

高压热灭菌中乳化剂吐温 80 的应用研究

张变飞, 杨杰, 毕可, 刘月, 辛伟山, 张攀峰, 章中*

(宁夏大学食品科学与工程学院 银川 750021)

摘要 使用高压热 HPTS 结合质量分数为 0.5%, 1%, 2% 的吐温 80 处理枯草杆菌芽孢。用平板计数法测定吐温 80 溶液处理后对芽孢菌落存活数的影响, 采用流式细胞术、比色法、ATP 酶试剂盒、傅里叶变换红外光谱分析吐温 80 溶液对芽孢内膜通透性、DPA (2, 6-吡啶二羧酸) 释放、芽孢 Na^+/K^+ -ATP、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活以及蛋白二级结构稳定性的影响。结果表明: 吐温 80 能够削弱 HPTS 对枯草杆菌芽孢的杀灭效果, 对芽孢产生保护作用。当吐温 80 的质量分数为 0.5% 时, 结合低压热 (200 MPa, 75 °C) 处理, 芽孢的最大存活量可达 5.3 lg(CFU/mL)。这种保护作用主要体现在吐温 80 溶液对芽孢的内膜通透性、关键物质 DPA、ATP 酶活以及芽孢蛋白二级结构稳定性的保护。动力学研究发现芽孢的灭菌效果与处理时间呈正比例相关, 处理时间越长, 芽孢的杀灭效果越强。HPTS 结合吐温 80 的杀菌过程符合 Weibull 模型, 且添加吐温 80 后 Weibull 模型的参数 b 值、 n 值均减小 ($n < 1$)。随着处理时间的延长, 对温度与压力敏感的芽孢很快被杀灭, 而一些超级深度休眠芽孢仍然存活。

关键词 吐温 80; HPTS; 芽孢; ATP 酶活; 蛋白二级结构

文章编号 1009-7848(2023)09-0171-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.09.018

食品乳状液中微生物的生长会导致生产企业的重大经济损失, 其原因是食品在保质期内因细菌、酵母和霉菌的生长而引起食物中毒或变质^[1]。食品中最常见的乳剂有两种形式: 水包油 (如牛奶、乳脂或蛋黄酱) 和油包水 (如黄油或低脂酱)^[2]。乳剂是由两种不相溶的液体形成的亚稳态胶体体系。在食品加工或储存过程中, 乳液是热力学不稳定的体系, 经常会发生絮凝、聚结和相分离 (如乳化的现象)^[3]。由于食品中蛋白质、脂类和乳化剂等各种成分的作用, 系统中相邻液滴之间存在排斥力, 因此它们可以在动力学上保持平衡。在这种复杂的食品乳剂中, 许多因素都可能对微生物产生影响。在乳液中, 水相通常被认为是微生物生长的场所^[4]。在食品灭菌中, 芽孢是最难以被灭活的物体^[5]。高压热杀菌 (HPTS) 可使芽孢失活, 对食品品质影响不大, 与传统的热灭菌相比, HPTS 实现商业灭菌所需时间短。高压热灭菌为静态超高压和热结合, 通常压力为 400~900 MPa, 温度 50~100 °C, 保持 15~20 min。吐温 80 作为一种表面活性剂和乳化剂, 对芽孢萌发和生长有一定的抑制作用,

并具有抗菌活性, 对界面现象也有很大的影响^[6]。本试验设置不同的压力和温度, 探讨 HPTS 结合不同质量分数的吐温 80 处理对枯草杆菌芽孢的杀灭效果。

1 材料与方法

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 As1.433^[7]。

硫酸锰 (分析纯), 天津市大茂化学试剂厂; 吐温 80 (分析纯), 国药集团化学试剂有限公司; ATP 酶试剂盒、考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司。营养琼脂, 天津市大茂化学试剂厂; TSA-YE 培养基, 北京索莱宝科技有限公司。

1.2 仪器与设备

AL204 型电子天平, 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司; PL202-L 型电子天平, 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司; DSX-280B 型高压灭菌锅, 上海申安医疗器械厂; LRH 系列生化培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; DZ-500/2G 型落地式真空包装机, 西安星火包装机械有限公司; HPP-600 MPa/5L 超高压灭菌装置, 包头科发高压科技有限公司; TG16-W 型台式高速离心机, 湘仪离心机仪

收稿日期: 2022-09-07

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31760474, 31460410)

第一作者: 张变飞, 女, 硕士生

通信作者: 章中 E-mail: zhangzhong99@126.com

器有限公司;TGL-10B型离心机,上海安亭科学仪器厂;UV-9000S型紫外可见分光光度计,上海元析仪器有限公司;Milli-Q/Gradient超纯水仪,美国MilliPore公司;754PC型紫外-可见分光光度仪,上海菁华仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 枯草杆菌芽孢的培养及菌悬液制备 芽孢的制备参照章中等^[7]的方法,将活化至少3代以上的枯草芽孢杆菌在已灭菌的促芽孢生长锰盐营养琼脂(营养琼脂培养基33g加入硫酸锰0.1538g,蒸馏水1000mL,pH=7,加热煮沸3次,分装试管内,121℃灭菌15min)试管斜面进行划线接种,于37℃恒温培养7d后,向每支试管斜面中加入2mL无菌蒸馏水洗涤并收集菌体,合并菌悬液,在4℃以9000r/min的转速离心15min,弃上清液,重复上述步骤再洗涤3次后,于80℃水浴10min,保证悬浮液中营养体被完全杀灭。离心浓缩并重悬无菌蒸馏水中的芽孢,测定菌液吸光度并调节芽孢浓度约为 1.5×10^9 CFU/mL,4℃保存,有效期为3个月。使用时经无菌蒸馏水稀释芽孢浓度至 5×10^7 CFU/mL,1个月内使用。

