

高密度 CO₂ 对虾优势腐败菌的杀菌效果及机理

刘书成, 张 良, 吉宏武*, 屈小娟, 章超桦, 郝记明

(广东省水产品加工与安全重点实验室, 广东普通高等学校水产品深加工重点实验室, 广东海洋大学食品科技学院, 湛江 524088)

摘 要: 为了探讨高密度 CO₂ (dense phase carbon dioxide, DPCD) 对水产品腐败菌的杀菌效果和机制, 以一株凡纳滨对虾优势腐败菌 (*Chryseobacterium sp.* LV1) 为研究对象, 研究了 DPCD 处理温度 (30~55℃)、压力 (5~25 MPa)、时间 (5~60 min) 对杀菌效果的影响, 分析了 DPCD 处理前后该菌理化性质的变化。结果表明: DPCD 对其具有较好的杀菌效果, 温度升高、压力增大、延长处理时间都会增强杀菌效果, 而且超临界 CO₂ 比亚临界 CO₂ 的杀菌效果好。当在 45℃、15 MPa 和 55℃、15 MPa 下处理菌悬液 30 min 时, 菌落总数均能下降 5 个对数; 菌悬液的 pH 值从 6.97 分别下降至 5.58 和 5.56; 细胞外蛋白由最初的 78.69 μg/mL 分别增至 151.91 和 157.40 μg/mL, 200~800 nm 范围内的吸光度值增大, 这说明 DPCD 处理改变了其细胞膜的通透性, 造成胞内蛋白质和核酸泄漏; 可溶性和不溶性蛋白的电泳图谱发生变化, 说明 DPCD 处理能够诱导 *Chryseobacterium sp.* LV1 可溶性蛋白质变性, 降低其溶解度; 能够钝化与其新陈代谢相关的 14 种酶类; 但不会造成其 DNA 的降解。因此, DPCD 处理致使其理化性质的改变可能是杀菌的主要原因之一。研究结果将为 DPCD 技术在对虾加工中的应用提供参考。

关键词: 物理性质, 化学性质, 菌, 高密度 CO₂, 杀菌效果, 腐败菌

doi: 10.3969/j.issn.1002-6819.2013.14.036

中图分类号: TS254.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2013)-14-0284-09

刘书成, 张 良, 吉宏武, 等. 高密度 CO₂ 对虾优势腐败菌的杀菌效果及机理[J]. 农业工程学报, 2013, 29(14): 284—292.

Liu Shucheng, Zhang Liang, Ji Hongwu, et al. Sterilizing effect of dense phase carbon dioxide on dominant spoilage bacteria from shrimp and its mechanism[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2013, 29(14): 284—292. (in Chinese with English abstract)

0 引 言

高密度 CO₂ (dense phase carbon dioxide, DPCD) 是一种新型非热杀菌技术。目前, 有关 DPCD 杀菌的研究对象主要是大肠杆菌 (*Escherichia coli*)^[1-5]、沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)^[6-8]、李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)^[9-10]、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)^[11] 等食源性致病菌及细菌孢子^[12-16] 等。然而食品中还存在着另一类决定其货架期的微生物——腐败菌。食品中常见的 2 类腐败菌包括黄杆菌 (*Flavobacteria*) 和假单胞菌 (*Pseudomonads*)。黄杆菌是一类菌落呈黄色的细菌总称, 其中金黄杆菌属 (*Chryseobacterium*) 占了很大一部分, 广泛存在于水产品、畜禽肉、牛奶等

食品中^[17]。

对虾中腐败菌群因品种、生存环境、捕捞方式、加工储藏的环境不同存在很大的差异。在冷冻或冷藏条件下, 对虾常见的腐败菌有: 假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、黄杆菌属 (*Flavobacterium*)、希瓦氏菌属 (*Shewanella*)、莫拉克斯氏菌属 (*Moraxella*) 等^[18-22]。目前, 尚没有 DPCD 对水产品中腐败菌致死效果的专门报道。对于一些水产品特定优势腐败菌, 如果不能抑制其生长或是杀灭, 在加工贮藏运输过程中极易造成水产品腐败变质。作为新型的非热加工技术, DPCD 不仅需要杀灭食品中的致病菌, 对腐败菌也应该具有很好的致死效果。本实验室前期利用 DPCD 实现了对凡纳滨对虾的杀菌^[23]和多酚氧化酶的钝化^[24], 并对杀菌的工艺参数进行了优化^[23]。为进一步探讨高密度 CO₂ 对水产品腐败菌的杀菌效果和机制, 本研究以一株从凡纳滨对虾中分离的腐败菌 (*Chryseobacterium sp.* LV1) 为目标微生物, 研究 DPCD 的杀菌效果, 分析 DPCD 处理前后其理化性质变化, 初步探讨 DPCD 的杀菌机制, 为 DPCD 技术在水产品加工中的应用提供参考。

收稿日期: 2013-04-26 修订日期: 2013-06-27

基金项目: 广东省教育厅创新课题 (2012KJCX0062); 现代农业产业技术体系专项基金 (CARS-47); 广东省水产蛋白改性技术研究团队专项经费 (2011A020102005); 广东省自然科学基金 (10152408801000010)

