

## HPTS 结合蛋清溶菌酶对枯草杆菌芽孢的灭活作用

辛伟山, 刘月, 李佳佳, 武思睿, 王旭娟, 王传发, 章中\*

(宁夏大学食品科学与工程学院 银川 750021)

**摘要** 本文研究了高压热杀菌技术(HPTS)结合蛋清溶菌酶处理对枯草杆菌芽孢的杀灭作用。采用 HPTS(200 MPa-25, 65, 75 °C)结合蛋清溶菌酶(0.05%, 0.1%, 0.3%)保压处理 20 min, 处理后测定枯草杆菌芽孢的失活量、蛋白质与核酸的泄漏量、电导率、细胞膜  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 活性变化、芽孢的形态结构变化、蛋白质二级结构稳定性变化、内膜通透性变化。结果表明, HPTS 结合溶菌酶对芽孢具有明显的协同杀灭作用, 200 MPa/75 °C 结合 0.3% 溶菌酶处理后, 芽孢存活浓度下降 3.91 lg (CFU/mL)。HPTS 结合溶菌酶处理后芽孢蛋白质、核酸泄漏量及上清液电导率都显著增加,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 活性显著降低, 芽孢蛋白质稳定性下降, 芽孢表面显示出极度的粗糙, 伴随着严重的塌陷破裂, 结构发生了明显变化。流式细胞术分析发现, 芽孢内膜的通透性显著增加。结论: HPTS 结合蛋清溶菌酶处理抑制了芽孢代谢途径中关键酶的活性, 同时破坏了枯草杆菌芽孢的芽孢壁、内膜等结构, 改变了芽孢的生理特性, 最终导致芽孢失活。

**关键词** HPTS; 蛋清溶菌酶; 杀菌; 芽孢; 细胞结构

**文章编号** 1009-7848(2024)03-0112-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.03.011

芽孢是细菌营养体在特殊条件下形成的休眠态, 对各种物理、化学杀菌处理有很强的抗性。休眠态芽孢的结构是这些抗性形成的主要原因。从外到内, 包括芽孢外壁、芽孢衣、芽孢外膜、皮层、生殖细胞壁、内膜和核心<sup>[1]</sup>。其中芽孢内膜的低渗透性, 对芽孢抵抗某些化学物质很重要, 因为它们限制了这些化学物质进入芽孢中心。由于杀菌强度不够, 因此在食品工业中常发生由芽孢引起的食品安全问题<sup>[2]</sup>。有证据表明, 70% 以上的食物中毒事件是由微生物, 特别是产芽孢菌造成的<sup>[3]</sup>。高抗性芽孢的杀灭是解决低酸性食品安全的一个关键问题<sup>[4]</sup>。

高压热杀菌技术(HPTS)通过压力和温度的联合处理, 可以在较短的时间内有效灭活芽孢<sup>[5]</sup>。相较于传统的热杀菌技术, HPTS 灭活芽孢所用温度低, 对食品品质的损害较小<sup>[6-7]</sup>。在一些国家, HPTS 正式被批准为传统巴氏杀菌的替代方案, 用于灭活细菌芽孢并生产耐储存的高质量食品<sup>[8]</sup>。

蛋清溶菌酶, 也称为胞壁酶或 N-乙酰胞壁水解酶, 是一种小的单体蛋白质, 通过其多肽链的 8 个半胱氨酸残基之间的 4 个二硫键来稳定<sup>[9]</sup>。蛋清

溶菌酶是一种具有抗菌活性的天然酶, 已被批准作为食品添加剂应用于食品工业中, 可灭活和抑制各种食品(如奶酪、肉类、水果、蔬菜和酒)中的微生物<sup>[10]</sup>。目前, 蛋清溶菌酶已广泛应用于食品杀菌、保鲜中, 然而 HPTS 结合蛋清溶菌酶灭活细菌芽孢及其杀菌机理的相关研究未见报道。本文探讨 HPTS 结合蛋清溶菌酶对枯草杆菌芽孢的影响, 为该方法在食品杀菌中的应用提供理论参考。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与试剂

枯草芽孢杆菌(编号 As 1.433), 中国普通微生物菌种保藏管理中心; 营养琼脂, 广东环凯微生物科技有限公司; 硫酸锰(分析纯), 上海易恩化学技术有限公司; 蛋清溶菌酶, 北京索莱宝科技有限公司; TSA-YE 培养基, 南通飞宇生物科技有限公司; 碘化丙啶(PI), 南通飞宇生物科技有限公司; 超微量  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶活性试剂盒, 南京建成生物工程研究所有限公司; 溴化钾, 苏州滢科生物科技有限公司。

#### 1.2 仪器与设备

LC-EC-3T 型电导率仪, 上海力辰邦西仪器科技有限公司; TG16-W 型台式高速离心机, 湘仪离心机仪器有限公司; 超高压设备(HPP -600 MPa-5L), 包头科发高压科技有限公司; HH-6 型

收稿日期: 2023-03-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(32260633, 31760474)

第一作者: 辛伟山, 男, 硕士生

通信作者: 章中 E-mail: zhangzhong@126.com

电子恒温水浴锅,上海力辰邦西仪器科技有限公司;EnSpire 荧光酶标仪,PerkinElmer 公司;流式细胞仪,日本 SYSMEX 株式会社;ZEISS EVO18 钨丝灯扫描电子显微镜,德国卡尔蔡司;Spectrum Two 型傅里叶变换红外光谱仪,美国 PerkinElmer 公司。