1.3.2 HPTS结合吐温80处理芽孢悬浮液 吸取30mL芽孢悬浮液至50mL无菌聚四氟乙烯离心管(经121℃高压灭菌)中,以9000r/min离心15min,弃上清液,分别加入50mL质量分数为0.5%,1%,2%的吐温80溶液,充分涡旋混匀后,转移至无菌聚乙烯塑封袋(紫外照射杀菌30min),使用真空包装机热封,放置于HPTS处理仓内,待处理。设置保压时间为20min,超高压处理压力为200,600MPa,处理温度为75℃。在HPTS处理前,将样品分别预热到所需的初始温度75℃,由于处理过程中温度下降幅度较小,所示温度(75±2)℃近似为HPTS处理期间计算出的样品温度的平均值^[9]。此外,由于所有样品在处理过程中都浸在水中,水量远远超过吐温80含量,所以吐温80对压缩加热的影响可以忽略不计,处理结束后立即放入冰水冷却,进行各项指标测定。

1.3.3 枯草杆菌芽孢悬浮液的HPTS动力学处理及灭活的动力学模型 取10mL芽孢悬浮液于无菌聚乙烯塑料袋中,菌悬液中的吐温80质量分数调整为0.5%,1%。将菌悬液真空包装,热封口后置

于超高压处理釜中,于200,600MPa结合75℃温度下处理0,5,10,15,20,25min。处理后立即将一部分样品置于冰水中冷却,测定芽孢存活数。将另一部分样品在37℃培养3h,测定菌落总数。本试验不考虑升压、泄压过程中样品的温度变化^[10-12]。

1.3.3.1 一级动力学模型 这个模型假定热压处理下芽孢的存活符合线性关系,可用下式表示^[13-14]:

$$\lg \frac{N_t}{N_0} = -\frac{t}{D} \quad (1)$$

N_0 ——达到目标压力后芽孢的数量,CFU/mL; N_t ——在压力处理时间 t 后芽孢的存活数量,CFU/mL; D ——使90%的芽孢失活所需的时间。

1.3.3.2 Weibull模型 Weibull模型是将微生物的杀灭作为Weibull模型概率事件,这与微生物群体中种群的异质性有关^[15]。这个模型假定营养体和芽孢具有不同的耐压性, b 和 n 分别为比例因子和形状参数,它们与温度和压力的大小有关^[16-17]。当存活曲线向下凹时($n < 1$),芽孢群体中对适温适压敏感芽孢以较快速度被杀灭,而一些超级深度休眠芽孢仍存活。而向上凸的曲线($n > 1$),表明深度休眠的芽孢在所处环境下减少^[18]。其表达式为:

$$\lg \frac{N_t}{N_0} = -bt^n \quad (2)$$

N_t ——时间 t 时芽孢菌落数量,CFU/mL; N_0 ——初始芽孢菌落数量,CFU/mL; b ——比例因子; n ——形状系数; t ——时间,min。

1.3.4 流式细胞法测定芽孢的膜通透性 取处理前后的枯草杆菌芽孢悬浮液1mL,离心后弃去上清液,加入0.75μL的20mmol碘化吡啶(PI)染色,并在室温下暗处孵育15min。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。每个样品检测约30000个细胞。采用488nm激发光,PI标记细胞在615nm处发红色荧光(FL₂通道),采集数据^[19]。

1.3.5 枯草杆菌芽孢菌落平板计数 将处理前后的芽孢悬浮液分别进行梯度稀释,用移液枪吸取1mL稀释液,用TSA-YE培养基进行倾注平板计数。每个平板中倒入1mL稀释菌液和15~20mL TSA-YE培养基,混合均匀后静置,每个样品倾倒

两个平板,在 37 ℃ 下培养 48 h 后进行计数,结果处理参照 GB 4789.2-2016 《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》^[20] 执行。

1.3.6 芽孢悬浮液中 DPA 的测定 芽孢在萌发、水解过程中会释放出 DPA, 试验采用比色法进行 DPA 含量检测。测量步骤如下:

DPA 标准曲线制作: 配制 10, 20, 40, 80, 120, 160 和 200 μg/mL DPA 溶液 5 mL, 其中含 1 mL DPA 色测反应剂。1~2 h 内, 于 440 nm 下测定吸光度值, 绘制出 DPA 含量对吸光度的标准曲线。

DPA 色测反应剂: 0.5 mol/L 乙酸钠缓冲液 100 mL, 抗坏血酸、硫酸亚铁铵各 1 g。

将处理后的枯草杆菌芽孢悬浮液离心 (4 ℃、9 000 r/min、15 min), 取 4 mL 上清液加 1 mL 的 DPA 色测反应剂, 在 1~2 h 内于 440 nm 下测定吸光度值。按照标准曲线算出 DPA 的含量。

1.3.7 芽孢傅里叶变换红外光谱 (FTIR) 分析 取处理前后的枯草杆菌芽孢悬浮液 5 mL, 以 9 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 用去离子无菌水反复洗去残余的吐温 80 溶液后, 冷冻干燥, 将粉末与样品质量 50~100 倍的溴化钾 (120 ℃ 干燥 10 h) 混合并进行研磨、压片, 以空白溴化钾为对照。放置在傅里叶红外光谱仪样品槽中, 在 4 000~400 cm⁻¹ 波数范围进行扫描, 扫描次数为 64 次, 分辨率为 2 cm⁻¹。

