

高压热杀菌结合氯化钠对芽孢的影响

刘焱畅, 王梦泽, 刘民安, 刘敦华, 陈翔, 章中*
(宁夏大学食品科学与工程学院 银川 750021)

摘要 腌制食品中可能含有芽孢类致病菌和腐败菌,采用高压热杀菌处理(HPTS)可杀灭这些芽孢,而腌制食品中的氯化钠可能会提高其杀菌效果。本研究高压热杀菌(600 MPa、75 °C)结合氯化钠(15%、25%、饱和氯化钠溶液)对枯草杆菌芽孢的杀菌效果。测定芽孢的 2,6-吡啶啉酸(DPA)泄漏率和芽孢内膜损伤情况。采用傅里叶变换红外光谱(FTIR)分析芽孢的内膜、蛋白质二级结构和核酸稳定性的变化。结果表明,600 MPa、75 °C、15%氯化钠联合处理对枯草杆菌芽孢的灭活效果最好[5.43 lg(CFU/mL)],此条件下芽孢的 DPA 泄漏率为 92%。HPTS 结合 15%氯化钠对芽孢内膜、蛋白质二级结构和核酸稳定性的损伤最大。而在 600 MPa、75 °C 结合质量分数 25%和饱和氯化钠条件下,芽孢的杀灭量约[3.48 lg(CFU/mL)]和 [3.08 lg(CFU/mL)],DPA 的泄漏率分别为 82%和 63%。与 15%氯化钠相比,该条件处理的芽孢内膜通透性减少,芽孢蛋白二级结构中的 α -螺旋比率显著回升,蛋白质二级结构更为有序。结论:质量分数 25%和饱和氯化钠意外保护了枯草杆菌芽孢,减少 HPTS 处理对芽孢内膜、蛋白质和核酸的损伤。

关键词 氯化钠; 高压热杀菌; 枯草杆菌; 傅里叶变换红外光谱; 芽孢

文章编号 1009-7848(2024)12-0256-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.12.023

细菌芽孢有极强的杀菌抗性,会造成食品腐败和食源性疾病^[1]。杀灭芽孢是食品杀菌的关键^[2],需要寻求更有效的芽孢灭菌方法。芽孢表现出较强的耐杀菌性,其结构是影响这种抗性的关键因素之一^[3]。芽孢结构可分为 7 个层,从外到内依次为芽孢外壁、芽孢衣、芽孢外膜、芽孢皮层、芽孢细胞壁、芽孢内膜和核心^[4]。芽孢外壁和芽孢衣起阻挡化学物质侵害的作用,位于芽孢的最外层。接下来的芽孢皮层保护芽孢免受高温损害。在芽孢的内部,芽孢内膜与营养体的细胞膜由磷脂双分子层构成,位于芽孢皮层之下。由于芽孢内膜的高度不通透性,因此芽孢核心水分含量很低,对热和化学物质有极强的抗性。

2,6-吡啶二羧酸(DPA)是一种独特的物质,仅存在于原核生物细胞壁上,占据芽孢干质量的 5%~15%^[5-6]。DPA 还可与蛋白质或其它生物分子相互作用形成复合物,主要功能是防止蛋白质的变性^[6]。

高压热杀菌(HPTS)是一种将高压和高温相结合的杀菌方法,其工作原理是通过将食品置于高压容器中,然后在高温条件下施加高压,以迅速

杀灭食品中的微生物,包括最难杀灭的芽孢^[7],常用的高压范围 300~800 MPa,而温度通常在 60~100 °C 之间,这使得高压热杀菌具有杀菌速度快,杀菌范围广,操作简便和不会影响食品的质地和口感的优点。对于含有潜在芽孢类致病菌和腐败菌的腌制食品,可考虑采用 HPTS 技术,以确保食品的安全和质量。

氯化钠(NaCl)是一种很好的食品调味料,它具有一定的杀菌和抑菌作用,且随着氯化钠浓度的提高,杀菌作用增强。Hutton 等^[8]发现,在培养基中添加 NaCl,经热处理的芽孢的菌落总数减少。无论其它条件如何(pH 值、温度),2%NaCl 都能杀死一定数量的芽孢。腌制食品中含有大量氯化钠,可以改变细菌细胞膜的通透性^[9],从而产生一定的杀菌和抑菌效果^[10]。

傅里叶变换红外光谱(FTIR)技术,是一种高效、快速且便捷的分析方法^[11],可同时检测多种化合物的变化情况^[12]。本研究高压热杀菌(600 MPa、75 °C)结合氯化钠(15%、25%、饱和氯化钠溶液)对枯草杆菌芽孢的杀菌效果。通过流式细胞术和傅里叶变换红外光谱分析氯化钠结合 HPTS 对枯草杆菌芽孢的内膜、蛋白质和核酸的影响,为 HPTS 技术在腌制食品中的应用提供参考。

收稿日期: 2023-12-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(32260633,31760474)

第一作者: 刘焱畅,女,硕士生

通信作者: 章中 E-mail: zhangzhong99@126.com

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 编号 As 1.433, 中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGM-CC); 营养琼脂, 北京奥博星生物公司; 硫酸锰 (分析纯), 天津市大茂化学试剂厂; 胰酪胨大豆酵母浸膏琼脂 (TSA-YE) 培养基, 北京索莱宝科技有限公司; 氯化钠, 北京索莱宝科技有限公司; 甲醇 (色谱纯), 默克生物技术有限公司; 磷酸二氢钠 (分析纯), 天津市福晨化学试剂厂; DPA (2,6-吡啶二羧酸), 99%, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司。碘化吡啶 (PI), 西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司; 溴化钾 (分析纯), 上海广诺化学科技有限公司。

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; DSX-280B 型高压灭菌锅, 上海申安医疗器械厂; HPP-600 MPa/5L 超高压灭菌装置, 山西三水河科技股份有限公司; 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; 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, 珀金埃尔默股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 枯草杆菌芽孢悬液的制备 采用枯草芽孢杆菌菌株 As 1.433, 根据 Fan 等^[13]的方法进行一些修改。将枯草芽孢杆菌活化 (3 代以上) 后, 接种于已经灭菌的促芽孢生长锰盐营养琼脂培养基中。接种后, 将试管放于恒温培养箱中 (37 °C) 培养 1 周。用无菌蒸馏水洗涤、离心, 去除上清液后合并菌液, 并重复上述步骤进行 3 次。用紫外分光光度计调整芽孢浓度约为 1.5×10^9 CFU/mL, 90 d 内使用并储存在 4 °C 下。使用时, 将芽孢浓度至 10^8 CFU/mL ($OD_{600nm}=1.0$), 30 d 内使用完毕。

