

加压 CO₂ 对大肠杆菌细胞膜的损伤作用

姚春艳^{1,2} 刘美凤¹ 付瑞东¹ 李晓东^{1*}

(1. 东北农业大学 食品学院 乳品科学教育部重点实验室 黑龙江 哈尔滨 150030)

(2. 黑龙江职业学院 食品工程学院 黑龙江 哈尔滨 150080)

摘要: 【目的】细菌细胞膜的损伤可以表现在细菌细胞内物质泄漏和细菌细胞吸收染料。与巴氏杀菌(63 °C、30 min)比较, 研究加压 CO₂ 对大肠杆菌细胞膜的损伤作用, 目的是分析出大肠杆菌死亡与细胞膜损伤的关系。【方法】检测大肠杆菌细胞膜通透性的改变情况, 大肠杆菌内蛋白质和核酸的泄漏程度, 并通过透射电镜观察大肠杆菌形态的改变情况。【结果】在研究范围内, 加压 CO₂ 处理使大肠杆菌细胞膜通透性发生改变; 加压 CO₂ 处理时虽然发生了胞内蛋白质泄漏, 但发生泄漏的时间明显滞后于 99% 以上菌体死亡时间, 因此并不是大肠杆菌死亡的原因, 只是大肠杆菌死亡后的继发现象; 大肠杆菌死亡与加压 CO₂ 处理导致的胞内核酸泄漏有关; 大肠杆菌死亡与加压 CO₂ 处理导致的菌体形态改变有关。【结论】加压 CO₂ 对大肠杆菌细胞膜的损伤作用与菌体死亡有直接关系。

关键词: 加压 CO₂, 大肠杆菌, 细胞膜通透性, 蛋白泄漏, 核酸泄漏, 细菌超微结构

Damaging effect of pressurized CO₂ on cell membrane of *Escherichia coli*

YAO Chun-Yan^{1,2} LIU Mei-Feng¹ FU Rui-Dong¹ LI Xiao-Dong^{1*}

(1. Key Laboratory of Dairy Science in Ministry of Education, College of Food in Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

(2. College of Food Engineering, Heilongjiang Polytechnic, Harbin, Heilongjiang 150080, China)

Abstract: [Objective] The damage in the cell membrane of bacteria could be reflected on the

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金资助课题(No. 20092325110010); 教育部留学回国人员科研启动基金资助项目; 博士后研究人员落户黑龙江科研启动资助项目; 哈尔滨市科学技术局留学回国人员基金项目(No. 2012RFLXN033)

*通讯作者: Tel: 86-451-55190459; 信箱: hrblxd@163.com

收稿日期: 2012-04-13; 接受日期: 2012-07-06

leakiness of the material in bacteria and the absorption of dye in bacteria. Compared with pasteurization (63 °C, 30 min), the damaging effect of pressurized CO₂ on the cell membrane of *Escherichia coli* was studied. The aim of the study was to analyze the relationship between the death of *Escherichia coli* and the damage of cell membrane. [Methods] The change of cell membrane permeability and the leakiness of protein and nucleic acid in *Escherichia coli* were detected. The change of *Escherichia coli* morphology was observed by TEM. [Results] The results indicated that pressurized CO₂ treatment induced the change of cell membrane permeability of *Escherichia coli*. Pressurized CO₂ treatment induced the leakiness of protein in *Escherichia coli*, but the time of leakiness was lagged behind the time of 99% *Escherichia coli* death, so it was not the reason for death, it was only the secondary phenomenon of death. The death of *Escherichia coli* could be related to the leakiness of nucleic acid induced by the pressurized CO₂ treatment. The death of *Escherichia coli* could be related to the ultrastructure change of *Escherichia coli* induced by the pressurized CO₂ treatment. [Conclusion] There was direct relationship between the damaging effect of pressurized CO₂ on cell membrane of *Escherichia coli* and the death of *Escherichia coli*.

Keywords: Pressurized CO₂, *Escherichia coli*, Cell membrane permeability, Protein leakiness, Nucleic acid leakiness, Ultrastructure of bacterium

CO₂ 是一种天然抗菌剂, 单独作用能抑制微生物生长, 但不能杀死微生物, 而与压力结合则能达到有效的杀菌效果^[1]。加压 CO₂ 杀菌在一些文献中也被称作高密度 CO₂ 杀菌, 是指利用高于或接近于临界温度 (31.1 °C) 和临界压力 (7.13 MPa) 的 CO₂ 对食品进行杀菌的技术^[2]。作为一种近年发展起来的新型非热力杀菌技术, 加压 CO₂ 杀菌温度温和, 在低于传统热杀菌的温度下能达到杀菌效果, 因此对食品原料的热敏性成分破坏小, 有利于保持食品的原有品质。此外, 加压 CO₂ 杀菌的处理压力低, 压力容易达到且容易控制, 逐渐成为食品非热力杀菌技术的研究热点。Garcia-Gonzalez 等在综述中总结了加压 CO₂ 杀菌机理的可能步骤: (1) CO₂ 溶解导致菌体细胞外部液相 pH 值的降低; (2) 细胞膜发生改变; (3) 细胞内 pH 值降低; (4) 关键酶失活或细胞代谢受到抑制; (5) CO₂ 分子或 H₂CO₃ 分子直接抑制细胞代谢; (6) 细胞内电解质平衡破坏; (7) 细胞和细胞膜中的重要组分被移除^[3]。

