

高压热杀菌处理 对枯草杆菌芽孢皮层裂解酶活力的影响

章 中,孙 静,张津瑜,郭洪伟,贺晓光

(宁夏大学农学院,宁夏银川 750021)

摘 要:高压热杀菌处理(HPTS)下芽孢皮层肽聚糖水解是造成细菌芽孢死亡的重要原因,芽孢自身皮层裂解酶活力变化对皮层肽聚糖水解有直接影响。本文从枯草杆菌芽孢中提取了皮层裂解酶,先研究了磷酸钠浓度、pH、温度和压力对皮层裂解酶活力的影响,在此基础上研究了 HPTS 对该酶活力的影响。结果发现,皮层裂解酶的最适磷酸钠浓度为 0.05 mol/L,当磷酸钠浓度为 0.35 mol/L 时,皮层裂解酶活力较低;当 pH 为 7 时,皮层裂解酶活力最强,偏酸或偏碱性条件下,活力均有所降低;在 4~44 ℃ 时皮层裂解酶均具活力,酶活变化无明显规律,但当温度升至 68 ℃ 时皮层裂解酶基本失活;在 150~530 MPa 压力范围内,压力对皮层裂解酶活性基本无影响,然而 HPTS 处理时(530 MPa,68 ℃、15 min),皮层裂解酶基本失活,而皮层裂解酶是芽孢中唯一能特异性地水解皮层肽聚糖的酶,由此可推测 HPTS 处理下皮层肽聚糖发生了非酶水解。

关键词:高压热杀菌,枯草杆菌,芽孢,皮层裂解酶,肽聚糖

Effects of High Pressure Thermal Sterilization on the Activity of Cortex-Lytic Enzyme Extracted from *Bacillus subtilis* Spores

ZHANG Zhong, SUN Jing, ZHANG Jin-yu, GUO Hong-wei, HE Xiao-guang

(College of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract: The hydrolysis of spore's cortical peptidoglycan under HPTS treatment was a critical reason for spore inactivation. However, the hydrolysis principle was still not clear. The activity change of spore's cortex-lytic enzyme had direct effects on hydrolysis of cortical peptidoglycan. The cortex-lytic enzyme was extracted from *Bacillus subtilis* spores, and the effects of sodium phosphate concentration, pH values, temperature and pressure on the activity of extracted enzyme were studied firstly, which was a basis for further research on HPTS's effects on the activity. It was found that the optimal concentration of sodium phosphate was 0.05 mol/L, and when the concentration was 0.35 mol/L, the enzyme activity was the lowest. The optimal pH for the enzyme was 7, and at acidic or alkaline conditions its activity decreased. At 4~44 ℃ the enzyme had activity with no obvious change rule, but when the temperature increased to 68 ℃ the enzyme lost basically its activity. At 150~530 MPa, the pressure had almost no effects on activity of the enzyme, but HPTS treatment (530 MPa, 68 ℃, 15 min) inactivated the cortex-lytic enzyme basically, and it was the only enzyme in the spore that could hydrolyze cortical peptidoglycan specially, which suggested that non-enzymatic hydrolysis of spore's cortical peptidoglycan occurred under HPTS treatment.

Key words: high pressure thermal sterilization; *Bacillus subtilis*; spores; cortex-lytic enzyme; peptidoglycan

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2018)15-0090-06

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2018.15.017

引文格式:章中,孙静,张津瑜,等.高压热杀菌处理对枯草杆菌芽孢皮层裂解酶活力的影响[J].食品工业科技,2018,39(15):90-95.

芽孢是细菌营养体在缺乏营养的环境条件下形成的休眠态,对辐照、超高压、热、超声波、微波、化学物质等各种杀菌处理有极强的抗性^[1-4]。高压热杀菌处理(HPTS)将超高压和温度耦合起来杀菌,对细菌芽孢有良好的杀灭作用,且对食品品质影响较小^[5-6]。Uchida等^[7]报道HPTS(600 MPa、65 ℃)能杀

灭酸土脂环酸芽孢杆菌芽孢。Ates等^[8]报道HPTS(650 MPa、65 ℃、10 min)能杀灭4.5个对数的枯草芽孢杆菌芽孢。Evelyn等^[9]报道:HPTS(400~600 MPa、70 ℃)能杀灭牛奶中的蜡样芽孢杆菌芽孢,Weibull模型能很好地描述芽孢死亡动力学。Luu-Thi等^[10]报道HPTS(300~600 MPa、60~100 ℃)能杀灭蜡样芽