作者简介: 刘书成 (1977—), 男, 博士, 教授, 研究方向为水产品加工新技术。湛江 广东海洋大学, 524088。Email: Lsc771017@163.com

※通信作者: 吉宏武 (1962—), 男, 博士, 教授, 研究方向为水产高值化加工和利用。湛江 广东海洋大学, 524088。

Email: jihw62318@163.com

1 材料与方法

1.1 材料

菌种: *Chryseobacterium sp.* LV1 由广东海洋大学食品科技学院分离鉴定。特征描述: 细胞杆状, 革兰氏阴性; 菌落淡黄色光滑, 边缘规整, 凸起。

主要试剂: 平板计数琼脂, 营养肉汤购于北京陆桥公司; Folin-酚试剂盒购于北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; SDS-PAGE 试剂盒购于碧云天生物技术研究所; API ZYM 购于法国生物梅里埃公司。细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒购于广州东盛生物科技有限公司; 琼脂糖购于碧云天生物技术研究所; CO₂ (纯度 99.9%) 购于当地氧气厂, 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

HA221-50-10-C 型超临界装置 (南通市华安超临界萃取有限公司); SW-CJ-2F 超净工作台 (上海博迅实业有限公司医疗设备厂); YXQ-LS-18SI 高压灭菌锅 (上海博迅实业有限公司医疗设备厂); SLI-700 培养箱 (上海爱朗仪器有限公司); UV-2550 紫外可见分光光度计 (日本岛津); PHS-3C 型精密 pH 计 (上海雷磁仪器厂); CR22G II 高速冷冻离心机 (日本日立公司); UX2200H 电子托盘天平 (日本岛津); DYCZ-24DN 型迷你双垂直电泳槽 (北京六一仪器厂); EPS-601 电泳仪 (美国 GE 公司); 5417R 冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); DYCP-31CN 型琼脂糖水平电泳仪 (北京六一仪器厂)。

1.3 试验方法

1.3.1 生长曲线的测定

将 *Chryseobacterium sp.* LV1 接种到营养肉汤培养基 (蛋白胨 10 g/L, 牛肉粉 3.0 g/L, 氯化钠 5.0 g/L) 中培养 12 h 后放置于 4℃ 中保存。取 1 mL 上述培养液加入 500 mL 营养肉汤液体培养基中, (36±1)℃, 200 r/min 震荡培养, 每隔 1 h 取出 3 mL 培养液置于 4℃ 冰箱内保存, 24 h 后在 600 nm 处检测其吸光度值。空白对照为 0 的培养液。*Chryseobacterium sp.* LV1 的生长曲线见图 1, 在营养肉汤培养基中迅速进入指数生长期, 并在 9 h 后达到稳定期, 600 nm 处的吸光度值为 1.5。

1.3.2 菌悬液的制备

取即将进入稳定期 (A_{600} 为 1.50±0.20) 的 *Chryseobacterium sp.* LV1 培养液 5 L, 在 4℃ 6 500 r/min 离心 10 min, 除去上清液, 将沉淀菌体在灭菌预冷的磷酸盐缓冲液 (0.27 g/L KH₂PO₄, 0.2 g/L KCl, 8 g/L NaCl, 1.42 g/L Na₂HPO₄, pH 值 =7.0) 中冲洗后再 4℃ 6 500 r/min 离心 10 min, 重复冲洗 2 次即为所需菌悬液。其在 800~200 nm 进

行紫外-可见光扫描, 在 415 nm 处 *Chryseobacterium sp.* LV1 有特征吸收峰, 稀释至菌落总数为 10⁸ CFU/mL, 吸光度值为 3.5。将菌悬液分装至无菌试管 20 mL 中, 每管 5 mL, 4℃ 放置, 每次制备的菌悬液当天处理完。

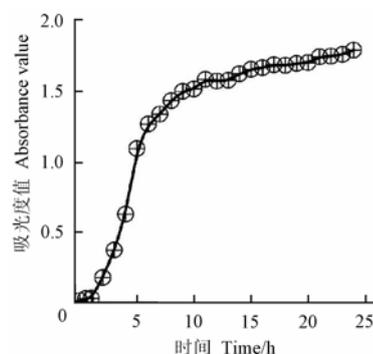


图 1 营养肉汤中 *Chryseobacterium sp.* LV1 生长曲线(36±1)℃
Fig.1 Growth curve of *Chryseobacterium sp.* LV1 at (36±1)℃ in nutrient broth

1.3.3 菌落总数的测定

按照国家标准 GB/T 4789.2-2010 执行^[25]。

1.3.4 高密度 CO₂ 处理

菌悬液置于 20 mL 无菌试管中, 用于 DPCD 处理。间歇式 DPCD 处理基本流程参考文献^[26], 具体如下: 试验开始时, 首先打开制冷及冷却循环, 设置处理釜所需温度。处理釜内外均用 75% 的酒精消毒至无菌, 将装有菌悬液的试管放入处理釜中, 密封, 开启高压泵泵入 CO₂ 气体, 待压力上升至所需压力, 关闭高压泵, 封闭处理釜进出口的阀门, 维持处理釜内的压力和温度, 静态处理一段时间后, 卸压并在超净工作台取出样品, 完成一次处理, 再进行下一步分析。压力和温度的精确度分别是 ±0.4 MPa 和 ±0.5℃。

