文章编号：1000-5773(2007)01-0095-08

超高压对枯草杆菌胞外蛋白酶的影响*

谢慧明[1]，黄训端[1,2]，潘 见[1]，曾庆梅[1]，王海翔[1]，蒋业雷[1]

(1. 合肥工业大学农产品生物化工教育部工程研究中心，安徽合肥 230009；
2. 安徽大学生命科学学院，安徽合肥 230039)

摘要：以枯草杆菌为研究对象，采用 Box-Behnken 响应曲面设计，研究了超高压处理对枯草杆菌胞外蛋白酶的影响以及菌体致死与胞外酶的关系。结果表明，超高压能显著抑制枯草杆菌胞外蛋白酶的活性，处理过程中压力和温度是酶失活的主要因素，并且两者之间存在交互作用，超高压处理时温度协同有效。利用 Design Expert 软件建立了胞外蛋白酶超高压钝化模型，决定系数 $R_2=0.9747$，调整决定系数 $R_{2,adj}=0.9421$。方差分析表明，模型显著，可应用于钝化效果分析与预测。实验结果还表明，超高压处理后枯草杆菌的致死率与胞外蛋白酶活的变化相关性达到极显著水平($R=0.9330$)，胞外酶可作为超高压处理对微生物影响的一个评价指标。

关键词：超高压；枯草杆菌；胞外蛋白酶；响应曲面法
中图分类号：O521.9；Q935 **文献标识码**：A

1 引 言

高压生物科学是近年来新兴的边缘学科[1-2]，超高压作为独立的热力学因素，同热处理一样，可造成微生物的损伤或致死，以及引起生物大分子的变性、蛋白酶类失活等。利用这一原理，超高压被普遍用于杀菌、消毒、酶类钝化、疫苗生产，以及蛋白质折叠等生物学多个领域的研究，高压生物科学与技术具有广阔的发展前景[3-5]。

枯草杆菌是革兰氏阳性细菌，广泛分布于土壤、空气、水、草类及腐败物中，与人类关系密切。由于可产生芽孢，枯草杆菌对周围环境有较强的适应能力和耐受能力，能抗拒热、辐射、静水压、渗透和化学药物等不利因素，这给食品安全和消毒工作带来了隐患。为拓宽微生物的杀灭手段，近年来，科学工作者采用了超高压处理办法，取得了一批成果[8-12]，但在超高压对微生物影响机理方面的研究薄弱。本工作以枯草杆菌为对象，研究在超高压条件下胞外蛋白酶活的变化以及菌体存活情况，旨在为从生化和代谢方面探索压力对微生物作用机理提供实验依据。

2 材料与方法

2.1 实验菌种

枯草杆菌[CMCC(B)63530]，由安徽进出口检验检疫局生物技术中心提供。营养琼脂(粉剂，北京陆桥技术有限公司；其组分为：蛋白胨 10 g，牛肉膏 3 g，氯化钠 5 g，琼脂 15 g)，37 ℃培养至对数期，将菌体洗脱至无菌生理盐水中，实验时菌液浓度为 1.5×10^8 cfu·mL^{-1}。

* **收稿日期**：2005-12-23；**修回日期**：2006-07-06
基金项目：农产品生物化工教育部重点实验室开放基金(NKF2004005)；安徽省教育厅重点科研项目(2004kj004zd)
作者简介：谢慧明(1956—)，女，硕士，副教授，主要从事食品科学教学与研究工作.
E-mail：huangxunduanwww@163.com

2.2 实验设计

实验采用响应曲面法的 Box-Behnken 设计[7]，实验因素水平及编码见表 1，以超高压处理后枯草杆菌胞外蛋白酶的活性(U)为响应值，假设由最小二乘法拟合的二次多项式方程为

$$Y=B_0+B_1x_1+B_2x_2+B_3x_3+B_{11}x_1^2+B_{22}x_2^2+B_{33}x_3^2+B_{12}x_1x_2+B_{13}x_1x_3+B_{23}x_2x_3 \quad (1)$$