收稿日期:2017-11-10

作者简介:章中(1977-),男,博士,副教授,研究方向:果蔬非热加工,E-mail:zhangzhong99@126.com。

基金项目:国家自然科学基金项目(31460410);国家自然科学基金项目(31760474)。

孢杆菌芽孢, HPTS 处理下初期芽孢死亡较快、后期较慢, 但两个阶段均可用一级动力学模型描述。HPTS 对芽孢的杀灭作用和杀菌动力学已有广泛报道, 但关于 HPTS 杀灭芽孢的机理却鲜有报道。芽孢的皮层是其耐压特性的关键结构, 皮层主要由肽聚糖构成, 前期研究发现 HPTS 处理下细菌芽孢皮层肽聚糖发生了水解^[1], 这是导致芽孢死亡的重要原因之一, 然而其水解机理尚不明确, 存在两种仅有的可能性: 其一是 HPTS 能激活芽孢自身的皮层裂解酶, 其二是 HPTS 未能激活皮层裂解酶, 而芽孢中唯一能特异地水解皮层肽聚糖的酶^[1], 即 HPTS 能导致皮层肽聚糖的非酶水解。

在休眠的芽孢中, 皮层裂解酶不表现出活性, 但在芽孢萌发而转变成营养体的过程中, 皮层裂解酶通过某种机制被激活并将皮层肽聚糖水解, 这是芽孢萌发过程中的一个重要步骤^[11]。Reineke 等^[12]认为 HPTS 可能会影响皮层裂解酶的活性, 在一定压力和温度条件下, 皮层裂解酶可能会被激活, 导致芽孢皮层水解, 进而使得芽孢结构被破坏。Mathys 等^[13]认为, HPTS 处理下芽孢内部的 2、6-吡啶二羧酸(DPA)的释放可能会激活皮层裂解酶, 从而将芽孢皮层水解, 进而导致芽孢死亡。关于压力和温度对酶蛋白构象影响的报道很多^[14-16], 但未见有关温度和压力对芽孢皮层裂解酶活力影响的研究报道。

本实验从枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的芽孢中提取皮层裂解酶, 研究温度、pH、磷酸钠浓度、压力和 HPTS 对芽孢皮层裂解酶活力的影响, 以分析 HPTS 处理下芽孢皮层肽聚糖的水解机理, 进一步阐明 HPTS 杀灭芽孢的机理, 夯实 HPTS 技术在食品工业中应用的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

枯草芽孢杆菌 中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC) 编号 As 1.433; 促芽孢生长锰盐营养琼脂培养基 向普通营养琼脂培养基中加入 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (使得培养基中 Mn^{2+} 的浓度为 50 mg/L), 调 pH 至 7, 灭菌, 备用; 2,6-吡啶二羧酸(DPA) 分析纯, 美国 Sigma 公司; L-丙氨酸、肌苷 上海瑞永生物科技有限公司; 其它化学试剂 均为分析纯, 天津市大茂化学试剂厂。

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; XMTD-6000 型电子恒温不锈钢水浴锅 上海宜昌仪器纱筛厂; LRH 系列生化培养箱 上海一恒科学仪器有限公司; GL-10C 型冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂; 722 型可见分光光度计 上海驰唐电子有限公司; FE28 型 pH 计 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; Agilent 1100 型 HPLC 色谱仪及数据处理平台 美国 Agilent 公司; Welch Ultimate AQ-C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 美国 Welch 公司; UV-2450 型紫外可见分光光度计 日本岛津公司。

1.2 实验方法

1.2.1 枯草杆菌芽孢菌悬液的制备 芽孢的制备参照 Gao^[17]的方法。枯草芽孢杆菌用营养琼脂培养基活化 3 代以上后, 接入促芽孢生长培养基试管斜面上划线培养, 经 37 ℃ 培养 7 d 后, 用无菌去离子水将试管斜面上的芽孢洗涤收集到离心管里, 然后用冷的无菌去离子水离心洗涤芽孢三次, 离心条件为 7000 × g, 4 ℃, 15 min, 离心后将上清液和沉淀的上部一起倒掉, 洗涤后的芽孢重悬在无菌去离子水中, 浓度约为 1.5×10^9 CFU/mL, 放在 4 ℃ 下保存, 一个月内使用。

1.2.2 脱芽孢衣芽孢的制备 脱芽孢衣芽孢的制备参照 Gombas^[18]的方法。将枯草杆菌芽孢用 30 mmol/L 十二烷基硫酸钠(SDS)、0.2 mol/L 2-巯基乙醇、0.1 mol/L 硼酸盐缓冲液(pH = 10.0)在 40 ℃ 下处理 8 h, 再用蒸馏水彻底洗干净。

1.2.3 芽孢萌发处理 萌发处理参照 Miyata^[19]和 Makino^[20]的方法。将枯草杆菌芽孢悬浮液(0.1 g/mL)在 65 ℃ 下热激活 45 min, 然后在冰水中冷却, 再经离心(7000 × g, 4 ℃, 15 min)沉淀后, 将芽孢置于 10 倍体积的、pH 为 7.0 的、30 mmol/L 的磷酸钠缓冲液中, 于 32 ℃ 下萌发, 磷酸钠缓冲液中含有 10 mmol/L 的 L-丙氨酸和 4 mmol/L 的肌苷。通过测定芽孢悬浮液 OD₆₀₀ 值的变化来判断萌发的情况。