1.3.5 DPCD 杀菌试验设计

DPCD 的杀菌效果以微生物下降对数 (-lg(N_t/N₀), N_t 表示处理后的细菌总数, CFU/mL; N₀ 表示初始细菌总数, CFU/mL) 表示, 考虑的因素包括温度 (30~55℃)、压力 (5~25 MPa)、时间 (5~60 min)。为了研究 DPCD 处理对菌悬液理化性质的影响, DPCD 处理条件参考前期的相关研究^[23], 设定为: 45℃ 和 15 MPa 下处理 30 min; 55℃ 和 15 MPa 下处理 30 min; 对照组: 未处理菌悬液、55℃ 压力 0.1 MPa 条件下在处理釜中保持 30 min。

1.3.6 菌悬液的 pH 值测定

直接用 pH 计测量。

1.3.7 紫外-可见光光谱扫描

菌悬液在 200~800 nm 进行紫外-可见光扫描; 菌悬液经 4℃ 10 000 r/min 离心 10 min 后, 取上清液

即为细胞外液,在200~400 nm处进行紫外光谱扫描。

1.3.8 胞外蛋白含量的测定

对1.3.7中的细胞外液进行蛋白质含量分析,采用Lowry法^[27],以牛血清蛋白作为标准品。

1.3.9 蛋白质 SDS-PAGE 电泳

菌悬液经4℃ 10 000 r/min离心10 min后,取菌体沉淀悬浮于预冷的0.05 mol/L Tris-HCl (pH值7.2)缓冲液中,-20℃反复冻融并进行超声处理5次,4℃ 12 000 r/min离心30 min,上清液主要成分为可溶性蛋白。沉淀再经过0.05 mol/L Tris-HCl (pH值7.2)缓冲液冲洗2次,离心所得沉淀主要成分为不溶性蛋白^[8]。对上清液和沉淀进行SDS-PAGE分析,采用Laemmli等^[28]的方法并稍加改进,采用浓缩胶质量分数为5%,分离胶质量分数为12%。

1.3.10 酶谱分析

Chryseobacterium sp. LV1 酶谱分析采用生物梅里埃公司的API ZYM半定量试剂条进行检测。API AYM检测系统可以系统和快速地研究19种酶的活性,这19种酶包括5大酶类,分别是酯水解酶类3种;氨肽酶类3种;蛋白酶类2种;糖甙酶类8种;磷酸酶类3种(表1)。颜色反应后:用标准比色卡对颜色强度进行分析,用0~5分制来标记相应的颜色深度。

1.3.11 琼脂糖凝胶电泳

Chryseobacterium sp. LV1 DNA采用细菌基因组DNA快速提取试剂盒进行提取。对提取的DNA进行琼脂糖凝胶电泳,将5 μL纯化的DNA样品溶解于5 μL 6×上样缓冲液(30%甘油,0.25%二甲苯青FF,0.25%溴酚蓝)中,电泳采用1.5%琼脂糖凝胶(含0.5 μg/mL溴化乙锭),在TBE(8.9 mmol Tris-硼酸,2.5 mmol EDTA,pH值8.3)缓冲液中进行电泳。100 V电泳1 h,紫外灯下观察拍照。

1.3.12 数据处理

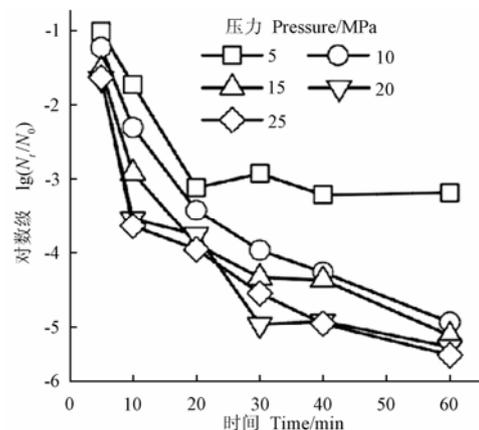
每个试验重复3次,数据用Mean±S.D.表示;方差分析(ANOVA)和Tukey's HSD多重比较用JMP 7.0软件分析,显著水平为 $p < 0.05$ 。

2 结果与讨论

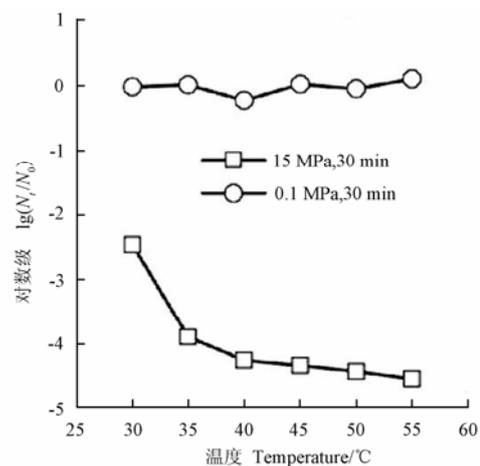
2.1 DPCD对*Chryseobacterium sp.* LV1的杀菌效果