式中：Y 代表枯草杆菌胞外蛋白酶的活性；B_0 为常数项，B_1、B_2、B_3 分别为线性系数，B_{12}、B_{13}、B_{23}为交互项系数，B_{11}、B_{22}、B_{33}为二次项系数。

表 1 实验因素水平及编码代码

Table 1 Codes and levels of factors chosen for the trials

Parameter	Coded(1)	Actual	Level		
			−1	0	+1
Pressure/(MPa)	x_1	X_1	100	300	500
Temperature/(℃)	x_2	X_2	20	40	60
Pressure holding time/(min)	x_3	X_3	10	15	20

Note:(1) $x_1=(X_1-300)/200$; $x_2=(X_2-40)/20$; $x_3=(X_3-15)/5$.

2.3 压力处理

超高压设备由本研究中心自行设计研制，容量 1 L，压力范围为 0～600 MPa，工作温度 0～60 ℃，传压介质为蓖麻油。

2.4 蛋白酶活性测定

将压力处理过的菌体 5 000 r/min 冷冻离心，取上清液作为粗酶，酶活测定采用福林-酚法，定义 1 mL酶液 A660 nm 变化 0.01 为一个单位(U)。

2.5 微生物计数

按《食品微生物检验国家标准》(GB 4789-2003)，采用菌落计数琼脂片(美国 MMM 公司生产)，37 ℃培养 48 h，进行菌数计数。

2.6 数据处理工具

Design Expert(Version 6.0.11)和 SPSS12.0。

3 结果与分析

3.1 超高压对枯草杆菌胞外蛋白酶影响的响应曲面分析

3.1.1 回归方程的建立

根据 Box-Behnken 响应曲面设计要求，本实验开展了 17 组枯草杆菌超高压处理实验，枯草杆菌胞外蛋白酶活性的测定值和预测值见表 2，利用 Design Expert 进行回归分析，得到多元二次回归方程(模型)，见方程 2。

$$Y=51.43-28.82x_1-23.63x_2+2.23x_3-7.02x_1^2-5.93x_2^2+4.86x_3^2+12.92x_1x_2+5.22x_1x_3+1.29x_2x_3 \quad (2)$$

对模型进行方差分析和显著性检验，结果见表 3。由表 3 可以看出：模型 $F_{\text{model}}=29.92>[F0.01(9,4)=14.66]$，模型 $P_{\text{model}}<0.0001$，表明模型极显著，不同处理会引起不同响应。失拟 $F_{\text{lose}}=3.46<[F0.05(9,3)=8.81]$，失拟项 $P_{\text{lose}}=0.1309>0.05$，模型失拟度不显著。模型决定系数 $R_2=0.9747$，调整决定系数 $R_{2,\text{adj}}=0.9421$，表明模型可以解释 97.21%的响应值的变化，模型的拟合度高，实验误差小，因此，应用该模型可以对超高压处理枯草杆菌胞外蛋白酶活性进行分析和预测。

从系数项的 P 值来分析，x_1、x_2、x_1x_2 达到极显著水平($P<0.01$)，提示压力和温度因素及两者交互作用对枯草杆菌胞外蛋白酶活产生极显著影响。

表 2　实验设计与响应

Table 2　Experimental designs and responses

Trial No.	x_1	x_2	x_3	Y/(U)	
				Experimental	Predicted
1	0	−1	−1	78.66	73.05
2	0	0	0	50.67	51.43
3	−1	1	0	32.89	30.75
4	−1	0	−1	82.65	81.07
5	1	0	1	26.32	27.90
6	1	1	0	6.14	1.05
7	0	−1	1	78.64	74.92
8	1	−1	0	18.23	20.37
9	−1	0	1	78.57	75.10
10	0	0	0	58.44	51.43
11	0	0	0	48.27	51.43
12	0	0	0	46.34	51.43
13	−1	−1	0	96.66	103.85
14	0	1	−1	19.48	23.20
15	0	1	1	24.63	30.24
16	1	0	−1	9.53	13.00
17	0	0	0	53.42	51.43

