文章编号：1000-5773(2006)01-0083-05

超高压处理对枯草芽孢杆菌超微结构的影响*

曾庆梅[1]，谢慧明[1]，潘 见[1]，杨 毅[1]，徐慧群[2]，黄训端[1]，赵阳楠[1]

(1. 农产品生物化工教育部重点实验室(合肥工业大学)，安徽合肥 230009；
2. 安徽省出入境检验检疫局，安徽合肥 230001)

摘要：研究了超高压处理对枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* AS 1.140)超微结构的影响，探讨其营养体以及芽孢的灭活机制。在经过 500 MPa、60 ℃下保温保压 20 min 超高压处理后，采用透射电子显微镜进行观察，比较处理前后超微结构的变化。观察结果表明：超高压处理后，枯草芽孢杆菌的营养体细胞壁皱缩、出现缺口，胞浆泄漏、结构层次感消失、出现大片透电子区；其芽孢外壳被破坏、出现缺口，芽孢内含物结构紊乱、泄漏、出现部分透电子区；甚至内含物质完全泄漏，出现细胞壁或孢子外壳残留。

关键词：枯草芽孢杆菌；超高压处理；超微结构

中图分类号：O521.9；Q932；TS201 **文献标识码**：A

1 引 言

超高压食品加工(Ultra-High Pressure Processing，UHPP)具有很多特点，可以杀灭食品中微生物、钝化食品中的酶，并可完整保留食品的香味、色泽和多种维生素物质[1-2]；此外，与热处理方法相比较，超高压杀菌作用均一、迅速，无大小和形状的限制[3-6]。食品超高压处理技术是食品加工业的一次重大革命，被列为 21 世纪食品加工领域十大尖端科技之一[7]。

微生物对超高压力的敏感性各有不同。微生物的耐压能力的排列次序为：芽孢(或孢子)＞革兰氏阳性菌＞真菌＞革兰氏阴性菌。一般来说，在 250～300 MPa 和室温下保压 10 min，可以杀灭食品中大部分微生物，实现所谓的“冷态巴氏杀菌”；然而，在上述处理条件下，不能灭活细菌芽孢[8]。革兰氏阳性产芽孢杆菌及其芽孢成为超高压杀菌的指示菌。研究此类菌的超高压灭活机制意义重大。

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)属于革兰氏阳性产芽孢菌，是食品中常见的一种污染菌，在传统的发酵制品中污染几率更大。一般而言，耐热的细菌同样耐压[9]，枯草芽孢杆菌比嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus Searothemophilus*)更耐压[10-11]。因此，本工作以枯草芽孢杆菌 AS 1.140 为试材，利用透射电子显微镜，观察枯草芽孢杆菌及其芽孢超高压处理后超微结构的变化，探讨此菌种营养体(菌体、繁殖体)和芽孢的灭活机制。

2 材料和方法

2.1 菌种

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* AS 1.140)，由合肥工业大学生物与食品工程学院提供(2000 年购自中国科学院微生物所)。

* **收稿日期**：2004-10-09；**修回日期**：2005-11-28

基金项目：国家自然科学基金(30571304)；安徽省教育厅重点科研项目(2004kj004zd)；农产品生物化工教育部重点实验室开放基金(KF2004005)

作者简介：曾庆梅(1962—)，男，博士，副教授，主要研究方向为食品科学、农产品生物化工.
E-mail：zengqingmei-1@163.com

2.2 培养基及培养方法

固体培养基:营养琼脂(蛋白胨10 g,牛肉膏3 g,氯化钠5 g,琼脂15 g,蒸馏水1 000 mL;用15%氢氧化钠校正pH值至7.4);分装烧瓶,121 ℃高压灭菌15 min备用。

液体培养基:营养肉汁(蛋白胨10 g,牛肉膏3 g,氯化钠5 g,蒸馏水1000 mL;用15%氢氧化钠校正pH值至7.4)。分装烧瓶,121 ℃高压灭菌15 min备用。

菌种经活化后,接入液体培养基,37 ℃,培养48 h。

2.3 试 剂

无菌生理盐水(浓度0.8%NaCl水溶液)、K_2HPO_4、KH_2PO_4、NaOH、NaCl、乙醇、蒸馏水、3.5%戊二醛、1%锇酸、环氧树脂、环氧丙烷、醋酸铀。

