

ДЛЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОЛОГІЧНІ ОБ'ЄКТИ

УДК 577.3: 663.8-988

ПРИЧИНЫ НЕЛИНЕЙНОСТИ В КИНЕТИКЕ ИНАКТИВАЦИИ
МИКРООРГАНИЗМОВ ПОД ДАВЛЕНИЕМ

И.В. Нога, В.М. Шаталов

Донецкий национальный университет, ул. Щорса 46, Донецк, 83050. E-mail: nogainna@mail.ru
Поступила в редакцию 30 января 2007 г.

Анализируются физические причины наблюдаемых отклонений от линейности при описании кинетики инактивации микроорганизмов под давлением. Показано, что при некоторых условиях незначительный нагрев образцов при сжатии приводит к возрастанию константы скорости реакции от 2 до 5 раз. На основе решения уравнения теплопроводности рассчитаны поправки к линейному закону, возникающие за счет неравномерного остывания образца в процессе воздействия давления. Показано, что кинетические кривые, полученные в рамках линейного уравнения при учете остывания, имеют нелинейный двухфазный характер. Оценены поправки к кривым инактивации МАФАМ. Сделан вывод о том, что отклонения от линейности могут возникать в рамках линейной модели при учете нестационарного пространственно-неоднородного распределения температуры внутри образца.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: высокое давление, адиабатический нагрев, теплопроводность, инактивация микроорганизмов, термодинамика, кинетика, нелинейность.

В последнее время вопросы, связанные с воздействием высокого (~600МПа) давления на биосистемы вызывают значительный интерес в связи с развитием новой технологии стерилизации продуктов и с фундаментальными исследованиями процессов денатурации белков. В нашей предыдущей работе [1] были рассмотрены возможности применения кинетической модели первого порядка для интерпретации экспериментальных данных по инактивации микроорганизмов под давлением. Полученные в [2] экспериментальные данные по инактивации давлением некоторых микроорганизмов и деградации витамина С при разных температурах и временах выдержки достаточно хорошо описываются в рамках модели первого порядка, что позволило нам определить соответствующие термодинамические параметры. Однако вопрос применимости этой модели для описания процесса инактивации под давлением остается открытым, поскольку в литературе на этот счет имеются противоречивые данные.

ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ

Обычно считается, что инактивация микроорганизмов под давлением, как и денатурация белков, описывается кинетическим уравнением первого порядка, в результате чего логарифм концентрации выживших после обработки давлением микроорганизмов уменьшается линейно с ростом времени обработки t как $-kt$, где k – константа скорости инактивации. Но в литературе часто встречаются данные со значительными отклонениями от линейности, которые обычно описываются комбинацией двух реакций первого порядка как двухфазная кинетика с различными скоростями инактивации [3]. Двухфазная кинетика часто наблюдается как для вегетативных, так и для споровых форм бактерий. Такая форма инактивационной кривой свидетельствует о существовании небольшой части популяции с повышенной сопротивляемостью к воздействию высокого давления. В таких случаях наблюдается замедление падения логарифма концентрации со временем, и скорость падения при малых и больших t равна k_1 и k_2 соответственно, причем $k_1 > k_2$.

В некоторых случаях наблюдались отклонения от первого порядка инактивации в виде «плеча» или «хвоста» или то и другое вместе. Изменение порядка реакции наблюдалось даже в пределах одного вида бактерий, более того, в пределах одной серии опытов. Как правило, линейность нарушалась при больших давлениях в виде замедления падения, что интерпретировалось как «хвост». Для описания такого поведения в рамках кинетики первого порядка в [4] была предложена трехфазная модель инактивации через промежуточное метастабильное состояние, известны и другие модели интерполяции кинетических кривых [5, 6]. Все они основаны на плохо обоснованных предположениях о разбросе сопротивляемости давлению внутри популяции бактерий. Для преодоления этого недостатка в [7] использована модель распада n -го порядка:

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

в которой порядок n и константа скорости реакции k определялись минимизацией отклонений от данных эксперимента. Область вариации n ограничивалась интервалом $1 < n < 1,25$ в котором ход модельных

Причины нелинейности в кинетике инактивации микроорганизмов...

