

## 高压热杀菌灭活枯草杆菌芽孢的作用研究

申瑾, 谭睿, 郭家俊, 陈翔, 吴珊, 包军鹏, 章中\*

(宁夏大学农学院 银川 750021)

**摘要** 为探究高压热杀菌(HPTS)对枯草杆菌芽孢灭活的影响,采用200 MPa结合25,65,75℃;550 MPa结合25,65,75℃;保压时间:20 min处理枯草杆菌芽孢,通过平板技术法、紫外分光光度法、流式细胞术、红外光谱法分析HPTS处理前、后芽孢的存活浓度、紫外吸收泄露量、内膜通透性、芽孢成分。结果显示:HPTS处理后,芽孢的存活浓度显著降低( $P < 0.05$ ),紫外吸收泄露量增大,芽孢内膜受损,芽孢内膜通透性增强。傅里叶红外光谱结果显示:HPTS处理前、后枯草杆菌芽孢的差异主要表现在蛋白质、脂质、核酸、多糖4种成分及其结构发生变化,如蛋白质二级结构从有序向无序转变,蛋白质稳定性降低。HPTS可有效破坏芽孢内膜的水分子通透屏障,改变芽孢膜脂质、蛋白质、核酸、多糖结构,从而使芽孢的抗性降低,影响芽孢的代谢,使芽孢灭活。本研究结果为HPTS灭活枯草杆菌芽孢提供理论依据,促进HPTS方法在食品加工中的应用。

**关键词** 高压热杀菌;傅里叶红外光谱;芽孢;机理;灭活

**文章编号** 1009-7848(2022)06-0142-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.06.015

芽孢是细菌营养体在缺乏营养的环境条件下形成的休眠态,可以休眠几万年以上而复活<sup>[1]</sup>。在食品工业中,常因杀菌强度不够而引发由芽孢导致的食物腐败和食物中毒问题时有发生<sup>[2]</sup>。高抗性芽孢的杀灭是低酸性食品安全的一个关键问题<sup>[3]</sup>。枯草杆菌芽孢是高抗性的细菌芽孢之一,其芽孢含水量极低,高度脱水及芽孢内膜的极端不通透性是其具有极强抗逆性的重要原因之一<sup>[4-7]</sup>。即使在室温、很高的压力水平(1 000 MPa)也不能有效灭活细菌芽孢。有研究指出,始终需要超高压和温度相结合才能有效地灭活枯草杆菌芽孢<sup>[8-10]</sup>。

高压热杀菌(High-pressure thermal sterilization, HPTS)是指将静态超高压和热耦合起来用于杀菌,是一种新兴的生产货架稳定食品的技术。和传统高温热杀菌相比,HPTS使用的温度较低、时间较短,能更好地保持食品原有的色、香、味、质、构、营养素和功能性成分<sup>[3,11]</sup>,受到国内外食品科学家的广泛关注<sup>[12-13]</sup>。目前关于HPTS对细菌芽孢的良好杀灭作用已得到公认,然而HPTS杀灭芽孢的机理鲜有报道,限制了该技术在食品工业的应用。

本试验采用平板计数法、紫外分光光度法、流式细胞术研究HPTS对芽孢存活率、紫外泄露量、内膜通透性的变化规律,同时利用傅里叶红外光谱结合二阶导数红外光谱及主成分分析分析HPTS处理枯草杆菌芽孢前、后芽孢脂质、蛋白质、多糖的变化,阐明HPTS杀灭芽孢的作用机理。

### 1 试验部分

#### 1.1 材料与试剂

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC),编号As 1.433;营养琼脂,天津市大茂化学试剂厂;硫酸锰(分析纯),天津市大茂化学试剂厂;碘化丙啶(PI),北京索莱宝科技有限公司;TSA-YE培养基,北京索莱宝科技有限公司。

#### 1.2 仪器与设备

UV-9000S型双光束紫外可见分光光度计,上海元析仪器有限公司;CyFlow Cube 8流式细胞仪,日本SYSMEX(希森美康)株式会社;Spectrum Two型傅里叶变换红外光谱仪,美国PerkinElmer公司;DSX-280B型高压灭菌锅,上海申安医疗器械厂;Scientz-11S真空冷冻干燥浓缩仪,宁波新芝生物科技股份有限公司;CyFlow Cube 8流式细胞仪,日本SYSMEX(希森美康)株式会社;Spectrum Two型傅里叶变换红外光谱仪,美国

收稿日期:2021-06-18

基金项目:国家自然科学基金项目(3176100462)

作者简介:申瑾(1992—),女,硕士生

通信作者:章中 E-mail: zhangzhong99@126.com

PerkinElmer公司;超高压设备5L HPP 600 MPa, 内蒙古包头科发高压科技有限公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 枯草杆菌芽孢悬浮液的制备** 芽孢的制备,将活化的枯草杆菌芽孢接入营养琼脂培养基,37℃恒温培养7d,用无菌去离子水振荡、洗涤、收集,将收集好的芽孢用无菌去离子水离心洗涤(4℃、8 000 r/min、15 min)芽孢3次,洗涤后的芽孢重悬在无菌去离子水,调节芽孢浓度约为 $10^8$  CFU/mL,4℃保存,1个月内使用。

**1.3.2 枯草杆菌芽孢悬浮液的HPTS处理** 取1.3.1节制备的芽孢悬浮液放入灭菌好的包装袋并置于超高压加压釜中,放入超高压仪器中,处理介质为水,作为压力传递介质对样品加压。对样品进行温压处理:压力为200,550 MPa结合处理温度25,65,75℃,保压处理20 min,处理时间不包括升压和卸压所需时间,每个样品平行3次。压力水平,时间和温度由计算机控制。在加压过程中,通过K型热电偶测量压力容器中介质的温度。减压后,将样品在冰浴中冷却,并在计数前4℃下保存6h。

**1.3.3 枯草杆菌芽孢平板计数方法** 将处理前、后的芽孢悬浮液进行梯度稀释,用移液枪分别吸取1 mL稀释液,用TSA-YE培养基进行倾注平板计数。37℃下培养24~48 h,计算菌落总数对数值。

#### 1.3.4 枯草杆菌芽孢紫外吸收物质泄漏量的测定

将处理前后的菌悬液于4℃、9 000×g离心15 min,收集上清液,使用紫外分光光度计测定260 nm(核酸)和280 nm(蛋白质)处的吸光值,每组设置3个平行,未处理的菌悬液为对照组,无菌水为空白对照。