细菌的细胞壁与细胞膜共同构成了菌体细胞的保护性屏障, 这在抵抗外界环境改变等方面发挥重要作用, 当它们被破坏时会使菌体变形, 细胞膜通透性发生改变, 造成细胞内物质比如蛋白质、核酸等发生泄漏, 这将会直接影响到细菌的生长代谢, 甚至造成菌体死亡。Garcia-Gonzalez 等和 Isenschmid 等提出未水化的 CO₂ 分子进入菌体细胞膜中能够通过化学作用改变细胞膜的流动性并会因此增加细胞膜的通透性^[3-4]。Jian Zhang 等使用加压 CO₂ 和 H₂O₂ 结合对芽孢杆菌进行杀菌时发现菌体细胞膜的通透性增大, H₂O₂ 进入到菌体细胞内使细菌死亡^[5]。Hong 等指出, 突然加压和卸压会破坏菌体细胞膜, 但多数人认为 CO₂ 的作用更大一些, 加压 CO₂ 对菌体细胞膜的破坏作用可能包括细菌耐盐能力的丧失, 细菌细胞内物质的泄漏和细菌细胞对染料吸收等^[6]。Oulé、Spilimbergo 和 Garcia 等研究了加压 CO₂ 处理对菌体细胞膜通透性的影响^[7-9]。Garcia、Kim 和吴垠等使用透射电镜研究了加压 CO₂ 处理导致

的菌体结构改变和细胞膜损伤^[9-11]。饶伟丽研究了高密度 CO₂ 处理对菌体蛋白的影响^[12]。目前虽然有学者已经研究了加压 CO₂ 对细菌细胞壁和细胞膜的破坏作用, 但对其破坏程度以及细胞内物质泄漏情况的研究还很少见。

大肠杆菌的遗传背景清楚、培养条件和操作技术简单, 是国家消毒试验标准菌株之一。本试验以大肠杆菌为研究对象, 目的是使用加压 CO₂ 处理大肠杆菌后, 观察其菌体细胞形态的变化情况, 检测菌体细胞膜通透性是否发生改变及改变程度, 并进一步检测菌体细胞内蛋白质和核酸是否发生泄漏及泄漏情况, 旨在探明加压 CO₂ 对大肠杆菌细胞壁和细胞膜的破坏作用与菌体死亡之间的关系, 为进一步研究加压 CO₂ 杀菌机理提供佐证的试验数据和理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料和培养基

大肠杆菌(CICC 21525)购于中国工业微生物菌种保藏管理中心; 食品级 CO₂ 气体购于哈尔滨啤酒厂。

营养琼脂培养基(g/L): 蛋白胨 5, 氯化钠 5, 牛肉膏 3, 琼脂 15-20, 蒸馏水 1 L。1×10⁵ Pa 灭菌 15 min。

1.2 加压设备

图 1 是 Erkmen 设计的加压 CO₂ 杀菌试验设备^[13]。本试验使用的加压 CO₂ 反应釜是改自这个设备, 见图 2。反应釜 7 由不锈钢制成、体积为 100 mL, 釜内放置一个磁力转子, 其搅拌速度由反应釜下面的磁力搅拌器调控。反应釜内菌液和 CO₂ 的温度由恒温水浴槽 8 调控。

1.3 试验方法

1.3.1 菌悬液的制备方法: 首先取一环营养琼脂斜面培养的大肠杆菌, 接种至 250 mL 营养琼脂液体培养基中, 置于恒温振荡培养箱, 在 30 °C、

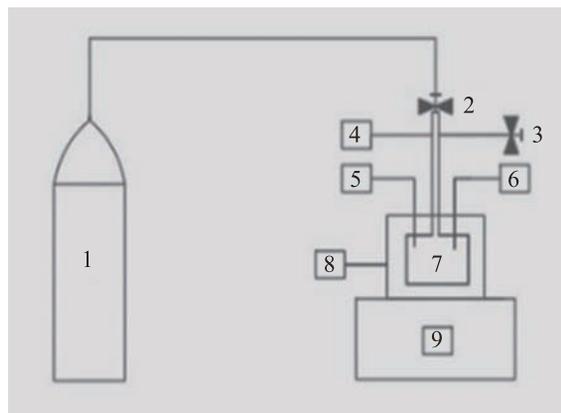


图 1 加压 CO₂ 试验设备示意图

Fig. 1 Schematic diagram of equipment for pressurized CO₂ treatment

注: 1: CO₂ 贮气钢瓶; 2: CO₂ 进气阀; 3: CO₂ 排气阀; 4: 压力表; 5: 热电偶; 6: 压力传感器; 7: 加压釜; 8: 水浴槽; 9: 温度调节控制器。

Note: 1: CO₂ gas cylinder; 2: Needle valve for CO₂ inlet; 3: Needle valve for CO₂ outlet; 4: Pressure gauge; 5: Thermocouple; 6: Pressure transducer; 7: Pressure vessel; 8: Water bath; 9: Thermostatic controller.