кривых наилучшим образом соответствовал наблюдаемому на опыте. Решение уравнения (1) для случая $C(0)=1$ имеет вид

$$C(t) = (1 + kt(n-1))^{-\frac{1}{n-1}} \quad (2)$$

Соответствующие кинетические кривые для разных n приведены на рис. 1. Как видно из рисунка, для ограниченных значений t этот результат всегда можно представить как совокупность реакций первого порядка с разными k , то есть представить как многофазный процесс. В модели с варьируемым порядком реакции не нужно делать предположений о разбросе значений k внутри одной популяции бактерий, однако вряд ли можно физически оправдать вариацию порядка реакции для одной серии опытов при изменении лишь действующего на систему давления [7].

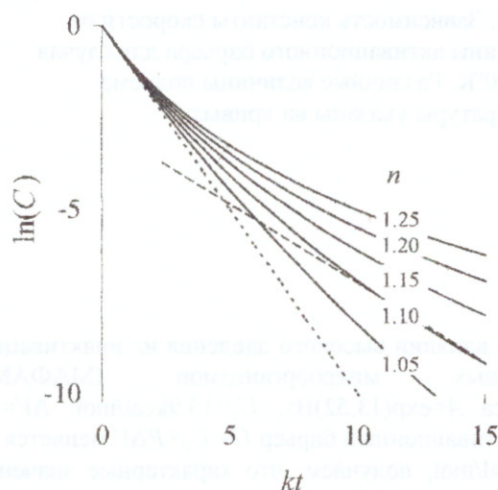


Рис. 1. Зависимость логарифма концентрации от времени для реакции первого (пунктир) и более высоких порядков (сплошные линии с указанием порядка n). Для кривой с $n = 1.1$ показана видимая асимптота (штриховая линия), которая в сочетании с пунктирной линией описывает двухфазную реакцию первого порядка.

Несмотря на то, что экспериментальные данные разных авторов согласуются лишь полуколичественно (см. обзор в [2]), анализируя кинетические кривые из разных источников можно заметить следующее. Во-первых, отклонения от линейности почти всегда имеют место при уменьшении начальной концентрации более, чем на 7-8 порядков, что наблюдается при достаточно больших временах обработки. В других случаях отклонения от линейности проявляются при больших давлениях и наблюдаются при достаточно малых временах обработки. Таким образом, складывается впечатление, что инактивация может описываться как двух или даже трехфазная реакция.

Причину первого вида отклонений объяснить легко, поскольку концентрация падает с ростом времени или давления. При малых значениях концентрации любые конечные экспериментальные ошибки дают большие флуктуации в логарифмическом масштабе, что может быть интерпретировано как появление «хвоста» или очередного отклонения от линейности.

В настоящей работе мы попытаемся объяснить причину отклонений от линейности при малых временах и больших давлениях обработки без каких-либо дополнительных предположений о «многофазности» процесса инактивации или изменения порядка реакции. Мы покажем, что эта нелинейность связана с неравномерным остыванием образца, нагретого в результате сжатия. Величина эффекта зависит от степени сжатия, скорости нагрева, а также от конструктивных особенностей используемой аппаратуры, определяющих скорость охлаждения. Последнее обстоятельство объясняет плохую воспроизводимость результатов, полученных в разных лабораториях на разных установках.

ОЦЕНКА ВЕЛИЧИНЫ ЭФФЕКТА

Проблема учета адиабатического нагрева при сжатии образцов далеко не нова. Исследователи решают ее по-разному. Можно варьировать скорость сжатия – при бесконечно малой скорости процесс можно считать изотермическим, но это неудобно из практических соображений. Можно менять геометрию камеры высокого давления, использовать термостабилизацию ее стенок, что, впрочем, дает незначительный эффект. Можно просто пренебречь нагревом, считая изменение температуры малым по сравнению с начальной температурой обработки. Например, для воды адиабатический нагрев составляет всего 3 °C на 100 МПа. Следовательно, на практике под давлением 600 МПа при конечной скорости сжатия температура поднимается не более, чем на 18°C, что, конечно, немного по сравнению с начальной температурой $T_0 \sim 300^\circ\text{K}$.