1.3.8 吐温 80 结合 HPTS 处理后枯草杆菌芽孢 ATP 酶活力的测定 取 10 mL 处理前后的芽孢悬浮液, 于 4 ℃ 以 8 000×g 离心 10 min, 取上清液, 按照 Na⁺/K⁺-ATP、Ca²⁺/Mg²⁺-ATP 酶活性测定试剂盒说明依次加入各试剂进行反应, 定磷后于室温 25 ℃ 静置 30 min, 使用酶标仪在 660 nm 处比色测定。

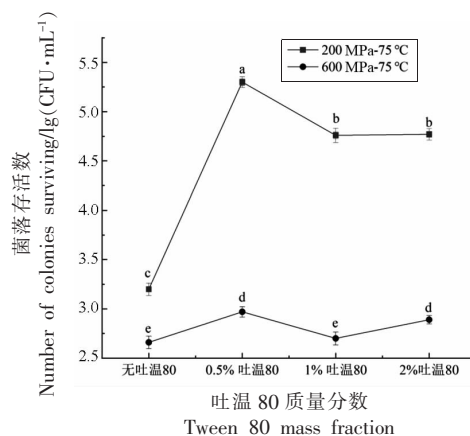
1.3.9 统计分析 所有试验都至少重复 3 次, 数据通过 SPSS 22.0 进行分析, 以 $P < 0.05$ 表示差异性显著。用 Origin 2020.0 软件对试验结果进行统计分析和作图。

2 结果与分析

2.1 HPTS 结合不同质量分数的吐温 80 处理对枯草杆菌芽孢灭活效果的影响

如图 1 所示, HPTS (处理条件: 200, 600 MPa

结合 75 ℃, 保压时间: 20 min) 结合不同质量分数的吐温 80 (0.5%, 1%, 2%) 处理下枯草杆菌芽孢的存活情况。结果表明 200 MPa, 75 ℃ 时结合不同质量分数的吐温 80 处理后, 芽孢存活量依次为 3.2, 5.3, 4.76, 4.77 lg (CFU/mL), 与不添加吐温 80 相比, 0.5%, 1%, 2% 吐温 80 均对芽孢产生协同保护作用, 其中, 200 MPa, 75 ℃, 0.5% 吐温 80 处理对芽孢的保护效果最强, 芽孢存活量增加了 2.1 lg (CFU/mL); 而当压力提升至 600 MPa 时, HPTS 结合吐温 80 处理对芽孢的灭活效果明显增强, 说明高压、高温会增加对芽孢的破坏作用。Leonard-Akkari 等^[21] 发现, 吐温 80 溶液会抑制芽孢的萌发和生长。Krstić 等^[22] 研究发现吐温 80 溶液可以降低抗生素对无乳链球菌和金黄色葡萄球菌的影响。Christina 等^[23] 发现表面活性剂吐温 80 通常用于食物的分散油中, 阻碍异丁香酚的抗菌性能。由此可见, 吐温 80 溶液能够影响微生物的萌发生长并抑制灭活效果。为了阐明它的这种保护机理, 需要我们进一步研究。



注: 标有不同字母的处理之间具有显著性差异 ($P < 0.05$), 下同。

图 1 HPTS 结合不同质量分数吐温 80 处理对芽孢灭活效果的影响

Fig.1 Spore-inactivation effects of different mass fraction of tween 80 combined with HPTS

2.2 HPTS 结合吐温 80 处理对枯草杆菌芽孢动力学杀菌效果动力学模型拟合

在 600 MPa, 75 ℃ 条件下结合吐温 80 质量分数为 0.5%, 1%, 处理时间 0, 5, 10, 15, 20, 25 min, 分析处理前后对枯草杆菌芽孢的动力学失活效果的影响情况。如图 2 所示。HPTS 结合吐温 80 处理

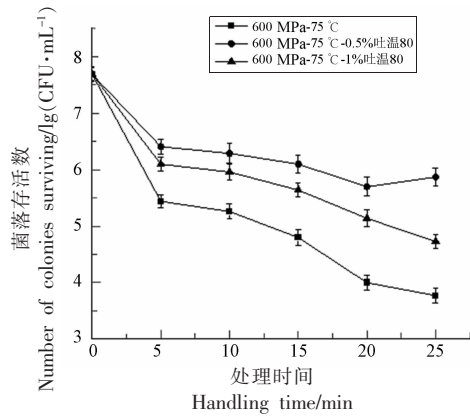


图 2 HPTS 结合吐温 80 处理对枯草杆菌芽孢动力学杀灭效果的影响

Fig.2 Effects of HPTS combined with tween 80 treatment on the kinetic inactivating effect of *Bacillus subtilis*

后,芽孢存活数明显高于单独 HPTS 处理,说明吐温 80 溶液对芽孢具有一定的保护效果。而芽孢的

灭菌效果与处理时间呈正比例相关,处理时间越长,芽孢的杀灭效果越强。

为了进一步阐明芽孢的动力学灭菌效果,采用线型、Weibull 模型对芽孢的杀灭效果进行动力学分析,并选择合适的动力学模型,主要从一级动力学角度分析 HPTS 结合吐温 80 处理对芽孢杀菌效果的影响。如图 3 所示:600 MPa,75 °C 结合质量分数 0%,0.5%,1%吐温 80 处理下枯草杆菌芽孢线性与 Weibull 模型拟合图,由表 1 可知,Weibull 模型的 R^2 均大于 0.92,线性模型的 R^2 为 0.738,0.526 和 0.616,说明 HPTS 结合吐温 80 的杀菌过程符合 Weibull 模型。与单独 HPTS 相比,添加吐温 80 后 Weibull 模型的参数 b 值、 n 值均减小($n < 1$),且随着处理时间的延长,芽孢群体对温度与压力敏感的芽孢很快被杀灭,而一些超级深度休眠芽孢仍存活。