**1.3.5 流式细胞仪检测枯草芽孢杆菌芽孢内膜通透性** 取处理前后的枯草芽孢杆菌芽孢悬浮液,稀释到菌液浓度为 $10^6\sim 10^7$  CFU/mL。使用PI(Propidium iodide,碘化丙啶)染色,在1 mL芽孢悬浮液中加入0.75 μL 20 mmol/L的PI染色液,在室温下暗处孵育15 min。用流式细胞仪检测前向散射光(FSC)、侧向散射光(SSC)、荧光通道FL2和FL3。采用488 nm激发光,PI标记细胞在615 nm处发红色荧光(FL3)。数据采集后用FSC Ex-

press Version 3.0软件(De Novo software,Canada)分析。

**1.3.6 傅里叶红外光谱分析** 将1.3.2节的枯草杆菌芽孢悬浮液进行冷冻干燥,通过傅里叶红外光谱仪在室温下进行测定,加入样品质量50~100倍的KBr后进行研磨,压片后,选用空白KBr片作为对照。置于傅里叶红外光谱仪上,于4 000~400  $\text{cm}^{-1}$ 范围内进行扫描,扫描次数为64次,分辨率为4  $\text{cm}^{-1}$ 。

### 1.4 数据处理及统计分析

样品的傅里叶变换红外光谱图利用PeakFitv 4.12软件在谱带范围内(酰胺I带1 600~1 700  $\text{cm}^{-1}$ )校正基线,然后用Gaussian去卷积,做二阶导数拟合,多次拟合使残差最小。根据峰面积计算枯草杆菌芽孢蛋白质各二级结构含量。利用Origin分析所采集的红外数据中3 300~2 800  $\text{cm}^{-1}$ 脂质波段、1 700~1 600  $\text{cm}^{-1}$ 蛋白质波段、1 300~900  $\text{cm}^{-1}$ 核酸波段的数据进行归一化并进行二阶求导。将校正基线后的红外光谱数据在SIMCA14.0软件中进行PCA分析。

所有试验至少重复3次,试验结果以均值±标准误差表示。用Origin 2018.0软件对试验结果进行作图及数据分析,用SPSS24进行统计分析。以 $P<0.05$ 为显著差异的标准。表中不同的标注字母表示有显著性差异( $P<0.05$ )。

## 2 结果与讨论

### 2.1 HPTS处理对枯草杆菌芽孢的杀灭作用

通过测量枯草杆菌芽孢的存活浓度来探究HPTS杀菌的效果。图1为HPTS(200,550 MPa分别结合25,65,75℃)处理前后枯草杆菌芽孢存活浓度的变化。枯草杆菌芽孢处理前的初始计数约为 $1\times 10^7$  lg(CFU/mL)。与未处理的枯草杆菌芽孢存活浓度相比,200 MPa-25℃/65℃/75℃处理后枯草杆菌芽孢分别下降0.02,1.61,4.2 lg(CFU/mL);550 MPa-25℃/65℃/75℃处理枯草杆菌芽孢分别下降0.04,2.85,5.2 lg(CFU/mL),结果表明单一压力不能灭活芽孢,这与前人研究结果一致<sup>[14]</sup>;HPTS处理能显著降低枯草杆菌芽孢的存活率。

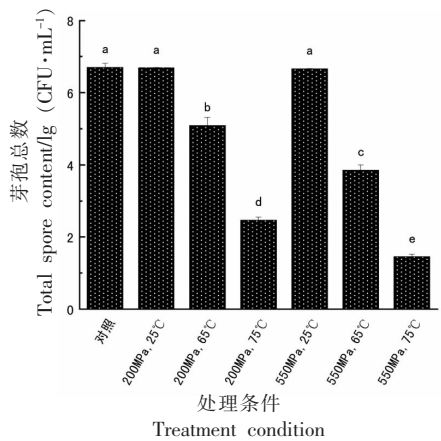


图1 HPTS处理前后对枯草杆菌芽孢存活浓度的影响

Fig.1 Effect of HPTS on the survival concentration of *Bacillus subtilis*

表1 HPTS对枯草芽孢杆菌紫外吸收物质泄漏量的影响

Table 1 Effect of HPTS on the leakage of ultraviolet absorbing substances of *Bacillus subtilis*

紫外吸收物质	压力/MPa	25 °C	65 °C	75 °C
OD <sub>260nm</sub>	0	0.049 ± 0.002 <sup>c</sup>	0.049 ± 0.002 <sup>c</sup>	0.049 ± 0.002 <sup>c</sup>
	200	0.078 ± 0.001 <sup>aA</sup>	0.148 ± 0.02 <sup>bB</sup>	0.209 ± 0.03 <sup>bC</sup>
	550	0.068 ± 0.001 <sup>bA</sup>	0.173 ± 0.01 <sup>aB</sup>	0.242 ± 0.03 <sup>aC</sup>
OD <sub>280nm</sub>	0	0.044 ± 0.002 <sup>b</sup>	0.044 ± 0.002 <sup>c</sup>	0.044 ± 0.002 <sup>c</sup>
	200	0.062 ± 0.003 <sup>aA</sup>	0.139 ± 0.02 <sup>bB</sup>	0.172 ± 0.02 <sup>bC</sup>
	550	0.052 ± 0.004 <sup>aA</sup>	0.155 ± 0.02 <sup>aB</sup>	0.212 ± 0.04 <sup>aC</sup>

注:标有不同字母的处理之间具有显著性差异(P<0.05)。

由表中可以看出,枯草杆菌芽孢经 HPTS 处理上清液中的核酸与蛋白的泄漏量都显著增加 (P<0.05),说明 HPTS 处理使得芽孢内膜的受损程度不断增加,通透性不断升高,使更多的核酸蛋白质流出到细胞外。

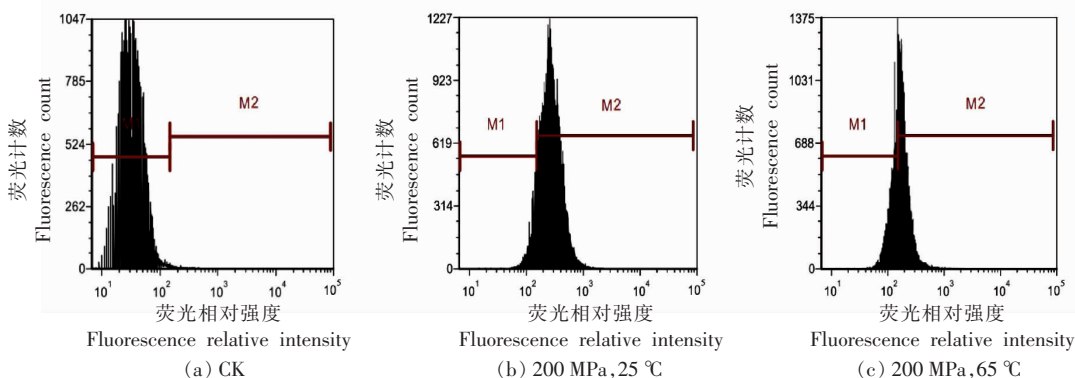
### 2.3 HPTS 处理对枯草杆菌芽孢细胞膜损伤的流式细胞仪检测

进一步采用流式细胞术 PI 荧光染料研究芽

### 2.2 HPTS 处理前后枯草杆菌芽孢紫外吸收物质泄漏量的测定

由于核酸中含有嘌呤、嘧啶碱基,蛋白质中含酪氨酸和色氨酸残基的苯环,这些结构都具有共轭双键(-C=C-C=C-),所以在紫外光区有强烈的光吸收作用。核酸和蛋白质的最大吸收峰分别在 260 nm 和 280 nm 附近。因此采用紫外线吸收来测量细胞内核酸和蛋白质物质的泄漏情况,以表明芽孢内膜受损<sup>[15]</sup>。处理条件不同导致所有处理样品中紫外线吸收物质的泄漏量不同(表 1)。