从图2可以看出,压力增大、温度升高或者延长处理时间都能增强DPCD对*Chryseobacterium sp.* LV1的杀菌效果。从理论上讲,压力控制了CO₂在液态介质中的溶解速率及溶解度,压力增大,其密度增大,溶解速率及溶解度也明显增加,渗透进入微生物细胞造成胞内pH值下降并萃取细胞内相关组分,导致微生物迅速死亡^[29];但微生物的致死

效果并不是随压力的增大而无限增大,当CO₂在液态介质中的溶解趋于饱和,压力增大,其溶解度也不会明显变化^[29]。温度升高,CO₂扩散性增大,微生物细胞膜的流动性也增大,其更容易渗透进入细胞内,从而导致微生物死亡^[30-32]。当温度为45℃时,压力为10、15、20、25 MPa时,*Chryseobacterium sp.* LV1的菌落总数均能下降5个对数;单纯的热处理(低于55℃)对照组菌落总数没有明显变化,而当压力为15 MPa时,温度逐渐升高,菌落总数迅速下降。通常,超高压在300~600 MPa压力下才会具有较好的杀菌效果^[31]。因此,在没有CO₂的条件下,单纯的低温与低压处理很难将微生物杀灭,压力下CO₂分子效应是造成*Chryseobacterium sp.* LV1致死的关键因素。



a. 压力 45℃
a. Pressure 45°C



b. 温度
b. Temperature

注: N_t 表示处理后的细菌总数, N_0 表示初始细菌总数。
Note: N_t is the total number of bacteria after treatment, N_0 is the total number of bacteria in the initial.

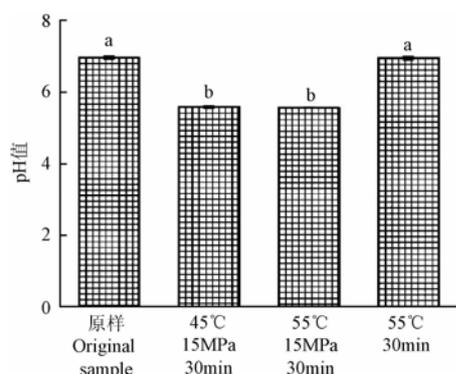
图2 高密度CO₂对*Chryseobacterium sp.* LV1的杀菌效果
Fig.2 Effect of dense phase carbon dioxide on inactivation of *Chryseobacterium sp.* LV1

从图2还可以看出,在5 MPa和45℃处理

20 min 后再延长处理时间, DPCD 的杀菌效果并不会明显增加; 而在 10 MPa 以上和 45℃ 处理 20 min 后再延长处理时间, DPCD 的杀菌效果持续增加。这可能与 CO₂ 在超临界状态 (临界压力 7.39 MPa、临界温度 31.1℃) 下独特的理化性质有关。超临界 CO₂ 的性质介于气态及液态之间, 同时具备较高的萃取能力及扩散性, 更容易渗透进入微生物细胞, 萃取细胞内的关键组分。也有一些研究也得出了类似的结论^[33-34], Ishikawa H 等^[34]研究了气态、液态及超临界态下 CO₂ 对生理盐水中 *Lactobacillus brevis* 的杀菌效果, 研究表明, 在 7 MPa、25℃ 条件下处理 15 min, 菌落总数下降约 2.7 个对数; 而在 25 MPa、35℃ 条件下处理 15 min, 菌落总数下降约 6 个对数。

2.2 DPCD 处理前后 *Chryseobacterium sp.* LV1 悬液 pH 值的变化

从图 3 可以看出, DPCD 处理能够显著降低菌悬液的 pH 值 ($p < 0.05$)。经过 45℃、15 MPa 处理 30 min 和 55℃、15 MPa 处理 30 min 后, *Chryseobacterium sp.* LV1 悬液 pH 值从 6.97 分别下降至 5.58 和 5.56。pH 值变化一直被认为是微生物致死的一个重要因素, 在酸性环境中, CO₂ 更容易渗透进入细胞内, 细胞内 pH 值下降, 造成微生物新陈代谢相关的酶失活, 进而导致微生物死亡。在 DPCD 条件下, CO₂ 溶于水生成 H₂CO₃, 并进一步解离生成 H⁺, 造成 pH 值的下降, 而 H⁺ 浓度大小与压力、温度密切相关^[31,36]。大量研究也证实, 经过 DPCD 处理后的溶液 pH 值下降^[9,37-38], Spilimbergo S 等^[38]利用流式细胞术联合荧光探针检测了 *Bacillus subtilis* 细胞内外的 pH 值变化, 研究发现在 8 MPa, 30℃ 处理 5 min, 细胞内 pH 值从 7.4 降低到 3.3, 胞外降低到 3.2。因此, 微生物经过 DPCD 处理后其 pH 平衡系统被破坏。



注: 标注不同字母表示有显著差异 ($p < 0.05$), 下同。

Note: Different small letters mean significantly different ($p < 0.05$), the same as below.