### 1.3 试验方法

**1.3.1 枯草杆菌芽孢的培养与菌悬液制备** 枯草杆菌芽孢的培养与菌悬液制备参照 Rao 等<sup>[11]</sup>的方法并略作修改。在无菌操作条件下,将活化 3 代的枯草杆菌芽孢划线接种至斜面培养基,36 °C 下培养 7 d。用无菌去离子水振荡洗涤斜面培养基上的芽孢,过筛收集到离心管里。收集的芽孢悬浮液离心 15 min (4 °C、9 000 r/min),倒掉上清液,重复 3 次。最后调节芽孢浓度约为  $1.5 \times 10^9$  CFU/mL,4 °C 保存。试验前对芽孢悬浮液进行 80 °C 水浴加热 15 min 处理,消除芽孢中残存的营养体。

**1.3.2 HPTS 结合溶菌酶处理** 将 30 mL 枯草杆菌芽孢悬浮液加入到离心管中,离心 15 min (4 °C、9 000 r/min),弃上清液,加入配制好的同等体积溶菌酶溶液(质量浓度:0.5,1,3 g/L),利用涡旋振荡使其充分混匀。制备好的样品转入无菌聚乙烯真空袋封装,待机器预热到指定条件后将其放入加压室;在电脑中分别输入 3 个处理方案(200 MPa-25 °C、200 MPa-65 °C、200 MPa-75 °C),时间处理设定为 20 min。处理完毕后立即进行冰水浴冷却,随即放入 4 °C 冰箱保存。

**1.3.3 活菌计数** 平板计数参照 Meng 等<sup>[12]</sup>的方法并略作修改。将处理前后的芽孢悬浮液进行梯度稀释,并培养于胰蛋白胨大豆琼脂培养基上,待琼脂冷却凝固,在 37 °C 下有氧培养 24~48 h 后,统计存活芽孢的数量。计数时以每个稀释度的 3 个平板上的平均值计算。

**1.3.4 测定紫外吸收物质泄漏量** 取 5 mL 处理后的样品离心 15 min (4 °C、9 000 r/min),收集上清液,利用紫外可见分光光度计分别测定 260,280 nm 处的 OD 值,每个处理设置 3 个平行,以未经任何处理的菌悬液作为对照组,测定前用蒸馏水校正仪器。

**1.3.5 测定电导率** 按照 1.3.4 节中的步骤收集

芽孢上清液,上清液为工作液,以去离子水为空白对照,测定电导率,测定前用无菌去离子水校正仪器,每个处理设置 3 个平行,未处理的菌悬液为对照组。

**1.3.6 测定 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶活力** HPTS 结合溶菌酶处理后芽孢 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶活力的测定参照 Pei 等<sup>[13]</sup>的方法并略做修改,样品离心 15 min (4 °C、9 000 r/min),收集上清液,用 BCA 蛋白浓度试剂盒测定蛋白浓度,严格按照 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶试剂盒的说明进行酶活力的测定。

**1.3.7 扫描电镜观察形态** 参照 Lv 等<sup>[14]</sup>的方法并略做修改。取 10 mL 处理后的样品离心 15 min (4 °C、9 000 r/min),弃上清液,加入无菌蒸馏水对菌体反复洗涤数次,确保没有残留的溶菌酶,置于冷冻干燥机中 5 h 得到样品,离子溅射喷金,使用扫描电镜进行观察并采集图像。

**1.3.8 测定芽孢内膜通透性** 参照 Mathys 等<sup>[15]</sup>的方法并略作修改。将芽孢悬浮液的浓度稀释为  $10^7$  CFU/mL,取 5 mL 芽孢悬浮液进行 PI 单染,向其中加入 0.75 μL 的 PI 染色液(30 mmol/L),室温下避光孵育 15 min。染色过程结束后,离心去上清液,加入无菌水洗涤 2 次,洗去游离的染色剂。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。

**1.3.9 傅里叶红外光谱检测芽孢** 将处理前后的芽孢悬浮液离心洗涤后进行真空冷冻干燥,将样品与干燥溴化钾粉末研磨混匀后,用压片机在 25 MPa 下压制成片,选用溴化钾压片作为空白对照,置于红外光谱仪上,置于红外光谱仪上,于 400~4 000 cm<sup>-1</sup> 范围内进行扫描,扫描次数为 32 次,分辨率为 4 cm<sup>-1</sup>。使用 Origin 202 软件进行作图。使用 Peakfit 软件进行曲线拟合分析,对酰胺 I 带蛋白质二级结构进行定量估计,确定 α-螺旋、β-折叠、β-转角和无规卷曲结构的百分比。

### 1.4 统计分析

使用 IBM SPSS 19 软件进行数据分析,采用 ANOVA 进行单因素方差分析及 Duncan's 多重比较检验( $P < 0.05$ ),使用 Origin 2021 进行绘图。试验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, $P < 0.05$  为显著差异的标准。