1.2.4 皮层裂解酶提取 皮层裂解酶提取参照 Gombas^[18]和 Makino^[20]的方法。在萌发处理后, 将芽孢悬浮液离心(8000 × g, 4 ℃, 10 min), 取上清液(50 mL)在 4 ℃ 透析处理 2 次, 每次 24 h, 透析对照液为 2 L、0.05 mol/L、pH = 7.0 的磷酸钠缓冲液, 缓冲液中含有 1 mmol/L 的乙二胺四乙酸(EDTA)和 1 mmol/L 的巯基乙酸钠。

1.2.5 皮层裂解酶活性分析 皮层裂解酶会导致脱芽孢衣芽孢萌发^[19]。芽孢萌发时, 其核心部分水化, 导致其折光性发生变化, 表现为脱芽孢衣芽孢悬浮液 OD₆₀₀ 值显著下降, 下降程度越高, 芽孢的萌发率就越高, 皮层裂解酶活性也就越高^[21]。皮层裂解酶的活性分析参照 Miyata^[19]和 Makino^[20]的方法。在 32 ℃ 下, 通过测定 1 cm 光路内脱除芽孢衣的芽孢悬浮液的 OD₆₀₀ 值的减少量来评价酶的活性。反应混合物最终体积为 5 mL, 包含 1 mL 脱芽孢衣芽孢悬浮液和 4 mL 酶液, 酶液包含 0.05 mol/L 磷酸钠缓冲液(pH = 7.0)、1 mmol/L 的 EDTA 和 1 mmol/L 的巯基乙酸钠。酶活性单位(U/L)定义为: 每分钟 OD₆₀₀ 值降低 0.001 所需的酶量。计算公式为:

$$X = \frac{\Delta \text{OD}_{600}}{0.001 \times t \times V} \times 1000$$

式中: X 为酶活(U/L), t 为反应时间(min), V 为参与反应的酶量(mL)。

1.2.6 RP-HPLC 法检测 DPA DPA 检测参照 Fichtel^[22]的方法。使用 C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 柱温 30 ℃, 流动相是 20% 的甲醇和 80% 的磷酸氢钠溶液(浓度为 50 mmol/L, 用磷酸调整 pH 至 2.5), 流速为 1.0 mL/min, 进样量为 10 μL, 采用紫

外检测器检测,检测波长为 272 nm。

1.2.7 各因素对皮层裂解酶活力的影响

1.2.7.1 温度对皮层裂解酶活力的影响 取 4 mL 透析后的酶液,酶液包含 0.05 mol/L、pH 为 7.0 磷酸钠缓冲液,分别于 4、12、20、28、36、44、68 °C 培育 20 min,对照组为 4 mL 无菌水在常温下放置 20 min,再向各组加入 1 mL 脱芽孢衣芽孢悬浮液,在 32 °C 下反应,每 10 min 测一次 OD₆₀₀ 值,根据 80 min 内 OD₆₀₀ 值变化量计算酶活。

1.2.7.2 pH 对皮层裂解酶活力的影响 分别调整酶液 pH 为 4、5、6、7、8、9、10,酶液包含 0.05 mol/L 的磷酸钠缓冲液,再各取 4 mL 酶液,对照组取 4 mL 无菌水,再向各组加入 1 mL 脱芽孢衣芽孢悬浮液,在 32 °C 下反应,每 10 min 测一次 OD₆₀₀ 值,根据 80 min 内 OD₆₀₀ 值变化量计算酶活。

1.2.7.3 磷酸钠浓度对皮层裂解酶活力的影响 将透析后酶液中的磷酸钠浓度分别调整为 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35 mol/L,酶液 pH 为 7,再取 4 mL 酶液,对照组为 4 mL 无菌水,再向各组加入 1 mL 脱芽孢衣芽孢悬浮液,在 32 °C 下反应,每 10 min 测一次 OD₆₀₀ 值,根据 80 min 内 OD₆₀₀ 值变化量计算酶活。

1.2.7.4 压力对皮层裂解酶活力的影响 将透析后的酶液(包含 0.05 mol/L、pH = 7.0 磷酸钠缓冲液)分别于常压、150、200、250、300、350、400、450、530 MPa 下处理 15 min,取处理后的酶液 4 mL,对照组为 4 mL 无菌水在常压放置 15 min,再向各组加入 1 mL 脱芽孢衣芽孢悬浮液,在 32 °C 下反应,每 10 min 测一次 OD₆₀₀ 值,根据 80 min 内 OD₆₀₀ 值变化量计算酶活。

1.2.7.5 HPTS 处理对皮层裂解酶活力的影响 将磷酸钠浓度为 0.05、0.35 mol/L 的两种透析后的酶液于 530 MPa、68 °C 下处理 15 min,取处理后的酶液 4 mL,对照组为 4 mL 透析后的酶液和 4 mL 无菌水在常压常压放置 15 min,再向各组加入 1 mL 脱芽孢衣芽孢悬浮液,在 32 °C 下反应,每 10 min 测一次 OD₆₀₀ 值,根据 80 min 内 OD₆₀₀ 值变化量计算酶活。