图 3 DPCD 处理对菌悬液 pH 值的影响

Fig.3 Effect of DPCD treatment on pH value of *Chryseobacterium sp.* LV1 suspensions

2.3 DPCD 处理前后 *Chryseobacterium sp.* LV1 胞外蛋白含量的变化

CO₂ 是非极性分子, 在压力条件下, CO₂ 分子能渗透进入细胞膜磷脂双分子层, 通过萃取作用导致细胞膜流动性、通透性发生改变, 胞内的一些小分子物质在卸压时可伴随 CO₂ 释放而渗出^[31]。从图 4 可以看出, 经过 45℃、15 MPa 处理 30 min 和 55℃、15 MPa 处理 30 min 后, 菌悬液离心后的上清液中蛋白质含量显著增加, 细胞外蛋白由最初的 78.69 μg/mL 分别增至 151.91 和 157.40 μg/mL, 都增大一倍以上。这说明 *Chryseobacterium sp.* LV1 经过 DPCD 处理后, 其细胞膜通透性发生了明显变化, 胞内的小分子蛋白渗出。Bothun 等^[39]通过人工构建细胞膜脂质体, 证实了细胞膜经 DPCD 处理后流动性的变化。Kim 等^[40]利用 DPCD 处理 *Salmonella enterica serotype typhimurium* 后, 发现其脂肪酸模式发生了很大变化。Liao 等^[4]的研究也表明, 大肠杆菌经过 DPCD 处理后胞内蛋白发生了流失。

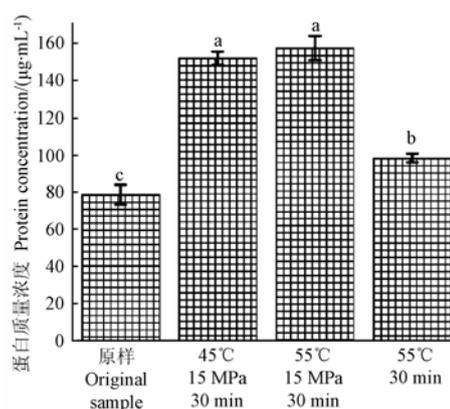


图 4 DPCD 处理对胞外蛋白含量的影响

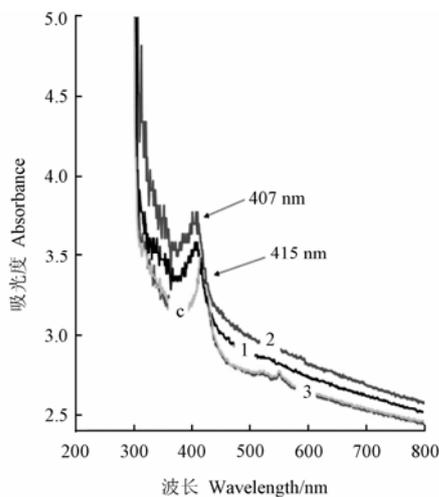
Fig.4 Effect of DPCD treatment on content of extracellular protein

2.4 DPCD 处理前后 *Chryseobacterium sp.* LV1 悬液紫外-可见吸收光谱的变化

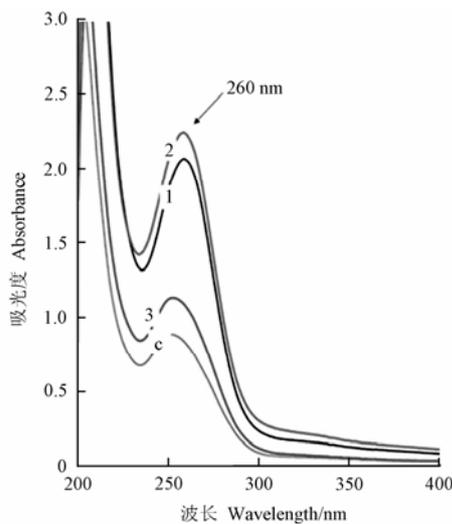
由 2.3 分析可知, 经过 DPCD 处理后微生物细胞膜通透性发生了改变, 检测到一些小分子蛋白质随之渗出。在微生物细胞内, 还有许多小分子物质, 如氨基酸、肽、核酸、膜脂等^[41], 这些物质可以通过紫外-可见光谱的变化反应出来。从图 5a 可以看出, 经过 DPCD 处理后, 200~800 nm 范围内的吸光度值增大, 55℃、15 MPa 处理 30 min 比 45℃、15 MPa 处理 30 min 的吸光度值大, 而且菌悬液在 415 nm 处的特征吸收峰发生蓝移至 407 nm。这可能是因为一方面细胞内容物外泄, 造成吸光度值的增大; 另一方面 DPCD 处理暴露细胞壁组分中的生色基团, 特征吸收峰蓝移的具体机制还需进一步分