1.3.2 HPTS 结合 NaCl 处理枯草杆菌芽孢悬液

试验前将聚四氟乙烯离心管放入 121 °C 的高压灭菌锅中, 灭菌后吸取 30 mL 芽孢悬浮液 (4 °C 下保存 6 h) 至离心管, 离心后倒掉上清液, 加入 30 mL 质量分数分别为 15%、25%、饱和的 NaCl 溶液并搅拌均匀, 转移至无菌聚乙烯塑封袋中, 热封

后, 待处理。在 HPTS 处理仓内, 设条件 20 min, 600 MPa, 处理温度为 25 °C 和 75 °C。进行各项指标测定。

1.3.3 枯草杆菌芽孢的平板计数 根据 Zhang 等^[14]的试验方法, 记录存活的芽孢数。依照《食品安全国家标准 食品微生物学检验菌落总数测定》(GB 4789.2-2016)^[15]对比结果, 计算菌落总数。

1.3.4 枯草杆菌芽孢悬液中 DPA 含量的测定 取离心 (9 000 r/min、15 min) 后上清液 2 mL, 通过 0.22 μm 水相滤膜进行预处理, 以便选用高效液相色谱法继续检测。根据相关文献^[16]稍作修改, 检测波长设置为 272 nm, DPA (2,6-吡啶二羧酸) 的保留时间约为 4 min。

1.3.5 流式细胞法测定芽孢内膜通透性 将枯草杆菌芽孢菌液离心 (9 000 r/min、15 min), 取 2 mL 加入 0.75 μL 的 20 μmol 碘化吡啶 (PI) 染色剂, 并在室温下避光处理 15 min。使用流式细胞仪分别检测前向散射光 (FSC)、侧向散射光 (SSC) 以及荧光通道 FL2。在激发光 488 nm 的条件下, 碘化吡啶标记的细胞在 615 nm 处发出红色荧光, 并收集数据。

1.3.6 FTIR 光谱分析 FTIR 光谱分析如 Nag 等^[17]所述。校正频谱波段到酰胺 I 波段 $1\ 600^{-1} \sim 1\ 700\ \text{cm}^{-1}$, 并进行了二阶导数, 观察峰形和位移并比较峰面积大小, 计算了枯草芽孢杆菌芽孢蛋白各二级结构的含量。采用 Origin 2019 分析了 $3\ 300 \sim 2\ 800\ \text{cm}^{-1}$ 脂质带, $1\ 700 \sim 1\ 600\ \text{cm}^{-1}$ 蛋白带和 $1\ 300 \sim 900\ \text{cm}^{-1}$ 红外核酸带。

1.3.7 统计分析 每组试验均重复进行 3 次。采用 Origin 2018 和 SPSS 24 软件进行统计学分析, 采用 Excel 2019 计算数据, 以 $P < 0.05$ 为显著性差异的标准。

2 结果和分析

2.1 HPTS 结合 NaCl 处理对枯草芽孢杆菌芽孢的影响

如图 1 所示, 在 25 °C 下 600 MPa 作用 20 min 时, 含 15%、25% 和饱和氯化钠的芽孢存活数 (分别为 7.95, 7.91 和 7.95 lg (CFU/mL)) 没有差异, 与无氯化钠相比, 对芽孢几乎没有灭活作用。但当处理温度为 75 °C 时, 芽孢失活率随着氯化钠浓度的

变化而变化。在 600 MPa、75 °C 和 15% 氯化钠处理 20 min 后,芽孢的灭活量达到了最大值 [5.54 lg (CFU/mL)]。而 25% 和饱和氯化钠则有效地削弱了 HPTS 对芽孢灭活作用。Zhang 等^[14]研究了 HPTS 和乙醇联合处理对枯草芽孢杆菌芽孢失活的影响。低浓度的乙醇可以增强 HPTS 对芽孢的杀菌效果,而高浓度的乙醇杀菌效果不如低浓度的乙醇。这是因为高浓度乙醇可能显著抑制了水解酶的活性,进而阻碍了芽孢皮层的水解过程,使得芽孢能够保持对高温和高压的抵抗力。这与本文的现象一致,也是一个反常的现象。而 Liu 等^[18]研究表明,枯草杆菌芽孢在 550 MPa、25 °C、65 °C 和 75 °C 的高温条件下分别用 0.1% 和 0.3% 的 ϵ -PL 处理后,结果发现在 550 MPa、75 °C 结合 0.3% 的 ϵ -PL 对芽孢灭活作用最好,HPTS 和 ϵ -PL 协同作用降低了芽孢存活数量,增加了芽孢悬液中细胞内成分的释放。氯化钠浓度变化对 HPTS 处理下芽孢灭活的影响趋势与 ϵ -聚赖氨酸不一致。

2.2 HPTS 结合 NaCl 对芽孢 DPA 泄漏的影响

如图 2 所示,在 600 MPa、25 °C 处理下,随着氯化钠浓度的增加,DPA 的释放量不断减少,且释

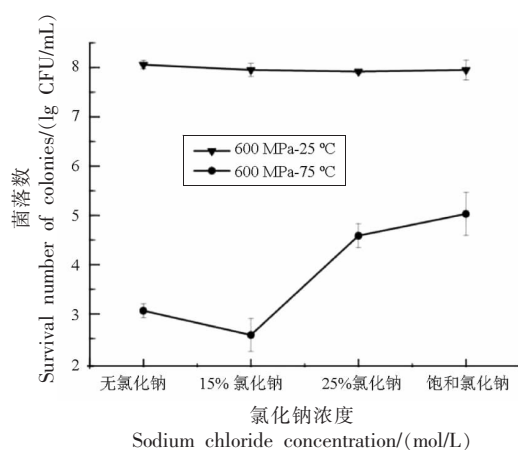


图 1 不同浓度的 HPTS 结合 NaCl 的芽孢灭活作用
Fig.1 Spore inactivation of different concentrations of HPTS combined with sodium chloride

2.3 HPTS 结合 NaCl 处理对芽孢内膜通透性的影响

为了进一步探究这一特殊现象,采用流式细胞仪来检测芽孢内膜的受损情况。碘化吡啶(PI)是可用于细胞核染色和荧光检测等领域的化学试

剂,能够穿透受损的细胞膜并与 DNA 结合^[21]。通过使用 PI 染料标记,受损的芽孢在流式细胞仪检测时会发射红色荧光,而红色荧光的强度则反映了芽孢内膜的受损程度^[22]。经过观察图 3,发现在 600 MPa-75 °C 的条件下,添加不同浓度的氯化钠