表 1 模型参数

Table 1 Model parameters of linear, Weibull

压力	温度/°C	吐温 80	线型			Weibull			
			D	MSE	R^2	b	n	R^2	MSE
600 MPa	75 °C	0%	5.48	0.519	0.738	1.040	0.407	0.974	0.051
		0.5%	10.61	0.239	0.526	0.793	0.273	0.970	0.015
		1%	9.00	0.275	0.616	0.791	0.331	0.973	0.019

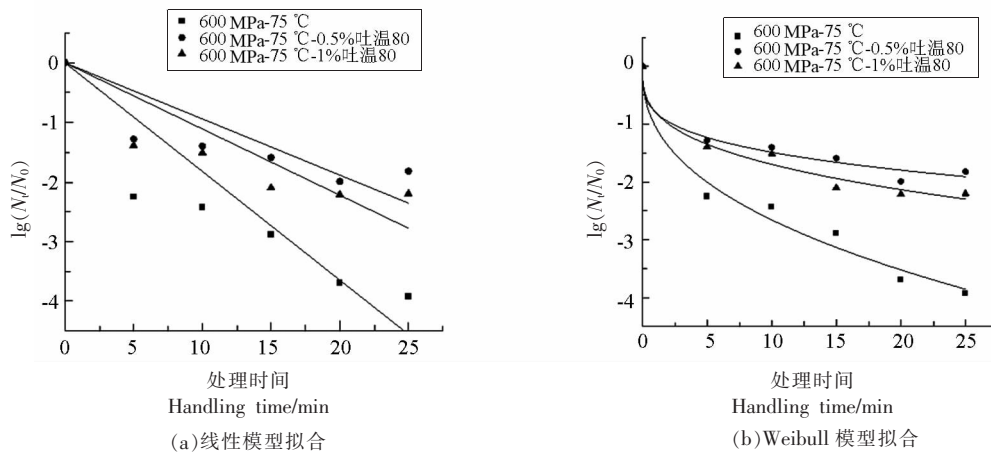


图 3 600 MPa,75 °C 结合不同质量分数的吐温 80 处理下枯草杆菌芽孢的致死曲线

Fig.3 Death curve of *Bacillus subtilis* under different mass fraction of tween 80 combined with 600 MPa, 75 °C treatment

2.3 HPTS 结合吐温 80 处理对芽孢的 DPA 泄漏影响

DPA(2,6-吡啶二羧酸)是细菌芽孢的重要物

质,在芽孢核内,DPA 与无水二价阳离子(如 Ca^{2+})形成复合物,提升了芽孢的热抗性。当芽孢萌发或结构完整性受到化学物质、热或高压的破坏时,

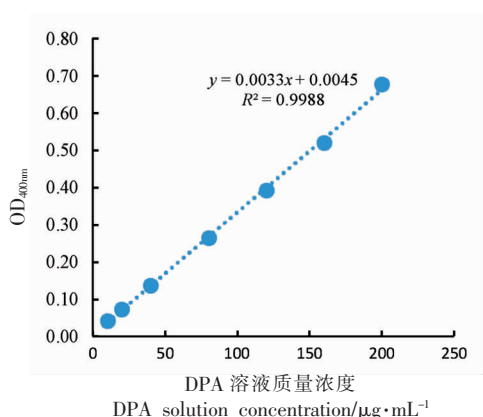


图 4 DPA 标准曲线

Fig.4 Standard curve of DPA

DPA 就会被释放出来^[24-26]。DPA 释放是孢子萌发的早期过程,会刺激孢子萌发,成为孢子萌发的重要评价指标。而 HPTS 可增加 DPA 的释放,刺激芽孢萌发,芽孢萌发后就丧失了对外界胁迫的抵抗

力^[27],进一步对芽孢内膜造成不可逆的损伤。因此,利用 DPA 的释放来评价芽孢内膜的受损情况。

如表 2 所示,随着温度压力的增加,DPA 释放显著增加($P<0.5$),表明高温、高压会使芽孢 DPA 迅速释放,促进芽孢萌发,对芽孢内膜具有很强的破坏作用。但加入吐温 80 处理后,与单独 HPTS 处理相比,DPA 释放显著降低($P<0.05$),说明吐温 80 溶液可降低 DPA 的释放。在 HPTS 结合吐温 80 处理过程中,芽孢的萌发机制不同,压力在 200 MPa 时,吐温 80 溶液首先抑制营养受体的激活,减少 DPA 释放,抑制芽孢萌发,削弱了 HPTS 对芽孢的灭活效应。当压力上升到 600 MPa 时,高温压力直接导致了 DPA 的释放,促进了芽孢的萌发,增加了 HPTS 对芽孢的灭活效果,但整体而言,吐温 80 溶液降低了 DPA 的释放,对芽孢内膜产生保护作用。

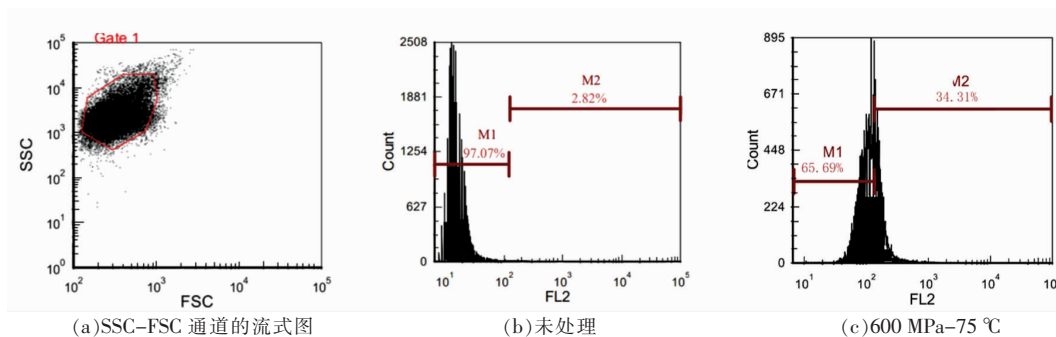
表 2 HPTS 结合不同质量分数的吐温 80 处理中芽孢 DPA 的释放量($\mu\text{g/mL}$)Table 2 DPA release of spores treated with different mass fraction of tween 80 and HPTS ($\mu\text{g/mL}$)