2.4 实验设备

超高压处理装置:1 L自制可控温超高压实验装置(工作压力0.1~600 MPa,工作温度0~60 ℃)。

其它仪器设备:DZ-400/2S型多功能薄膜封口机(浙江金华市包装机械厂);TGL-220型冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂);Sartorious精密电子天平(北京塞多斯天平有限公司);JEOL-1230EX型透射电子显微镜(日本电子株式会社);SX-18型光学电子显微镜(江南光学仪器厂);净化工作台、生化培养箱、电热恒温培养箱、高压蒸汽灭菌锅、微生物实验常规仪器。

2.5 实验方法

2.5.1 枯草芽孢杆菌的超高压处理

为了保证枯草芽孢杆菌营养体与芽孢稳定的比例,将其在37 ℃培养约48 h,营养体与芽孢之比为4∶6。用无菌移液管分别吸取1 mL菌液,移入9 mL无菌生理盐水中并依次稀释,最后以pH6.8磷酸缓冲液制成菌悬液,调整细胞浓度,使起始菌数N_0为10^8 cfu·mL^{-1}数量级,然后将其分装于10 mL的无菌聚乙烯塑料袋,并进行真空包装,热封口(不留顶隙)、冷藏备用。每一样品重复3次。高压容器的温度通过其夹套内恒温水浴来控制,将供试菌提前1 min置于高压容器介质中,待样品温度与高压介质温度(60 ℃)达到平衡后,进行超高压处理(考虑枯草芽孢杆菌芽孢非常耐压,采用较高的协同温度,并确定处理参数为500 MPa、60 ℃下保温保压20 min。处理后立即进行微生物培养计数,同时取未经超高压处理的菌悬液进行微生物培养计数,作为对照。

2.5.2 微生物数量测定

按《食品微生物检验国家标准》(GB4789-2003),采用平板倾注计数法进行菌数的测定。以无菌生理盐水适当稀释超高压处理后和未处理作为对照的供试菌悬液,于营养肉汁琼脂平板在37 ℃培养48 h后,然后进行菌落记数。

2.5.3 透射电镜观察

分别取未高压处理的对照样和高压处理样的液体培养物20 mL,在离心管中以10 000 r/min离心。静置10 min后,吸取上清液,并将沉淀的菌体转移至0.5 mL的微量离心管中继续以10 000 r/min离心20 min。最后将沉淀的菌体用3.5%戊二醛固定4 h,1%锇酸固定1 h,30%乙醇脱水10 min,50%乙醇脱水15 min,70%醋酸铀作用12 h,80%乙醇脱水15 min,95%乙醇脱水20 min,两次无水乙醇脱水40 min,然后用环氧丙烷脱水30 min,加入1∶1的环氧丙烷与环氧树脂丙作用2 h,加入纯环氧树脂渗透3 h,然后在50 ℃下环氧树脂包埋12 h,最后用环氧树脂继续包埋48 h。包埋后用LKB1型超薄切片机制70 nm切片,放入10张230目的铜网中。切片后进行染色,以醋酸铀作用30 min,水洗,然后加入柠檬酸铅作用20 min,水洗。于JEOL-1230EX电镜下观察。

3 结果与讨论

3.1 超高压处理后对枯草芽孢杆菌存活量

枯草芽孢杆菌营养体特别是器芽孢,在室温和500 MPa条件下保压处理的灭活作用有限。为了在压力不提高的前提下,加大超高压处理对其灭活作用,本实验采用较高的协同温度进行超高压杀菌处

理,并确定处理参数为 500 MPa、60 ℃下保温保压 20 min。超高压处理后立即进行微生物培养计数,同时取未经杀菌处理的菌悬液进行微生物培养计数,作为对照。枯草芽孢杆菌死亡数量级达到 6.81。

3.2　正常枯草芽孢杆菌的超微结构

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)为类炭疽芽孢杆菌(*B. anthracoides*)中的模式种,为需氧菌。其常态营养体(菌体、繁殖体)呈直或弯曲,菌端平齐,宽 0.5 μm,长 1.5～2.0 μm,散布或成链状排列,两菌相接处呈竹节状;形成的芽孢呈卵圆形,位于菌体中央或近端,芽孢形成后菌体不膨胀[12]。