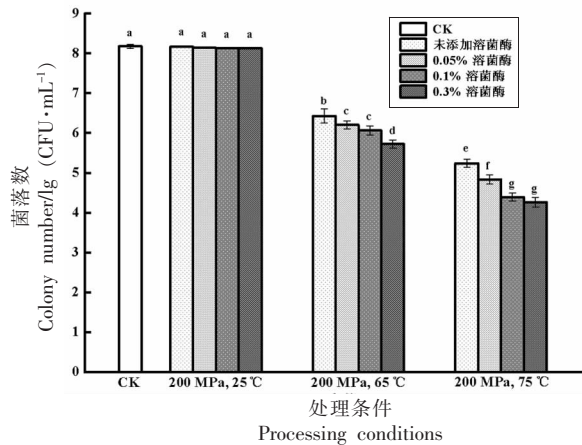
## 2 结果与讨论

### 2.1 HPTS 结合蛋清溶菌酶处理对枯草杆菌芽孢存活率的影响

图 1 为 HPTS(200 MPa-25, 65, 75 °C, 保压时间 20 min) 结合溶菌酶(0.05%, 0.1%, 0.3%) 处理下枯草杆菌芽孢的存活情况。处理前计数为  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL, 25 °C 时, HPTS 结合溶菌酶对芽孢基本没有灭活作用( $P > 0.05$ )。处理条件为 200 MPa-65、75 °C 时, 芽孢存活浓度分别下降 1.75, 2.94 lg (CFU/mL), 相同压力条件下温度的升高, HPTS 对芽孢灭活数量显著增加( $P < 0.05$ )。200 MPa-65、75 °C 结合 0.05% 溶菌酶处理后, 芽孢存活浓度分别下降 1.97, 3.34 lg (CFU/mL); 随着溶菌酶添加量变大, 200 MPa-65、75 °C 结合 0.3% 溶菌酶处理后芽孢存活浓度分别下降 2.47, 3.91 lg (CFU/mL), 溶菌酶浓度越高, 对芽孢的杀灭效果越好。Tribst 等<sup>[16]</sup>提出, HPTS 能够诱导溶菌酶抗微生物活性的增加, 杀菌能力进一步提高。因此, 溶菌酶结合 HPTS 处理对杀灭枯草杆菌芽孢有协同作用。

### 2.2 HPTS 结合蛋清溶菌酶处理对芽孢紫外吸收物质泄漏量的影响

通过测定样品在 260 nm/280 nm 处的紫外吸收强度来确定芽孢的核酸、蛋白质泄漏量。如图 2 所示, 芽孢经过 200 MPa-25, 65, 75 °C 处理后,  $OD_{260nm}$  分别为 0.08, 0.24, 0.31,  $OD_{280nm}$  分别为 0.05, 0.21, 0.28, 压力相同条件下随着温度升高,



注: 不同的字母代表处理之间存在显著差异( $P < 0.05$ )。

图 1 HPTS 结合溶菌酶处理对枯草杆菌孢子生存浓度的影响

Fig.1 Effect of HPTS combining with lysozyme treatment on spore survival concentration of *Bacillus subtilis*

芽孢核酸和蛋白质泄漏量显著增加 ( $P < 0.05$ ), 这一结果与 Meng 等<sup>[12]</sup>的研究结果是一致的。Zhang 等<sup>[17]</sup>的研究表明, HPTS 处理会导致芽孢内膜破损, 内膜的通透性变大, 核酸、蛋白质等物质会漏出芽孢。添加溶菌酶联合处理后, 芽孢核酸和蛋白质泄漏量进一步增大, 200 MPa-65、75 °C 结合 0.05% 溶菌酶处理后,  $OD_{260nm}$  分别为 0.1, 0.27, 0.32,  $OD_{280nm}$  分别为 0.06, 0.23, 0.31; 溶菌酶添加量为 0.3% 时, 芽孢核酸和蛋白质泄漏量达到最高

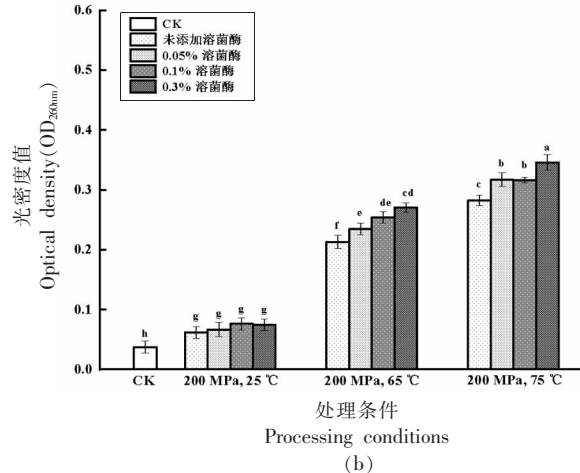
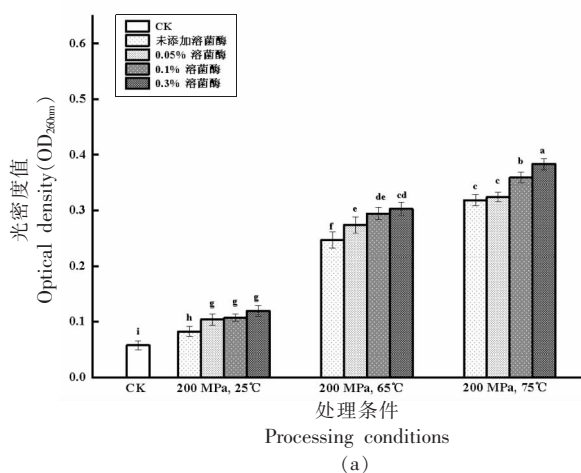


图 2 HPTS 结合溶菌酶处理对枯草杆菌芽孢紫外吸收物质泄漏量的影响

Fig.2 Effect of HPTS combining with lysozyme treatment on the leakage of UV-absorbing material from *Bacillus subtilis* spores



值,  $OD_{260nm}$  分别为 0.12, 0.3, 0.38,  $OD_{280nm}$  分别为 0.07, 0.27, 0.32。HPTS 结合溶菌酶处理使芽孢中更多的紫外吸收物质泄漏到细胞外, 芽孢内膜通透性进一步增大。黄小鸣<sup>[18]</sup>发现, 单增李斯特菌经过 200 MPa 结合 6 mg/mL 溶菌酶处理后, 紫外吸收物质的泄漏量比单独 200 MPa 处理增加了 5.9%。Gänzle 等<sup>[19]</sup>的研究表明, 压力诱导会导致细胞膜通透性增大, 同时压力诱导使微生物细胞膜对细菌素更加敏感。