处理	200 MPa, 25 °C	200 MPa, 65 °C	200 MPa, 75 °C	600 MPa, 25 °C	600 MPa, 65 °C	600 MPa, 75 °C
对照	25.3 ± 0.003	36.52 ± 0.002	40.15 ± 0.003	52.87 ± 0.003	79.55 ± 0.004	82.57 ± 0.003
0.5%吐温 80	8.33 ± 0.001	11.97 ± 0.002	14.09 ± 0.001	16.52 ± 0.002	17.42 ± 0.002	20.45 ± 0.003
1%吐温 80	9.84 ± 0.002	16.52 ± 0.001	20.15 ± 0.002	19.24 ± 0.001	21.97 ± 0.001	24.70 ± 0.002
2%吐温 80	13.79 ± 0.002	17.12 ± 0.001	24.09 ± 0.001	22.27 ± 0.001	24.39 ± 0.002	27.42 ± 0.002

2.4 HPTS 结合吐温 80 处理对芽孢内膜通透性的影响

流式细胞技术以激光技术为基础,能够分析光源通过的细胞或颗粒的物理、化学特性。使用荧光染料标记微生物后,根据染料被激光照射后激发的荧光强度可计算特定细胞成分的含量和不同处理的变化,可用于测定芽孢的大小、折光性等形

态学指标和膜通透性、代谢活动等生理指标^[28-30]。PI 是一种核酸荧光染色剂,能够渗透失去完整性细胞的膜结构并与 DNA 结合^[31]。经 PI 染料标记,采用流式细胞技术研究微生物内膜通透性的变化已较为成熟^[32-33]。HPTS 结合吐温 80 处理后的芽孢内膜通透性变化见图 5。



(a)SSC-FSC 通道的流式图

(b)未处理

(c)600 MPa-75 °C

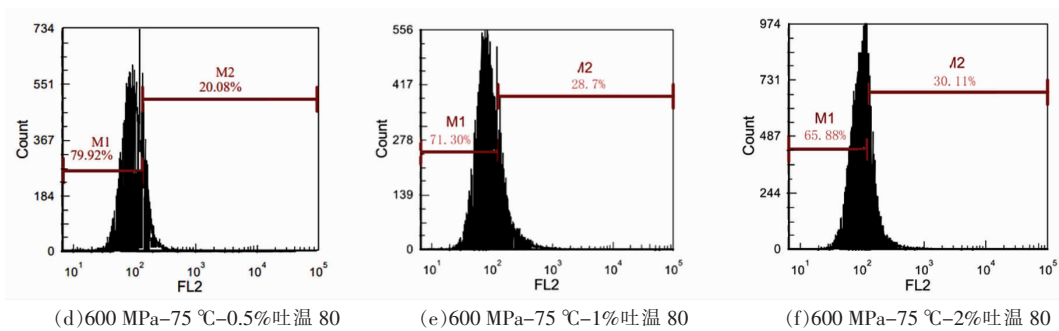


图5 600 MPa-75 °C时不同质量分数吐温 80 处理对枯草杆菌芽孢内膜通透性的影响

Fig.5 Effect of different mass fraction tween 80 treatment at 600 MPa-75 °C on inner membrane permeability of *Bacillus subtilis*

如图 5 所示,在 SSC-FSC 通道的流式图中圈选 PI 染料的荧光阳性区,并根据门的偏移情况分析处理后芽孢内膜的通透性变化。在 600 MPa-75 °C 时,不添加吐温 80 使阳性区域偏移值为 34.31%,随着吐温 80 质量分数的增加,依次减小至 20.08%,28.70%和 30.11%,表明本试验中加入吐温 80 质量分数后均能降低对芽孢内膜通透性的改变,其中,0.5%吐温 80 对芽孢内膜通透性保护效果最好。

2.5 枯草芽孢杆菌细胞膜酶活性的变化

如图 6 所示,HPTS 结合不同质量分数的吐温 80 处理后,单独 HPTS 处理, $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATP}$ 、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}-\text{ATP}$ 酶活性呈下降趋势,表明 HPTS 处理会使得枯草杆菌芽孢内的 ATP 酶失活,导致孢内外离子运输及能量供应失衡,进而使得孢内生理

代谢紊乱。当加入吐温 80 处理后,随着吐温 80 质量分数的提升, $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATP}$ 、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}-\text{ATP}$ 酶活显著增加($P>0.05$),说明吐温 80 会在一定程度上保护 ATP 酶活,使得部分 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATP}$ 、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}-\text{ATP}$ 酶能够正常工作,维持芽孢酶活性的平衡和稳定。

一般认为,温度和压力的胁迫均能导致 ATP 酶的活性降低,且温度为主导因素^[34]。即使在很高压下,一些酶仍能具有较高的构象稳定性,并保留固有活性,这与酶对压力的敏感性有关^[34-35],孙国龙等^[36]研究发现非离子表面活性剂对酶活性影响较小,甚至有激活作用;阴离子表面活性剂对酶活性影响大,主要起抑制作用。而吐温 80 是非离子表面活性剂,对酶具有激活效果,与该研究结论相一致^[36-37]。