孢内膜通透性的改变<sup>[16]</sup>。荧光染料 PI 是一种溴化乙啶的类似物,当膜受到损伤时,PI 能够透过受损的细胞膜进入到细胞内部,结合 DNA 后发出强烈的荧光。流式细胞仪直方图可分为两个区域 M1 和 M2, M1 区是阴性区域,表明芽孢的内膜没有遭到破坏,PI 无法透过芽孢内膜, M2 是阳性区域,表明 PI 和芽孢 DNA 结合且发射强荧光。与未处理芽孢相比,经 HPTS 处理后,荧光分布都极显著



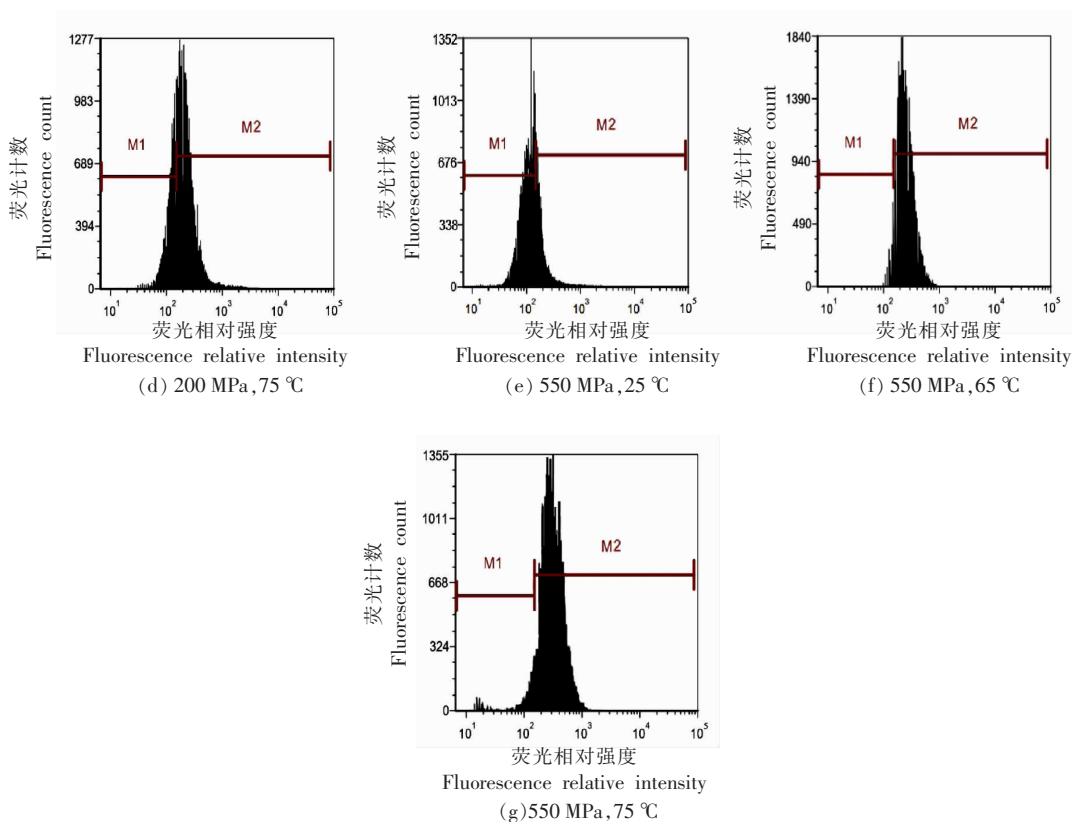


图 2 HPTS 处理对枯草芽孢杆菌芽孢内膜通透性的影响

Fig.2 The effect of HPTS treatment on the permeability of the endometrial membrane of *Bacillus spores*

的向 M2 区移动,说明芽孢受到一定程度的损伤,芽孢内膜通透性增加,与紫外吸收泄漏量的结果相一致。HPTS 导致芽孢灭活机制与芽孢内膜通透性有关。

2.4 HPTS 处理枯草杆菌芽孢的红外光谱分析

图 3a 反映不同条件下处理枯草杆菌芽孢样品进行傅里叶红外检测的谱图,红外检测的波长

范围为 4 000~400  $\text{cm}^{-1}$ ,可以看出不同条件处理枯草杆菌芽孢光谱的峰形、峰高等基本相似反映出不同条件处理后枯草杆菌芽孢的化学组分基本相似,主要包括 3 000~2 800  $\text{cm}^{-1}$ ,1 700~1 600  $\text{cm}^{-1}$ ,1 300~900  $\text{cm}^{-1}$  处的脂质、蛋白质、核酸<sup>[17]</sup>。

由图 3b 可见,HPTS 处理前后枯草杆菌芽孢谱图的变化较不明显,从谱图中无法分辨峰位的

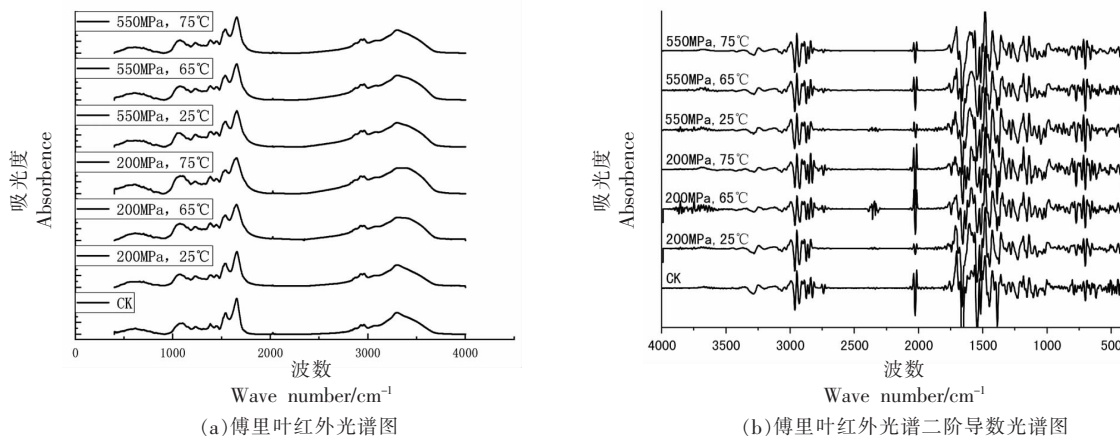


图 3 HPTS 处理前后枯草杆菌芽孢的红外及二阶导数光谱图

Fig.3 Infrared and second-derivative of *Bacillus spores* before and after HPTS treatment