析。从图 5b 可以看出, DPCD 处理使上清液在 260 nm 处的吸光度值较原样对照几乎增大一倍, 这也证明胞内核酸泄漏。

通过对胞外蛋白质含量和菌悬液紫外可见扫描光谱图的分析可知, DPCD 处理确实造成了微生物细胞膜的严重破坏, 大量胞内内容物渗出。目前, 关于细胞膜破坏的机制有 2 种观点: 1) DPCD 卸压时, 由于溶解于微生物细胞内的 CO_2 急于向外排泄, 突然发生“爆炸”现象, 造成细胞膜的破裂; 另一种是由于 DPCD 的萃取作用改变了细胞膜的微观结构, 而外观形态不变。上述两种观点都有大量试验证据^[31,36], 这种差异可能与 DPCD 处理条件的不同、不同微生物对卸压时的耐受力、卸压速率等有关。



a. 菌悬液
a. Suspension



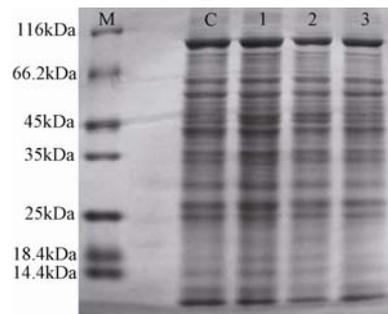
b. 上清液
b. Supernatant

注: c, 原样; 1, 45°C 15MPa 30min; 2, 55°C 15MPa 30min; 3, 55°C 30 min.
Note: c, original sample; 1, 45°C 15MPa 30min; 2, 55°C 15MPa 30min; 3, 55°C 30min.

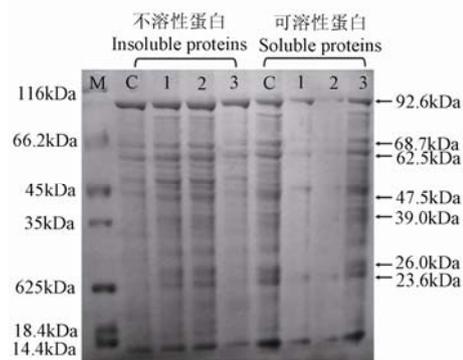
图 5 DPCD 处理后菌悬液及上清液紫外-可见扫描光谱图
Fig.5 Ultraviolet-visible scan spectrum of *Chryseobacterium sp. LV1* suspension and supernatant treated by DPCD

2.5 DPCD 处理前后 *Chryseobacterium sp. LV1* 蛋白质组成的变化

从图 6b 可以看出, *Chryseobacterium sp. LV1* 菌体蛋白主要为可溶性蛋白, 不溶性蛋白少; 比较发现 DPCD 处理不会造成 *Chryseobacterium sp. LV1* 总蛋白模式发生明显变化, 但可使可溶性蛋白减少, 大部分变为不溶性蛋白; 另外 *Chryseobacterium sp. LV1* 菌体蛋白的分子量发生了变化, 这可能主要是 DPCD 诱导蛋白质变性后肽链解离或者肽链再聚集所造成的, 目前还没有关于 DPCD 致使蛋白质肽链降解的报道。这表明: 经过 DPCD 处理后, 可溶性蛋白变性, 溶解性发生改变。Kim 等^[8]研究了 DPCD 对 *Salmonella typhimurium* 蛋白的影响, 得出了类似的结论。Liao 等^[4]采用蛋白组学方法研究了 *Escherichia coli* 蛋白经过 DPCD 处理后的变化, 结果发现有 182 个不同的蛋白质点, 对其中 20 个具有显著差异的蛋白质进行鉴定, 发现这些蛋白质与细胞组成、能量代谢、核酸代谢、渗透压调节有关。



a. 总蛋白 (菌悬液)
a. Total proteins (Bacterial suspension)



b. 不溶性蛋白 (沉淀) 及可溶性蛋白 (上清液)
b. Soluble protein (supernatant) and insoluble protein (precipitate)

注: M, 蛋白分子量标准; C, 未处理菌悬液; 1, DPCD 处理 (45°C、15 MPa、30 min); 2, DPCD 处理 (55°C、15 MPa、30 min); 3, 水浴 (55°C、30 min)。
Note: M, Maker; C, Untreated; 1, DPCD (45°C, 15 MPa, 30 min); 2, DPCD (55°C, 15 MPa, 30 min); 3, Heated treatment (55°C, 30 min).