### 2.3 HPTS 结合蛋清溶菌酶处理对芽孢上清液电导率的影响

枯草杆菌芽孢的内膜遭到破坏后, 孢内带电离子流出会导致上清液的导电性增加。因此, 通过菌液电导率的变化可以来分析细胞膜的通透性变化<sup>[20]</sup>。

由图 3 可知, 经 HPTS 结合溶菌酶处理后电导率整体呈上升趋势。与未处理样品的电导率相比, 200 MPa 条件下, 温度由 25 °C 升高到 75 °C, 上清液电导率分别提高 0.9, 4.9, 7.9 mS/cm, 表明 HPTS 处理可以增加细胞膜的通透性, 且电导率随着温度和压力的升高而增加。在适度升高的温度下, 膜磷脂双分子层的结构更无序、更松散和更薄, 这可能使芽孢对超高压更敏感<sup>[21]</sup>。在 200 MPa-75 °C 下, 随着溶菌酶浓度的升高, 电导率也进一步上升, 上清液电导率分别升高至 16.6, 17.6, 17.4 mS/cm。结果表明, 随着处理强度的增加, 细胞膜通透性增大, 导致细胞内  $Na^+$  和  $K^+$  等带电离子的泄漏。上述结果与黄小鸣<sup>[18]</sup>的研究结果一致, 超高压与溶菌酶协同处理使细菌细胞内带电离子泄漏量增加。

### 2.4 HPTS 结合蛋清溶菌酶处理对芽孢 $Na^+/K^+$ -ATPase 活力的影响

$Na^+/K^+$ -ATPase 是存在于质膜上的载体蛋白

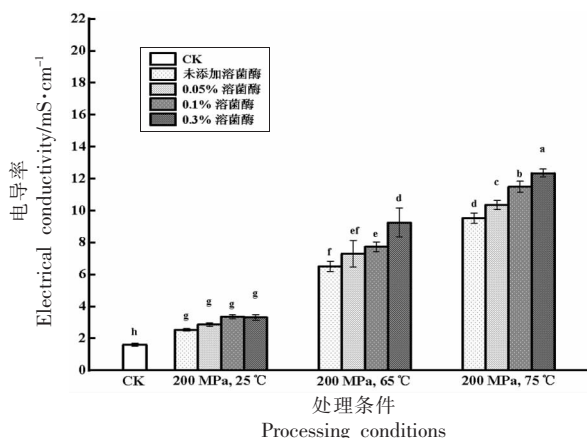


图 3 HPTS 结合溶菌酶处理对枯草杆菌芽孢上清液电导率的影响

Fig.3 Effect of HPTS combining with lysozyme treatment on the electrical conductivity of *Bacillus subtilis* spores supernatant

质, 也被称为钠钾泵, 对于细胞的生长代谢有着重要的作用<sup>[22]</sup>。

如表 1 所示, 在处理压力为 200 MPa, 温度由 25 °C 升高至 75 °C, 酶活力分别下降至 17.1, 12.4, 10.4 U/mg。之前的研究表明, 压力会损害酶活性以及生理和生化反应, Ma 等<sup>[23]</sup>发现大肠杆菌 O157:H7 经过 HP(400 MPa)处理 5 min 后, ATPase 的相对活性为未处理样品的 43.90%; Kato 等<sup>[24]</sup>的研究表明, 100~220 MPa 的压力处理下, 膜结合的  $Na^+K^+$ -ATPase 活性受损的机理是由于脂质相变、亚基之间的分离界面以及跨膜蛋白和脂质双层的构象变化引起。在本研究中我们发现, 温度协同压力处理时, 随着温度的升高, ATPase 的活力进一步减弱, 这可能是由温度升高导致 ATPase 发生了变性, 导致 ATPase 活性降低。Sui 等<sup>[25]</sup>的研究同样证实了这一点, 他们的研究发现酵母菌的 ATP 酶在 45 °C 热处理后呈下降趋势。HPTS 结合溶菌酶处理

表 1 HPTS 结合溶菌酶处理对枯草杆菌芽孢  $Na^+/K^+$ -ATP 酶活力的影响

Table 1 Effect of HPTS combining with lysozyme treatment on the  $Na^+/K^+$ -ATPase activity of *Bacillus subtilis* spores

条件	酶活/ $U \cdot mg^{-1} \cdot prot$			
	不添加	0.05% 溶菌酶	0.1% 溶菌酶	0.3% 溶菌酶
空白对照	18.48 ± 0.151	-	-	-
200 MPa-25 °C	17.18 ± 0.488	16.79 ± 0.192	16.37 ± 0.505	16.18 ± 0.655
200 MPa-65 °C	12.42 ± 0.277	12.14 ± 0.301	11.61 ± 0.452	11.16 ± 0.440
200 MPa-75 °C	10.48 ± 0.386	9.52 ± 0.350	9.14 ± 0.733	8.60 ± 0.223

后,Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP酶活力进一步下降,与对照组样品相比,处理条件为200 MPa-75℃时,溶菌酶添加浓度由0.05%增加至0.3%,Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP酶活力分别下降0.96,1.34,1.88 U/mg。溶菌酶增加了芽孢对HPTS处理的敏感性,进而使Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP酶发生不可逆的失活,芽孢的能量代谢受到影响,从而导致细胞死亡。