变化情况,必须对得到的原谱图进行数据分析处理。二阶导数处理是红外谱图处理中常见的方法<sup>[18]</sup>,它可以将原谱图中微小的差别分辨开来,有利于谱图的分析利用红外且二阶导数光谱与传统光谱相比具有精度高、分辨率好、灵敏度高等特点,能有效地分辨出重叠峰和强峰的肩峰。从二阶导数光谱看除了在大约 $3\ 000\sim 2\ 800\text{ cm}^{-1}$ ,和 $1\ 700\sim 500\text{ cm}^{-1}$ 的范围内的窄峰之外,在研究的光谱区域中没有发现峰位置的显著差异。在这些区域中选取对细菌芽孢灭活影响大的脂质、蛋白质、核酸和肽聚糖进行二阶导数分析,根据官能团的位移及峰强的形状来具体研究对细菌芽孢灭活作用的影响。

## 2.5 HPTS 处理枯草杆菌芽孢的二阶导数图谱分析

由图 4a 看出不同处理条件下红外光谱有一些共同的特征峰的变化。区域在 $3\ 000\sim 2\ 800\text{ cm}^{-1}$ 主要代表膜脂质,大约 $2\ 855\text{ cm}^{-1}$ 和 $2\ 925\text{ cm}^{-1}$ 波数表示 $-\text{CH}_3$ 和 $-\text{CH}_2$ 对称和反对称伸缩振动<sup>[18]</sup>。 $-\text{CH}_2$ 发生的规律性位移则在一定程度上反映细

胞膜脂质次甲基链的堆积特征和脂质双层的有序/无序性质<sup>[19]</sup>。HPTS 引起细胞膜脂肪酰基链的变化,如果脂肪酰基链被“融化”而达到高度构象紊乱,则峰移至更高的波数<sup>[20]</sup>。如图 4a 所示,HPTS 处理后, $2\ 852\text{ cm}^{-1}$ 波段的峰位基本没有变化; $2\ 929\text{ cm}^{-1}$ 波段的峰值位移复杂,与未处理的枯草杆菌芽孢相比, $550\text{ MPa}\sim 65\text{ }^\circ\text{C}/75\text{ }^\circ\text{C}$ 没有发生位移,而 $200\text{ MPa}$ 压力处理下与 $550\text{ MPa}\sim 25\text{ }^\circ\text{C}$ 波段的峰值都向低波数段位移,分别移至 $2\ 927, 2\ 925, 2\ 927\text{ cm}^{-1}$ 。表明枯草杆菌芽孢的细胞膜的磷脂分子疏水尾链混乱度增大。与常温结合压力处理相比, $200\text{ MPa}\sim 65\text{ }^\circ\text{C}/75\text{ }^\circ\text{C}$ 向低波数段位移而 $550\text{ MPa}\sim 65\text{ }^\circ\text{C}/75\text{ }^\circ\text{C}$ 向高波数段位移,说明随着温度的升高 $200\text{ MPa}$ 与 $550\text{ MPa}$ 结合温度处理对枯草杆菌芽孢的作用不同而在 $550\text{ MPa}\sim 65\text{ }^\circ\text{C}/75\text{ }^\circ\text{C}$ 时,由于较高压似乎将热引起的内膜相态转变抵消了,高压与温度升高导致的磷脂膜改变,波峰没有发生位移,这与前人结果一致<sup>[21-22]</sup>。

波段 $1\ 600\sim 1\ 700\text{ cm}^{-1}$ 的酰胺 I 带,主要涉及

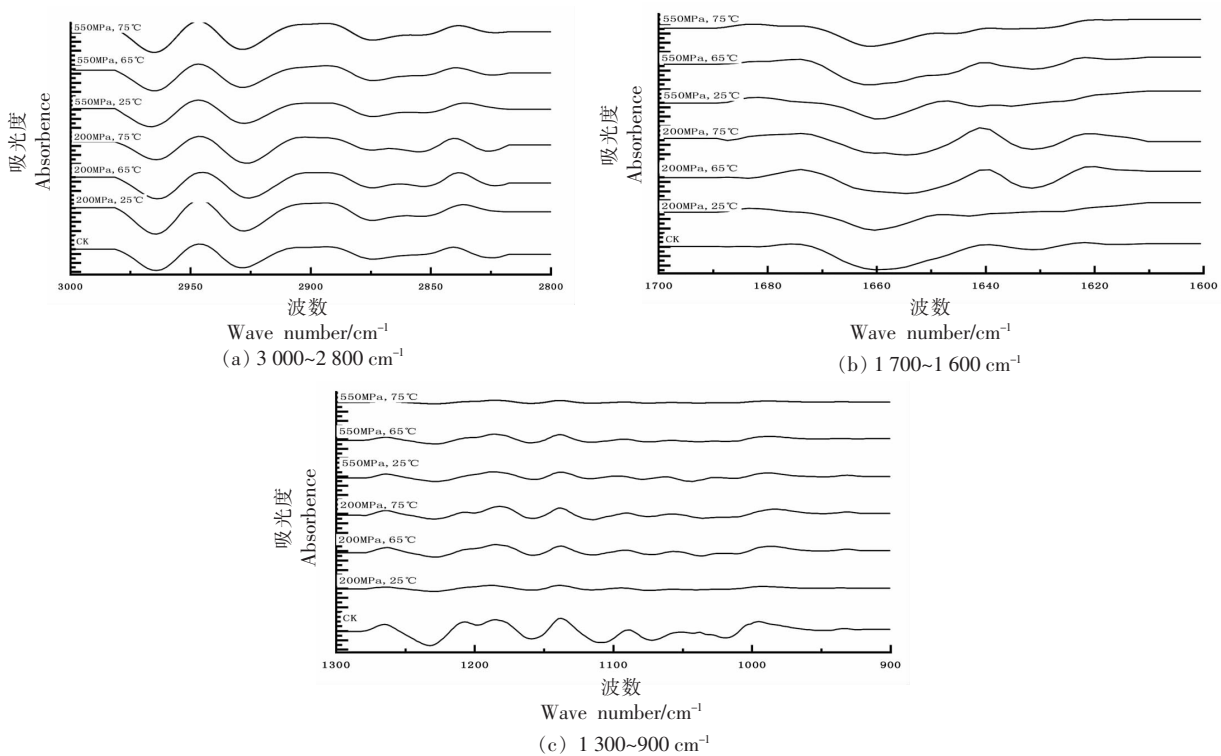


图 4 HPTS 处理前后枯草杆菌芽孢二阶导数红外光谱图

Fig.4 Second- derivative FT-IR spectra of *Bacillus subtilis* spores nucleic acid treated by HPTS