放量相对较低,说明高压处理下对芽孢内膜的损伤随着氯化钠浓度的增加而不断减少。在 600 MPa、25 °C 处理下,氯化钠浓度的越高,DPA 释放量越大,变化趋势不大,但总体呈下降趋势,说明与不添加氯化钠相比,600 MPa、25 °C 结合氯化钠可以降低 DPA 的释放量。在 600 MPa、75 °C 处理下,氯化钠浓度的变化,DPA 释放量随之变化,15% 质量分数的氯化钠,DPA 释放量达到最大,此时的泄漏率为 91.9%。然而,随着氯化钠浓度进一步升高,DPA 的释放量不断显著降低。DPA 的释放与芽孢核心的水化及芽孢的杀菌抗性直接相关。图 2 中的 DPA 释放结果与图 1 的杀菌效果是一致的。

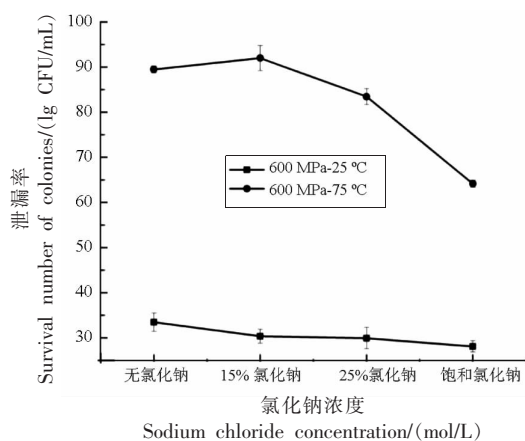


图 2 用 HPTS 和 NaCl 处理的枯草芽孢杆菌芽孢的 DPA 泄漏率

Fig.2 DPA leakage rate of *Bacillus subtilis* spores treated with HPTS and sodium chloride

处理后,芽孢内膜的通透性发生了明显的变化。具体而言,不添加氯化钠时,阳性区域偏移值为 20.4%;这说明在 600 MPa-75 °C 条件下,添加 15%氯化钠时,通过检测芽孢的荧光标记来检测芽孢内膜,观察到阳性区域偏移值达到了最高值 (57.0%),说明此时芽孢受损程度最大,内膜通透性变化最为明显。综上,600 MPa-75 °C 条件下,添

加 15%氯化钠对芽孢内膜结构变化程度大于 25%和饱和氯化钠,这与菌落计数结果相符。此外,Mathys 等^[23]指出 HPTS 处理会损伤芽孢的内膜的结构。然而,氯化钠与 HPTS 结合也会对芽孢的内膜造成不可逆的损伤,并导致 DPA 的释放,DPA 的释放与杀菌效果密切相关^[24]。

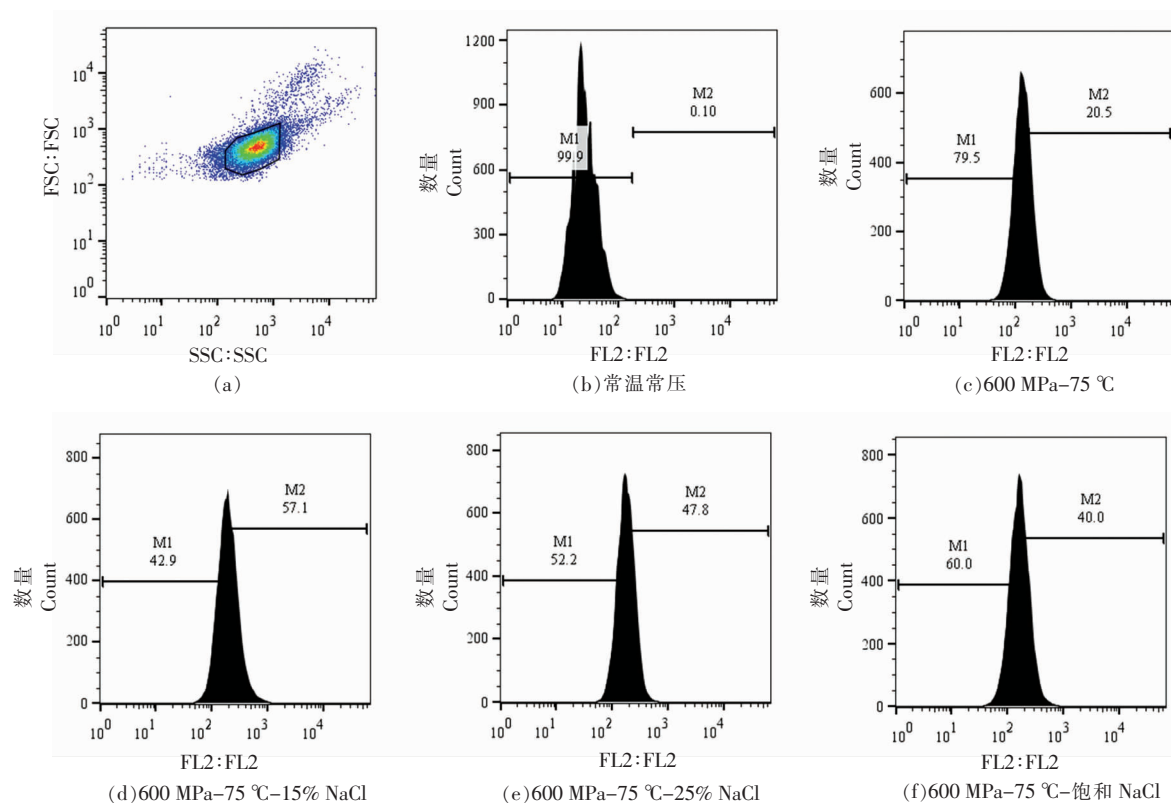


图 3 HPTS 结合不同浓度 NaCl 处理对枯草芽孢杆菌内膜通透性的影响

Fig.3 Effects of HPTS combined with different concentrations of NaCl on the endometrial permeability of *Bacillus subtilis*

