

文章编号:1000-582X(2006)07-0055-04

# 用高压气体喷射方法进行液体消毒的试验\*

杨成禹,柏冰,郭杰,卢啸风

(重庆大学 动力工程学院,重庆 400030)

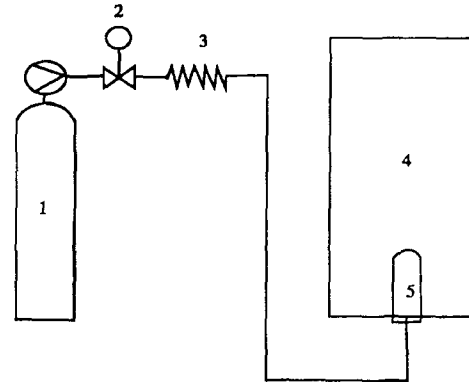
**摘要:**针对高压气体(CO<sub>2</sub>、N<sub>2</sub>)“渗透破碎”杀灭液体中细菌的机理,采用正交方法,综合考虑杀菌时间、溶液浓度、作用压力和杀菌媒质等不同因素作为评价指标进行试验研究.结果表明:通过使用2种不同杀菌媒质所得结果的比较,进一步验证高压气体的“破碎”杀菌机理;CO<sub>2</sub>的“酸化效应”对杀菌效果的影响不大;杀菌率会随时间、压力、浓度的增加而增大.

**关键词:**高压气体;液体消毒;杀菌机理;正交试验

**中图分类号:**TS201

**文献标识码:**A

目前常用的液体消毒技术主要有各种消毒剂、高温杀菌、微波杀菌和膜过滤技术等.但是这些杀菌技术都存在各种不足之处.相比之下,新型高压CO<sub>2</sub>消毒技术具有投资低,应用范围广等优点<sup>[1]</sup>.目前出现的CO<sub>2</sub>杀菌的机理假说很多,主要集中在2个方面.有些研究人员认为,在超临界的状态下,CO<sub>2</sub>分子会十分活跃,并通过细菌的膜壁进入其体内,当压力骤减时,分子迅速膨胀,细菌随之破裂,从而达到杀菌效果<sup>[2]</sup>.也有人认为高压CO<sub>2</sub>溶于水形成弱酸,降低了菌体生存环境的pH值,使细胞性质改变(如细胞膜、细胞质、酶等),导致细菌死亡.为了深入了解高压气体杀菌的原理,试验以杀菌时间、溶液浓度、作用压力和杀菌媒质作为影响因素,以杀菌率作为考核指标进行正交试验研究.



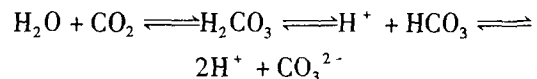
1.CO<sub>2</sub>气瓶; 2.减压阀; 3.加热带;  
4.杀菌筒; 5.气体分配管.

图1 试验台结构原理图

## 2 试验的正交设计

### 2.1 影响因素的选择

高压气体杀菌就是当溶液中的菌体细胞接触到从微孔气体分配管出来的高压气体时,高压气体会瞬时渗透到细胞内部,当所处环境的压力急剧降低时,菌体内部气体迅速膨胀,以至于引起菌体“爆炸”.即所谓的“破碎”杀菌<sup>[3-4]</sup>;另外,CO<sub>2</sub>可以溶于水形成碳酸,它的平衡方程如下:



因此,溶解的CO<sub>2</sub>就通过降低介质的pH值,导致细胞体内生理系统的紊乱从而杀死酵母菌<sup>[5]</sup>.由上述

## 1 试验装置和试验材料

试验台的结构原理如图1所示.试验中所用高压气体由高压气瓶经减压阀后通过气体分配管进入杀菌筒瞬间降压以达到杀菌的目的.杀菌筒内溶液所用菌种为啤酒酵母菌,溶剂是纯净水.啤酒酵母菌尺寸约为5~12 μm,平均直径8 μm.它是一种对温度特别敏感的微生物,在0℃以下,细胞的容积会增大,引起酵母死亡;而温度超过60℃后,酵母会产生自消化作用.所以酵母菌一直保存在恒温箱中.为了消除高压气体由气瓶到气体分配管过程中气化吸热对酵母菌的低温影响,在气体输送管路的减压阀后端包裹有加热带.

\* 收稿日期:2006-03-21

基金项目:重庆市应用基础研究基金资助项目(8604)

作者简介:杨成禹(1982-),男,吉林柳河人,重庆大学硕士研究生,主要从事洁净煤燃烧及两相流动方向的研究.