肽链 C=O 伸缩振动,与蛋白质的二级结构有关。图 4b 可以发现在 HPTS 处理后其峰位都有所改变。与未处理的枯草杆菌芽孢相比,25 °C 结合压力处理条件下,C=O 伸缩振动都向高波数方向移动,可能的原因是高压导致蛋白变性主要是由于分子内部的空穴体积变化,根据“水渗透模型”,由于压力的作用,水分子进入到空穴中,导致蛋白分子体积的变化,从而导致蛋白质变性,其中蛋白质分子之间的氢键被破坏,使峰位向高波数方向移动<sup>[23]</sup>。同时 550 MPa 结合温度处理 C=O 伸缩振动也向高波数方向移动,有报道<sup>[24]</sup>指出,通常蛋白质高温会破坏分子的内氢键,使峰位向高波数方向移动。这主要是由于蛋白质的水合作用造成偶极离子的瞬间改变从而使酰胺 I 带的峰增强,说明在温压结合处理过程中蛋白质发生了变性且破坏了蛋白质分子内的氢键。200 MPa-65/75 °C 与 220 MPa 常温处理相比,C=O 伸缩振动向低波数方向移动,这是因为蛋白质的氨基酸残基间形成的氢键 (C=O...H-) 较强时,C=O 的电子云密度较低,较少的能量就可使其发生振动,C=O 的吸收峰向低波数方向移动。综上所述,经过 HPTS 处理后,峰形也发生了明显的变化,细菌芽孢蛋白质的结构破坏,蛋白质发生了变性。

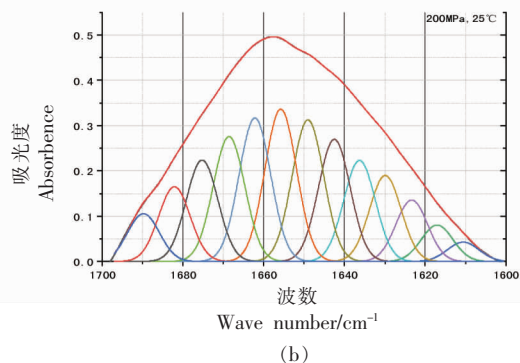
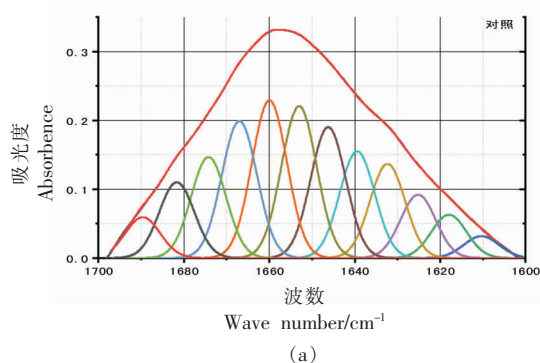
图 4c 中波段 1 300~900 cm<sup>-1</sup> 表示细胞核酸,细胞壁成分的振动特征,1 232 cm<sup>-1</sup> 和 1 082 cm<sup>-1</sup> 吸收峰,分别属于核酸磷酸二酯主链的反对称伸缩和对称伸缩振动,与核酸变性相关<sup>[25]</sup>。1 232 cm<sup>-1</sup> 与 1 080 cm<sup>-1</sup> 处的吸收峰发生了明显的变化,表明 HPTS 确实能够导致细菌芽孢内核酸物质的变性,

且 1 080 cm<sup>-1</sup> 和 1 232 cm<sup>-1</sup> 特征峰都向低波数移动,这是因为在 HPTS 处理过程中,细胞内的核酸分子中 PO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 基团氢键化程度发生变化引起,氢键的减弱使得峰位向低波数移动。芽孢 1 232 cm<sup>-1</sup> 处的吸收峰向低波数谱带偏移,表明其以氢键化形式存在的基团数增多。

此外,1 200~900 cm<sup>-1</sup> 的吸收峰变化主要是由 C-O-C 伸缩振动导致的,可以反映细胞壁肽聚糖层在处理前后的变化<sup>[26]</sup>。芽孢皮层肽聚糖支架是其耐压特性的关键结构。图 4c 中,枯草杆菌芽孢在 HPTS 处理前后肽聚糖层和细胞壁 (950 cm<sup>-1</sup>) 发生了明显的变化,说明芽孢皮层肽聚糖和芽孢细胞壁结构发生了改变。

## 2.6 枯草杆菌芽孢酰胺 I 带 (1 700~1 600 cm<sup>-1</sup>) 的拟合结果分析

蛋白质酰胺 I 带的光谱区间为 1 700~1 600 cm<sup>-1</sup>,主要包含了 -C=O 的伸缩振动,对于蛋白质二级结构的变化非常敏感,对于研究二级结构最有价值<sup>[27]</sup>。应用二阶导数和曲线拟合的方法对未处理及 HPTS 处理后的枯草杆菌芽孢酰胺 I 带曲线拟合。酰胺 I 带是由多个子峰重叠而成的宽峰,从图 5 得出分别有 12,13,18,12,14,14,13 自带峰,对自带峰进行指认,计算各子峰和总峰的峰面积,得各二级结构含量<sup>[23]</sup>。位于 1 600~1 700 cm<sup>-1</sup> 范围的酰胺 I 带与蛋白质骨架构象类型相关,其主要涉及肽链 C=O 伸缩振动和 N-H 平面弯曲振动等。 $\alpha$  螺旋集中于 1 650~1 660 cm<sup>-1</sup>, $\beta$  折叠集中于 1 610~1 640 cm<sup>-1</sup>, $\beta$  转角集中于 1 660~1 670 cm<sup>-1</sup>,无规卷曲集中于 1 640~1 650 cm<sup>-1</sup><sup>[28]</sup>。