2.4 HPTS 结合 NaCl 对枯草杆菌芽孢内膜磷脂、蛋白质和核酸的红外光谱的影响

2.4.1 傅里叶变换红外光谱图

近年来,FTIR 在微生物学领域得到广泛应用。因为其能够综合检测微生物关键物质和关键结构的变化,可用于研究杀菌领域。通过检测杀菌处理后关键物质吸收峰位置和强度的变化,来揭示杀菌处理对关键物质和关键结构的损伤作用。章中等^[25]对高压热结合酸对枯草芽孢杆菌的杀菌作用进行了研究,并采用傅里叶变换红外光谱法对芽孢成分进行了分析。结果表明,当 pH 值降低至 1 时,HPTS (550 MPa-75 °C) 结合酸对芽孢的杀灭作用显著增强,

导致芽孢数量最多减少了 6.25 个数量级 CFU/mL;同时,蛋白质的二级结构发生变化、核酸物质发生变性。

如图 4 所示,不同的处理条件对枯草杆菌芽孢的红外光谱产生了明显的影响,吸收峰的强度发生了多样化的变化。15%氯化钠结合 HPTS(600 MPa-75 °C)处理组的吸收峰的振动强度高于其它组。但总体峰形基本接近,从图中很难分析出特征峰位置变化情况。为了更好的监测枯草杆菌芽孢的红外光谱特征峰的变化,选择对傅里叶变换红外光谱图二阶求导。这样处理有助于提高特征峰的辨识度,使其变化更加清晰可见,从而更好地了

解样品的特性和变化。

2.4.2 HPTS 结合 NaCl 处理后枯草杆菌芽孢红外光谱二阶导数图 (3 000~2 800 cm^{-1}) 如图 5 所示, HPTS 结合氯化钠处理前后枯草杆菌芽孢在 3 000~2 800 cm^{-1} 的二阶导数红外光谱图。在 600 MPa 和 75 $^{\circ}\text{C}$ 的 15% 氯化钠中处理 20 min 后, 达到最强吸收峰。Wang 等^[26]研究发现细菌在 3 000~2 800 cm^{-1} 区域的变化, 表明细胞膜可能由于脂肪酸中的 C-H 拉伸振动而受到破坏, 导致内膜形态结构的改变。第 1 个吸收峰位于 2 927~2 916 cm^{-1} 处, 对应于细胞膜脂肪酸- CH_2 官能团的反对称伸缩振动^[27]。- CH_2 吸收峰的位移表明细胞膜中 R- CH_2 - CH_2 -R' 的堆积属性和双层磷脂分子层的规则性和无规则性^[28]。经 HPTS 处理后, 吸收峰位置偏移是因为脂肪酸酰基链“融化”或达到高度不规则构象^[29]。随着氯化钠浓度的增加达到饱和, 所对应的- CH_2 吸收峰位置发生了改变, 并且 HPTS 结合 15% 的氯化钠比结合 25% 氯化钠位移明显。第 2 个吸收峰位于 2 855~2 849 cm^{-1} 处, 它代表了特定细胞膜官能团脂肪酸- CH_3 的对称伸缩振动。结

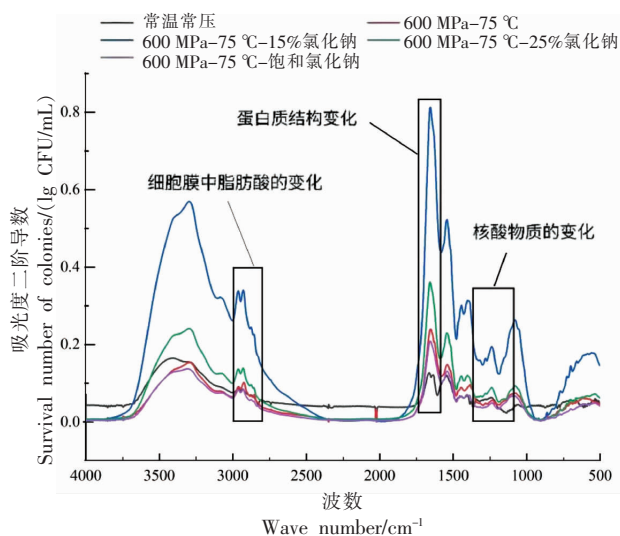


图 4 HPTS 结合 NaCl 对芽孢傅里叶变换红外光谱图的影响

Fig.4 Effect of HPTS combined with sodium chloride on Fourier transform infrared spectra of spores

2.4.3 HPTS 结合 NaCl 处理后枯草杆菌芽孢红外光谱二阶导数图 (1 300~950 cm^{-1}) 在 1 300~950 cm^{-1} 处的傅里叶变换红外光谱反映 DNA 碳骨架

果表明, 经 HPTS 和氯化钠处理后, 波峰位置基本没有变化, 600 MPa、75 $^{\circ}\text{C}$ 结合 15% 氯化钠处理下, 与其它处理组相比, 吸收峰的强度达到最大。两个特征吸收峰均表明, 15% 氯化钠处理后, 脂肪酸的甲基和亚甲基特征官能团的振动强度最高, 枯草杆菌芽孢内膜结构变化最显著。600 MPa、75 $^{\circ}\text{C}$ 结合 15% 氯化钠处理下, 芽孢内膜主要发生- CH_2 的反对称振动, 导致枯草杆菌芽孢内膜的磷脂脂质分子疏水尾链混乱度增大, 从而破坏芽孢内膜的结构, 而 25% 和饱和氯化钠却有利于保持官能团- CH_2 - CH_3 的稳定性并削弱了 HPTS 处理对芽孢内膜的损伤。高瑀琰等^[19]研究了 HPTS 结合聚 ϵ -赖氨酸对枯草杆菌芽孢的影响, 在 550 MPa、75 $^{\circ}\text{C}$ 下, 与未添加 ϵ -聚赖氨酸相比, 添加 0.1% 的 ϵ -聚赖氨酸处理后, 吸收峰向大波数方向移动, 随着 ϵ -聚赖氨酸的添加量增加到 0.3%, 吸收峰的位移和芽孢内膜损伤更明显。氯化钠浓度变化对 HPTS 处理下芽孢内膜损伤的影响趋势与 ϵ -聚赖氨酸不一致。