图 2 加压 CO₂ 试验设备图

Fig. 2 Equipment for pressurized CO₂ treatment

150 r/min 下培养 18-24 h, 然后取 50 mL 菌液在 8 000 r/min 下离心 10 min, 弃去上清液并用磷酸缓冲溶液将沉淀洗涤 3 次, 最后向沉淀中加入 50 mL 磷酸缓冲溶液, 用旋涡混匀器振荡 20 s 使细菌悬浮均匀, 浓度为 10⁸-10⁹ CFU/mL。

1.3.2 加压 CO₂ 的处理方法: 先向加压釜中通入 CO₂ 赶走残留空气, 再向加压釜中加入 50 mL 左

右大肠杆菌菌悬液, 菌悬液和 CO₂ 需在设定温度的水浴中保持一段时间, 然后向加压釜中通入 CO₂ 至一定的压力并保压一定时间, 加压完成后取出菌悬液。

1.3.3 菌数的测定方法: 采用 GB4789.3-2008 平板计数法, 用营养琼脂培养基于 30 °C 培养 48 h 计数。

1.3.4 杀菌率的计算方法: 杀灭率(%) = $\frac{N_0 - N}{N_0} \times 100$

其中 N 为杀菌后菌数(CFU/mL), N_0 为杀菌前菌数(CFU/mL)。

1.3.5 细胞膜相对通透率的测定方法: 先向菌悬液中加入荧光染料 PI 至终染色浓度为 2.9 μmol/L 并将菌悬液放入加压 CO₂ 加压釜中, 然后将加压 CO₂ 处理后的菌悬液放在 37 °C 的暗处孵化 10 min, 再将菌悬液在 8 000 r/min 下离心 10 min, 用磷酸缓冲溶液洗涤重悬, 重复 2 次, 最后用荧光分光光度计检测处理完的菌悬液, 检测指标为荧光强度, 其激发光波长为 495 nm、发射光波长为 615 nm、狭缝宽度为 10 nm。PI 染料可以穿过通透性增大的菌体细胞膜并且嵌入到 DNA 分子的双链区域而发出荧光, 检测菌体细胞内荧光强度的改变可以得出细菌细胞膜通透性的改变情况。将巴氏杀菌(63 °C、30 min)菌悬液的荧光强度作为阳性对照, 将其荧光强度设置为 100%, 细胞膜相对通透率按下式计算^[14]:

$$\text{细胞膜相对通透率(\%)} = \frac{\text{处理菌液荧光强度}}{\text{阳性对照菌液荧光强度}} \times 100。$$

1.3.6 细胞内蛋白质泄漏量的测定方法: 采用考马斯亮蓝染色法。取处理菌液上清液 0.01 mL, 用未处理细菌上清液调零, 在波长 595 nm 下测吸光值, 并通过蛋白标准曲线将吸光度值转换为蛋白含量(g/L)。每个加压 CO₂ 处理菌液的蛋白质泄漏量为其蛋白质浓度与未处理菌液蛋白质浓度的差值。蛋白质浓度-吸光值标准曲线如图 3 所示。

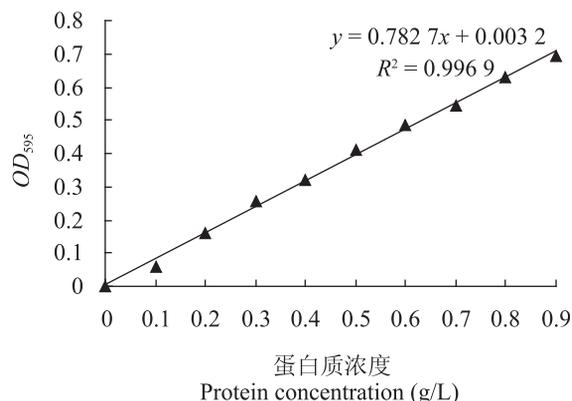


图 3 蛋白标准曲线

Fig. 3 Protein standard curve

1.3.7 细胞内核酸泄漏量的测定方法: 将待测菌液在 8 000 r/min 下离心 10 min, 然后取 1 mL 上清液将其置于石英比色皿中, 使用紫外分光光度计检测, 检测波长为 260 nm^[15]。

1.3.8 透射电镜样品的制备及观察方法: 固定: 在 4 °C 下用 3% 戊二醛将菌体沉淀固定 4 h, 用 0.2 mol/L 的磷酸漂洗液漂洗 15 min 共 3 次, 用 1% 锇酸固定 2 h, 用 0.2 mol/L 的磷酸漂洗液漂洗 15 min 共 3 次。脱水: 在 4 °C 下用 50% 乙醇浸泡 15–20 min, 用 70% 乙醇浸泡过夜, 用 90% 乙醇浸泡 15–20 min, 用 90% 乙醇与 90% 丙酮 (1:1, V/V) 的混合液浸泡 15–20 min, 用 90% 丙酮浸泡 15–20 min。浸透: 在室温下用 100% 丙酮浸泡 15 min 共 3 次, 用 100% 丙酮与包埋剂 (2:1, V/V) 的混合液浸透 3–4 h, 用 100% 丙酮与包埋剂 (1:2, V/V) 的混合液浸透过夜, 在 37 °C 下用纯包埋剂浸透过夜。包埋: 将样品置于包埋块的槽子前端, 加入包埋剂置于 37 °C 恒温箱内过夜, 取出包埋块置于 45 °C 恒温箱内聚合 12 h, 转移至 60 °C 恒温箱内聚合 24 h。切片: 用超薄切片机切成 50 nm–60 nm 的超薄切片, 用铜网捞片后自然晾干。染色: 用醋酸铀枸橼酸与铅染液进行双染色。观察: 在透射电子显微镜下观察并拍片。