本实验中,枯草芽孢杆菌营养体和芽孢的大小在宽 0.5 μm、长 1.5～2.0 μm 的范围之内,形态特征基本符合以上描述(如图 1～8 所示)。

在透射电子显微镜下,其营养体胞壁完整光滑,胞浆分布均匀有序,部分营养体胞浆中心部位有规则的低电子密度区(如图 1 所示)。其芽孢外壳光滑,皮质层清晰,核区电子较均匀(如图 2 所示)。

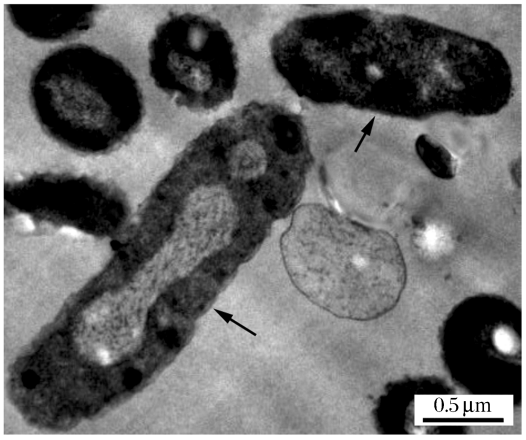


图 1　正常枯草芽孢杆菌营养体

Fig. 1　Normal vegetative form of *Bacillus subtilis*

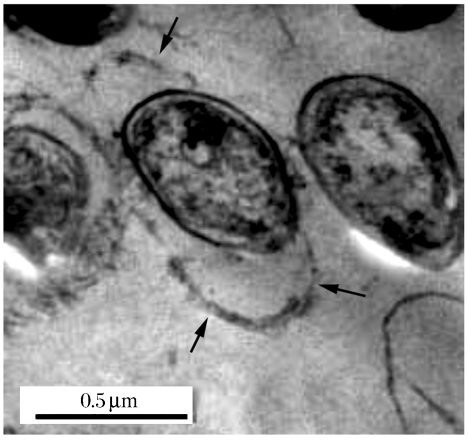


图 2　正常枯草芽孢杆菌芽孢
(箭头所指为营养体残留胞壁)

Fig. 2　Normal spore of *Bacillus subtilis*
(Arrowheads point to the remains of vegetative cell wall)

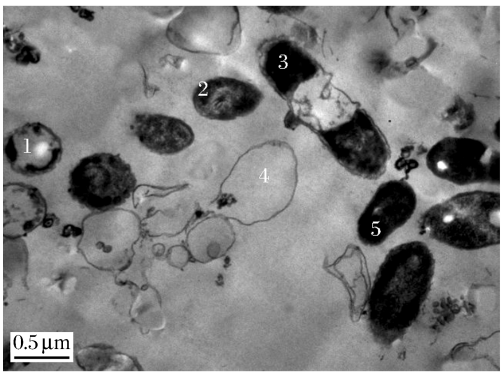


图 3　压后枯草芽孢杆菌营养体和芽孢

Fig. 3　Vegetative cells and spores of *Bacillus subtilis* after compression

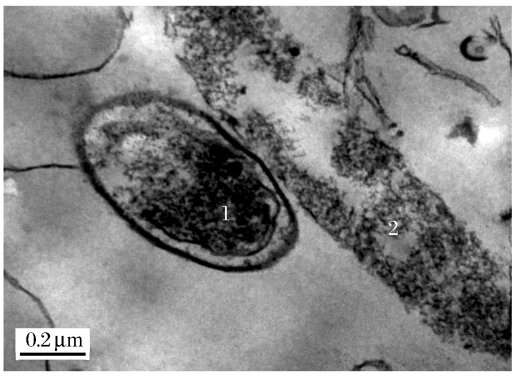


图 4　压后枯草芽孢杆菌芽孢和营养体

Fig. 4　Spores and vegetative cells of *Bacillus subtilis* after compression

3.3　超高压处理后枯草芽孢杆菌的营养体和芽孢的超微结构

超高压处理后枯草芽孢杆菌的营养体呈现多种破坏形式,营养体细胞壁局部被破坏、出现缺口、胞质泄漏、细胞中部出现透电子区(如图 3 中标记 3 所示);营养体外壳皱缩,胞浆层次消失,出现大片透电子区(如图 4 中标记 2 所示)。其芽孢呈现更多的破坏和超微结构形式:(1) 芽孢内含物泄漏,出现大片透电子区(如图 3 中标记 1 所示);(2) 芽孢内含物结构紊乱,出现部分透电子现象(如图 3 中标记 2 所示);(3) 为内部物质完全泄漏的细胞壁或孢子外壳残留(如图 3 中标记 4 所示);(4) 上部芽孢的外壳和皮质层模糊,核区出现透电子区(如图 4 中标记 1 所示)。从图 3 中标记 5 处还可看到芽孢的内含物正