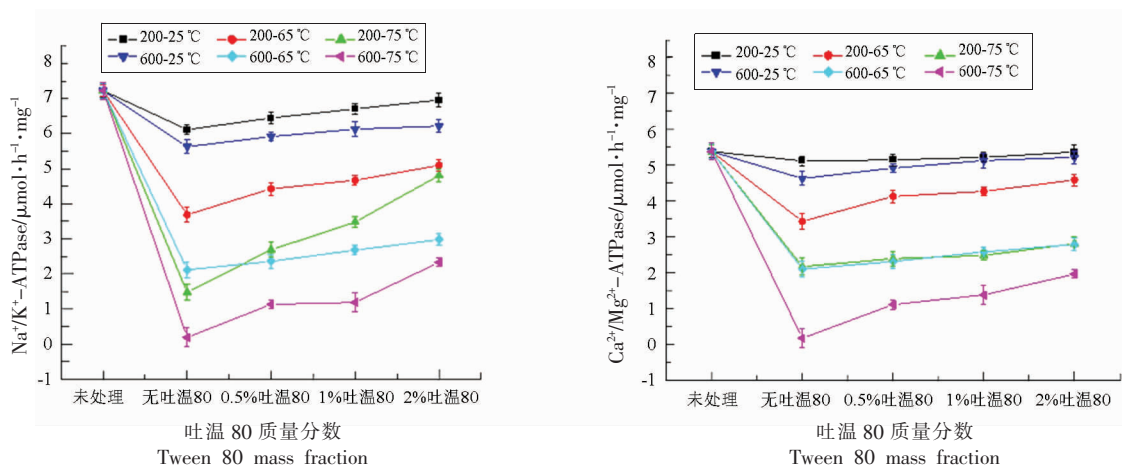


图6 不同质量分数的吐温 80 结合 HPTS 处理后芽孢内膜 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATP}$ 、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}-\text{ATP}$ 酶活的变化

Fig.6 Changes in $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATP}$, $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}-\text{ATP}$ of spore inner membrane treated with different mass fraction of tween 80 combined with HPTS

2.6 枯草杆菌芽孢酰胺 I 带 ($1\ 600\sim 1\ 700\ \text{cm}^{-1}$) 红外光谱拟合蛋白二级结构结果分析

位于 $1\ 600\sim 1\ 700\ \text{cm}^{-1}$ 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。 α 螺旋集中于 $1\ 650\sim 1\ 660\ \text{cm}^{-1}$, β 折叠集中于 $1\ 610\sim 1\ 640\ \text{cm}^{-1}$, β 转角集中于 $1\ 660\sim 1\ 670\ \text{cm}^{-1}$, 无规卷曲集中于 $1\ 640\sim 1\ 650\ \text{cm}^{-1}$ [38]。

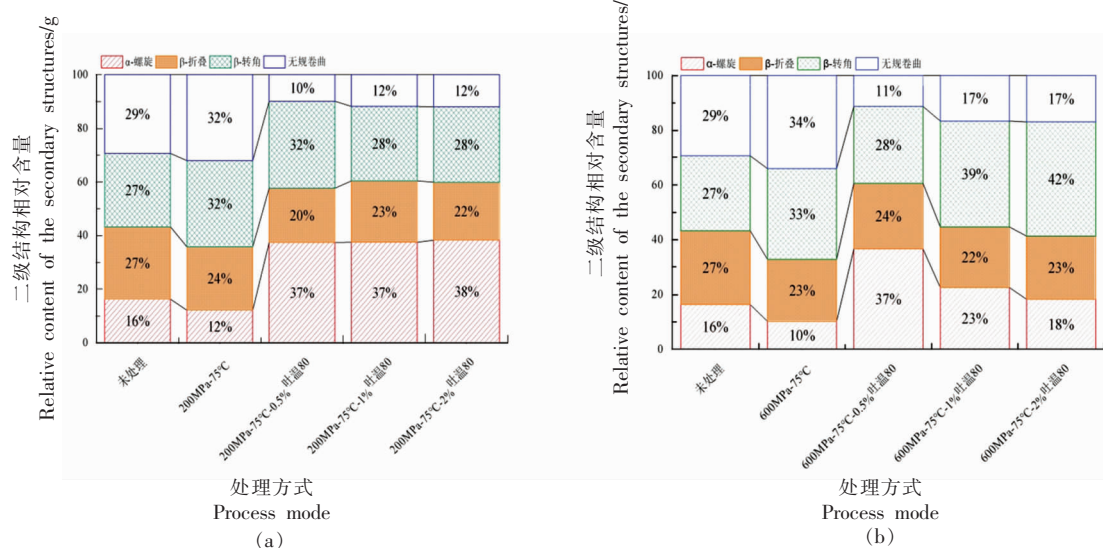


图 7 枯草杆菌芽孢蛋白质二级结构含量

Fig.7 Protein secondary structure content *Bacillus subtilis* spores

由图 7 可以看出,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。相比未处理的枯草杆菌芽孢,单独 HPTS 处理后, α -螺旋和 β -折叠均减少, β -转角和无规卷曲含量均增加,说明超高压处理后枯草杆菌芽孢从有序状态向无序状态转变。而加入吐温 80 处理后,与未处理样品相比,枯草杆菌芽孢 α -螺旋结构均增加, β -折叠减少, β -转角增加、无规卷曲含量减少,说明吐温 80 对蛋白 α -螺旋结构的稳定性具有一定的保护作用;同时,有效地降低了蛋白无规卷曲结构的含量,说明经过吐温 80 处理后能有效地维持蛋白二级结构的有序状态,使蛋白质稳定性增加,降低了 HPTS 对芽孢蛋白二级结构的影响。

