的。

正常的皮层细胞溶质再生系统的钝化将导致需要外源性细胞溶质再生酶。业已表明E型肉毒杆菌孢子的表观耐热性通过在后培养基中加入溶菌酶,可以增加1800倍(Aldertons等1974)。在鸡蛋黄中可能含有极少量的蛋白溶菌酶,虽然对受到微热的产气荚膜杆菌或肉毒杆菌孢子几乎没有刺激作用,但对受强热的这些菌的孢子的耐热性有很大的促进作用。分析表明,正在产孢子的产气荚膜杆菌的无菌培养液的过滤物含有象溶菌酶那种活性的“启动蛋白”(Duncan等, 1972, Cassier和Sebald, 1969)。在产气荚膜杆菌正在萌发的孢子中发现存在释放的皮层细胞溶质再生酶(Gombas和Labbe, 1981; Ando, 1979)。这种释放的酶可帮助邻近的已经不能自身提供活性酶的孢子的萌发。因此紧密排列的孢子比松散分布的孢子呈现更高耐热性。

有些报道将特定的热损伤与萌发过程联系起来。受到热冲击的产夹膜杆菌孢子对普通的无毒抗菌素—多粘雷素和新雷素的敏感性与这些化学物质的表面活性有关(Flowers和Adams, 1976; Chamney和Adams, 1980)。孢子对其它表面活性剂也是敏感的,并且在恢复损伤时需要渗透压的稳定(Flowers和Adams, 1976)。也有报道说,脂状杆菌的热损伤孢子可被月桂硫酸盐和多粘雷素抑制(Maka和Flowers, 1982)。孢子内膜也是被热破坏的部位(Chamney和Adams, 1980)。电子显微图表明,受热孢子的内膜将会受到损伤(Prokop和Humphrey, 1972)。一些研究断言,孢子膜和孢子生长系统是孢子结构中最不稳定的部分(Prokop和Humphrey, 1972; Flowers和Adams, 1976)。利用这种敏感性,把对膜损伤作为热处理目标,就可能增加孢子钝化速率和程度。

热损伤也能表现在生长之后。例如, *B. megaterium* 菌孢子在热处理后需要蔗糖和镁,以便使细胞分裂正常进行(Busla等, 1976)。与萌发系统的损伤不同,在生长和繁殖上表现的损伤通常能被合适的环境条件所修复。

五、细菌孢子耐热性理论在食品工业中的应用

已知细菌孢子的耐热性与许多因素有关,而且,那些相同因子的相互作用将会产生更深远的影响。因此,毫不奇怪为什么孢子悬浮在蒸馏水或缓冲液中表现的耐热性与在食品系统中有很大的差别。至今还没有通用模式能够准确地预测孢子在某种产品中加热后的残存情况。因此,食品工业必须依靠工作量很大的接种实罐试验来证实杀菌要求。另一方面,也能够利用改变孢子耐热性的方法来降低杀菌强度,从而减少通常伴随着长时间的加热所造成的在色香味以及组织和营养成分等方面的损失。孢子敏感化技术,如食品酸化,加入NaCl和 NaNO_2 等是有效的降低杀菌强度的方法(Pierson和Smoot, 1982)。虽然使孢子对热敏感化或阻止损伤孢子的繁殖是行之有效的方法,但在采用这种方法时,必须注意使所有的孢子都受到这种热敏感化的影响。如果最初孢子的含量超过 10^3 个,那么,孢子数的99.9%被敏感化是不够的。同样地,如果采用阻止热损伤孢子的增殖,那么,热处理必须达到这样的程度即所有残存的孢子都受到损伤。也就是说,所有损伤的孢子在加热后都受到抑制,不再存在孢子恢复和克服损伤的条件。

孢子耐热性机理及其影响因素需要进一步研究,以便有信心地预告灭菌手段和结果,到那时,人们就可以得心应手地应用联合处理的方法来改变目前的杀菌强度,而不增加食品腐败的机会,也不降低目前食品工业所要求的卫生安全标准,但食品原有的色香味却能得到最大程度的保留。

参 考 文 献

- [1] Ball, C. O., 1957 "Sterilization in Food Technology. Theory, Practice and Calculations." McGraw-Hill Book Co., New York.
- [2] Stumbo, C. R., 1973 "Thermobacteriology in Food Processing.", 2nd ed. Academic Press.
- [3] 芝奇勋, 1983, "新食品の杀菌工学"
- [4] National Canners Association Reseach Lab., 1980 "Laboratory Manual"

for Food Canners and Processors" 4th ed.

[5] Herson, A. C. and Hullan, E. D., 1980 "Canned Foods, Thermal Processing and Microbiology."

[6] Gombas, D. E., 1983 Food Technology, Vol.37 No.11