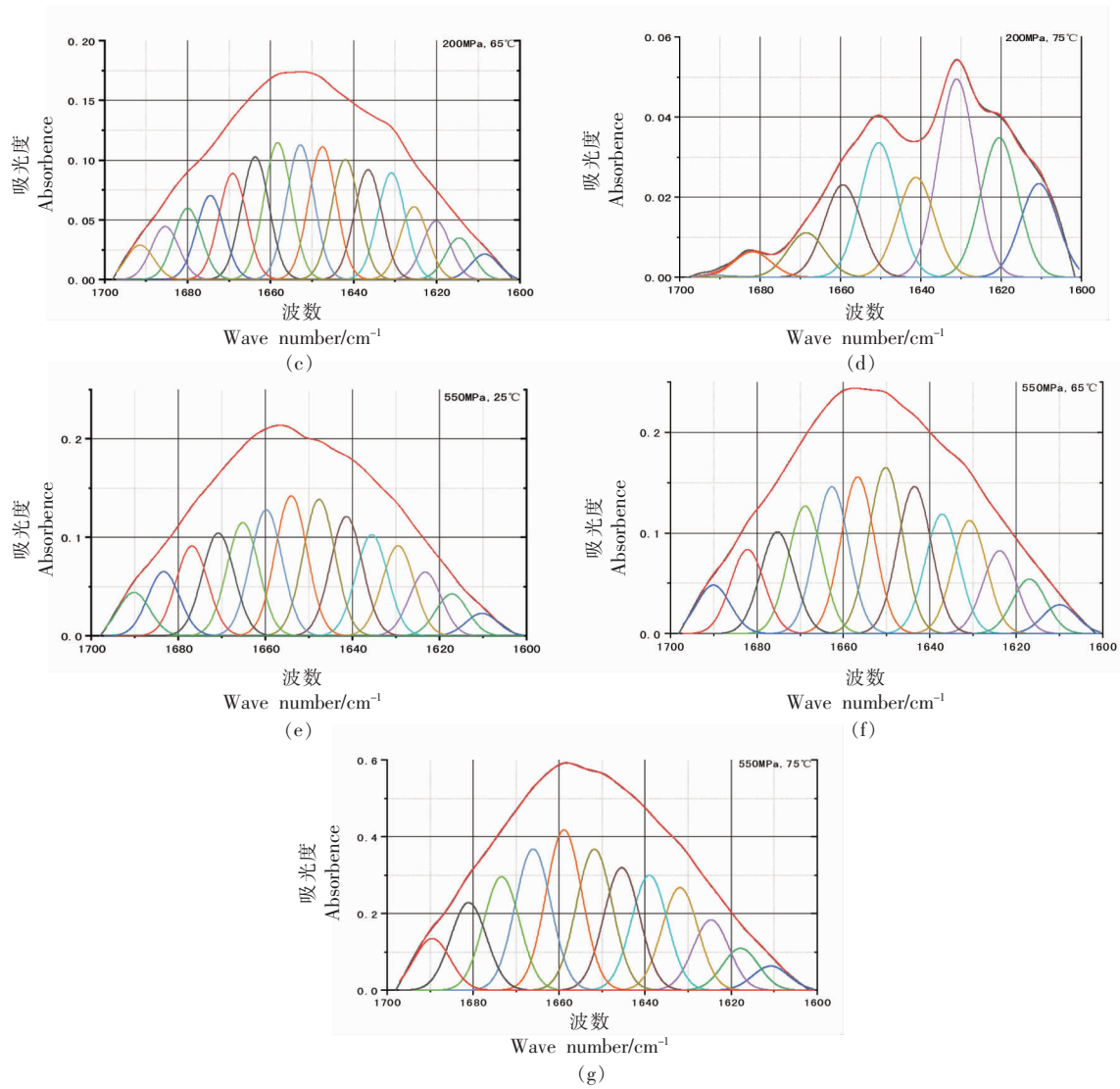


图5 蛋白质酰胺 I 带 (1700~1600 cm<sup>-1</sup>) 拟合红外谱图  
 Fig.5 Curve-fitting FTIR spectra of the amide I (1700~1600 cm<sup>-1</sup>)

枯草杆菌芽孢蛋白二级结构的相对含量如图6, 未处理的枯草杆菌芽孢酰胺 I 带有大量的有序二级结构 α-螺旋与 β-折叠。从整体趋势发现, 与未处理的枯草杆菌芽孢相比, HPTS 处理主要减少蛋白的 α-螺旋结构, 转变为 β-转角结构与无规卷曲结构, 说明 HPTS 处理后细菌芽孢蛋白质发生变性且从有序状态转变为无序状态, 可能通过影响细菌芽孢的代谢过程导致芽孢灭活<sup>[29-31]</sup>。Hamzah 等<sup>[31]</sup>发现二级结构从有序状态转变为无序状态会导致蛋白质稳定性下降, 并进一步影响细胞的代谢过程, 与本试验结果一致。同时 β-转角主要出现在蛋白的表面, 说明 HPTS 处

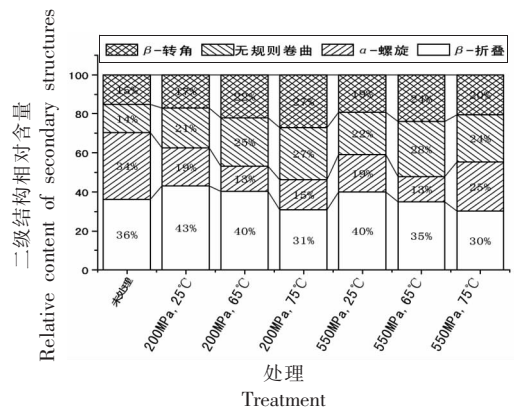


图6 枯草杆菌芽孢蛋白质二级结构含量  
 Fig.6 Protein secondary structure content of *Bacillus subtilis* spores

理后蛋白的结构较为紧密。

## 2.7 HPTS 处理前、后枯草杆菌芽孢红外主成分分析

主成分载荷图能够显示不同变量对主成分的贡献大小, 获取更多 HPTS 处理枯草杆菌芽孢前后样品的差异信息。对 PC1 和 PC2 的相应载荷图的进一步分析(图 7b)确定了光谱波数(和相关的官能团)及其在区分不同 HPTS 处理细菌芽孢中的意义。在解释载荷图时, 如果波数具有较大的正负荷载, 则波数对于相关的主分量很重要; 在 PC1 中具有较大荷载的波数对区分芽孢的贡献大于

PC2, PC1 是主成分分析中最重要的成分。p[1]和 p[2]分别为主成分变量 PC1 和 PC2 的载荷值, PC1 负载最大的最突出峰在  $1\ 000\sim 1\ 700$ 、 $2\ 500\sim 3\ 660\ \text{cm}^{-1}$ , 即在上述波数附近有吸收峰的物质对第一主成分的贡献较大, 通过光谱解析结合枯草杆菌芽孢化学成分信息可知主成分载荷图的吸收峰主要归属为芽孢的蛋白质、脂肪、核酸等, 表明 HPTS 处理导致这些物质结构变化存在差异。对 PC2 贡献较大的吸收峰为  $775\sim 997$ 、 $1\ 774\sim 2\ 576$ 、 $3\ 670\sim 4\ 000\ \text{cm}^{-1}$  等, 与 PC1 形成互补, 总贡献率达到 95.1%。