1.3 数据处理

所有实验重复三次,实验结果均以平均值 ± 标准差表示。数据采用 Origin 8.0 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 芽孢皮层裂解酶提取液中 DPA 测定

芽孢萌发渗出物中不但有皮层裂解酶,也有 DPA,而 DPA 也会诱导芽孢萌发,从而干扰实验结果,为此通过透析处理来去除皮层裂解酶提取液中的 DPA。通过全波段扫描可以看出在 272.5 nm 处 DPA 有最大吸收峰,因此选取 272 nm 作为检测波长。由图 1b~c 可知,DPA 的出峰时间为 4.64 min,而透析后的皮层裂解酶提取物仅在 2.37 min 时出现了一个峰,说明透析处理已将酶液中的 DPA 完全去除。

2.2 温度对皮层裂解酶活力的影响

由图 2 可知,在 4~44 °C 温度范围内时,芽孢悬浮液的 OD₆₀₀ 值与对照组相比,均显著下降($p < 0.05$),说明皮层裂解酶仍具活力,但是在此温度范围

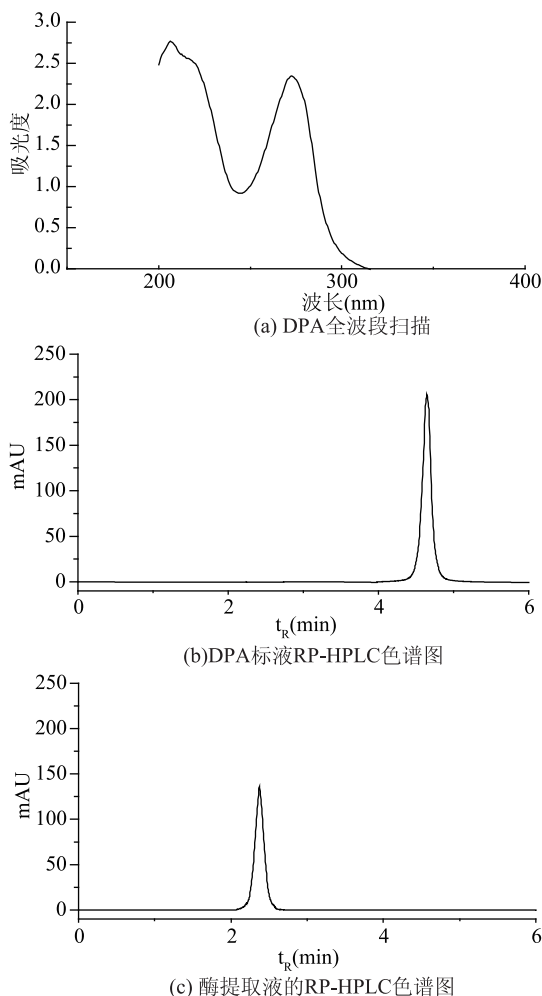


图1 芽孢皮层裂解酶提取液中 DPA 含量分析

Fig.1 DPA content analysis of cortical lyase extract of spores

内,皮层裂解酶活力的变化并没有明显规律。而当温度升至 68 °C 时,芽孢悬浮液 OD₆₀₀ 值与对照组基本没有变化,说明皮层裂解酶基本失活。Makino 等^[20]研究发现,60 °C 处理 2 min 或者 45 °C 处理 10 min 时,分离出的皮层裂解酶就已经完全失活。Ando 等^[23]研究发现,当处理温度为 45 °C 时皮层裂解酶活力最强,而当处理温度为 60 °C 时酶活显著降低,处理时间为 20 min 时酶完全失活。这些研究报道与本实验的结果有细微差异,这可能与菌种有关,菌种不同,皮层裂解酶的分子量、分子结构不同,对温度的耐受程度也不同,但以上研究报道均表明,60 °C 以上的热处理会造成皮层裂解酶失活。

2.3 pH 对皮层裂解酶活力的影响

由图 3 可知,皮层裂解酶对 pH 非常敏感,当 pH 为 4~7 时,随着 pH 的增大,芽孢悬浮液 OD₆₀₀ 值与对照组相比,下降幅度逐渐增大,说明皮层裂解酶活力逐渐增强;而当 pH 为 7~10 时,随着 pH 的增大,OD₆₀₀ 值与对照组相比,下降幅度逐渐减小,说明皮层裂解酶活力逐渐降低。当 pH 为 7 时,OD₆₀₀ 值的下降幅度最大,说明皮层裂解酶的活力最强。Miyata 等^[19]研究发现:当 pH 为 7.2~8.4 时,皮层裂解酶活力最佳,随着 pH 的减小,皮层裂解酶活力逐渐降低,当 pH 为 3.4 时,皮层裂解酶活力最低,这一研究报道与