2 结果与讨论

2.1 加压 CO₂ 对大肠杆菌的杀灭效果

这个试验的目的是为后续试验提供加压 CO₂ 对大肠杆菌杀灭率的数据, 以作为讨论加压 CO₂ 对大肠杆菌细胞膜损伤作用与菌体死亡关系的基础。本试验使用的试验设备和采用的试验条件不能达到超临界 CO₂ 状态。从前期研究结果得知在低压范围内(<15 MPa), 时间和温度对杀灭效果具有显著的影响, 而压力的影响相对不显著, 因此我们以时间和温度作为变量来讨论加压 CO₂ 对大肠杆菌细胞膜的损伤。从图 4 结果可知, 在本试验的加压参数范围内, 大肠杆菌的杀灭率随着加压时间的延长而提高, 在 25 °C、7.5 MPa 下加压 40 min 时的杀灭率达到 98.04%, 在 45 °C、7.5 MPa 下加压 20 min 时的杀灭率达到 91.65%, 加压 30 min 时的杀灭率达到 99.14%。

2.2 加压 CO₂ 处理后大肠杆菌细胞膜通透性的改变情况

PI 是大分子染料, 不能穿过完整的细胞膜, 而当细胞膜受损、通透性变大时, PI 染料可以穿过菌体细胞膜并且嵌入到 DNA 分子的双链区域而发出荧光。因此通过检测加压 CO₂ 处理前后细

菌荧光强度的改变可以得出细菌细胞膜通透性的改变情况^[14]。

从图 5 可知, 在 25 °C、7.5 MPa 加压 50 min 的范围内, 大肠杆菌的细胞膜通透性随加压时间延长呈增加趋势, 这与 2.1 中的杀灭率曲线变化相同, 说明当加压 CO₂ 处理使大肠杆菌逐渐致死的过程中, 确实伴随发生了菌体细胞膜通透性的逐渐变大, 分析原因为当加压时间延长时, 菌体细胞膜的非极性成分更容易受到 CO₂ 的溶解萃取作用从而改变膜的流动性和通透性。但是, 虽然在此条件下导致大肠杆菌的细胞膜通透性从 15.88% 增加到 42.54%, 但是与巴氏杀菌的 88.20% 相比, 差异极显著 ($P < 0.01$), 说明加压 CO₂ 杀菌机理与热杀菌不同, 不能使细胞膜的通透性发生全透改变, 由此说明还有其他原因导致大肠杆菌死亡。

当处理温度升高到 45 °C 时, 在前 20 min 内, 细胞膜通透率从 13.19% 增加到 55.25%, 而在 20 min 时的杀菌率是 91.65%, 这说明菌体死亡同时确实伴随发生了菌体细胞膜通透性的逐渐变大。但是当加压时间继续延长时, 细胞膜通透性却呈现下降趋势, 在加压 20–30 min 这段时间内, 细胞膜通透性从 55.25% 下降到 52.74%, 而从 2.1 结果可知杀菌率却是从 91.65% 增加到 99.14%, 说明在这段时间大肠杆菌的死亡已经与其细胞膜通透性的变化无关。但这个结果与 Spilimbergo 等的研究结果不同, Spilimbergo 等也使用 PI 染料研究了超临界 CO₂ 对菌体细胞膜的损伤作用, 使用的温度为 36 °C^[8]。而本试验使用的加压温度为 45 °C, 高于 36 °C, 此外, 与超临界状态下处于流体状态的 CO₂ 分子的萃取作用不同, 加压 CO₂ 杀菌是在高于或接近于临界温度和临界压力下进行, 随着加压时间的延长, 有更多的 CO₂ 分子发生水化生成 H₂CO₃ 并且电离产生 H⁺, 推测菌体细胞外环境 pH 降低的同时菌体细胞内 pH 也

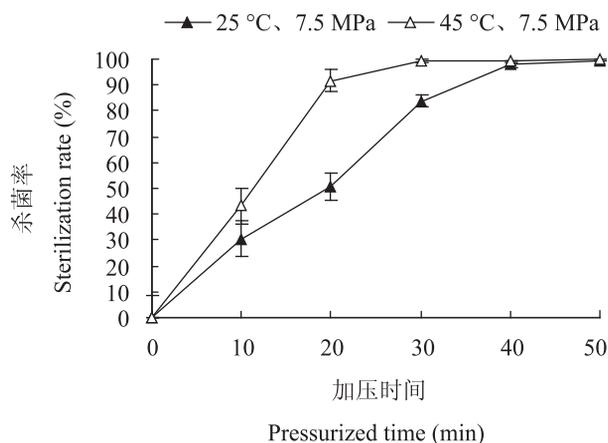
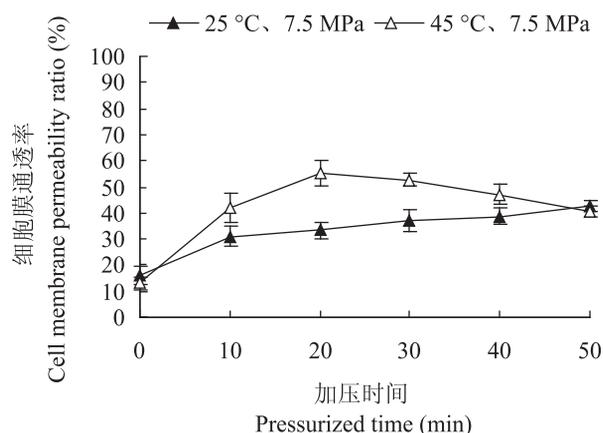