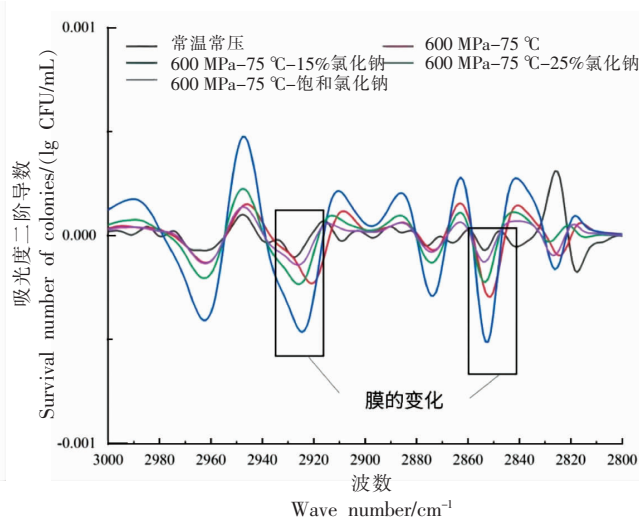


图 5 HPTS 结合 NaCl 对芽孢内膜傅里叶二阶导数光谱图的影响

Fig.5 Effect of HPTS combined with sodium chloride on second-order Fourier derivative spectrogram of endomycospora

的振动特征^[30]。1 080 cm^{-1} 附近的吸收峰表示 P=O 的反对称和对称伸缩振动。如图 6 所示, 600 MPa、75 $^{\circ}\text{C}$ 时随着氯化钠浓度的增加, 核酸特征吸

收峰的振幅降低,削弱了 HPTS 处理对芽孢 DNA 碳骨架的损伤。而 600 MPa, 75 °C 结合 15% 氯化钠处理下枯草杆菌芽孢核酸分子的 P=O 对称伸缩振动最强,对芽孢 DNA 碳骨架的稳定性的破坏最大。对比添加和不添加氯化钠处理后芽孢 1 300~950 cm^{-1} 红外光谱图,表明芽孢内核酸物质稳定性降低、相关蛋白变性、结构发生变化。Graf 等^[27]研究了 HPTS 结合酸对枯草杆菌芽孢的杀灭作用,在 550 MPa-75 °C 条件下结合酸(pH=1)处理后,吸收峰位置向低波形函数方向移动,吸收峰强度降低。氯化钠浓度变化对 HPTS 处理下芽孢内核酸物质的影响趋势与 pH 值不一致。高浓度的氯化钠有利于芽孢 DNA 碳骨架的稳定性。

2.4.4 HPTS 结合 NaCl 处理后枯草杆菌芽孢红外光谱二阶导数图 (1 700~1 600 cm^{-1}) 酰胺 I 带 (1 700~1 600 cm^{-1}) 代表了特定官能团-C=O 的拉伸振动,与蛋白质的二级结构有关。如图 7 所示,在该范围内有两个吸收峰显著增强。在 HPTS 结

合氯化钠处理过程中,蛋白质发生变性导致氢键断裂。第 1 个吸收峰位于 1 660 cm^{-1} 附近,各浓度氯化钠所对应的吸收峰的位置基本没有变化^[31]。然而随着氯化钠浓度的增加,与对照组相比,吸收峰面积都有所增加,15% 氯化钠的峰面积达到最大,吸收峰的震动强度最大,吸收峰的位置也发生了移动。说明当温度压力一定时,15% 氯化钠对蛋白质二级结构的影响最大。第 2 个吸收峰位于 1 638~1 618 cm^{-1} 处,代表酰胺 I 带蛋白的 β -折叠结构 HPTS 结合氯化钠处理后,均出现了不同程度的偏移,吸收峰的峰形和特征官能团的振动强度也有显著变化。综上,随着氯化钠浓度增加到饱和状态,两个吸收峰的特征官能团的振动强度逐渐减小。HPTS 与 15% 氯化钠结合对枯草杆菌芽孢的蛋白质结构有很强的破坏作用,而饱和和氯化钠会削弱 HPTS 处理对蛋白质分子氢键的破坏,在一定程度上保护了芽孢的蛋白质分子^[32]。

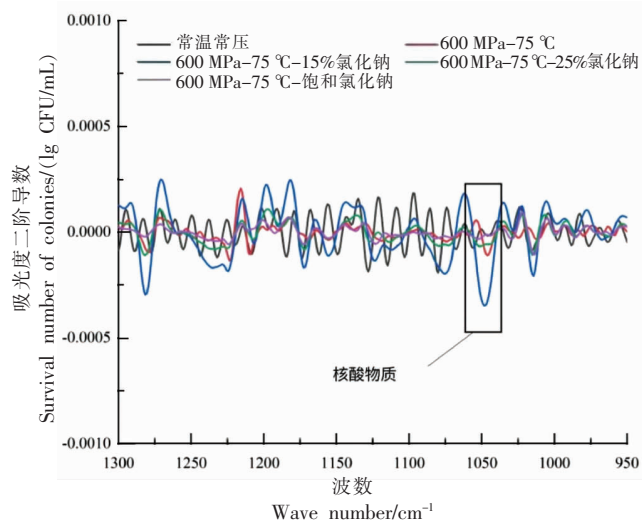


图 6 HPTS 结合 NaCl 对芽孢核酸的傅里叶变换二阶导数光谱图的影响

Fig.6 Effect of HPTS combined with sodium chloride on Fourier transform second derivative spectra of spore nucleic acids

2.4.5 HPTS 结合氯化钠处理对枯草杆菌芽孢酰胺 I 带蛋白二级结构的影响 对傅里叶变换红外光谱图进行蛋白质二级结构拟合,采用二阶导数和 Gaussian 法去卷积拟合得到了吸收峰^[33],结果如图 8 所示。各亚峰与蛋白质二级结构对应的关

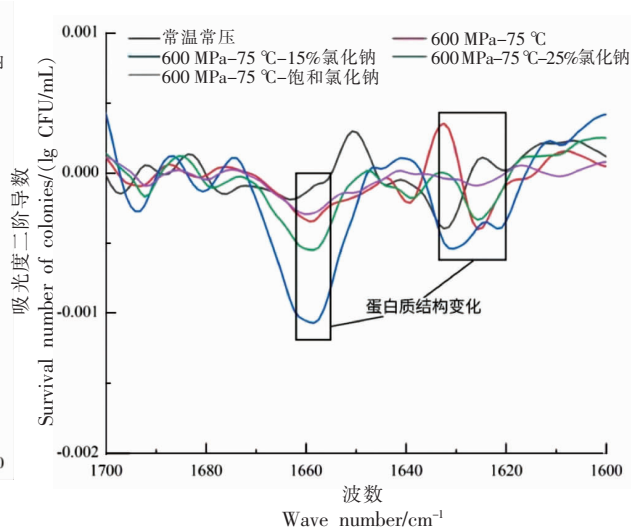


图 7 HPTS 结合 NaCl 对芽孢蛋白质傅里叶变换二阶导数光谱图的影响

Fig.7 Effect of HPTS combined with sodium chloride on Fourier transform second derivative spectra of spore proteins