在向外泄漏的情况。

3.4 超高压处理后枯草芽孢杆菌芽孢的几种典型超微结构

超高压处理后枯草芽孢杆菌的芽孢的几种典型破坏形式:(1) 压后芽孢内含物的结构紊乱(如图 5 所示);(2) 压后芽孢内含物的结构紊乱、外壳皱缩和透电子区(如图 6 所示);(3) 压后芽孢外壳出现缺口、皮质层厚度不均和核区透电子(如图 7 所示);(4) 压后芽孢外壳皱缩、缺口,内含物的结构紊乱、泄漏(正在泄漏)和大片透电子区(如图 8 所示)。

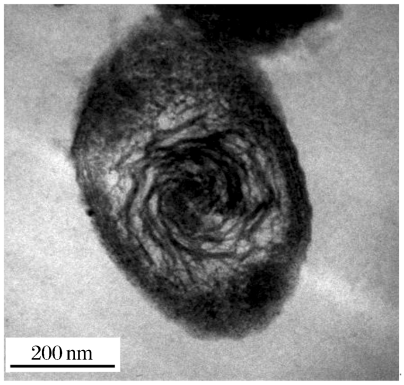


图 5 压后芽孢内含物的结构紊乱

Fig. 5 The disordered structure of spore inclusion after compression

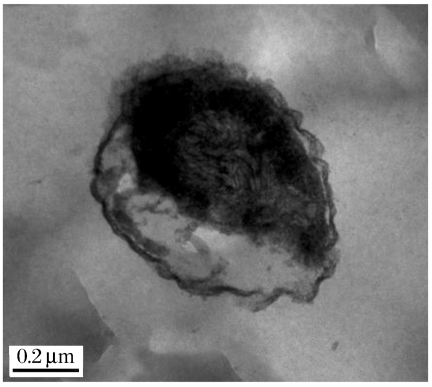


图 6 压后芽孢内含物的结构紊乱、外壳皱缩和透电子区

Fig. 6 The disordered structure, shrinkage of outer coat, ppearance of large electron transmission area in the inclusion of spore after compression

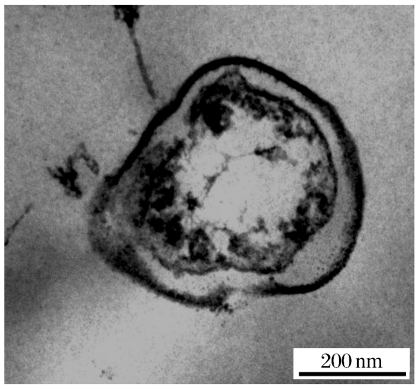


图 7 压后芽孢外壳出现缺口、皮质层厚度不均和核区透电子

Fig. 7 The appearance of gap in outer coat, asymmetry of cortex, appearance of large electron transmission area in spore after compression

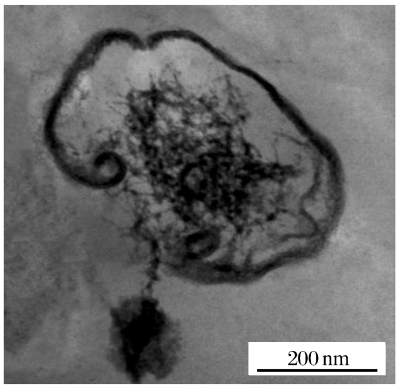


图 8 压后芽孢外壳皱缩、缺口,内含物的结构紊乱、泄漏和大片透电子区

Fig. 8 The shrinkage of outer coat, gap, disordered structure and leaking out of inclusion, appearance of large electron transmission area in the inclusion of spore after compression

4 结 论

(1) 在 500 MPa、60 ℃条件下保温保压 20 min 进行超高压处理,微生物死亡数量级达到 6.81,能有效灭活芽孢杆菌营养体及其芽孢。

(2) 超高压处理后枯草芽孢杆菌的营养体细胞壁皱缩、出现缺口,胞浆泄漏、结构层次感消失、出现大片透电子区。

(3) 超高压处理后其芽孢外壳被破坏、出现缺口,芽孢内含物结构紊乱、泄漏、出现部分透电子区;甚至内含物质完全泄漏,出现细胞壁或孢子外壳残留。

References:

[1] Pan J, Zeng Q M, Xie H M, et al. Study on UHP Treatment of Microflora Sterilization of Strawberry Juice [J]. Food Science, 2004, 25(1): 31-34. (in Chinese)
潘　见,曾庆梅,谢慧明,等. 草莓汁的超高压杀菌研究 [J]. 食品科学,2004,25(1):31-34.