图 4 加压 CO₂ 对大肠杆菌的杀灭效果

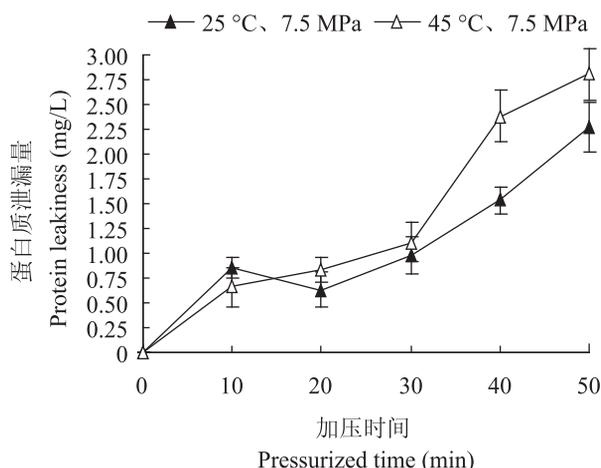
Fig. 4 Inactivation effect of pressurized CO₂ on *Escherichia coli*

图 5 加压 CO₂ 对大肠杆菌细胞膜通透性的影响Fig. 5 Effect of pressurized CO₂ on cell membrane permeability of *Escherichia coli*

发生降低。细胞内 DNA 分子在较低 pH 下更加敏感并容易发生变性, 加之 DNA 分子在结合染料后其双螺旋构象对于环境改变是更加敏感的, 因此推测此时发生了 DNA 分子的变性即双螺旋解链, 而 PI 染料在穿过菌体细胞膜以后只有嵌入到 DNA 分子的双链区域才可发出荧光, 所以此时由于 DNA 分子的双螺旋结构被部分破坏而使荧光强度变小, 结果就是测得的细胞膜通透性变小。这个结果与 Garcia 等在 21 MPa、45 °C 下加压 CO₂ 处理 20 min 时测定的 PI 吸收因子的减小相似^[9]。这说明在 45 °C 下使用加压 CO₂ 杀菌时菌体细胞内的核酸变性可能是导致大肠杆菌死亡的原因之一, 而这个结论是否成立还需要进行其他试验加以阐明。

2.3 加压 CO₂ 处理后大肠杆菌蛋白质泄漏情况

本试验研究杀菌后的菌液在离心后的上清液中蛋白质的增加情况。从图 6 可以看出, 在 10–50 min 期间内, 在 25 °C 和 45 °C 两个温度下, 随着加压时间的延长, 蛋白质均存在泄漏情况并且呈现出增加趋势。但是短时加压导致的菌体蛋白质泄漏量在加压 50 min 时分别为在 25 °C 下的 2.28 mg/L 和在 45 °C 下的 2.81 mg/L, 这与试验得

图 6 短时加压 CO₂ 处理大肠杆菌蛋白质泄漏情况Fig. 6 Protein leakiness in *Escherichia coli* under pressurized CO₂ treatment of short time

到的巴氏杀菌的 15.71 mg/L 相比, 差异极显著 ($P < 0.01$), 这个结果与前述的使菌体细胞膜通透性增加较明显的结论不一致。

推测有两种可能情况发生, 一是菌体细胞膜通透性的增大程度较小, 形成的孔隙还不足以使细胞内蛋白质泄漏到细胞外, 所以短时处理导致的泄漏量确实极小。二是 CO₂ 分子水化生成 H₂CO₃ 并且电离产生 H⁺ 可导致菌体细胞内 pH 下降, 但是降低程度是未知的, 因此有可能使菌体内蛋白质发生变性聚集, 这时即使细胞膜通透性在变大, 但聚集后的蛋白质也无法渗透到细胞外, 导致检测到的蛋白质泄漏量极低。

为了解释这个问题, 本试验继续研究了长时加压 CO₂ 处理后的大肠杆菌蛋白质泄漏情况, 从图 7 结果可知, 在 2–10 h 期间, 蛋白质泄漏量都是随着时间延长呈增加趋势的, 在 25 °C 下加压 8 h 的泄漏量达到 18.96 mg/L, 略超巴氏杀菌的 18.07 mg/L, 加压 10 h 的蛋白质泄漏量达到了 23.83 mg/L, 极显著 ($P < 0.01$) 地大于巴氏杀菌的 15.71 mg/L; 而在 45 °C 下加压 6 h 的泄漏量就已经达到 17.54 mg/L, 超过巴氏杀菌 15.71 mg/L。此结果说明当采用长时间加压 CO₂ 处理时, 菌体