杀菌机理的分析可以看出,杀菌时间、溶液浓度和作用压力(试验一直在常温下进行,所以暂不考虑温度的影响)对杀菌效果有着十分重要的影响.把它们作为杀菌试验的影响因素加以考察可以进一步了解各种因素与杀菌率之间的关系,给出利于高压气体杀菌技术工业化生产的参考意见.选择  $\text{CO}_2$  和  $\text{N}_2$  作为杀菌媒质是因为  $\text{CO}_2$  有“酸化效应”而  $\text{N}_2$  没有,通过两种媒质杀菌效果的对比可以验证高压气体的杀菌机理.

## 2.2 因素水平的选择

根据高压气体杀菌试验的一般经验和参考国外一些研究试验,杀菌时间、作用压力和溶液浓度分别取4个水平,杀菌媒质也取4个水平,但只用两种媒质  $\text{CO}_2$  和  $\text{N}_2$ . 因素各水平的选取详见表1.

表1 试验的因素与水平

序号	1	2	3	4
因素名称	杀菌时间 /min	作用压力 /MPa	溶液浓度 /cfu · mL <sup>-1</sup>	杀菌媒质
水平1	1(2)	1(0.3)	1(0.925 × 10 <sup>6</sup> )	1(N <sub>2</sub> )
水平2	2(5)	2(0.6)	2(1.230 × 10 <sup>6</sup> )	2(N <sub>2</sub> )
水平3	3(10)	3(0.9)	3(1.850 × 10 <sup>6</sup> )	3(CO <sub>2</sub> )
水平4	4(15)	4(1.2)	4(3.700 × 10 <sup>6</sup> )	4(CO <sub>2</sub> )

## 2.3 正交表的选择

试验所取影响因素为4个,每个因素取4个水平.因此,选取  $L_{16}(4^5)$  正交表.按此正交表设计的正交方案及试验结果见表2.

表2 正交设计方案及试验结果

所在列	1	2	3	4	5	
因素名称	杀菌时间 /min	作用压力 /MPa	溶液浓度 /cfu · mL <sup>-1</sup>	杀菌媒质	空列	试验结果 (杀菌率)
试验1	1(2)	1(0.3)	1(0.925 × 10 <sup>6</sup> )	1(N <sub>2</sub> )	1	15.88%
试验2	1(2)	2(0.6)	2(1.230 × 10 <sup>6</sup> )	2(N <sub>2</sub> )	2	20.54%
试验3	1(2)	3(0.9)	3(1.850 × 10 <sup>6</sup> )	3(CO <sub>2</sub> )	3	25.02%
试验4	1(2)	4(1.2)	4(3.700 × 10 <sup>6</sup> )	4(CO <sub>2</sub> )	4	33.01%
试验5	2(5)	1(0.3)	2(1.230 × 10 <sup>6</sup> )	3(CO <sub>2</sub> )	4	22.09%
试验6	2(5)	2(0.6)	1(0.925 × 10 <sup>6</sup> )	4(CO <sub>2</sub> )	3	20.77%
试验7	2(5)	3(0.9)	4(3.700 × 10 <sup>6</sup> )	1(N <sub>2</sub> )	2	35.94%
试验8	2(5)	4(1.2)	3(1.850 × 10 <sup>6</sup> )	2(N <sub>2</sub> )	1	34.0%
试验9	3(10)	1(0.3)	3(1.850 × 10 <sup>6</sup> )	4(CO <sub>2</sub> )	2	30.4%
试验10	3(10)	2(0.6)	4(3.700 × 10 <sup>6</sup> )	3(CO <sub>2</sub> )	1	36.18%
试验11	3(10)	3(0.9)	1(0.925 × 10 <sup>6</sup> )	2(N <sub>2</sub> )	4	25.73%
试验12	3(10)	4(1.2)	2(1.230 × 10 <sup>6</sup> )	1(N <sub>2</sub> )	3	32.35%
试验13	4(15)	1(0.3)	4(3.700 × 10 <sup>6</sup> )	2(N <sub>2</sub> )	3	35.57%
试验14	4(15)	2(0.6)	3(1.850 × 10 <sup>6</sup> )	1(N <sub>2</sub> )	4	31.84%
试验15	4(15)	3(0.9)	2(1.230 × 10 <sup>6</sup> )	4(CO <sub>2</sub> )	1	33.59%
试验16	4(15)	4(1.2)	1(0.925 × 10 <sup>6</sup> )	3(CO <sub>2</sub> )	2	33.33%

## 3 试验过程及试验结果

### 3.1 取样

在试验前后分别取3个样品,在计数完成后取2个数值相近的样品,去掉相差较大的一个.取样时保证溶液浓度均匀.

### 3.2 计数

试验计数采用高倍光学显微镜进行.所取样品与

0.01%的美兰溶液混合调匀后放在血球计数板上通过显微镜观察酵母菌的数量.血球计数板中酵母菌显示如图2.