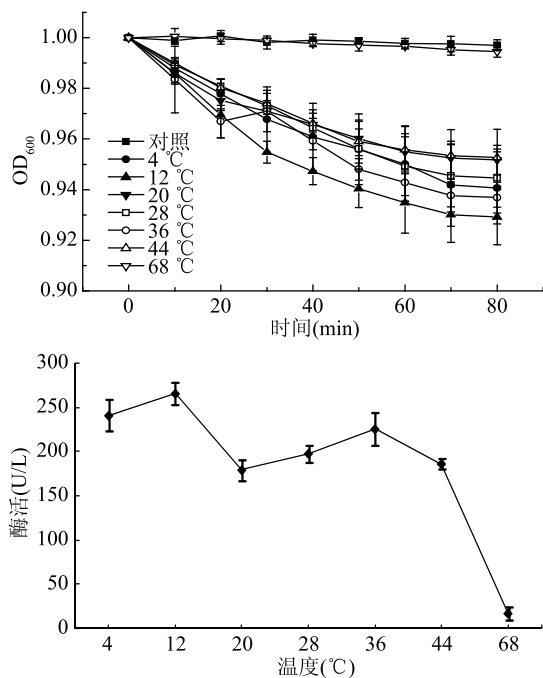


图2 温度对皮层裂解酶活力的影响

Fig.2 Effects of temperature on the activity of cortical lyases

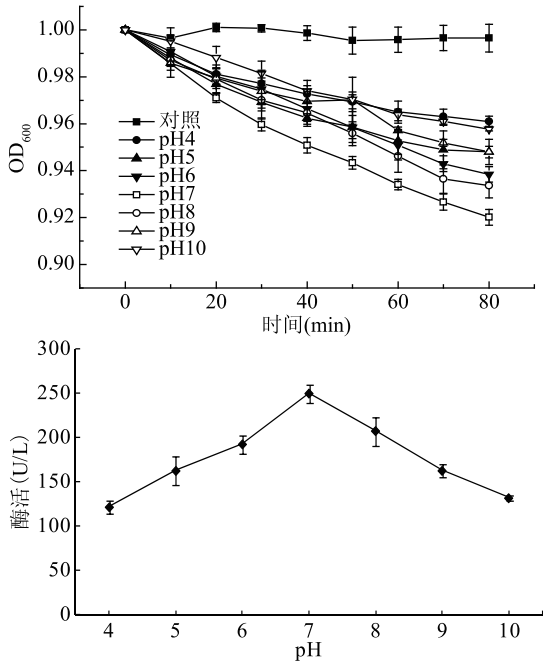


图3 pH对皮层裂解酶活力的影响

Fig.3 Effects of pH on the activity of cortical lyases

本实验结果基本一致。在研究其它因素对皮层裂解酶活力的影响时,将酶液的pH调整为7,以避免其对酶活的影响。

2.4 磷酸钠浓度对皮层裂解酶活力的影响

由2.3中的实验结果可知,pH是影响酶活性的一个重要因素,为维持稳定的pH,选用磷酸钠缓冲液,因此研究了磷酸钠浓度对皮层裂解酶活性的影响。由图4可知,随着磷酸钠浓度的增大,芽孢悬浮液OD₆₀₀值与对照组相比,下降幅度变小,说明皮层裂解酶的活力逐渐降低。当磷酸钠浓度为0.05 mol/L时,OD₆₀₀值与对照组相比,下降幅度最大,说明皮层

裂解酶最具活力。而当磷酸钠浓度为0.35 mol/L时,皮层裂解酶活性最小。这可能是由于该酶的催化部位对离子浓度非常敏感,离子浓度对形成精确的三维结构位点起着重要作用^[20],而高浓度钠盐形成的高渗透压作用及离子间静电作用破坏了某些酶结构,从而导致酶活性降低^[24]。在研究其它因素对皮层裂解酶活力的影响时,将磷酸钠浓度调整为0.05 mol/L,以避免其对酶活的影响。

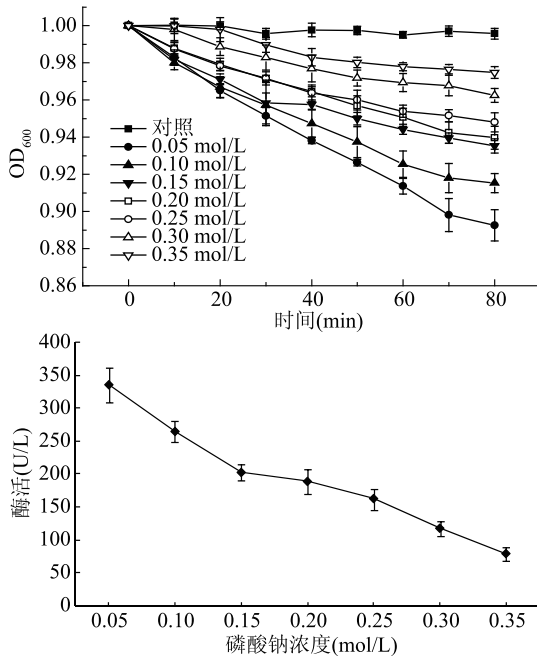


图4 磷酸钠浓度对皮层裂解酶活力的影响

Fig.4 Effects of sodium phosphate concentration on the activity of cortical lyases