蛋白质的泄漏量继续增加,并且能够超过巴氏杀菌,因此说明菌体细胞内蛋白质并没有发生变性聚集。此外,菌体蛋白质泄漏量与巴氏杀菌相当时的处理时间(分别为 25 °C 下的 8 h 和 45 °C 下的 6 h)明显滞后于 99% 以上菌体死亡的时间 40 min,由此说明长时加压 CO₂ 杀菌时虽然发生了菌体蛋白质泄漏,但是这并不是导致菌体死亡的原因,这种泄漏情况只是加压 CO₂ 处理导致大肠杆菌死亡以后的一个继发现象。饶伟丽的研究发现高密度 CO₂ 处理后的大肠杆菌碱溶性蛋白并未完全变性,蛋白变性并不是导致菌体死亡的唯一原因,与热杀菌机理有所不同^[12],本试验结果与饶伟丽的结果一致。

2.4 加压 CO₂ 处理后大肠杆菌核酸泄漏情况

从 2.2 的结果可知加压 CO₂ 处理可使大肠杆菌的细胞膜发生损伤,而随之发生的可能有细胞内容物的泄漏。菌体细胞内的核酸在波长 260 nm 处具有最大紫外吸收值,并且吸光值与核酸浓度成正比。本试验以未处理菌液和巴氏杀菌菌液作为对照,通过检测菌悬液离心后其上清液紫外吸光值的改变,研究加压 CO₂ 处理后菌体细胞内核

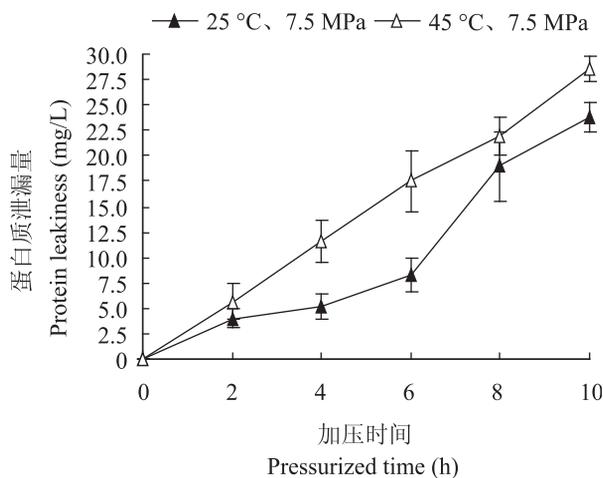


图 7 长时加压 CO₂ 处理大肠杆菌蛋白质泄漏情况
Fig. 7 Protein leakiness in *Escherichia coli* under pressurized CO₂ treatment of long time

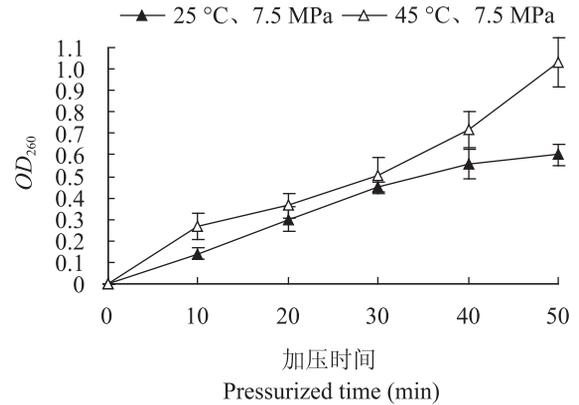
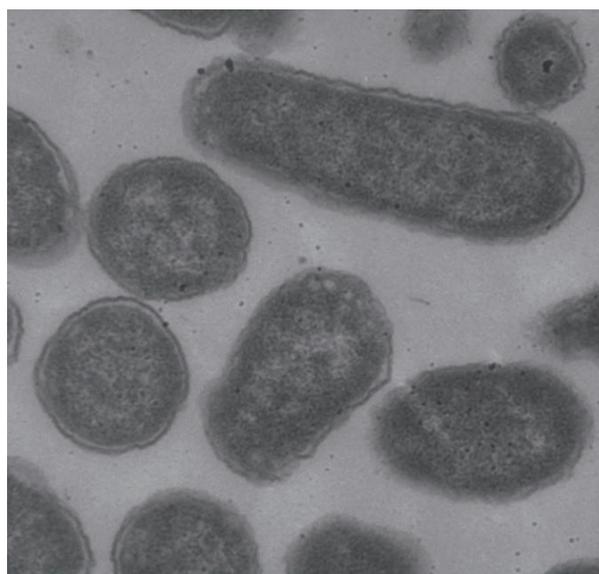


图 8 加压 CO₂ 处理大肠杆菌核酸泄漏情况
Fig. 8 Nucleic acid leakiness in *Escherichia coli* under pressurized CO₂ treatment

酸的泄漏情况。从图 8 可知,在 7.5 MPa、25 °C 和 45 °C 两个温度下,在加压 CO₂ 处理的 10–50 min 期间内,菌体细胞内的核酸都存在泄漏情况,并且都是随着加压时间的延长呈现出增加趋势。在 45 °C 下加压 50 min 时,紫外吸收值为 1.032 与巴氏杀菌的 1.160 相比差异不显著 ($P>0.05$),这说明此时核酸泄漏程度已经和巴氏杀菌导致的核酸泄漏程度相当。同时从细菌存活的角度分析,在两个温度下加压 50 min 时,已经有 99% 以上的大肠杆菌死亡,由此可推断菌体细胞膜通透性变大而引起的核酸泄漏是加压 CO₂ 将大肠杆菌杀死的原因之一。