表 3　回归模型方差分析表

Table 3　Analysis of variance for regressive equation

Source	Sum of squares	DF	Mean square	F Value	P Value
Model	12 382.10	9	1 375.79	29.92	$<0.000\,1^{**}$
x_1	6 644.16	1	6 644.16	144.48	$<0.000\,1^{**}$
x_2	4 467.49	1	4 467.49	97.15	$<0.000\,1^{**}$
x_3	39.78	1	39.78	0.87	0.383 3
x_1^2	212.08	1	212.08	4.61	0.068 9
x_2^2	136.02	1	136.02	2.96	0.129 1
x_3^2	99.29	1	99.29	2.16	0.185 2
x_1x_2	667.71	1	667.71	14.52	$0.006\,6^{**}$
x_1x_3	108.89	1	108.89	2.37	0.167 7
x_2x_3	6.68	1	6.68	0.15	0.714 4
Residual	321.90	7	45.99		
Lack of fit	232.33	3	77.44	3.46	0.130 9
Pure error	89.57	4	22.39		
Cor total	12 704.00	16			

Note: Determination coefficient $R_2=0.974\,7$; Adjusted determination coefficient $R_{2,\mathrm{adj}}=0.942\,1$.

(**) indicates significance at 0.01 level.

3.1.2 压力与温度的影响

图 1 为 $x_3=0$，即在固定时间为 15 min 的条件下，压力与温度因素的响应曲面和等高线，该图反映压力和温度因素，以及两者的交互作用对蛋白酶活性变化产生了显著影响。由图 1 可知，在同一温度条件下，随着压力的增加，酶活降低，处理时每增加 40～60 MPa，酶活衰减 10 U；在同一压力条件下，随着温度的增加，酶活减少，每增加 5～7 ℃，酶活衰减 10 U；若压力与温度同时交互作用，则酶活衰减更加迅速，每增加 20～40 MPa 和 2～4 ℃，酶活可衰减 10 U；在两个因素共同作用下，可使酶活预测值为零。

3.1.3 压力与时间的影响

图 2 为 $x_2=0$，即在固定温度为 40 ℃的条件下，压力和时间因素的响应曲面和等高线。由图 2 可知，枯草杆菌胞外蛋白酶活性主要受到压力的影响，时间的影响并不明显。在时间固定不变的情况下，随着压力的增加，酶活降低，处理时每增加 50～70 MPa，酶活衰减 10 U；在压力固定不变的情况下，随着时间的增加，酶活衰减程度较小；压力与时间的交互作用也不明显。在 40 ℃条件下，压力和时间不能使蛋白酶完全失活，最低时，酶活预测值仍有 13 U。