### 3.3 计算杀菌率

#### 1) 细胞浓度的计算

细胞浓度 (cfu/mL) = 5 个方格所计酵母菌数 × 5 稀释因子 × 10<sup>4</sup>

其中,5个方格分别是血球计数板栅格的左下角,

左上角,右下角,右上角和中间的5个大格子.因为总共有25个格子,所以5个格子点出的细菌数还要乘以 $5 \cdot 10^4$ 是经验系数.意指血球计数板内25个格子的溶液量乘以 $10^4$ 即为1 mL溶液稀释因子就是溶液的稀释倍数.

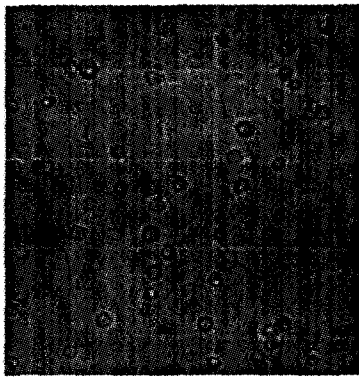


图2 血球计数板上的酵母菌

2) 杀菌率计算.试验所取样品的原始数据以酵母菌的“个数”表示,而后通过上述公式将其转化为以细胞浓度表示.杀菌率计算公式如下:

$$\text{杀菌率} = \frac{\text{初始酵母菌浓度} - \text{杀菌后酵母菌浓度}}{\text{初始酵母菌浓度}} \times 100\%$$

### 3.4 试验结果

试验没有按试验号做,选用抽签的办法安排试验顺序.试验结果以杀菌率作为考核指标,具体数值见表2.

## 4 试验结果分析

### 4.1 直观分析

表3 直观分析表

所在列	1	2	3	4	5
因素名称	杀菌时间	作用压力	溶液浓度	杀菌媒质	空列
均值 K1	0.236	0.26	0.265	0.29	0.299
均值 K2	0.282	0.273	0.271	0.29	0.301
均值 K3	0.312	0.301	0.303	0.292	0.284
均值 K4	0.336	0.332	0.352	0.294	0.282
极差 R	0.100	0.072	0.113	0.004	0.019

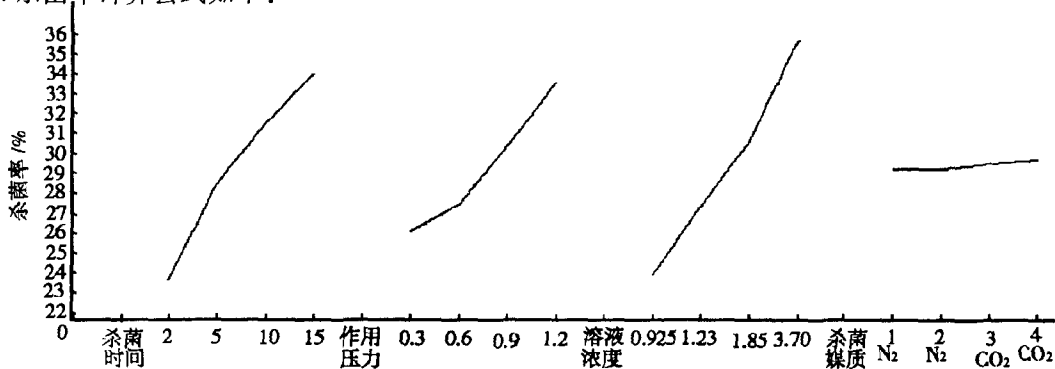


图3 各因素在不同水平下的效应曲线图

由直观分析表3和效应曲线图3可以看出:

1) 杀菌率随着杀菌时间、作用压力、溶液浓度的增加而增加,就是说当作用时间越长,高压气体与酵母菌菌体接触的机会越大,就有更多的酵母菌被杀死,但是当压力足够大时,时间对杀菌率的影响将降至最低水平,所以杀菌率和时间关系曲线应是渐缓的直至趋近于平行;而当作用压力增大时,高压气体形成的小气泡更多,同时,由高压变成低压的过程会对酵母菌体形成更大的破坏,使杀菌率增加.杀菌率不会随压力增加而线性增加,当压力增大到某一水平时,杀菌率也将达到极限值;溶液浓度增加会使同样体积溶液中的酵母菌个数增多,在同样的杀菌条件下,很容易理解会有更多的酵母菌死亡.