2.5 加压 CO₂ 处理后大肠杆菌菌体形态的改变情况

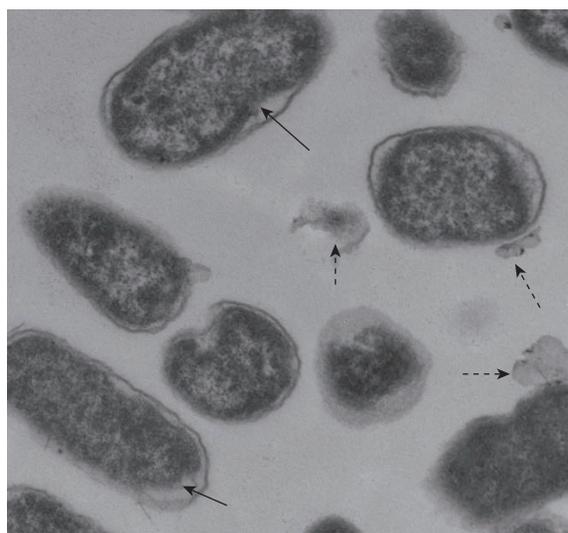
图 9 是未处理的大肠杆菌,正常大肠杆菌的形态完整,菌体呈杆状或近似椭圆形状,菌体细胞壁的外表面光滑平整、内表面与细胞质之间没有空隙,细胞内容物分布均匀。图 10 是经过巴氏杀菌的大肠杆菌,其菌体结构没有发生很大变化,但可以看到在菌体细胞壁与细胞质之间出现可见空隙,如图 10 中实线箭头所示;此外还有细胞内物质的泄漏现象,如图 10 中的虚线箭头所示。



HV Mag Date Mic
100 kV 40 000 x 11-11-03, 9:30 H-7650 — 1 μm —

图 9 未处理的大肠杆菌(40 000×)

Fig. 9 Untreated *Escherichia coli* (40 000×)

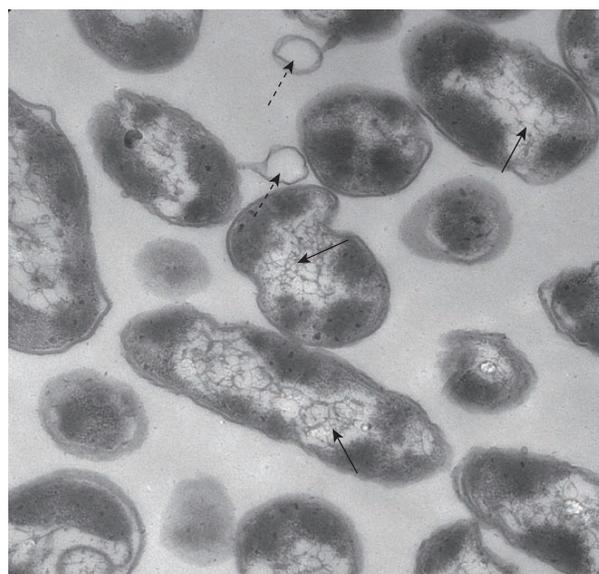


— 1 μm —

图 10 巴氏杀菌的大肠杆菌(40 000×)

Fig. 10 Pasteurized *Escherichia coli* (40 000×)

图 11 是在 25 °C 下加压 40 min 后的大肠杆菌。与未处理菌体相比,多数菌体发生变形,分析是高压的机械力所致,菌体细胞质出现明显的分布不均和聚集收缩现象,在多数菌体细胞壁与细胞质之间出现了分离空泡现象,如图 11 实线箭



HV Mag Date Mic
100 kV 40 000 x 11-11-03, 11:48 H-7650 — 1 μm —

图 11 25 °C、7.5 MPa 下加压 40 min 的大肠杆菌(40 000×)

Fig. 11 Pressurized *Escherichia coli* for 40 min under 25 °C, 7.5 MPa (40 000×)

头所示,这个结果与 Garcia 等^[9]和吴垠^[11]的结果相同。从图 11 还可见菌体确实出现了细胞内物质泄漏情况,如图 11 中的虚线箭头为膨胀穿过菌体细胞壁的小空隙的细胞内物质,其周围被一层薄膜包围。此外,与 Oulé 等的研究结果不同,本试验没有发现大肠杆菌细胞膜破裂的现象,而 Oulé 等观察到加压 CO₂ 处理后大肠杆菌的细胞膜碎片^[7]。

图 12 是在 45 °C 下加压 40 min 后的大肠杆菌。与未处理菌体相比,多数大肠杆菌严重变形,菌体细胞壁边缘变得模糊不清,有的菌体细胞壁破裂,甚至还出现菌体溶解现象,如图 12 的虚线箭头所示;多数菌体出现细胞质密度很低的空白区域,如 12 图实线箭头所示。而从大肠杆菌存活的角度分析,在 25 °C 和 45 °C 这两个温度下加压 40 min 时,99% 以上的菌体已经死亡,这说明菌体死亡与菌体形态改变有关,但在 7.5 MPa 的低压下加压并没有导致菌体完全破裂,说明加压 CO₂ 杀菌机理与超高压杀菌所导致的菌体破裂杀菌机理不同。