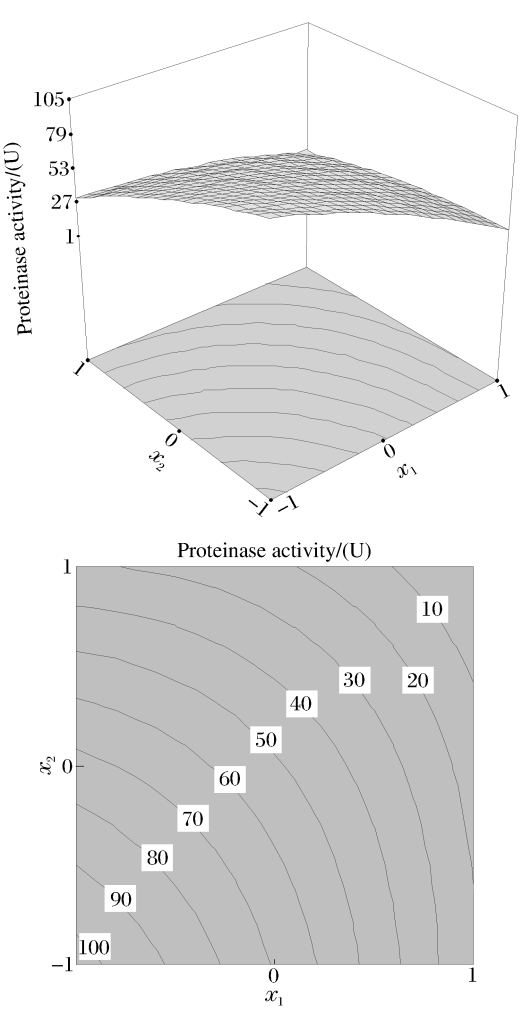


图 1 $Y=f(x_1,x_2,0)$的响应曲面和等高线

Fig. 1 Response surface and contours of $Y=f(x_1,x_2,0)$

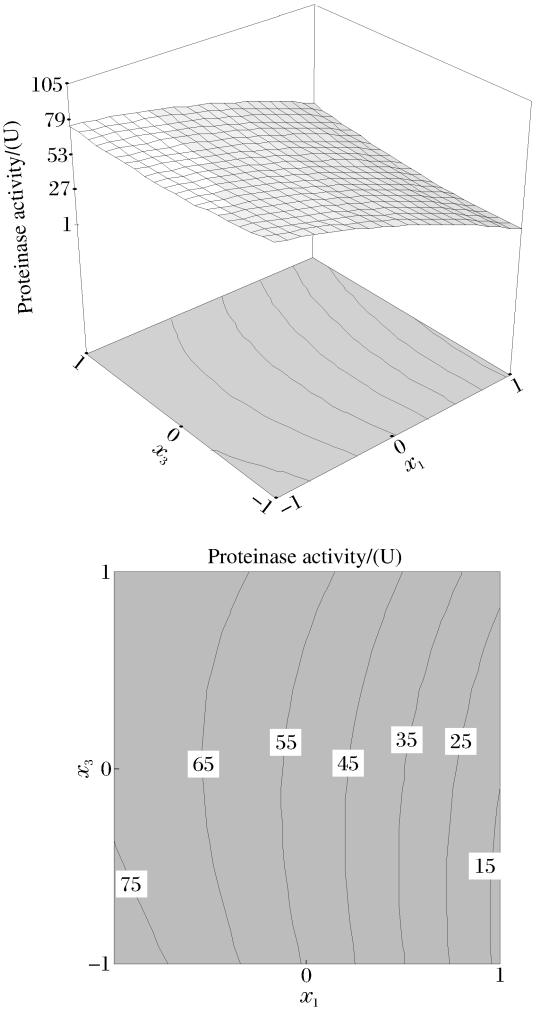


图 2 $Y=f(x_1,0,x_3)$的响应曲面和等高线

Fig. 2 Response surface and contours of $Y=f(x_1,0,x_3)$

3.1.4　温度与时间的影响

图 3 为 $x_1=0$,即在固定压力为 300 MPa 的条件下,温度与时间因素的响应曲面和等高线。图 3 表明温度是杆菌胞外蛋白酶活性的显著影响因素,而时间的影响并不明显。在时间固定不变的情况下,随着温度的增加,酶活降低,处理时每增加 6～10 ℃,酶活衰减 10 U;在温度固定不变的情况下,随着时间的增加,酶活衰减程度较小;压力与时间的交互作用也不明显。在 300 MPa 条件下,温度和时间不能使蛋白酶完全失活,最低时,酶活预测值仍有 22 U。