Посмотрим, в каких случаях и в какой мере подобное повышение температуры в результате адиабатического сжатия может изменить константу скорости реакции в модели первого порядка. Для этого воспользуемся формулой Аррениуса и изобразим графически (см. рис. 2) относительное изменение константы скорости реакции

$$\frac{k(T)}{k(T_0)} = \exp\left[\frac{U}{RT_0}\left(\frac{T-T_0}{T}\right)\right], \quad (3)$$

в зависимости от величины активационного барьера для случаев $T_0=300^\circ\text{K}$, $T-T_0=10, 15$ и 20°C .

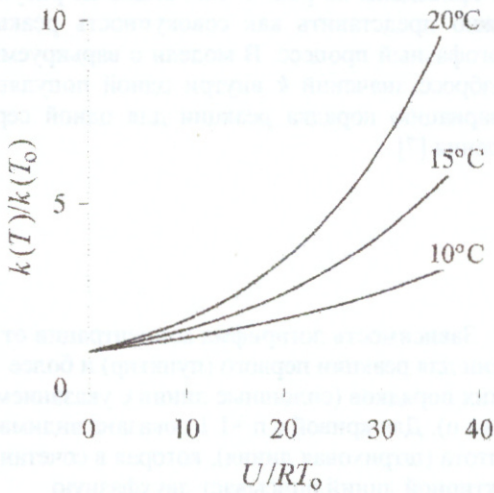


Рис. 2. Зависимость константы скорости от величины активационного барьера для случая $T_0=300^\circ\text{K}$. Различные величины подъема температуры указаны на кривых.

Для дальнейших оценок воспользуемся данными [2] о влиянии высокого давления на инактивацию мезофильно-аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (МАФМ): предэкспоненциальный множитель в формуле Аррениуса $A=\exp(13.52)\text{Hz}$, $U_0=15.9\text{kcal/mol}$, $\Delta V=-35.5\text{ mL/mol}$. При изменении давления P от 0 до 600 МПа активационный барьер $U=U_0+P\Delta V$ меняется от 16 до 11 kcal/mol, поделив эти пределы на $RT_0=0.6\text{ kcal/mol}$, получаем, что характерные значения отношения U/RT_0 лежат в интервале (17, 27). Как видно из рис. 2, константа скорости при этом увеличивается от 2 (для $T-T_0=10^\circ\text{C}$) до 5 раз (для $T-T_0=20^\circ\text{C}$). Это максимальные увеличения k , которые достигаются лишь при выполнении условий адиабатичности, однако, возможность столь существенного изменения константы скорости не может не отразиться на форме наблюдаемых кинетических кривых. Очевидно, что эффект должен зависеть от соотношения между временем измерения (выдержкой под давлением) t и характерным временем охлаждения сжатого образца τ . Охлаждение идет через стенки камеры, масса и теплоемкость которой, как правило, достаточно велики, чтобы считать контакт изотермическим. Таким образом, скорость охлаждения (как и степень адиабатичности сжатия) определяется теплопроводностью самого образца (скажем, воды), она конечна, и поэтому выравнивание температуры не может происходить мгновенно. С другой стороны, это означает, что процесс сжатия не может быть полностью адиабатическим и максимально возможным подъем температуры достигим только в экспериментах со скачком давления или при использовании импульсной обработки давлением. При $t < \tau$ и $T > T_0$ скорость реакции внутри объема образца выше, чем на периферии. При $t > \tau$ температура выравнивается, средняя по объему скорость реакции падает, что и наблюдается как новая «фаза с повышенной сопротивляемостью давлению». Возможность фиксации этой фазы на опыте зависит, прежде всего, от величины подъема температуры, что определяется как величиной самого давления, так и временем его подъема относительно τ . Кроме того, само время охлаждения τ зависит от конструктивных особенностей используемой камеры высокого давления, ее размеров, теплопроводности передающей давление жидкости, упаковочного материала и т.п.