## 2.5 扫描电镜观察不同处理对芽孢形态的影响

采用扫描电子显微镜观察处理前后芽孢形态的变化情况。枯草杆菌芽孢正常观测的形态饱满<sup>[26]</sup>。扫描电镜结果如图4所示。其中图4a为未处理的枯草杆菌芽孢,表现为完整的短杆,其外观圆滑。而经200 MPa-75℃处理的样品(图4b)表现出明显差异,大部分芽孢的具有凹凸不平的粗糙表面,出现了许多褶皱并伴有塌陷,表明HPTS处理对芽孢结构产生了严重的损伤。Black等<sup>[27]</sup>的研

究也证实了HPTS处理能够破坏枯草杆菌芽孢结构的完整性。经过200 MPa/75℃结合0.3%溶菌酶处理的芽孢(图4c)形态变化更为显著,芽孢表面显示出极度的粗糙,伴随着严重的塌陷破裂,可见溶菌酶溶解了芽孢壁肽聚糖层。溶菌酶的添加增强了HPTS对芽孢结构的破坏作用。溶菌酶对于革兰氏阳性菌细胞壁肽聚糖层的水解具有催化作用,使得细胞壁发生破裂受损<sup>[28]</sup>。主要作用机理在于可通过断开肽聚糖的N-乙酰-胞壁酸和N-乙酰-氨基葡萄糖之间的 $\beta(1-4)$ 键来裂解细菌的细胞壁,导致细胞壁破裂从而使细菌解体<sup>[29]</sup>。Zhao等<sup>[30]</sup>的研究也证实了溶菌酶可以使芽孢形态发生显著改变。HPTS结合溶菌酶处理对芽孢的结构造成了严重损伤,导致芽孢对外界物理、化学因素的抗性减弱,最终导致芽被灭活。

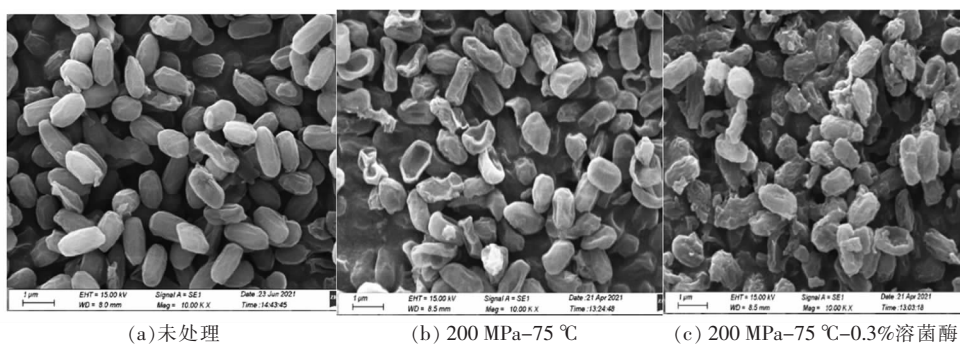


图4 HPTS结合0.3%溶菌酶处理下枯草杆菌芽孢扫描电镜图

Fig.4 Scanning electron micrograph of *Bacillus subtilis* spores under HPTS combining with 0.3% lysozyme treatment

## 2.6 HPTS结合蛋清溶菌酶处理对芽孢内膜通透性的影响

PI是一种常用的DNA染色剂,能够穿过受损的细胞膜并与DNA结合,PI染色结合流式细胞术检测细胞膜通透性变化是一项比较可靠的技术<sup>[31-32]</sup>。根据前面的试验结果,选择对照组、溶菌酶添加量为0.3%的处理组进行内膜通透性检测。

HPTS结合溶菌酶处理后芽孢内膜通透性变化见图5,未处理的芽孢经PI染色后其阳性区域比例为1.84%。处理温度为25℃时,阳性区域比例变化都较小。当温度达到65,75℃时,HPTS处理组阳性区域比例分别为21.82%,37.01%,表明在一定压力基础上,温度能显著提升芽孢内膜的通透性。Meng等<sup>[12]</sup>发现当压力为100 MPa,温度从

40℃升高到60℃时,枯草芽孢杆菌的细胞膜通透性提高19%。Zhang等<sup>[17]</sup>的研究也表明HPTS处理可以对芽孢内膜造成破坏,导致内膜通透性变大。与对照组样品相比,200 MPa/65℃、200 MPa/75℃分别添加0.3%溶菌酶处理后,阳性区域比例分别增加至38.12%,48.11%,表明HPTS结合溶菌酶处理对芽孢的内膜造成了更严重的损伤,这也与紫外吸收物质泄漏量结果是一致的。溶菌酶可以水解肽聚糖的 $\beta-1,4$ -糖苷键,使得芽孢壁破裂,细菌细胞壁机械强度降低,芽孢内膜间接承受温压胁迫,导致芽孢内膜通透性增大<sup>[33]</sup>。同时,温度的适度升高,提高了溶菌酶的疏水性,使得溶菌酶对细菌细胞膜损伤能力进一步增强<sup>[9,34]</sup>。因此,HPTS结合溶菌酶处理使芽孢内膜的通透性显著增加,