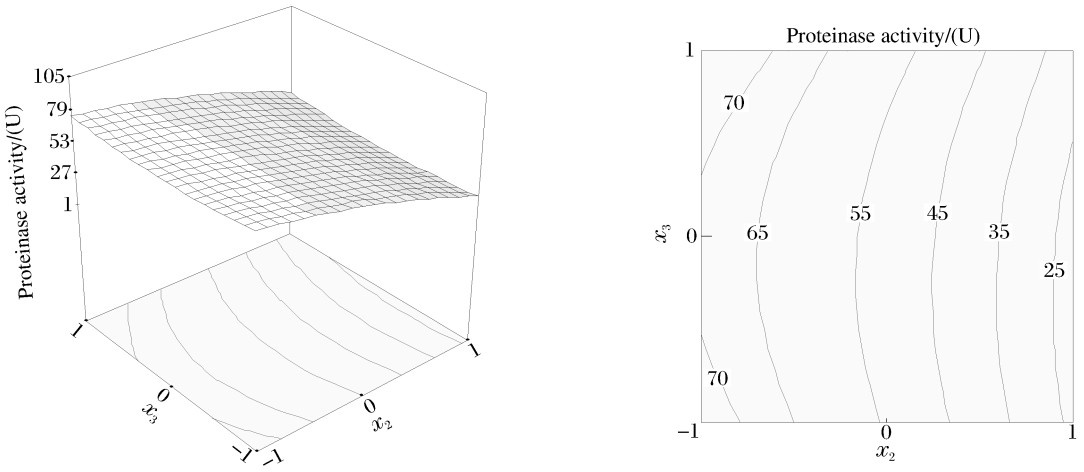


图 3　$Y=f(0,x_2,x_3)$的响应曲面和等高线

Fig. 3　Response surface and contours of $Y=f(0,x_2,x_3)$

3.1.5　单因素响应分析

图 4 为单因子响应曲线图,即将其它两个因素固定在中等水平的条件下,每个独立因素对响应变化的影响。图 4 提示在 3 个因素中压力对蛋白酶活性的影响最大,在本实验条件下,压力的作用可使蛋白酶活衰减预测值为 58 U;温度的影响也十分显著,温度的作用可使蛋白酶活衰减预测值为 48 U;而时间的影响较小。

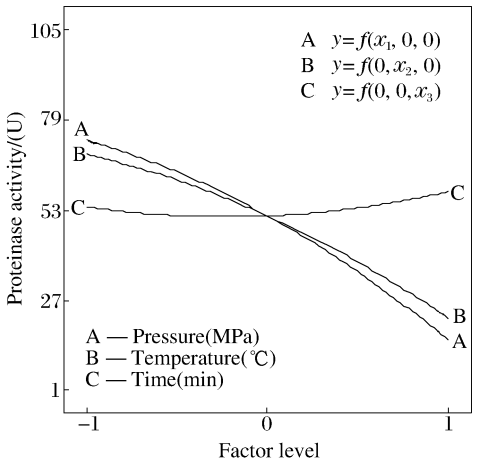


图 4　单因子响应曲线图

Fig. 4　Response curves of single factor

3.2　超高压对枯草杆菌的致死效应与胞外酶的活性相关性分析

在对枯草杆菌胞外酶活性检测的同时,实验还对枯草杆菌的存活情况进行了计数,实验结果见表 4。为使数据更直观,利用 SPSS 软件对两组实验值取对数进行数据转换,并对两组数据的相关性进行了分析,结果显示相关系数 $R=0.933\,0$,两者相关性达到极显著水平($P<0.01$)。由此可知,超高压对枯草杆菌的致死作用与胞外酶活的变化高度一致。

表 4 存活菌数及其与胞外酶蛋白酶活性的相关性

Table 4 Correlation of survival count and exoproteinase activity of *Bacillus subtilis*

Trial No.	Survival count		Proteinase activity	
	Actual/(cfu · mL^{-1})	$\log_{10}$	Actual/(U)	$\log_{10}$
1	290 000	5.46	78.66	1.90
2	3 130	3.50	50.67	1.70
3	1 960	3.29	32.89	1.52
4	290 000	5.46	82.65	1.92
5	896	2.95	26.32	1.42
6	121	2.08	6.14	0.79
7	6 910	3.84	78.64	1.90
8	708	2.85	18.23	1.26
9	125 000	5.10	78.57	1.90
10	4 210	3.62	58.44	1.77
11	3 250	3.51	48.27	1.68
12	1 960	3.29	46.34	1.67
13	468 000	5.67	96.66	1.99
14	429	2.63	19.48	1.29
15	896	2.95	24.63	1.39
16	201	2.30	9.53	0.98
17	3 820	3.58	53.42	1.73

Note: $R=0.933\,0$, significance at 0.01 level.