3 结论

本文研究发现吐温 80 能够削弱 HPTS 对枯草芽孢杆菌的灭活效果,低压热(200 MPa, 75 °C)结合 0.5%吐温 80 对芽孢产生很好的保护作用。同时吐温 80 溶液能够有效地保护芽孢的内膜通透性,减少芽孢内容物 DPA 的释放,有助于激活

芽孢 ATP 酶的活性,另外吐温 80 还可以有效地维持芽孢蛋白质二级结构的稳定性,对芽孢产生保护作用,因此,乳化剂吐温 80 不利于高压灭菌技术,说明高压热灭菌技术对乳化食品的灭菌依旧需要进一步探索。

参 考 文 献

- [1] ZALAZAR A L, GLIEMMO M F, CAMPOS C A. Effect of stabilizers, oil level and structure on the growth of *Zygosaccharomyces bailii* and on physical stability of model systems simulating acid sauces[J]. Food Research International, 2016, 85(8): 200-208.
- [2] BROCKLEHURST T F, WILSON P. The role of lipids in controlling microbial growth[J]. Grasas Y Aceites, 2000, 51(1): 66-73.
- [3] MAO L, WANG D, LIU F, et al. Emulsion design for the delivery of β -carotene in complex food systems[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2017, 58(5):1-31.
- [4] NICOLAI B M, IMPE J F V, BAERDEMAEKER J

- D. Modelling of microbial growth during cold storage of agricultural products: A probabilistic approach[J]. *Acta Horticulturae*, 1996, 35(406): 341–350.
- [5] CHEN Y, RAY W K, HELM R F, et al. Levels of germination proteins in *Bacillus subtilis* dormant, superdormant, and germinating spores[J]. *Plos One*, 2014, 9(4): 1–8.
- [6] LÉONARD –AKKARI L, GUÉGAN S, COURAND F, et al. Dispersed phase volume fraction, weak acids and Tween 80 in a model emulsion: Effect on the germination and growth of *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores[J]. *Food Research International*, 2018, 109(7): 288–297.
- [7] 章中, 杨宏伟, 胡济美, 等. 化学物质辅助超高压处理对枯草杆菌芽孢的作用[J]. *中国食品学报*, 2015, 15(5): 47–53.
- ZHANG Z, YANG H W, HU J M, et al. Effect of *Bacillus subtilis* spores by high –pressure thermal sterilization assisted with Chemicals[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2015, 15(5): 47–53.
- [8] MINH H N T, DURAND A, LOISON P, et al. Effect of sporulation conditions on the resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat and high pressure[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 90(4): 9–17.
- [9] ZHANG Z, JIANG B, LIAO X, et al. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by combining high–pressure thermal sterilization and ethanol[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2012, 160(2): 99–104.
- [10] C, Clery –Barraud, A, et al. Combined effects of high hydrostatic pressure and temperature for inactivation of *Bacillus anthracis* spores[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(1): 635–637.
- [11] PINA PÉREZ M C, RODRIGO A D, SAUCEDO R D, et al. Pressure inactivation kinetics of *Enterobacter sakazakii* in infant formula milk[J]. *Journal of Food Protection*, 2007, 70(10): 2281–2289.
- [12] WANG B S, LI B S, HUANG J, et al. Inactivation kinetics of *Bacillus coagulans* spore by the combination of high hydrostatic pressure and moderate heat [J]. *Microbiology Bulletin*, 2008, 35(4): 633–638.
- [13] MD S I, AYAKA I, NORIYUKI I, et al. Inactivation of *Bacillus* spores by the combination of moderate heat and low hydrostatic pressure in ketchup and potato[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 107(2): 124–130.
- [14] DARYAEI H, BALASUBRAMANIAM V M, LEGAN J D. Kinetics of *Bacillus cereus* spore inactivation in cooked rice by combined pressure–heat treatment[J]. *Journal of Food Protection*, 2013, 76(4): 616.
- [15] MHO A, HE B, FB A, et al. Comparative study of five different methods of adjustment by the Weibull model to determine the most accurate method of analyzing annual variations of wind energy in Tetouan – Morocco [J]. *Procedia Manufacturing*, 2020, 46(1): 698–707.
- [16] BUZRUL S, ALPAS H, LARGETEAU A, et al. Modeling high pressure inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in whole milk[J]. *European Food Research and Technology*, 2008, 227(2): 443–448.
- [17] BUZRUL S, ALPAS H. Modeling the synergistic effect of high pressure and heat on inactivation kinetics of *Listeria innocua*: a preliminary study[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 238(1): 29–36.
- [18] MAJSV B. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, 74(1): 139–159.
- [19] 郭家俊, 申瑾, 陈翔, 等. 热结合乙醇对芽孢的杀灭效果及内膜通透性的影响[J]. *食品与生物技术学报*, 2021, 40(10): 34–38.
- GUO J J, SHEN J, CHEN X, et al. Effect of heat–bound ethanol on spore killing effect and inner membrane permeability [J]. *Journal of Food and Biotechnology*, 2021, 40(10): 34–38.
- [20] 卢福荣, 李杰, 邵悦, 等. 食品中菌落总数能力验证的结果分析与质量控制探讨[J]. *现代食品*, 2021, 4(16): 217–219.
- LU F R, LI J, SHAO Y, et al. Analysis of results and quality control of total colonies in food[J]. *Modern Food Products*, 2021, 4(16): 217–219.
- [21] LÉONARD –AKKARI L, GUÉGAN S, COURAND F, et al. Dispersed phase volume fraction, weak acids and tween 80 in a model emulsion: Effect on the germination and growth of *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores[J]. *Food Research International*, 2018, 109(8): 288–297.
- [22] KRSTA D, KU C, IAN T C, et al. Bacterial fatty acid synthesis: Effect of Tween 80 on antibiotic po-