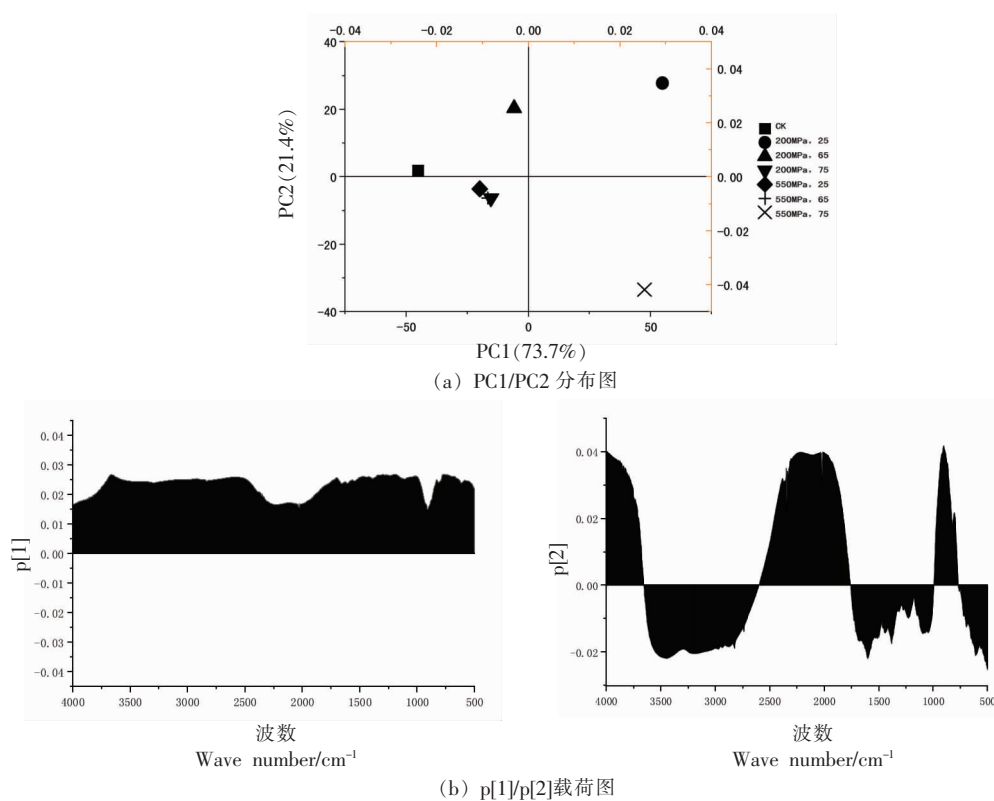


图 7 HPTS 处理前后枯草杆菌芽孢红外光谱主成分分析

Fig.7 Analysis of the main components of the infrared spectroscopy of *Bacillus subtilis* spores before and after HPTS treatment

## 3 讨论

本文通过 HPTS 处理枯草杆菌芽孢前后存活浓度、芽孢内膜损伤程度、内膜通透性、芽孢成分等指标的检测, 探讨了 HPTS (200 MPa 结合 25, 65, 75 °C; 550 MPa 结合 25, 65, 75 °C; 保压时间: 20 min) 处理对枯草杆菌芽孢杀灭作用及机理。得出以下结论:

1) 经 HPTS 处理后, 芽孢内膜损伤严重、内膜通透性增加, 芽孢存活浓度降低。HPTS 可有效破坏芽孢内膜的水分子通透屏障, 水分子更易通过芽孢内膜而进入到芽孢核心, 而随着芽孢核心水分含量的增加, 芽孢耐热性大大降低, 芽孢通透性的增加是芽孢灭活的一个重要原因。

2) 傅里叶红外光谱反映了 HPTS 处理引起



的膜脂质、蛋白质、核酸和多糖的变化,在本研究中采用傅里叶红外光谱结合二阶导数红外光谱对HPTS处理前后的枯草杆菌芽孢进行分析,发现波段在 $3\ 000\sim 2\ 800\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\ 700\sim 1\ 600\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\ 300\sim 900\text{ cm}^{-1}$ 区域的膜脂质,蛋白质、核酸和肽聚糖层发生了变性,并对蛋白质二级结构进行拟合进一步发现从有序变为无序,蛋白质稳定性下降。这些物质的变化可影响芽孢的生理代谢,从而使芽孢灭活。这些结果增加了有关HPTS对枯草杆菌芽孢灭活机制的研究,促进了HPTS在食品加工中的应用。

3) 利用SIMCA对不同HPTS处理的芽孢FT-IR光谱进行主成分分析,对不同HPTS处理的芽孢生理结构相似性进行判别,发现其相似性,并得到HPTS处理对芽孢影响密切相关的特征波长,这些特征波长反映HPTS灭活芽孢作用过程中的关键成分的变化,促进了FT-IR光谱应用于微生物的研究。

综上所述,芽孢内膜受损,芽孢内膜通透性增加、芽孢膜脂质、蛋白质、核酸、多糖等结构改变与HPTS灭活芽孢相关。

### 参 考 文 献

- [1] PAUL C, FILIPPIDOU S, JAMIL I, et al. Bacterial spores, from ecology to biotechnology[J]. *Adv Appl Microbiol*, 2019, 106: 79-111.
- [2] SADIQ F A, FLINT S, HE G. Microbiota of milk powders and the heat resistance and spoilage potential of aerobic spore-forming bacteria[J]. *Int Dairy J*, 2018, 85: 159-168.
- [3] LOPES R P, MOTA M J, GOMES A M, et al. Application of high pressure with homogenization, temperature, carbon dioxide, and cold plasma for the inactivation of bacterial spores: A review[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2018, 17(3): 532-555.
- [4] SETLOW P. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, 101(3): 514-525.
- [5] 梁栋, 陈芳, 胡小松. 芽孢萌发研究进展[J]. *中国食品学报*, 2018, 18(6): 221-228.
- [6] LIANG D, CHEN F, HU X S. Research progress on the spore germination[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2018, 18(6): 221-228.
- [7] WELLS -BENNIK M H J, JANSSEN P W M, KLAUS V, et al. Heat resistance of spores of 18 strains of *Geobacillus stearothermophilus* and impact of culturing conditions[J]. *Int J Food Microbiol*, 2019, 291: 161-172.
- [8] ABHYANKAR W R, WEN J, SWARGE B N, et al. Proteomics and microscopy tools for the study of antimicrobial resistance and germination mechanisms of bacterial spores[J]. *Food Microbiol*, 2019, 81: 89-96.
- [9] OBAIDAT R, YU D, ALJAWHIRI S, et al. Moderate hydrostatic pressure-temperature combinations for inactivation of *Bacillus subtilis* spores[J]. *High Pressure Research*, 2015, 35(3): 317-329.
- [10] BRESSUIRE-ISOARD C, BROUSSOLLE V, CARLIN F. Sporulation environment influences spore properties in *Bacillus*: evidence and insights on underlying molecular and physiological mechanisms[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2018, 42(5): 614-626.
- [11] EVELYN, SILVA F V M. Differences in the resistance of microbial spores to thermosonication, high pressure thermal processing and thermal treatment alone[J]. *J Food Eng*, 2018, 222: 292-297.
- [12] AL-GHAMDI S, SONAR C R, PATEL J, et al. High pressure-assisted thermal sterilization of low-acid fruit and vegetable purees: Microbial safety, nutrient, quality, and packaging evaluation[J]. *Food Control*, 2020, 114: 107233.
- [13] SEVENICH R, RAUH C, KNORR D. A scientific and interdisciplinary approach for high pressure processing as a future toolbox for safe and high quality products: A review[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2016, 38: 65-75.
- [14] SEVENICH R, MATHYS A. Continuous versus discontinuous ultra-high-pressure systems for food sterilization with focus on ultra-high-pressure homogenization and high-pressure thermal sterilization: A review[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2018, 17(3): 646-662.
- [15] JÁN Š. Effect of some environmental factors on the content and composition of microbial membrane lipids[J]. *Crit Rev Biotechnol*, 1997, 17(2): 87-