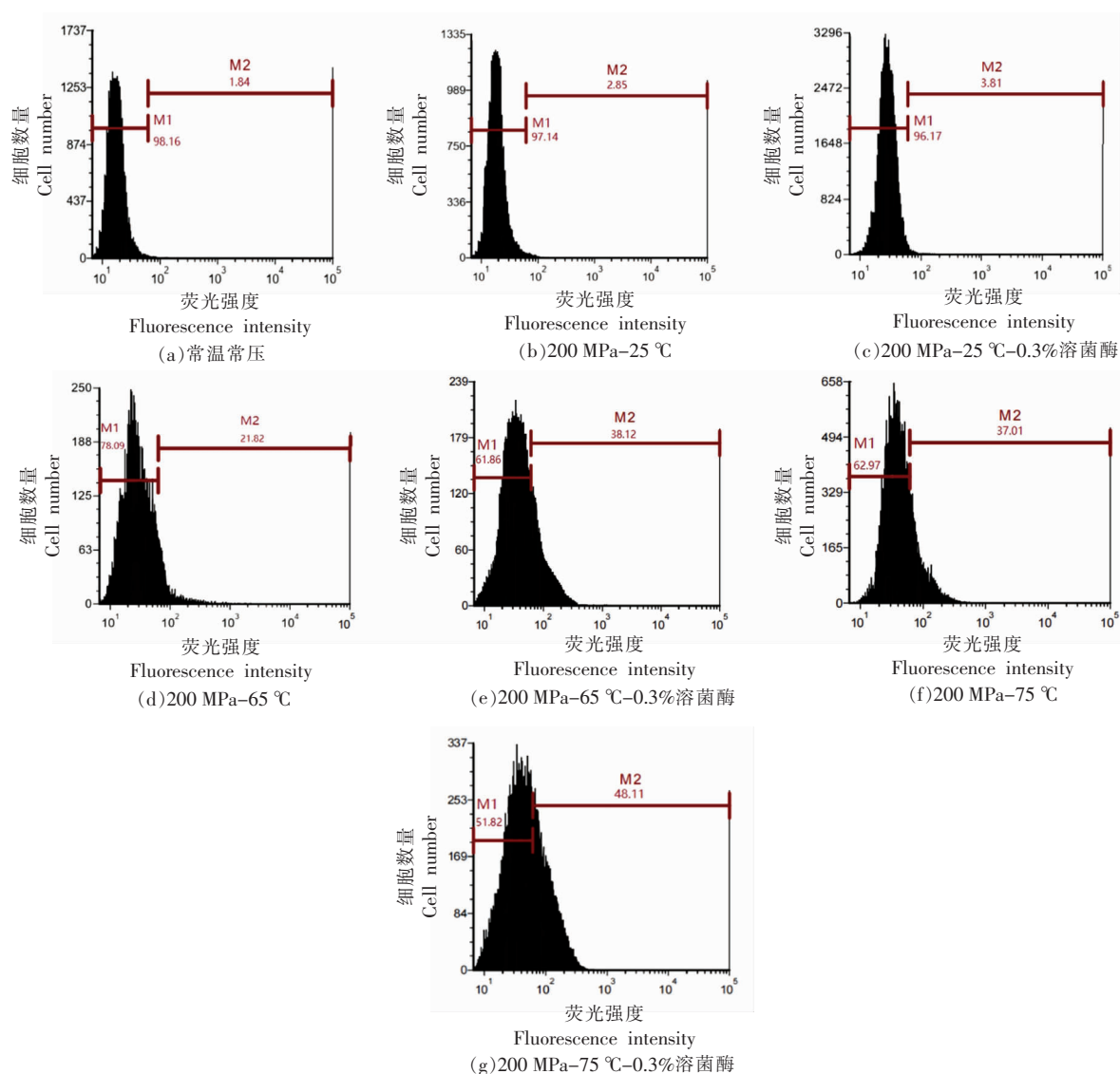


图 5 HPTS 结合 0.3%溶菌酶处理对枯草芽孢杆菌芽孢内膜通透性的影响

Fig.5 Effect of HPTS combining with 0.3% lysozyme treatment on the permeability of *Bacillus subtilis* spore inner membrane

内膜发生严重损伤,最终导致芽孢的灭活。

## 2.7 芽孢酰胺 I 带 ( $1600\sim 1700\text{ cm}^{-1}$ ) 红外光谱拟合蛋白二级结构结果分析的影响

位于  $1600\sim 1700\text{ cm}^{-1}$  范围的酰胺 I 带与蛋白质骨架象类型相关,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  $1650\sim 1660\text{ cm}^{-1}$ , $\beta$  折叠集中于  $1610\sim 1640\text{ cm}^{-1}$ , $\beta$  转角集中于  $1660\sim 1670\text{ cm}^{-1}$ , 无规卷曲集中于  $1640\sim 1650\text{ cm}^{-1}$ [35]。为了定量测定 HPTS 结合溶菌酶处理下芽孢蛋白质的二级结构变化,对酰胺 I 区域进行了曲线拟合分析。

HPTS 处理后芽孢蛋白质二级结构变化情况如表 2 所示。未处理的枯草杆菌芽孢酰胺 I 带含有 39%的  $\alpha$ -螺旋、32%的  $\beta$ -折叠、18%的  $\beta$ -转角、11%的无规卷曲结构。随着温度和压力的升高,表现出  $\alpha$ -螺旋  $\beta$ -折叠含量降低, $\beta$ -转角与无规卷曲含量增加。研究表明,压力可能通过破坏非共价键(如静电作用或疏水相互作用)改变蛋白质的空间结构,蛋白质活性中心的不可逆变化可能导致其功能丧失[36]。Subramanian[37]等的研究发现压力与温度联合处理导致蛋白质酰胺 I 带发生了显著改变,芽孢蛋白质变性。上述结果表明 HPTS

处理导致芽孢蛋白质发生变性,其二级结构从有序状态转变为无序状态,蛋白质稳定性下降。HPTS结合溶菌酶处理后芽孢蛋白质二级结构变化情况如表3所示。与HPTS处理的样品相比,HPTS结合溶菌酶处理后无规卷曲呈现上升趋势,

而 $\alpha$ -螺旋与 $\beta$ -折叠含量呈现下降趋势,二级结构从有序状态转变为无序状态,HPTS结合溶菌酶处理进一步降低了芽孢蛋白质的稳定性,芽孢抗性降低,最终导致芽孢被灭活。