- tency against *Streptococcus agalactiae* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Anti-infective Agents*, 2014, 12(1): 0-4.
- [23] NIELSEN C K, KJEMS J, MYGIND T, et al. Antimicrobial effect of emulsion-encapsulated isoeugenol against biofilms of food pathogens and *spoilage bacteria*[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 242: 7-12.
- [24] 张凤秋. 基于红外光谱研究细胞乙酰化及其对辐射损伤效应的影响[D]. 安徽: 中国科学技术大学, 2016, 1(1): 1-12.
- ZHANG F Q. Cell acetylation and its effect on radiation damage effects based on infrared spectroscopy[D]. Anhui: University of Science and Technology of China, 2016, 1(1): 1-12.
- [25] DENG J L, WEI Q, ZHANG M H, et al. Study of the effect of alcohol on single human red blood cells using near - infrared laser tweezers Raman spectroscopy[J]. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2010, 36(3): 257-261.
- [26] YANG D, YING Y. Applications of raman spectroscopy in agricultural products and food analysis: A review[J]. *Applied Spectroscopy Reviews*, 2011, 46(7): 539-560.
- [27] SETLOW P. Spores of *Bacillus subtilis*: Their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 101(3): 514-525.
- [28] ANTONIO B, LEONARDO P, MILENA S, et al. Effect of physical and chemical treatments on viability, sub-lethal injury, and release of cellular components from *Bacillus clausii* and *Bacillus coagulans* spores and cells[J]. *Foods*, 2020, 9(12): 1814.
- [29] CELIK S, OZKOK F, OZEL A E, et al. Synthesis, FT-IR and NMR characterization, antibacterial and antioxidant activities, and DNA docking analysis of a new vanillin-derived imine compound[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2021, 1236(8): 130288.
- [30] HE T, HUA J Q, CHEN R P, et al. Adsorption characteristics of methylene blue by a dye-degrading and extracellular polymeric substance -producing strain[J]. *Journal of Environmental Management*, 2021, 288(15): 112-446.
- [31] GEORGET E, SHOBHNA K W, REINEKE K, et al. In situ investigation of *Geobacillus stearothermophilus* spore germination and inactivation mechanisms under moderate high pressure[J]. *Food Microbiology*, 2014, 41(8): 8-18.
- [32] DUBIEL M, HSU C H, CHIEN C C, et al. Microbial iron respiration can protect steel from corrosion[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(3): 1440-1445.
- [33] 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]. *Biochimica Et Biophysica Acta Biomembranes*, 2011, 4(1187): 95-97.
- [34] 吴傲. 温-压协同处理对仙人掌有孢汉逊酵母的致死机理[D]. 北京: 北京林业大学, 2019.
- WU A. The lethal mechanism of temperature-pressure cooperative treatment[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2019.
- [35] OKUNO D, NISHIYAMA M, NOJI H, et al. Single-molecule analysis of the rotation of F1-ATPase under high hydrostatic pressure[J]. *Biophysical Journal*, 2013, 105(7): 1635-1642.
- [36] 孙国龙, 陈丽, 黄金, 等. 表面活性剂对酶活性的影响研究进展[J]. *西部皮革*, 2013, 35(10): 24-29.
- SUN G L, CHEN L, HUANG J, et al. Advances in investigating the effects of surfactant on enzymatic activity[J]. *Western Leather*, 2013, 35(10): 24-29.
- [37] YONEDA J S, RIGOS C F, CIANCAGLINI P. Addition of subunit γ , K^+ ions, and lipid restores the thermal stability of solubilized Na, K -ATPase [J]. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 2013, 530(2): 93-100.
- [38] BYLER D M, SUSI H. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra[J]. *Biopolymers*, 1986, 25(8): 469-487.

Studies on the Application of Emulsifier Tween 80 in High-pressure Thermal Sterilization Technique

Zhang Bianfei, Yang Jie, Bi Ke, Liu Yue, Xin Weishan, Zhang Panfeng, Zhang Zhong*
(College of Food Science and Engineering, Ningxia University, Yinchuan 750021)

Abstract The *Bacillus subtilis* spores were treated with High-pressure thermal sterilization combined with mass fraction of 0.5%, 1%, and 2% tween 80 on *Bacillus subtilis*. The effect of tween 80 solution treatment on the survival of spore colonies was determined by plate counting, The flow cytometry, colorimetric method, ATP enzyme kit, Fourier transform infrared spectroscopy was used to analyse the effect of tween 80 solution on spore inner membrane permeability, DPA (2,6-pyridinedicarboxylic acid) release, spore Na⁺/K⁺-ATP, Ca²⁺/Mg²⁺-ATP enzyme kit and stability of protein secondary structure. The results showed that tween 80 could weaken the inactivating effect of HPTS on *Bacillus subtilis* and exert a protective effect on spores. When the tween 80 mass fraction was 0.5%, combining the low pressure heat (200 MPa, 75 °C), the maximum survival of spores could reach 5.3 lg (CFU/mL). It was found that protection of the inner membrane permeability, DPA, ATP enzyme activity, and the secondary structural stability of the spore protein. Kinetic studies found that the spore sterilization effect was positively proportional to the treatment time, and the longer the treatment time, the stronger the spore inactivating effect. The sterilization process of HPTS combined with tween 80 complied with the Weibull model, and the parameter *b* and *n* (*n*<1) values of the Weibull model decreased after the addition of tween 80. As the treatment time continued, the temperature and pressure sensitive spores were quickly inactivated, while some super-deep dormant spores were survived.

Keywords tween 80; HPTS; spores; ATPase; protein secondary structure