- 103.
- [15] HONG S I, PYUN Y R. Membrane damage and enzyme inactivation of *Lactobacillus plantarum* by high pressure CO<sub>2</sub> treatment [J]. *Int J Food Microbiol*, 2001, 63(1): 19–28.
- [16] MOUSSA M, PERRIER–CORNET J–M, GERVAIS P. Damage in *Escherichia coli* cells treated with a combination of high hydrostatic pressure and subzero temperature [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(20): 6508–6518.
- [17] KAR S, KATTI D R, KATTI K S. Fourier transform infrared spectroscopy based spectral biomarkers of metastasized breast cancer progression [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2019, 208: 85–96.
- [18] Yang H, Griffiths P R, Manning C J. Improved Data Processing by Application of Brault's Method to Ultra–Rapid–Scan FT–IR Spectrometry [J]. *Applied Spectroscopy*, 2002, 56(10): 1281–1288.
- [19] KAPOOR S, WERKMULLER A, DENTER C, et al. Temperature–pressure phase diagram of a heterogeneous anionic model biomembrane system: results from a combined calorimetry, spectroscopy and microscopy study [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1808(4): 1187–1195.
- [20] H M U. Effects of pressure–induced membrane phase transitions on inactivation of HorA, an ATP–dependent multidrug resistance transporter, in *Lactobacillus plantarum* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(3): 1088–1095.
- [21] MENG J, GONG Y, QIAN P, et al. Combined effects of ultra–high hydrostatic pressure and mild heat on the inactivation of *Bacillus subtilis* [J]. *LWT – Food Science and Technology*, 2016, 68: 59–66.
- [22] HOFSTETTER S, DENTER C, WINTER R, et al. Use of the fluorescent probe LAURDAN to label and measure inner membrane fluidity of endospores of *Clostridium* spp [J]. *J Microbiol Methods*, 2012, 91(1): 93–100.
- [23] 蓝蔚青, 胡潇予, 阮东娜, 等. 傅里叶红外结合拉曼分析卡拉胶寡糖对南美白对虾蛋白结构影响 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2019, 39(8): 2507–2514.
- LAN W Q, HU X Y, RUAN D N, et al. Effects of carrageenan oligosaccharides on the protein structure of *litopenaeus vannamei* by fourier transform infrared and micro–raman spectroscopy [J]. *Spectroscopy and Spectral*, 2019, 39(8): 2507–2514.
- [24] 石燕, 刘凡, 葛辉, 等. 微胶囊形成过程中蛋白质二级结构变化的红外光谱分析 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2012(7): 1815–1819.
- SHI Y, LIU F, GE H. Study on secondary structural changes of protein in the formation of microcapsule by FTIR spectroscopy. *spectroscopy.spectroscopy and spectral* [J]. 2012(7): 1815–1819.
- [25] GEORGET E, KUSHMAN A, CALLANAN M, et al. *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 spore chemical germination mechanisms in model systems [J]. *Food Control*, 2015, 50: 141–149.
- [26] ANAND S. Monitoring biochemical changes in bacterial spore during thermal and pressure–assisted thermal processing using FT–IR spectroscopy [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 22(55): 9311–9317.
- [27] SINGH B R, FULLER M P, SCHIAVO G. Molecular structure of tetanus neurotoxin as revealed by Fourier transform infrared and circular dichroic spectroscopy [J]. *Biophys Chem*, 1990, 36(2): 155–166.
- [28] BYLER D M, SUSI H. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra [J]. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 1986, 25(3): 469–487.
- [29] 张登科, 张慧恩, 朱艳杰, 等. 超高压处理对养殖大黄鱼肌原纤维蛋白结构的影响 [J]. *食品科学*, 2019, 40(9): 61–67.
- ZHANG D K, ZHANG H E, ZHU Y J. Effect of high hydrostatic pressure treatment on myofibrillar protein structure of cultured large yellow croaker [J]. *Food Science*, 2019, 40(9): 61–67.
- [30] BORCH–PEDERSEN K, MELLEGARD H, REINEKE K, et al. Effects of high pressure on *Bacillus licheniformis* spore germination and inactivation [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2017, 83(14): 13.
- [31] HAMZAH M A–Q. Using Fourier transform infrared (FT–IR) absorbance spectroscopy and multivariate analysis to study the effect of chlorine–induced bacterial injury in water [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 19(56): 8992–8997.

### Studies on Inactivation of HPTS on *Bacillus subtilis* Spore

Shen Jin, Tan Rui, Guo Jiajun, Chen Xiang, Wu Shan, Bao Junpeng, Zhang Zhong\*  
(College of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021)

**Abstract** In order to explore the mechanism of HPTS in inactivation of *Bacillus subtilis* spores. In this paper, HPTS (200 MPa combined with 25 °C, 65 °C, 75 °C; 550 MPa combined with 25 °C, 65 °C, 75 °C; holding time: 20 min) was used to treat *Bacillus subtilis* spores. The survival concentration, UV absorption leakage, inner membrane permeability and spore composition of HPTS before and after HPTS treatment were studied by plate technology, UV spectrophotometry, flow cytometry and infrared spectroscopy. The results showed that after treated with HPTS, the survival concentration of spores decreased significantly ( $P < 0.05$ ), the leakage of ultraviolet absorption increased, and the endospore membrane was damaged, resulting in the enhancement of the permeability of spore endomembrane. The results of Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) showed that the main differences of *Bacillus subtilis* spores before and after HPTS treatment were protein, lipid, nucleic acid and polysaccharide. The secondary structure of protein changed from order to disorder, and the stability of protein decreased. Therefore, HPTS can effectively destroy the permeability barrier of water molecules, lipid, protein, nucleic acid and polysaccharide structure of spore membrane, so as to reduce the resistance of spores, affect the metabolism of spores and inactivate the spores. It provides a theoretical basis for HPTS to inactivate *Bacillus subtilis* spores and promotes the successful application of HPTS in food processing.

**Keywords** high pressure thermal sterilization; fourier infrared spectrum; spore; mechanism; inactivated