4 讨 论

(1) 胞外酶是原核单细胞生物的重要酶系,由于大分子物质不能进入胞内,为获取营养和满足生存发育需要,在进化过程中菌体将某些酶类在胞内合成并分泌到胞外,其中包括了降解大分子的胞外酶系,它们整联在质膜上,或存于周质空间,或在细胞外基质中,在代谢和生理过程中发挥重要作用。本实验选择胞外蛋白酶,是基于以下三点考虑:一、胞外蛋白酶是枯草杆菌的核心酶类之一,其作用主要是将环境中蛋白质水解为小分子的多肽或游离的氨基酸,为菌体持续提供可利用的氮源[6],本实验为对数期细菌,生命活动最为活跃,如果缺乏氮源或氮源不可利用,那将是对菌体细胞致命的威胁;二、胞外蛋白酶处于胞外,缺乏保护,对外界压力敏感,为超高压处理提供了直观可检测的指标;三、胞外酶分离工艺简单,操作便捷、经济,且能完整的收集样品,精确度高。

(2) 响应曲面法是数学方法和统计学方法相结合的产物,可对多个变量引起的响应进行建模和分析。本工作利用该方法快速建立了响应模型,实验次数少,分析结果精确、直观。实验结果与分析表明,所建立的模型显著,其决定系数 $R_2=0.974\,7$,调整决定系数 $R_{2,\mathrm{adj}}=0.942\,1$,表明模型可以解释 97.21%的响应值的变化,拟合度高,实验误差小,因此,应用该模型可以对超高压处理枯草杆菌胞外蛋白酶的活性进行分析和预测。

(3) 压力和温度均是影响酶活的热力学因素,压力和温度都有可能通过破坏蛋白质的空间结构及(或)酶活中心而使酶不同程度地失活,或造成菌体损伤,不能合成新的酶系,酶活降低。在本实验条件下,压力的独立作用可使蛋白酶活衰减 58 U;温度的独立作用可使蛋白酶活衰减 48 U;压力比时间更为显著。两者不仅可独立显著影响酶活,本文中 3.1 节分析表明,两者交互作用极显著,在两个因素的共同作用下,最终可使酶活为零。因此在超高压处理时,适当的温度协同作用,可起到事半功倍的效果。

(4) 超高压处理后枯草杆菌的存活数量与胞外蛋白酶活的变化相关性达到极显著水平($R=0.9330$)。正常情况下枯草杆菌大约 25 min 可完成一个生命周期,因此在短时间内,需要有大量的氮源合成蛋白质,以满足生理代谢需要和修复外界因子劣变造成的损伤。由于超高压作用的高度均一性,除直接使细菌破裂解体外,在多数情况下,表现为不同程度的损伤,如果损伤轻微,并得到了及时修复,细菌就可能成活,其中包括蛋白酶在内的一系列酶系在修复中将发挥重要作用;如不能修复,则随着时间延长(可能几小时或更长),细菌必然死亡。据此可以推测,胞外酶的失活与菌体致死可能存在一定的因果关系。微生物的致死率一般是通过直接计数得到的,而计数则需在高压处理后进行微生物培养,时间长,且存在取样、计数等环节的人为误差。由于高度相关,通过胞外酶活性的检测,可间接地反映超高压对枯草杆菌的致死情况。

5　结　论

超高压处理对枯草杆菌胞外蛋白酶产生显著影响,其中压力和温度是酶失活的主要因素,并且两者之间存在交互作用,超高压处理时温度协同有效。利用 Design Expert 进行实验设计并建立了二次多项回归方程,$Y=51.43-28.82x_1-23.63x_2+2.23x_3-7.02x_1^2-5.93x_2^2+4.86x_3^2+12.92x_1x_2+5.22x_1x_3+1.29x_2x_3$,模型显著,可用于高压处理枯草杆菌的分析和研究。超高压处理后枯草杆菌的致死作用与胞外蛋白酶活的变化高度一致,胞外酶的失活是致死的原因之一,胞外酶的变化可作为超高压处理对微生物影响的一个检测指标。

References:

[1] Li Z J, Fang W, Xu J X. A Review on High Pressure Bioscience and Biotechnology [J]. Acta Biophysica Sinica, 2004, 20(1): 1-6. (in Chinese)
李宗军,方　武,徐建兴. 高压生物科学与技术研究进展 [J]. 生物物理学报,2004,20(1):1-6.

[2] Farkas D F, Hoover D G. High Pressure Processing [J]. J Food Sci, 2000, 65(Supl): 47-64.