图 6 *Chryseobacterium sp. LV1* 蛋白质 SDS-PAGE 电泳图谱
Fig.6 SDS-PAGE electrophoretogram of *Chryseobacterium sp. LV1* proteins

2.6 DPCD 处理前后 *Chryseobacterium sp. LV1* 相关酶活性的变化

从表 1 可以看出, 利用 APIZYM 酶谱试剂条检

测到 *Chryseobacterium sp.* LV1 15 种酶的活性，这些酶类与微生物的新陈代谢息息相关，包括酯水解酶类，氨基酶类，蛋白酶类，糖甙酶类，磷酸酶类。其中 11 种酶的活性较高（颜色强度 > 3），主要包括碱性磷酸酶、亮氨酸芳胺酶、胰凝乳蛋白酶、酸性磷酸酶、β-半乳糖甙酶等。

表 1 *Chryseobacterium sp.* LV1 的酶活性

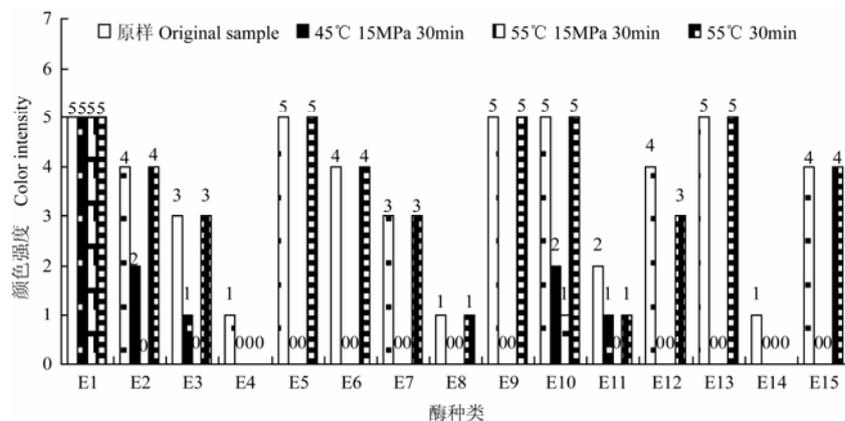
Table 1 Enzymatic activities of *Chryseobacterium sp.* LV1 detected by API ZYM enzyme test kit

酶 Enzyme	颜色反应 Color reaction
酯水解酶 Ester hydrolases	酯酶 Esterase 4
	类脂酯酶 Esterase lipase 3
	类脂酶 Lipase 1
氨基酶类 Amino peptidases	亮氨酸芳胺酶 Leucine arylamidase 5
	缬氨酸芳胺酶 Valine arylamidase 4
	胱氨酸芳胺酶 Cystine arylamidase 3
蛋白酶类 Proteases	胰蛋白酶 Trypsin 1
	胰凝乳蛋白酶 Chymotrypsin 5
	α-半乳糖甙酶 α-galactosidase 4
	β-半乳糖甙酶 β-galactosidase 5
	β-糖醛酸甙酶 β-glucuronidase 1
糖甙酶类 Glycosyl hydrolases	α-葡萄糖甙酶 α-glucosidase 4
	β-葡萄糖甙酶 β-glucosidase -
	N-乙酰-葡萄糖胺酶 N-acetyl-β-glucosidaminidase -
	α-甘露糖甙酶 α-mannosidase -
	α-岩藻糖甙酶 α-fucosidase -
磷酸酶类 Phosphoric hydrolases	碱性磷酸酶 Alkaline phosphatase 5
	酸性磷酸酶 Acid phosphatase 5
	萘酚-AS-BI-磷酸水解酶 Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase 2

从图 7 可以看出，经过 DPCD 在 45℃、15 MPa 处理 30 min 之后，与原样对比，碱性磷酸酶的酶活

无变化，酯酶、酸性磷酸酶及萘酚-AS-BI-磷酸水解酶存在微弱活性，其他 11 种酶全部失活；在 55℃、15 MPa 处理 30 min 后，与原样对比，碱性磷酸酶的酶活性无变化，酸性磷酸酶部分失活，其他 13 种酶全部失活；在 55℃处理 30 min 后，与原样对比，包括碱性磷酸酶在内的 11 种酶活性无变化，只有类脂酶和 β-糖醛酸甙酶失活，萘酚-AS-BI-磷酸水解酶和 α-半乳糖甙酶部分失活。比较这些结果发现：在相同的处理温度（55℃），单纯热处理对 11 种酶的活性无影响，而 DPCD 处理会导致 13 种酶失活，甚至低于 55℃的 DPCD 处理也会导致 11 种酶失活，这说明 DPCD 处理中 CO₂ 的分子效应是酶钝化的主要原因。55℃热处理导致类脂酶和 β-糖醛酸甙酶失活，萘酚-AS-BI-磷酸水解酶和 α-半乳糖甙酶部分失活，其原因主要是这 4 种酶的最适温度在 35℃左右，高于这个温度，酶活性会迅速下降。

Ballestra 等^[1]认为 DPCD 钝化微生物中的酶具有选择性，在酸性条件下，一些等电点为酸性的酶更容易沉淀，包括碱性磷酸酶和 β-半乳糖甙酶。在本研究中，碱性磷酸酶一直保持高活性，Hong 等^[39]用 API ZYM 酶谱试剂条研究了 *Lactobacillus plantarum* 在 7 MPa 30℃处理 10 min 的酶活，研究发现其碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、β-半乳糖甙酶都保持较高的活性。Kim 等^[10]在 35℃、15 MPa 下处理 *Salmonella typhimurium* 30 min，其碱性磷酸酶，酸性磷酸酶及萘酚-AS-BI-磷酸水解酶活性均未发生明显变化。而 Li 等^[42]的研究表明，35℃、10 MPa 下处理 *Saccharomyces cerevisiae* 30 min，其碱性磷酸酶已经失活，而处理 120 min 后，酸性磷酸酶及萘酚-AS-BI-磷酸水解酶活性还没有丧失。