系为:不同峰的位置与蛋白质的二级结构相关: 1 650~1 660 cm^{-1} 代表 α -螺旋结构,1 610~1 640 cm^{-1} 和 1 690~1 700 cm^{-1} 表示 β -折叠结构, 1 660~1 690 cm^{-1} 表示 β -转角结构,1 640~1 650 cm^{-1} 表示无规则卷曲结构^[34]。对各处理芽孢样品,

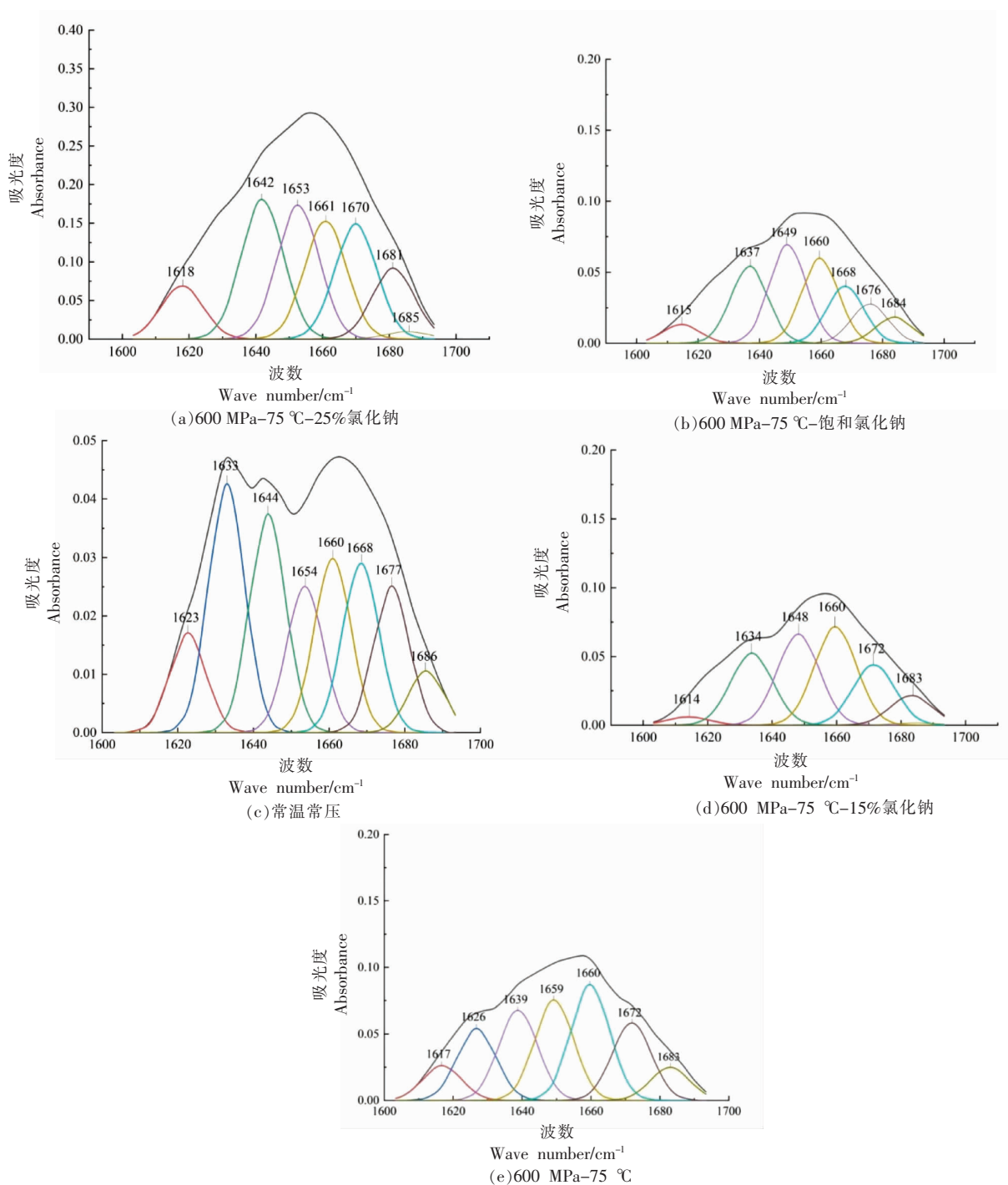


图8 不同处理的枯草杆菌芽孢蛋白质酰胺I带拟合曲线

Fig.8 Fitting curves of *Bacillus subtilis* spore protein amide I bands under different treatments

确认每个子峰，并计算每种二级结构的含量，结果见表1。

蛋白质的构象的稳定性决定了其生理功能。这种稳定性可以受多种因素的影响，包括静电力、氢键、疏水键、范德华力、二硫键以及与溶剂分子

的相互作用^[37]。试验结果表明，高压热杀菌改变了芽孢蛋白质的结构。Ho等^[38]研究发现，因为氯化钠作为一种强电解质，它能够引起蛋白质分子内部的化学反应，导致蛋白质的二级结构发生改变，进而失去其原有的生物学功能。在600 MPa和75

表 1 不同浓度的 NaCl 结合 600 MPa 和 75 °C 处理对枯草杆菌芽孢蛋白二级结构的影响

Table 1 Effects of different concentrations of sodium chloride combined with 600 MPa and 75 °C on secondary structure of *Bacillus subtilis* spore protein

处理	二级结构/%			
	α 型螺旋	β 折叠	β 旋转角度	无规绕制线圈
常温常压	25.56 ± 0.02 ^a	27.41 ± 0.03 ^d	29.87 ± 0.03 ^c	17.22 ± 0.06 ^e
600 MPa-75 °C	21.75 ± 0.02 ^b	27.21 ± 0.10 ^e	32.20 ± 0.05 ^b	18.97 ± 0.07 ^e
600 MPa-75 °C-15%氯化钠	16.09 ± 0.05 ^c	31.09 ± 0.11 ^b	37.43 ± 0.06 ^a	15.50 ± 0.08 ^d
600 MPa-75 °C-25%氯化钠	20.30 ± 0.03 ^d	31.58 ± 0.04 ^a	27.70 ± 0.06 ^e	20.53 ± 0.05 ^b
600 MPa-75 °C-饱和氯化钠	20.87 ± 0.04 ^c	29.71 ± 0.11 ^e	28.46 ± 0.05 ^d	20.99 ± 0.07 ^a