[3] Zeng Q M, Pan J, Xie H M, et al. Effect of High Pressure Treatments on PPO Activity in Pear Juices [J]. Chinese Journal of High Pressure Physics, 2004, 18(2): 144-148. (in Chinese)
曾庆梅,潘　见,谢慧明,等. 超高压处理对多酚氧化酶活性的影响 [J]. 高压物理学报,2004,18(2):144-148.

[4] Zeng Q M, Pan J, Xie H M, et al. Influence of Ultra High Pressure on Microorganisms 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.

[5] Zeng Q M. Review of Study on Enhancement Methods of Ultra High Pressure Processing to Foodstuff [J]. Chinese Journal of Food Science, 2004, 25(10): 346-350. (in Chinese)
曾庆梅. 降低超高压杀菌压力的协同措施研究进展 [J]. 食品科学,2004,25(10):346-350.

[6] Tang X Y, Wen Ch Q. Relation between Proteinase and α-Amylase Synthesis in Proteinase Mutants of *Bacillus Subtilis*. [J]. Industrial Microbiology, 2003, 33(2): 19-26. (in Chinese)
唐欣韵,温崇庆. 枯草杆菌蛋白酶突变株蛋白酶和 α-淀粉酶合成的关系 [J]. 工业微生物,2003,33(2):19-26.

[7] Gao Y L, Wang Y X, Jiang H H. Optimization of Conditions to Sterilize Staphloccus Aureus by Ultra High Hydrostatic Pressure Using Response Surface Methodology [J]. Chinese Journal of High Pressure Physics, 2004, 18(3): 273-278. (in Chinese)
高瑀珑,王允祥,江汉湖. 响应曲面法优化超高压杀灭金黄色葡萄球菌条件的研究 [J]. 高压物理学报,2004,18(3):273-278.

[8] Ritz M, Jugiau F, Rama F, et al. Inactivation of *Listeria monocytogenes* by High Hydrostatic Pressure: Effects and Interactions of Treatment Variables Studied by Analysis of Variance [J]. Food Microbiology, 2000, 17: 375-382.

[9] Erkmen O, Dogan C. Kinetic Analysis of *Escherichia coli* Inactivation by High Hydrostatic Pressure in Broth and Foods [J]. Food Microbiology, 2004, 21: 181-185.

[10] Dogan C, Erkmen O. High Pressure Inactivation Kinetics of *Listeria monocytogenes* Inactivation in Broth, Milk, and Peach and Orange Juices [J]. J Food Eng, 2004, 62: 47-52.

[11] Kristien M, Carine C, Kris C, et al. Kinetic Analysis and Modelling of Combined High-Pressure-Temperature Inactivation of the Yeast *Zygosaccharomyces bailii* [J]. Int Food Microbiology, 2000, 56: 199-210.

[12] Spilimbergo S, Elvassore N, Bertucco A. Microbial Inactivation by High-Pressure [J]. J Supercritical Fluids, 2002, 22: 55-63.

Effect of High Pressure on Exoproteinase of *Bacillus subtilis*

XIE Hui-Ming[1], HUANG Xun-Duan[1,2], PAN Jian[1], ZENG Qing-Mei[1], WANG Hai-Xiang[1], JIANG Ye-Lei[1]

(1. *Engineering Research Center of Bio-Process, Ministry of Education, Hefei University of Technology, Hefei* 230009, *China*;
2. *School of Life Sciences, Anhui University, Hefei* 230039, *China*)

Abstract: We studied the effect of high pressure process (HPP) on exoproteinase of *Bacillus subtilis* by using Box-Behnken response surface methodology. Experimental results showed that HPP could inhibit activity of exoproteinase significantly. In the course of treatment, pressure and temperature were key factors to passivate enzyme, and their interaction was notable. A model of exoproteinase passivation was established by design expert software, which determination coefficient was 0.974 7 and adjusted determination coefficient was 0.942 1. Analysis of variance implied that the model was significant. Therefore, the model could be used to analyze and predict. Additionally, the experiment indicated that exoproteinase activity correlated with lethal rate significantly (R=0.933 0). The exoproteinase could be regarded as an index to evaluate effect of HPP on microorganism.

Key words: high pressure process (HPP); *Bacillus subtilis*; exoproteinase; response surface methodology