2.5 压力对皮层裂解酶活力的影响

由图5可知,随时间增加,各处理压力下,芽孢悬浮液OD₆₀₀值呈不断下降趋势,处理压力较低时,芽孢悬浮液OD₆₀₀值与对照组相比下降速度较快,最终下降幅度较大。较常压相比,150、200 MPa下皮层裂解酶活力有所增强,当压力超过300 MPa时,皮层裂解酶活力逐渐降低,但仍无法灭活皮层裂解酶。有报道称超高压会改变酶的活力,郝梦甄等^[25]研究发现在较低压力范围内,随着压力的升高,海参体壁粗酶的酶活逐渐升高,250 MPa处理时,酶活达到最高值。陈发庆等^[26]研究超高压对核桃多酚氧化酶和过氧化物酶的影响时发现,当压力在200 MPa以下时,多酚氧化酶和过氧化物酶的活力随着压力升高而增大,但当压力超过200 MPa时,两种酶的活力随压力升高而逐渐减小。在超高压处理下,不同酶的活力变化是不同的,这是由于酶的种类和分子结构等不同而造成的。

2.6 HPTS处理对皮层裂解酶活力的影响

由2.4中结果可知,0.05 mol/L磷酸钠浓度对皮层裂解酶活力影响最小,为进一步排除磷酸钠浓度对HPTS杀灭芽孢效果的影响,选用高纯水制备芽孢悬浮液以模拟天然的HPTS杀菌环境,发现HPTS处理下0.05 mol/L磷酸钠溶液(pH=7.0)中的芽孢死亡率和高纯水中芽孢死亡率无显著差异($p > 0.05$)。由

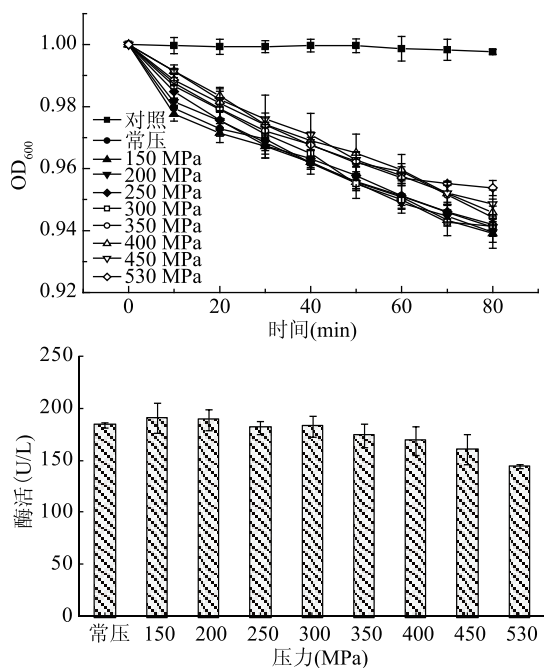


图5 压力对皮层裂解酶活力的影响

Fig.5 Effects of pressure on the activity of cortical lyases

图6可知,经530 MPa、68℃处理15 min后,0.05 mol/L磷酸钠溶液(pH=7.0)中的皮层裂解酶基本失活,表现为芽孢悬浮液OD₆₀₀值基本无变化。有文献报道^[14]:随压力和温度的变化,以压力和温度为横、纵坐标,酶构象和活力的变化呈现出一个椭圆形区域,在这个椭圆形区域内酶有活力,而在这个椭圆形区域外酶失活。实验结果表明,在530 MPa和68℃下,皮层裂解酶位于失活区域,HPTS处理不但没有激活皮层裂解酶,反而使得皮层裂解酶失去了活性,由此可推测HPTS处理下,芽孢皮层肽聚糖的水解方式是非酶水解,