[2] Zeng Q M, Pan J, Xie H M, et al. Influence of Ultra High Pressure (UHP) on Micro-Organisms in Watermelon Juice [J]. Chinese Journal of High Pressure Physics, 2004, 18(1): 70-74. (in Chinese)
曾庆梅,潘　见,谢慧明,等. 西瓜汁的超高压杀菌效果研究 [J]. 高压物理学报,2004,18(1):70-74.

[3] Cheftel J C. Review: High-Pressure, Microbial Inactivation and Food Preservation [J]. Food Sci Technol Int, 1995, 1: 75-90.

[4] Knorr D. Effects of High-Hydrostatic-Pressure Processes on Food Safety and Quality [J]. Food Technology, 1993, 6: 156-161.

[5] Fair D. High Pressure Technology in the Food Industry [J]. Trends Food Science and Technology, 1990, 1: 15-16.

[6] Mertens B, Knorr D. Developments of Nonthermal Processes for Food Preservation [J]. Food Technol, 1992, 46: 124-133.

[7] Pan J, Zhang W Ch, Chen C G. Equipment Design and Applied Technology of High Hydrostatic Pressure Beverage Sterilization [J]. Food Science, 1999, 20(1): 62-64. (in Chinese)
潘　见,张文成,陈从贵,等. 超高压液体饮料实用性灭菌工艺及设备设计 [J]. 食品科学,1999,20(1):62-64.

[8] Stewarta C M, Dunne C P, Sikes A, et al. Sensitivity of Spores of *Bacillus subtilis* and *Clostridium* Sporogenes PA 3679 to Combinations of High Hydrostatic Pressure and Other Processing Parameters [J]. Inovative Food Science & Emerging Technologies, 2000, 1: 49-56.

[9] Smelt J P P M. Recent Advances in the Microbiology of High Pressure Processing [J]. Food Science & Technology, 1998, 9: 152-158.

[10] Nakayama A, Yano Y, Kobayashi S, et al. Comparison of Pressure Ressistances of Spores of Six Bacillus Strains with Their Heat Resistances [J]. Appl Enviro Microbiro, 1996, 62: 3897-3900.

[11] Sojka B, Ludwig H. Effect of Pressure Changes on the Inactivation of *Bacillus subtillus* Spores [J]. Pharm Ind, 1997, 59: 436-438.

[12] Zhou Q D. Microbiology Textbook [M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1986: 109-113. (in Chinese)
周庆德. 微生物实验手册 [M]. 上海:上海科学出版社,1986:109-113.

Effect of Ultra-High Pressure Processing (UHPP) on the Microstructure of *Bacillus subtilis*

ZENG Qing-Mei[1], XIE Hui-Ming[1], PAN Jian[1], YANG Yi[1],
XU Hui-Qun[2], HUANG Xun-Duan[1], ZHAO Yang-Nan[1]

(1. *Key Laboratory of Bio-Process (Hefei University of Technology), Ministry of Education, Hefei* 230009, *China*;
2. *Anhui Province Import and Export Commodity Inspection and Quarantine Bureau, Hefei* 230006, *China*)

Abstract: The effect of ultra-high pressure processing on the microstructure of *Bacillus subtilis* AS 1.140 was investigated, and the inactivation mechanism of its vegetative form and spore was studied. The change of *B. subtilis* microstructures were analyzed and compared in terms of the oberation with a Transmission Electron Microscope (TEM) after UHPP (500 MPa, 60 ℃, 20 min). Results showed that the vegetative cell wall of *B. subtilis* was shrinked, breached and leaked out cytoplasm, the layer structure of cytoplasm disappeared, and a large electron transmission area appeared in the cell after compression. The outer coat of its spores was also breached, the layer structure of spores' inclusion disordered, the inclusion leaked out from the cell, and a partial electron transmission area appeared after compression.

Key words: *Bacillus subtilis* AS 1.140; ultra-high pressure processing(UHPP); Microstructure