Выравнивание температуры описывается нестационарным уравнением теплопроводности [8]:

$$\frac{\partial T}{\partial t} = a\Delta T, \quad (4)$$

где a – коэффициент температуропроводности, определяемый как отношение теплопроводности λ к плотности ρ и к удельной теплоемкости C_p . В нашем случае это задача с заданными граничными и начальными условиями. Камера высокого давления, заполненная рабочей жидкостью, представляет собой цилиндр радиуса r_c , ограниченный двумя плоскостями. Решение для этого случая, как известно, имеет вид произведения рядов по косинусам вдоль оси цилиндра и по функциям Бесселя вдоль расстояния от оси, причем скорость затухания разных гармоник растет с ростом их номера [9]. Грубую оценку времени остывания для длинного цилиндра можно получить по формуле:

$$\tau = \frac{r_c^2}{a}. \quad (5)$$

Принимая для воды [10] $\lambda \sim 0.6\text{W}\cdot\text{m}^{-1}\text{K}^{-1}$, $C_p \sim 1\text{kcal}\cdot\text{kg}^{-1}\text{K}^{-1}$, $\rho \sim 1\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ для цилиндра радиусом 1см получаем оценку $\tau \sim 10\text{min}$, которая попадает в область характерных экспозиций (до 30min). Таким образом, при

Причины нелинейности в кинетике инактивации микроорганизмов...

снятии кинетической кривой исследователи неизбежно охватывают области $t < \tau$ и $t > \tau$. Интересно отметить, что оценка времени остывания не зависит от величины нагрева.

УСРЕДНЕНИЕ ПО ОБЪЕМУ

Для расчета измененных кинетических кривых с учетом нестационарного распределения температуры в сжатом объеме следует, вообще говоря, перейти от точечного кинетического уравнения (1) (при $n=1$) к уравнению в частных производных, которое учитывало бы диффузионные потоки продуктов реакции. Однако, мы пренебрежем диффузионными потоками микроорганизмов между областями с разной концентрацией и усредним решение по объему сжатого образца с учетом неоднородного затухающего распределения температуры. Это распределение получается как решение уравнения теплопроводности (4) при заданных начальных и граничных условиях. Как правило, рабочая камера в аппаратах высокого давления имеет вид цилиндра, длина которого намного больше радиуса r_c . Термическое сопротивление теплоотдачи стальных стенок камеры мало, по сравнению с внутренним сопротивлением теплопроводности жидкого образца, следовательно можно считать, что температура внешней поверхности всегда равна начальной T_0 . Воспользуемся асимптотическим решением для бесконечного цилиндра [8, 9] для распределения превышения температуры над T_0 :

$$\Theta(r, t) = \cos\left(\frac{\pi r}{2 r_c}\right) \exp\left[-\left(\frac{\pi}{2}\right)^2 \frac{t}{\tau}\right]. \quad (6)$$

Здесь $\Theta(r, t)$ – безразмерное распределение температуры в единицах максимального превышения, которое задается величиной адиабатического нагрева при сжатии βP (для воды $\beta=3^\circ\text{C}/100\text{MPa}$). Таким образом, распределение температуры в образце имеет вид:

$$T(P, T_0, r, t) = \beta P \Theta(r, t) + T_0. \quad (7)$$

Упрощенное решение (6) выбрано для приближенного моделирования последствий неравномерного остывания, тем не менее, при $\tau = \frac{r_c^2}{a}$ оно удовлетворяет уравнению (4), а также граничным и начальным условиям, которые вытекают из постановки задачи:

$$\left.\frac{\partial \Theta}{\partial r}\right|_{r=0} = \Theta|_{r=r_c} = 0; \quad \Theta|_{t=0} = \cos\left(\frac{\pi r}{2 r_c}\right). \quad (8)$$

Заметим, что здесь начало отсчета времени $t=0$ соответствует окончанию подъема давления, мы сознательно не рассматриваем этап подъема давления, чтобы не загромождать результат техническими параметрами, которые меняются от опыта к опыту. Такое же приближение делалось в [1, 2] для кинетики без учета остывания.