图 12 45 °C、7.5 MPa 下加压 40 min 的大肠杆菌 (40 000×)

Fig. 12 Pressurized *Escherichia coli* for 40 min under 45 °C, 7.5 MPa (40 000×)

3 结论

在本试验使用的加压参数范围内,从加压 CO₂ 对大肠杆菌细胞膜损伤作用的研究结果可以得到以下结论:

(1) 25 °C 下加压 50 min, 细胞膜通透性从 15.88% 增加到 42.54%, 极显著低于巴氏杀菌的 88.20% ($P<0.01$); 45 °C 下加压 30 min, 杀菌率从 91.65% 增加到 99.14%, 细胞膜通透性却是从 55.25% 下降到 52.74%, 推测是由于胞内 DNA 分子双螺旋发生解链而导致测得的荧光强度变小所致。

(2) 短时(50 min)加压导致的胞内蛋白泄漏量 2.28 mg/L 和 2.81 mg/L 极低于巴氏杀菌的 15.71 mg/L ($P<0.01$), 原因是细胞膜通透性增大的程度还不足以使细胞内蛋白质泄漏到细胞外; 长时(10 h)加压导致的蛋白泄漏量虽显著 ($P<0.01$) 高于巴氏杀菌, 但明显滞后于 99% 以上

菌体死亡时间(40 min), 因此不是菌体死亡的原因, 只是菌体死亡后的继发现象。

(3) 45 °C 下加压 50 min, 胞内核酸的紫外吸收值 1.032 与巴氏杀菌的 1.160 差异不显著 ($P>0.05$), 推断大肠杆菌的死亡与细胞膜通透性变大而引起的核酸泄漏有关。

(4) 在 25 °C 和 45 °C 加压都使菌体变形, 细胞质出现明显的分布不均和聚集收缩现象, 细胞壁与细胞质之间出现了分离空泡现象, 细胞内物质发生泄漏现象, 在 45 °C 加压还出现菌体溶解现象, 推断菌体死亡与加压 CO₂ 处理导致的菌体形态改变有关。

参 考 文 献

- [1] 薛源, 桂芬琦, 孙志健, 等. 高压 CO₂ 技术杀菌灭酶效果及其机理研究进展[J]. 食品工业科技, 2006, 27(3): 203-205.
- [2] 谢宏, 韩冰, 张德权. 高密度 CO₂ 在牛奶杀菌中的应用研究[J]. 食品工业, 2010(2): 83-85.
- [3] Garcia-Gonzalez L, Geeraerd AH, Spilimbergo S, et al. High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: the past, the present and the future[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 117(1): 1-28.
- [4] Isenschmid A, Marison IW, Stockar U. The influence of pressure and temperature of compressed CO₂ on the survival of yeast cells[J]. Journal of Biotechnology, 1995, 39(3): 229-237.
- [5] Jian Z, Nishita D, Michael A, et al. Supercritical carbon dioxide and hydrogen peroxide cause mild changes in spore structures associated with high killing rate[J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 70(3): 442-451.
- [6] Hong SI, Pyun YR. Membrane damage and enzyme inactivation of *Lactobacillus plantarum* by high pressure CO₂ treatment[J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 63(1/2): 19-28.
- [7] Oulé MK, Tano K, Bernier AM. *Escherichia coli* inactivation mechanism by pressurized CO₂[J].

- Canadian Journal of Microbiology, 2006, 52(12): 1208-1217.
- [8] Spilimbergo S, Mantoan D, Quaranta A, et al. Real-time monitoring of cell membrane modification during supercritical CO₂ pasteurization[J]. Journal of Supercritical Fluids, 2009, 48(1): 93-97.
- [9] Garcia L, Geeraerd AH, Mast J, et al. Membrane permeabilization and cellular death of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Saccharomyces cerevisiae* as induced by high pressure carbon dioxide treatment[J]. Food Microbiology, 2010, 27(4): 541-549.
- [10] Kim SR, Park HJ, Yim DS, et al. Analysis of survival rates and cellular fatty acid profiles of *Listeria monocytogenes* treated with supercritical carbon dioxide under the influence of cosolvents[J]. Journal of Microbiological Methods, 2008, 75(1): 47-54.
- [11] 吴垠. 微生物在加压 CO₂ 下的致死过程及机理研究[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2006.
- [12] 饶伟丽. 高密度 CO₂ 对大肠杆菌菌体蛋白影响的研究[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2009.
- [13] Erkmen O. Inactivation of *Salmonella typhimurium* by high pressure carbon dioxide[J]. Food Microbiology, 2000, 17(2): 225-232.
- [14] Pagan R, Mackey B. Relationship between membrane damage and cell death in pressure-treated *Escherichia coli* cells: differences between exponential-and stationary-phase cells and variation among strains[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(7): 2829-2834.
- [15] Aronsson K, Ronner U, Borch E. Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Saccharomyces cerevisiae* in relation to membrane permeabilization and subsequent leakage of intracellular compounds due to pulsed electric field processing[J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 99(1): 19-32.

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: (1) 本刊要求作者投稿时在正文前写上主要作者的简介, 并指出自己的工作(已发表的文章)在综述中的体现, 同时请在稿件中用不同颜色标出来。(2) 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。