注:同一列中不同的小写字母存在显著性差异($P < 0.05$)。

°C 的处理条件下, 枯草芽孢的蛋白质二级结构发生了变化($P < 0.05$)。尤其是在添加了 15%氯化钠的 600 MPa-75 °C 处理条件下, α -螺旋结构的比例为 16.09%。而在 600 MPa-75 °C 结合 25%的氯化钠和饱和氯化钠的条件下, α -螺旋结构的比例分别为 20.30%和 20.87%。值得注意的是,当氯化钠的浓度为 15%时, α -螺旋结构的比率显著降低,转化为 β 旋转角和 β -折叠,蛋白质二级结构肽链的稳定性下降,对芽孢造成损害。与 15%氯化钠相比,25%氯化钠和饱和氯化钠的 α -螺旋结构增加,保持了 α -螺旋结构的稳定性,有效的保护了芽孢蛋白结构。

3 结论

试验结果表明,高浓度氯化钠不但没有增加 HPTS 处理杀灭枯草杆菌芽孢的效果,反而对 HPTS 处理下的芽孢有保护作用。15%质量分数的氯化钠增加了 HPTS 处理芽孢对细胞膜、蛋白质和核酸的损伤,杀菌效果和 DPA 释放量均为最大,而 25%质量分数和饱和浓度氯化钠却有利于增加 HPTS 处理下芽孢内膜、蛋白质和核酸的稳定性,饱和浓度氯化钠下芽孢的杀灭效果和 DPA 释放量均为最小。这可能是因为随着氯化钠浓度的增加,水分活度降低,水分子更难进入芽孢核心,而芽孢核心的水分含量对芽孢的杀菌抗性至关重要,芽孢核心水分含量越低,芽孢越难被杀灭。本文为 HPTS 技术在腌制食品中的应用提供了理论参考。

参 考 文 献

- [1] FAN L, HOU F, MUHAMMAD A I, et al. Synergistic inactivation and mechanism of thermal and ultrasound treatments against *Bacillus subtilis* spores[J]. Food Research International, 2019, 116 (FEB.): 1094-1102.
- [2] GUPTA I, CHAKRABORTY J, ROY S, et al. Nanocarbon immobilized membranes for generating bacteria and endotoxin free water via membrane distillation[J]. Separation and Purification Technology, 2021(259): 118133.
- [3] CHRISTIE G, SETLOW P. *Bacillus* spore germination: Knowns, unknowns and what we need to learn [J]. Cellular Signaling, 2020, 74: 109729.
- [4] 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.
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.
- [5] SETLOW P. Spores of *Bacillus subtilis*: Their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010(101): 514-525.
- [6] MOLVA C, BAYSAL A H. Effect of sporulation medium on wet-heat resistance and structure of *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 3922 -type strain spores and modeling of the inactivation kinetics in apple juice[J]. International Journal of Food Microbiology, 2014(189): 82-88.
- [7] 张变飞. 吐温 80 对 HPTS 杀灭枯草杆菌芽孢的影响研究[D]. 银川: 宁夏大学, 2022.