2) 由杀菌媒质这一因素的几个水平对比得知,CO<sub>2</sub>因为溶于水形成酸性介质而破坏菌体生存环境对

致死酵母菌影响不大,因为在同样条件下,N<sub>2</sub>基本上跟CO<sub>2</sub>达到相同的杀菌率.由此可见,高压CO<sub>2</sub>杀菌的机理主要是CO<sub>2</sub>在高压的情况下渗透进入细胞后降压膨胀而使细胞壁破碎.事实上,pH值在高压杀菌条件下对酵母菌杀菌效果无明显的影响.因为高压CO<sub>2</sub>的杀菌效果远远好于其他用来降低pH值的酸(盐酸,磷酸等).而这些酸对细胞的影响要更大些<sup>[6]</sup>.

### 4.2 方差分析

表4 方差报表 (α=0.005)

因素	偏差平方和	自由度	F比	F临界值	显著性
杀菌时间	0.022	3	22	9.28	*
作用压力	0.012	3	12	9.28	*
溶液浓度	0.028	3	28	9.28	*
杀菌媒质	0	3	0	9.28	

由方差分析表4可以看出,杀菌时间、作用压力和溶液浓度均对考核指标有显著影响,并且溶液浓度的影响更大.而杀菌媒质项的偏差平方和与F比均为零,充分说明这一项的变化对杀菌结果没有影响.通过上述分析,可以较为准确的掌握高压气体杀菌的影响因素和影响趋势,有助于进一步探索其具体的作用方式.

#### 4.3 误差分析

1) 试验中误差产生最大的地方在于取样时浓度的不均匀性,这是因为啤酒酵母泥具有很强的沉降性.减小其误差的办法是在相同情况下,分别在试验前后取3个样品,取计数后数值相近的两组的平均值.

2) 试验中原始溶液的浓度也有差别,这是因为初始的酵母泥的浓度不同,为此,在试验前采取多次配比的方式,将实际溶液浓度与所设定水平的相对误差控制在2%以内.

3) 操作误差.试验中溶液配比、计量、读数等产生的误差,均采用重复操作后取均值的方法减小误差.

## 5 结论

1) 验证了高压CO<sub>2</sub>的杀菌机理,即高压气体渗透到细胞内部后膨胀,使细胞破碎致死的“渗透破碎”原理.通过与N<sub>2</sub>的杀菌率的对比证明CO<sub>2</sub>溶于水形成的弱酸对杀菌率几乎没有影响.在“渗透破碎”原理的支持下,很多热物理性质良好的气体都可以作为杀菌媒质.

2) 试验证明,高压气体可以杀死酵母菌,并且其杀菌率随着杀菌时间、作用压力和溶液浓度的增加而增加.当杀菌时间和溶液浓度受工业应用条件影响而不能改变时,增加压力可以使杀菌率增加.

3) 试验所得结果与柏冰等人研究结果进行比较,结果一致.

4) 可以通过进一步的试验给出高压气体杀菌率与其影响因素之间的具体关系,即经验公式.

#### 参考文献:

- [1] SPILIMBERGO, S, ELVASSORE N, BERTUCCO A. Microbial Inactivation by High - pressure [J]. Journal of Supercritical Fluids, 2002, 22: 55 - 63.
- [2] Debs-LOUKA E, LOUKA N, ABRHAM G, et al. Effect of Compressed Carbon Dioxide on Microbial Cell Viability [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 626 - 631.
- [3] LIN, H - M, CHAN E - C, et al. Disintegration of Yeast Cells by Pressurized Carbon Dioxide [J]. Biotechnol, 1991, (7): 201 - 204.
- [4] LIN, H-M, YANG Z, et al. 1992. An Improved Method for Disruption of Microbial Cells with Pressurized Carbon Dioxide [J]. Biotechnol, 1992, (8): 165 - 166.
- [5] Fraser D. Bursting Bacteria by Release of Gas Pressure. Nature, 1967, 33 - 34.
- [6] 柏冰, 周建军, 俞逾, 等. 高压CO<sub>2</sub>杀菌的试验研究 [A]. 第五届全国超临界流体技术学术及应用研讨会论文集 [C]. 山东: 青岛出版社, 2004.

## Experimental Study on Liquid Sterilization by High-pressure Gas

YANG Cheng-yu, BAI Bing, GUO Jie, LU Xiao-feng

(College of Power Engineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China)

**Abstract:** In order to study the principle of liquid sterilization by high - pressure gas, the Orthogonal experiment based on the value index of time, pressure, solution concentration and sterilizing medium was conducted. The experimental results confirm the rupture mechanism by comparing the rate of inactivation among the different medium. The dissolved CO<sub>2</sub>'s acidity has no influence on the rate of sterilization. It also show that the rate of sterilization will increase when time, solution concentration and pressure raise.

**Key words:** high-pressure gas; liquid sterilization; mechanism of sterilization; orthogonal experiment

(编辑 陈移峰)