Усредним результат решения точечного кинетического уравнения первого порядка по объему образца:

$$C(P, T_0, t) = \frac{2}{r_c^2} \int_0^{r_c} \exp\left[-\int_0^t k(P, T_0, t') dt'\right] r dr. \quad (9)$$

где константа скорости реакции определяется по формуле Аррениуса с заданным температурным распределением (7):

$$k(P, T_0, t) = A \exp\left[-\frac{U_0 + P \Delta V}{RT(P, T_0, r, t)}\right]. \quad (10)$$

Посмотрим, как изменятся кинетические кривые при учете остывания образца после адиабатического сжатия. Для этого рассчитаем $\ln C(P, T_0, t)$ как функцию t для случая $P=600\text{MPa}$, $T_0=298^\circ\text{K}$, значения остальных параметров были указаны выше по данным для обработки МАФАМ [2]. Результаты для разных времен остывания τ представлены графически на рис. 3. Параметр τ , как было показано выше, пропорционален квадрату радиуса камеры r_c и, по сути, отражает конструктивные особенности используемой установки высокого давления. Как видно из рис. 3, при прочих равных условиях в камерах разного размера будут получаться разные результаты. Получающиеся кривые по форме напоминают двухфазную или нелинейную кинетику (ср. рис. 1). Скорость падения $\ln(C)$ при малых $t < \tau$ существенно выше, чем при больших. Однако подчеркнем – этот результат получен в рамках линейной кинетики без каких-либо дополнительных предположений о составе популяции, изменении ее сопротивляемости давлению и т.п.

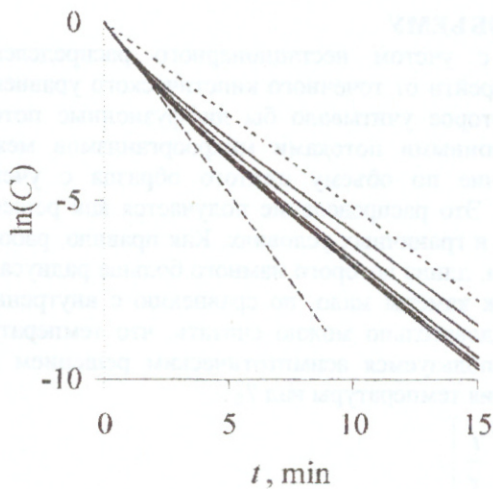


Рис. 3. Сплошные линии – кинетические кривые, рассчитанные по формулам (6)-(10) для МАФАМ [2] при различных значениях времени остывания $\tau=5, 10, 20, 30, 40$ min (сверху вниз) при $P=600$ МПа, $T_0=278^\circ\text{K}$, пунктир – кинетика без учета нагрева, штриховая линия – начальная фаза инактивации.

Основываясь на предложенной схеме оценок, рассчитаем поправки к кривым зависимости степени выживаемости от давления, которые были получены в [2] в рамках точечной модели первого порядка. Результаты расчетов приведены на рис. 4. Пунктирные линии соответствуют исходным кривым инактивации МАФАМ [2] в зависимости от давления для двух значений времени обработки $t=10$ и 20 min, производившейся при начальной температуре 25°C . Сплошные линии – результаты расчета по формулам (6)-(10) с учетом нагрева и неравномерного остывания для случая $\tau=10$ min.

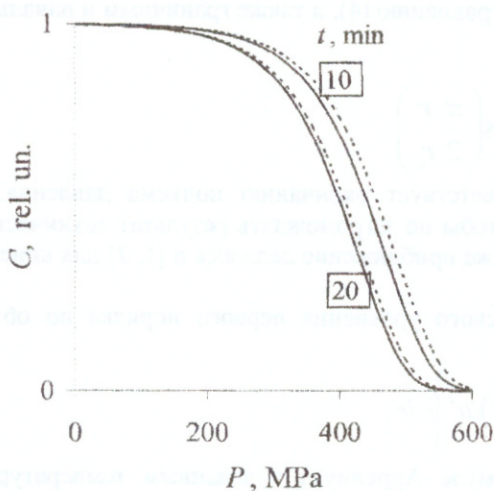


Рис. 4. Зависимость от давления обработки относительной концентрации МАФАМ по данным [2] (пунктир) и с учетом нагрева по формулам (6)-(10) для случая $\tau=10$ min, $T_0=278^\circ\text{K}$ (сплошные линии); время обработки указано на кривых.