- ZHANG B F. Effect of Tween 80 on killing *Bacillus subtilis* spores by HPTS[D]. Yinchuan: Ningxia University, 2022.
- [8] HUTTON M, KOSKINEN M, HANLIN J. Interacting effects of pH and NaCl on heat resistance of bacterial spores[J]. Journal of Food Science, 2006, 56: 821-822.
- [9] ZHONG W Q, YAO Y C, YALING L, et al. Synthesis and antifungal activities of hydrophilic cationic polymers against *Rhizoctonia solani*[J]. Fungal Biology, 2020, 124(8): 735-741.
- [10] 傅星, 杨振春, 孙丽. 复方氯化钠滴眼液中羟苯乙酯含量测定及抑菌效力评价[J]. 中国药业, 2023, 32(9): 84-87.
- FU X, YANG Z C, SUN L. Content determination of ethylparaben in compound sodium chloride eye drops and evaluation of its bacteriostatic efficacy[J]. Chinese Pharmaceutical Industry, 2023, 32(9): 84-87.
- [11] 赵贤德, 董大明, 郑文刚, 等. 傅里叶变换红外光谱在葡萄酒品质劣变检测中的应用[J]. 光谱学与光谱分析, 2014, 34(10): 2667-2672.
- ZHAO X D, DONG D M, ZHENG W G, et al. Application of Fourier transform infrared spectroscopy in identification of wine spoilage[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2014, 34(10): 2667-2672.
- [12] 葛俊苗, 宋益善, 李燕, 等. 傅里叶变换红外光谱仪及其在食品中的应用[J]. 广东化工, 2017, 44(2): 54-55.
- GE J M, SONG Y S, LI Y, et al. Fourier transform infrared spectrometer and its application in the food[J]. Guangdong Chemical Industry, 2017, 44(2): 54-55.
- [13] FAN L, HOU F, MUHAMMAD A I, et al. Synergistic inactivation and mechanism of thermal and ultrasound treatments against *Bacillus subtilis* spores[J]. Food Research International, 2018, 116: 1094-1102.
- [14] ZHANG Z, BIN J, XIAO J L, 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.
- [15] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定: GB 4789.2-2016[S]. 北京: 中国农业出版社, 2016.
- National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, State Food and Drug Administration. National food safety standard. Food microbiological examination. Determination of total colony count: GB 4789.2-2016[S]. Beijing: China Agriculture Press, 2016.
- [16] 孙静. 芽孢皮层裂解酶的提取纯化及高压热处理对其影响研究[D]. 银川: 宁夏大学, 2018.
- SUN J. Study on the extraction, purification of spore cortex-lytic enzyme and effects of high-pressure thermal sterilization on the enzyme[D]. Yinchuan: Ningxia University, 2018.
- [17] NAG A, WATERLAND M, JANSSEN P, et al. Importance of intact secondary protein structures of cell envelopes and glass transition temperature of the stabilization matrix on the storage stability of probiotics[J]. Food research international, 2019, 123: 198-207.
- [18] LIU Y, ZHANG Z, CHEN L E, et al. High pressure thermal sterilization and ϵ -polylysine synergistically inactivate *Bacillus subtilis* spores by damaging the inner membrane[J]. Journal of Food Protection, 2022, 85(3): 390-397.
- [19] 高瑛珑, 鞠兴荣, 吴定. 微热协同超高压处理杀灭芽孢杆菌芽孢效果的研究[J]. 食品科学, 2007(3): 59-63.
- GAO Y L, JU X R, WU D. Study on synergetic killing effects of mild heat treatment and high hydrostatic pressure on *Bacillus* spores[J]. Food Science, 2007(3): 59-63.
- [20] LOISON P, GERVAIS P, PERRIER-CORNET J, et al. Effect of ethanol perturbation on viscosity and permeability of an inner membrane in *Bacillus subtilis* spores[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bio membranes, 2016, 1858(9): 2060-2069.
- [21] RAO L, WANG Y, CHEN F, et al. High-pressure CO₂ reduces the wet heat resistance of *Bacillus subtilis* spores by perturbing the inner membrane[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2020, 60: 102291.
- [22] SEVENICH R, REINEKE K, HECHT P, et al. Impact of different water activities (aw) adjusted by solutes on high pressure high temperature inactivation of *Bacillus amyloliquefaciens* spores[J]. Frontiers in Microbiology, 2015; 6: 689.
- [23] 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.
- [24] 尚彬玲, 申瑾, 陈翔, 等. HPTS 结合 Nisin 对枯草杆菌芽孢的杀灭机理[J]. *食品与生物技术学报*, 2022, 41(3): 29–36.
- SHANG B L, SHEN J, CHEN X, et al. Study on inactivation mechanism of *Bacillus subtilis* spores by HPTS combined with nisin[J]. *Journal of Food Science*, 2022, 41(3): 29–36.
- [25] 章中, 杨杰, 申瑾, 等. 高压热杀菌结合酸对枯草杆菌芽孢的杀灭作用[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(12): 9–15.
- ZHANG Z, YANG J, SHEN J, et al. Effects of high-pressure thermal sterilization combining with acid on the sterilization of *Bacillus subtilis* spores[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2022, 48(12): 9–15.
- [26] WANG D W, ZHU B, HE X, et al. Iron oxide nanowire-based filter for inactivation of airborne bacteria[J]. *Environ Sci Nano*, 2018, 5: 1096–1106.
- [27] GRAF B, HEHNKE S, NEUWIRTH M, et al. Continuous microwave heating to inactivate thermophilic spores in heating-sensitive skim milk concentrate[J]. *International Dairy Journal*, 2021, 113: 104894.
- [28] 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*, 2011, 1808(4): 1187–1195.
- [29] WANG L, XIA Q, LI Y. The effects of high pressure processing and slightly acidic electrolysed water on the structure of *Bacillus cereus* spores[J]. *Food Control*, 2017, 79: 94–100.
- [30] LU X N, QIAN L, DI W, et al. Using of infrared spectroscopy to study the survival and injury of *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni* and *Pseudomonas aeruginosa* under cold stress in low nutrient media[J]. *Food Microbiology*, 2011, 28: 537–546.
- [31] NAG A, MARK W, PATRICK J, et al. Importance of intact secondary protein structures of cell envelopes and glass transition temperature of the stabilization matrix on the storage stability of probiotics[J]. *Food Research International*, 2019, 123: 198–207.
- [32] SHI L, XIONG G, YIN T, et al. Effects of ultra high-pressure treatment on the protein denaturation and water properties of red swamp crayfish (*Procambarus clarkia*)[J]. *LWT- Food Science and Technology*, 2020, 133: 110124.
- [33] SIDDIQUE, MD A B, PAOLA M, et al. Effect of pulsed light treatment on structural and functional properties of whey protein isolate[J]. *Food Research International*, 2016, 87: 189–196.
- [34] BALTACIÖĞLU 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: 507–514.
- [35] WANG X, CHEN X, QI Z, et al. A study of *Ganoderma lucidum* spores by FTIR microspectroscopy[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2012, 91: 285–289.
- [36] 管弋铄, 何苗, 熊双丽. 超高压处理对大米蛋白功能特性及结构的影响[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(20): 104–109.
- GUAN Y Z, HE M, XIONG S L. Effects of ultra-high pressure treatment on functional properties and structure of rice protein[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(20): 104–109.
- [37] YANG H, TAO F, CAO G, et al. Stability improvement of reduced-fat reduced-salt meat batter through modulation of secondary and tertiary protein structures by means of high-pressure processing[J]. *Meat Science*, 2021(176): 108439.
- [38] HO T M, ZHU J, BANSAL N, et al. Effect of pH and heat treatment on physicochemical and functional properties of spray-dried whey protein concentrate powder[J]. *International Dairy Journal*, 2021, 119: 105063.

Effect of High Pressure Hot Sterilization Combined with Sodium Chloride on Spores

Liu Yichang, Wang Mengze, Liu Minan, Liu Dunhua, Chen Xiang, Zhang Zhong*

(College of Food Science and Engineering, Ningxia University, Yinchuan 750021)

Abstract Pickled food may contain spore pathogenic bacteria and spoilage bacteria, high pressure thermal sterilization (HPTS) can kill these spores, and sodium chloride in pickled food may improve its bactericidal effect. The bactericidal effect of high pressure thermal sterilization (600 MPa, 75 °C) combined with sodium chloride (15%, 25%, saturated sodium chloride solution) on *Bacillus subtilis* spores was studied. After treatment, the leakage rate of 2, 6-dipyridinolinic acid (DPA) and the damage of the intima of the spores were measured. The changes of spore intima, protein secondary structure and nucleic acid stability were analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The results showed that the combined treatment of 600 MPa, 75 °C and 15% sodium chloride had the best inactivation effect on *Bacillus subtilis* spore [5.43 lg (CFU/mL)], and the DPA leakage rate of spore under this condition was 92%. HPTS combined with 15% sodium chloride had the greatest damage to the intima, protein secondary structure and nucleic acid stability. Under the conditions of 600 MPa, 75 °C binding concentration of 25% and saturated sodium chloride, the kill amount of treated spores was about [3.48 lg (CFU/mL)] and [3.08 lg (CFU/mL)], and the leakage rate of DPA was 82% and 63%, respectively. Compared with 15% sodium chloride, the inner membrane permeability of the spore was reduced, the α -helix ratio of the secondary structure of the spore protein increased significantly, and the secondary structure of the protein was more orderly. Studies have shown that 25% and saturated sodium chloride unexpectedly protected *Bacillus subtilis* spores and reduced the damage of the spore intima, proteins and nucleic acids caused by HPTS treatment.

Keywords sodium chloride; high pressure thermal sterilization; *Bacillus subtilis*; Fourier transform infrared spectroscopy; spores