表2 HPTS对枯草杆菌芽孢二级结构构象单元组成的影响

Table 2 Effect of HPTS on the composition of the conformational unit of the secondary structure of *Bacillus subtilis* spores

处理	蛋白质二级结构/%			
	$\alpha$ -螺旋	$\beta$ -折叠	$\beta$ -转角	无规卷曲
常温常压	39	32	18	11
200 MPa-25 °C	38	31	15	16
200 MPa-65 °C	36	23	21	20
200 MPa-75 °C	33	21	23	25

表3 HPTS结合溶菌酶处理对芽孢二级结构构象单元组成的影响

Table 3 Effect of HPTS combining with lysozyme treatment on the composition of conformational units of the secondary structure of *Bacillus subtilis* spores

处理	溶菌酶/%	蛋白质二级结构/%			
		$\alpha$ -螺旋	$\beta$ -折叠	$\beta$ -转角	无规卷曲
200 MPa-25 °C	0.05	37	29	16	18
	0.1	36	26	18	20
	0.3	35	26	19	20
200 MPa-65 °C	0.05	34	23	21	22
	0.1	33	22	23	22
	0.3	33	21	22	24
200 MPa-75 °C	0.05	32	20	23	25
	0.1	30	20	24	26
	0.3	30	19	23	28

### 3 结论

本文发现HPTS结合溶菌酶显著降低了枯草杆菌芽孢的存活率。HPTS与溶菌酶的联合处理导致芽孢蛋白质和核酸的释放增加,芽孢样品上清液中电导率显著增大,芽孢 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP酶的活性降低。扫描电镜结果表明,联合处理后芽孢原有的正常结构发生显著改变;流式细胞术检测发现联合处理使芽孢内膜的通透性显著增加,内膜发生了严重损伤。红外光谱分析发现,联合处理降低了芽孢蛋白质的稳定性。HPTS结合溶菌酶对芽孢的灭活作用是多方面的,本文的研究结果为推动该技术在食品杀菌中的应用提供了理论参考。

### 参 考 文 献

- [1] 饶雷. 高压二氧化碳结合温度对枯草芽孢杆菌芽孢的杀灭效果与机制[D]. 北京: 中国农业大学, 2017. RAO L. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by combining treatment of high pressure  $\text{CO}_2$  and temperature [D]. Beijing: China Agricultural University, 2017.
- [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]. International Dairy Journal, 2018, 85(10): 159-168.
- [3] ISHAQ A R, MANZOOR M, HUSSAIN A, et al. Prospect of microbial food borne diseases in Pak-



- istan: A review[J]. *Brazilian Journal of Biology*, 2021, 81(4): 940–953.
- [4] 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: Sterilization with emerging technologies[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2018, 17(3): 532–555.
- [5] LUONG T S V, MOIR C, CHANDRY P S, et al. Combined high pressure and heat treatment effectively disintegrates spore membranes and inactivates *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in acidic fruit juice beverage[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2020, 66(8): 102523.
- [6] 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: HPTS and UHPH for food sterilization[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2018, 17(3): 646–662.
- [7] 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*, Oxford: Elsevier Sci Ltd, 2016, 38(6): 65–75.
- [8] CHIOZZI V, AGRIOPOULOU S, VARZAKAS T. Advances, applications, and comparison of thermal (pasteurization, sterilization, and aseptic packaging) against non-thermal (ultrasounds, UV radiation, ozonation, high hydrostatic pressure) technologies in food processing[J]. *Applied Sciences, Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 2022, 12(4): 2202.
- [9] WU T T, JIANG Q Q, WU D, et al. What is new in lysozyme research and its application in food industry? A review[J]. *Food Chemistry*, 2019, 274(5): 698–709.
- [10] IRKIN R, ESMER O K. Novel food packaging systems with natural antimicrobial agents[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2015, 52(10): 6095–6111.
- [11] RAO L, WANG Y T, CHEN F, et al. High pressure CO<sub>2</sub> reduces the wet heat resistance of *Bacillus subtilis* spores by perturbing the inner membrane[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, Oxford: Elsevier Sci Ltd, 2020, 60(2): 102291.
- [12] 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(4): 59–66.
- [13] PEI Q H, LI Y, GE X Z, et al. Multipath effects of berberine on peach Brown rot fungus *Monilinia fructicola*[J]. *Crop Protection*, 2019, 116(2): 92–100.
- [14] LV R, ZOU M, CHANTAPAKUL T, et al. Effect of ultrasonication and thermal and pressure treatments, individually and combined, on inactivation of *Bacillus cereus* spores[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, New York: Springer, 2019, 103(5): 2329–2338.
- [15] MATHYS A, CHAPMAN B, BULL M, et al. Flow cytometric assessment of *Bacillus* spore response to high pressure and heat[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2007, 8(4): 519–527.
- [16] TRIBST A A L, RIBEIRO L R, CRISTIANINI M. Comparison of the effects of high pressure homogenization and high pressure processing on the enzyme activity and antimicrobial profile of lysozyme[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2017, 43(5): 60–67.
- [17] ZHANG Z, JIANG B, LIAO X J, 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.
- [18] 黄小鸣. 超高压协同溶菌酶、nisin 处理对单增李斯特菌的影响及其在鲜虾仁杀菌中的应用[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2013.
- HUANG X M. Effect of ultra high pressure treatment on listeria monocytogenes and application in shrimp meat sterilization [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2013.
- [19] GÄNZLE M, LIU Y. Mechanisms of pressure-mediated cell death and injury in *Escherichia coli*: from fundamentals to food applications[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6(2): 00599.
- [20] PENG L, YANG S, CHENG Y J, et al. Antifungal activity and action mode of pinocembrin from propo-