Как видно из рис. 4, зависимости от давления качественно не меняются, пороговое значение давления, при котором наблюдается резкий спад концентрации, сдвигается с сторону меньших давлений на 20 и 10 МПа для $t=10$ и 20 min соответственно. С ростом времени обработки поправка на нагрев уменьшается за счет уменьшения средней температуры, при которой происходит инактивация. Мы видим, что учет адиабатического нагрева не оказывает существенного влияния на результаты, полученные в [2].

ВЫВОДЫ

Таким образом, цель работы достигнута, показано, что отклонения от линейности могут возникать в рамках линейной модели при учете нестационарного пространственно-неоднородного распределения температуры внутри образца.

Отклонения от линейности наиболее существенны при временах малых по сравнению с характерным временем остывания, которое определяется геометрией камеры сжатия. Отклонения растут с ростом давления обработки и скорости его подъема.

По-видимому, такие же эффекты могут иметь место и для других процессов, как минимум, для денатурации белков под давлением, которая, по сути, является причиной инактивации микроорганизмов [2]. Основываясь на полученных результатах можно отбросить ненужные предположения, которые часто делаются для объяснения особенностей кинетики этих процессов. С другой стороны, тот факт, что

Причины нелинейности в кинетике инактивации микроорганизмов...

линейная кинетическая модель способна описать наблюдаемые на опыте отклонения от линейности является лишним подтверждением достоверности результатов, полученных в рамках этой модели.

Авторы выражают глубокую благодарность профессорам Г.Ю.Ризниченко, подсказавшей идею работы, и С.В.Беспаловой за плодотворные обсуждения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Нога И.В., Шаталов В.М., Сукманов В.А. Кинетическая модель деградации биомолекул под воздействием высокого давления и температуры // Физика и техника высоких давлений. – Донецк: ДонФТИ НАНУ, 2004. – Т.14, N.2. – С.74-85.
2. Нога И.В. Термодинамика воздействия высокого давления и температуры на микроорганизмы и витамины // Физика и техника высоких давлений. – Донецк: ДонФТИ НАНУ, 2006. – Т.16, N.3, С.126-136.
3. Merkulow N. Auswirkungen von hohem hydrostatischem Druck auf Schimmelpilze und die Synthese des Mycotoxins Patulin // Inaugural dissertation, Heidelberg: Ruprecht - Karls - Universität, 2001. – 145P. Merkulow N., Ludwig H. The influence of high hydrostatic pressure on the adduct formation of patulin with cysteine // Progress in Biotechnology. – 2002. – V.19, N1. – P.664.
4. Heinz V., Knorr D. High pressure inactivation kinetics of *Bacillus subtilis* cells by a three-state-model considering distributed resistance mechanisms // Food Biotechnology. – 1996. – V.10, N2. – p.149-161.
5. Patterson, M.F., and Kilpatrick, D.J. The combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on inactivation of pathogens in milk and poultry // J. Food. Prot. - 1998. – V.61, N4. – P.432-436.
6. Reys, K.M.F.A., Soontjens, C.C.F., Cornelis, K., Weemaes, C.A., Hendrickx, M.E., Michiels, C.W. Kinetic analysis and modeling of combined high-pressure-temperature inactivation of the yeast *Zygosaccharomyces bailii* // Int. J. Food Microbiol. - 2000. – V.56. – P.199-210.
7. Ardia A. Process Considerations on the Application of High Pressure Treatment at Elevated Temperature Levels for Food Preservation: Genehm. – dis. – Berlin: Technischen Univers., 2004. – 94 P.
8. Тихонов А.Н., Самарский А.А. Уравнения математической физики. М.: «Наука», 1972. – 736с.
9. А.П.Солодов, В.Ф.Очков Mathcad / Дифференциальные модели. - М.: МЭИ, 2002. - 239 с.
10. Александрова А.А. и Григорьева Б.А. Таблицы теплофизических свойств воды и водяного пара: Справочник. - М.: Издательство МЭИ, 1999. – 168 с.