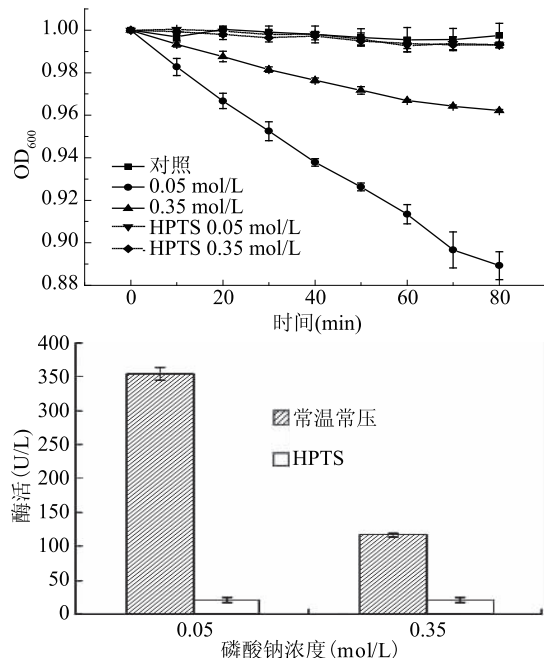


图6 HPTS处理对皮层裂解酶活力的影响

Fig.6 Effects of HPTS treatment on the activity of cortical lyases

这对揭示HPTS杀灭细菌芽孢的机理有重要意义。

3 结论

本文研究了磷酸钠浓度、pH、温度和压力对枯草杆菌芽孢皮层裂解酶活力的影响,在此基础上研究了HPTS对该酶活力的影响。结果发现,皮层裂解酶的最适磷酸钠浓度为0.05 mol/L,当磷酸钠浓度为0.35 mol/L时,皮层裂解酶活力较低;最适pH为7,偏酸或偏碱性条件下,活力均有所降低;温度升至68℃时皮层裂解酶基本失活;在150~530 MPa压力范围内,压力对皮层裂解酶活性基本无影响,然而HPTS处理时(530 MPa、68℃、15 min),皮层裂解酶基本失活。HPTS处理下芽孢皮层肽聚糖水解机理仅有两种可能性,其一是HPTS激活皮层裂解酶,其二是HPTS导致皮层肽聚糖的非酶水解。实验结果表明,HPTS处理不但没能激活皮层裂解酶,反而导致了该酶的失活,由此可推测HPTS处理下芽孢皮层肽聚糖的水解方式是非酶水解。本实验推进了对HPTS杀灭芽孢机理的理解,有助于HPTS技术在食品工业中的应用。

参考文献

- [1]章中.热和化学因素辅助超高压对枯草杆菌芽孢的灭活研究[D].北京:中国农业大学,2013.
- [2]章中,杨宏伟,胡济美,等.化学物质辅助超高压处理对枯草杆菌芽孢的作用[J].中国食品学报,2015,15(5):47-53.
- [3]黄甜甜,陆利霞,姚丽丽,等.食品中芽孢杀灭新技术[J].食品工业科技,2012,33(3):391-394.
- [4]钱静亚,马海乐,李树君,等.温度、超声、nisin协同脉冲磁场杀灭枯草芽孢杆菌的研究[J].现代食品科技,2013,29(12):2970-2974.
- [5]任欣,姜阁,沈群.高压热处理对复合芝麻酱品质特性的影响[J].中国食品学报,2016,16(8):140-148.
- [6]Zhang Z, Jiang B, Liao X, 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.
- [7]Uchida R, Silva F V M. *Alicyclobacillus acidoterrestris*, spore inactivation by high pressure combined with mild heat: Modeling the effects of temperature and soluble solids[J]. Food Control, 2017, 73:426-432.
- [8]Ates B, Skipnes D, Rode T M, et al. Comparison of spore inactivation with novel agitating retort, static retort and combined high pressure-temperature treatments[J]. Food Control, 2016, 60:484-492.
- [9]Evelyn E, Silva F V M. High pressure processing of milk: Modeling the inactivation of psychrotrophic *Bacillus cereus* spores at 38-70℃[J]. Journal of Food Engineering, 2015, 165:141-148.
- [10]Luu-Thi H, Grauwet T, Vervoort L, et al. Kinetic study of *Bacillus cereus* spore inactivation by high pressure high temperature treatment[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2014, 26:12-17.
- [11]Black E P, Setlow P, Hocking A D, et al. Response of spores to high-pressure processing[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2007, 6(4):103-119.

- [12] Reineke K, Mathys A, Heinz V, et al. Mechanisms of endospore inactivation under high pressure [J] . Trends in Microbiology, 2013, 21(6) :296–304.
- [13] Mathys A, Reineke K, Heinz V, et al. High pressure thermal sterilization – development and application of temperature controlled spore inactivation studies [J]. High Pressure Research, 2009, 29(1) :3–7.
- [14] Eisenmenger M J, Reyes–De–Corcuera J I. High pressure enhancement of enzymes: A review [J] . Enzyme & Microbial Technology, 2009, 45(5) :331–347.
- [15] Chen K, Sun X, Chen G, et al. Combined action of high pressure, temperature, pH and time on jack bean α -mannosidase activity [J] . Advance Journal of Food Science & Technology, 2013, 5(1) :5–8.
- [16] Terefe N S, Delon A, Versteeg C. Thermal and high pressure inactivation kinetics of blueberry peroxidase [J] . Food Chemistry, 2017, 81(4) :820–826.
- [17] Gao Y L, Ju X R, Jiang H H. Studies on inactivation of *Bacillus subtilis* spores by high hydrostatic pressure and heat using design of experiments [J] . Journal of Food Engineering, 2006, 77(3) :672–679.
- [18] Gombas D E, Labbe R G. Extraction of spore-lytic enzyme from *Clostridium perfringens* spores [J] . Journal of General Microbiology, 1981, 126(1) :37–44.
- [19] Miyata S, Moriyama R, Sugimoto K, et al. Purification and

(上接第 82 页)

- [29] 鞠磊,王静雪,林洪,等.一株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌噬菌体 qdsa002 的分离鉴定及其生理学性质研究[J].食品工业科技,2016(16):230-233.
- [30] 宋增福,徐华东,彭孟凡,等.两株副溶血弧菌烈性噬菌体的分离鉴定[J].水生生物学报,2017(4):793-799.