- lis against *Penicillium italicum*[J]. Food Science and Biotechnology, 2012, 21(6): 1533–1539.
- [21] PODOLAK R, WHITMAN D, BLACK D G. Factors affecting microbial inactivation during high pressure processing in juices and beverages: A review[J]. Journal of Food Protection, 2020, 83(9): 1561–1575.
- [22] BENITO DE LA PUEBLA H, GIACALONE D, COOPER A, et al. Role of SpoIVA ATPase motifs during *Clostridioides difficile* sporulation[J]. Journal of Bacteriology, 2020, 202(21): e00387.
- [23] MA J J, WANG H H, YU L L, et al. Dynamic self-recovery of injured *Escherichia coli* O157:H7 induced by high pressure processing[J]. LWT, 2019, 113(15): 108308.
- [24] KATO M, HAYASHI R, TSUDA T, et al. High pressure-induced changes of biological membrane: Study on the membrane-bound Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase as a model system[J]. European Journal of Biochemistry, 2002, 269(1): 110–118.
- [25] SUI Y, LIU J. Effect of glucose on thermotolerance and biocontrol efficacy of the antagonistic yeast *Pichia guilliermondii*[J]. Biological Control, 2014, 74(7): 59–64.
- [26] ZHANG H, CHEN X, SONG L, et al. The mechanism by which *Enteromorpha linza* polysaccharide promotes *Bacillus subtilis* growth and nitrate removal[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 209(16): 840–849.
- [27] BLACK E P, LINTON M, MCCALL R D, et al. The combined effects of high pressure and nisin on germination and inactivation of *Bacillus* spores in milk[J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 105(1): 78–87.
- [28] VILCACUNDO R, MÉNDEZ P, REYES W, et al. Antibacterial activity of hen egg white lysozyme denatured by thermal and chemical treatments[J]. Scientia Pharmaceutica, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2018, 86(4): 48.
- [29] KHORSHIDIAN N, KHANNIRI E, KOUSHKI M R, et al. An overview of antimicrobial activity of lysozyme and its functionality in cheese[J]. Frontiers in Nutrition, Lausanne: Frontiers Media Sa, 2022, 9(2): 833618.
- [30] ZHAO J, KRISHNA V, MOUDGIL B, et al. Evaluation of endospore purification methods applied to *Bacillus cereus*[J]. Separation and Purification Technology, 2008, 61(3): 341–347.
- [31] DÍAZ M, HERRERO M, GARCÍA L A, et al. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses[J]. Biochemical Engineering Journal, 2010, 48(3): 385–407.
- [32] KIM H T, CHOI H J, KIM K H. Flow cytometric analysis of *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* inactivated with supercritical carbon dioxide[J]. Journal of Microbiological Methods, 2009, 78(2): 155–160.
- [33] GÁLVEZ-IRIQUI A C, PLASCENCIA-JATOMEA M, BAUTISTA-BAÑOS S. Lysozymes: characteristics, mechanism of action and technological applications on the control of pathogenic microorganisms[J]. Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology, 2020, 38(3): 360–383.
- [34] IBRAHIM H R, MATSUZAKI T, AOKI T. Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function[J]. FEBS Letters, 2001, 506(1): 27–32.
- [35] BALTACIOGLU H, BAYINDIRLI A, SEVERCAN F. Secondary structure and conformational change of mushroom polyphenol oxidase during thermosonication treatment by using FTIR spectroscopy[J]. Food Chemistry, 2017, 214(1): 507–514.
- [36] SILVA J L, OLIVEIRA A C, VIEIRA T C R G, et al. High-pressure chemical biology and biotechnology[J]. Chemical Reviews, American Chemical Society, 2014, 114(14): 7239–7267.
- [37] SUBRAMANIAN A, AHN J, BALASUBRAMANIAM V M, et al. Monitoring biochemical changes in bacterial spore during thermal and pressure-assisted thermal processing using FT-IR spectroscopy[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(22): 9311–9317.

## Inactivation of High-pressure Thermal Sterilization Combining with Egg White Lysozyme on *Bacillus subtilis* Spores

Xin Weishan, Liu Yue, Li Jiajia, Wu Sirui, Wang Xujuan, Wang Chuanfa, Zhang Zhong\*  
(College of Food Science and Engineering, Ningxia University, Yinchuan 750021)

**Abstract** This study aimed to investigate the inactivation effect of HPTS combining with egg white lysozyme on the spores of *Bacillus subtilis*. The spores were treated with pressure 200 MPa at 25, 65 °C and 75 °C, and egg white lysozyme at 0.05%, 0.1% and 0.3%. After treatment, the inactivation rate of *Bacillus subtilis* spores, leakage of nucleic acid and protein, the change in the cell membrane ATPase activity, the changes in inner membrane permeability of spores and the damage on protein of the spores were determined. The results showed that HPTS and egg white lysozyme synergistically inactivated the spores, and the survival concentration of spores decreased by 3.91 lg (CFU/mL) after 200 MPa/75 °C combining with 0.3% lysozyme treatment. HPTS combining with lysozyme treatment significantly increased the protein and nucleic acid leakage and conductivity of the spores, significantly decreased the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity, decreased the stability of the budding spore proteins, and significant increases in the permeability of the inner membrane of the spores. In summary, HPTS combining with egg white lysozyme treatment inhibited the activity of key enzymes in the spore metabolic pathway, while disrupting the spore wall, inner membrane and other structures of *Bacillus subtilis* budding spores, changed the physiological properties of spores, and eventually led to spore inactivation.

**Keywords** high-pressure thermal sterilization; egg white lysozyme; sterilization; spores; cell structure