(上接第 89 页)

- [J].食品与发酵工业,2011,37(1):26-31.
- [6]蔡明迪.超高压及超声波处理对黄酒陈化过程的影响研究[D].广州:华南理工大学,2012.
- [7]汪建国.黄酒的贮存与色香味关系[J].中国酿造,2007,26(10):48-52.
- [8]郑飞云,姜甜,董建军,等.酒类主要风味物质对乙醇-水体系中氢键的影响[J].食品科学,2010,31(9):106-112.
- [9]Nose A. Hydrogen bonding in alcoholic beverages (distilled spirits) and water-ethanol mixtures[J].J Agric Food Chem,2005,53(2):7074-7081.
- [10]杨星,曾新安,樊荣.白酒模拟体系氢键缔合时效性核磁共振研究[J].食品工业科技,2011,32(7):112-114.
- [11]Nose A, Hojo M. Hydrogen bonding of water-ethanol in alcoholic beverages[J].J Biosci Bioeng,2006,102(4):269-280.
- [12]王琳,曾庆梅.不同年份黄酒香气的差异研究[J].安徽农业科学,2016,14:93-96.
- [13]Charisiadis P, Kontogianni V G, Tsiafoulis C G, et al. ChemInform abstract:¹H-NMR as a structural and analytical tool of intra- and inter-molecular hydrogen bonds of phenol-containing natural products and model compounds [J]. Molecules,2014,19(9):13643-82.

- partial characterization of a spore cortex - lytic enzyme of *Clostridium perfringens* S40 spores[J].Bioscience Biotechnology & Biochemistry,1995,59(59):514-515.
- [20] Makino S, Ito N, Inoue T, et al. A spore - lytic enzyme released from *Bacillus cereus* spores during germination [J]. Microbiology,1994,140(2):1403-1410.
- [21] Minh H N T, Dantigny P, Perrier - Cornet J M, et al. Germination and inactivation of *Bacillus subtilis* spores induced by moderate hydrostatic pressure [J]. Biotechnology & Bioengineering,2010,107(5):876-83.
- [22] Fichtel J, Köster J, Scholzböttcher B, et al. A highly sensitive HPLC method for determination of nanomolar concentrations of dipicolinic acid, a characteristic constituent of bacterial endospores[J].Journal of Microbiological Methods,2007,70(2):319-327.
- [23] Ando Y. Spore lytic enzyme released from *Clostridium perfringens* spores during germination[J].Journal of Bacteriology,1979,140(1):59-64.
- [24] 李梅娟, 刘丹, 贾真, 等. 鲍鱼内脏内源蛋白酶特性的研究[J].食品工业科技,2016,37(19):81-85.
- [25] 郝梦甄, 胡志和, 肖学勇. 超高压处理对海参体壁粗酶活性的影响[J].食品工业科技,2013,34(2):143-146.
- [26] 陈发庆, 王成忠, 张新明. 超高压处理对核桃雄花序体内酶及主要成分的影响研究[J].现代食品科技,2013,29(4):745-748.

- [31] 李梦哲.宽谱沙门氏菌噬菌体 STP4-a 的发酵制备及其在蛋鸡体内的抑菌研究[D].青岛:中国海洋大学,2014.
- [32] Pepin K M, Domsic J, McKenna R. Genomic evolution in a virus under specific selection for host recognition[J]. *Infection Genetics Evolution*, 2008, 8(6): 825-834.

- [14] 高惠文,沈艺,杨春芳,等.关于黄酒标准的理解及探讨[J].食品安全质量检测学报,2013(2):613-616.
- [15] Burikov S, Dolenko T, Patsaeva S, et al. Raman and IR spectroscopy research on hydrogen bonding in water-ethanol systems[J]. Molecular Physics, 2010, 108(18):2427-2436.
- [16] Dixit S, Crain J, Poon WCK, et al. Molecular segregation observed in a concentrated alcohol-water solution[J]. Nature, 2002, 416(6883):829-832.
- [17] Oliveira B G, Vasconcellos M L A A. Hydrogen bonds in alcohols: water complexes: A theoretical study about new intramolecular interactions via CHELPG and AIM calculations[J]. Journal of Molecular Structure Theochem, 2006, 774(1):83-88.
- [18] 王亚超,马永昆,于怀龙,等.超高压处理对黄酒中醇水缔合影响的研究[J].现代食品科技,2016(2):221-226.
- [19] Nose A, Masasjo, Ueda T, et al. Effects of salts, acids, and phenols on the hydrogen-bonding structure of Water-Ethanol Mixtures[J]. J Phys Chem B, 2004, 108:798-804.
- [20] 姜甜,李峙,顾国贤.醇水饮料中氢键的研究-啤酒的氢键[J].食品工业科技,2008(11):299-302.