注：颜色强度，0 为无活性，5 为活性最强；E1，碱性磷酸酶；E2，酯酶；E3，类脂酯酶；E4，类脂酶；E5，亮氨酸芳胺酶；E6，缬氨酸芳胺酶；E7，胱氨酸芳胺酶；E8，胰蛋白酶；E9，胰凝乳蛋白酶；E10，酸性磷酸酶；E11，萘酚-AS-BI-磷酸水解酶；E12，α-半乳糖甙酶；E13，β-半乳糖甙酶；E14，β-糖醛酸甙酶；E15，α-葡萄糖甙酶

Note: Color intensity: 0 (no activity) to 5 (strong activity). Numbers of the horizontal axis correspond to the following enzyme: E1, alkaline phosphatase; E2, esterase; E3, esterase lipase; E4, lipase; E5, leucine arylamidase; E6, valine arylamidase; E7, cystine arylamidase; E8, trypsin; E9, chymotrypsin; E10, acid phosphatase; E11, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase; E12, α-galactosidase; E13, β-galactosidase; E14, β-glucuronidase; E15, α-glucosidase.

图 7 API ZYM 酶谱试剂条检测 *Chryseobacterium sp.* LV1 相关酶活性

Fig.7 Related enzymatic activities of *Chryseobacterium sp.* LV1 detected by API ZYM system kit

不同研究者的研究结果存在差异,原因可能是DPCD不仅对所钝化的酶具有选择性,而且对不同微生物来源的酶也具有选择性,这可能与微生物自身对DPCD的耐受力有关。另外,Hong等^[41]、Kim等^[8]、Li等^[42]研究的DPCD处理在35℃以下,而本研究DPCD处理温度为55℃,温度升高也增加了CO₂的渗透能力和扩散性,使溶解在微生物中的CO₂数量相对较多,pH值下降程度增加导致酶失活加剧^[36]。磷酸酶是一类广泛存在于微生物中的酶类,在DPCD处理中,碱性磷酸酶、酸性磷酸酶及萘酚-AS-BI-磷酸水解酶都表现出对DPCD处理的耐受力。尤为特殊的是碱性磷酸酶,虽然其等电点为酸性pH值,但其经DPCD处理后,活性未发生明显下降,其具体耐受DPCD机制还需进一步研究。

2.7 DPCD处理前后 *Chryseobacterium sp.* LV1 DNA的变化

DNA的一级结构是脱氧核苷酸序列,它通过磷酸二酯键连接,可以通过琼脂糖凝胶电泳证明DNA一级结构是否遭到破坏。从图8可以看出,未处理的和经过DPCD处理的*Chryseobacterium sp.* LV1 DNA都只显示单一亮带,这表明DPCD处理并不会造成DNA的降解。Liao等^[4]在研究DPCD处理*Escherichia coli*时,琼脂糖凝胶电泳及彗星试验也证明了DPCD不会造成DNA的降解。



注: C, 未处理菌悬液; 1, 45℃、15 MPa、30 min; 2, 55℃、15 MPa、30 min; 3, 55℃、30 min。

Note: C, untreated bacterial suspension; 1, 45℃、15 MPa、30 min; 2, 55℃、15 MPa、30 min; 3, 55℃、30 min。

图8 *Chryseobacterium sp.* LV1 DNA 琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig.8 Agarose gel electrophoretogram of DNA in *Chryseobacterium sp.* LV1

3 结论

以一株凡纳滨对虾中的优势腐败菌(*Chryseobacterium sp.* LV1)为目标微生物,研究了DPCD对其的杀菌效果及理化性质的影响,初步探讨了杀菌机制,结论如下:

1)DPCD处理在30~55℃、5~25 MPa和5~60 min范围内,温度越高、压力越大、时间越长,对*Chryseobacterium sp.* LV1的杀菌效果越好,超临界CO₂比亚临界CO₂杀菌效果好;在45℃和15 MPa条件下DPCD处理30 min即可达到理想的杀菌效果。

2)DPCD的pH值降低、高压破坏细胞膜结构、萃取和对酶的抑制等作用改变了*Chryseobacterium sp.* LV1的理化性质,是其致死的关键因素。

[参 考 文 献]

- [1] Ballestra P, Da Silva A A, Cuq J L. Inactivation of *Escherichia coli* by carbon dioxide under pressure[J]. *Journal of Food Science*, 1996, 61(4): 829—831.
- [2] Garcia-Gonzalez L, Geeraerd A H, 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.
- [3] Liao H, Zhang F, Liao X, et al. Analysis of *Escherichia coli* cell damage induced by HPCD using microscopies and fluorescent staining[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 144(1): 169—176.
- [4] Liao H, Zhang F, Hu X, et al. Effects of high-pressure carbon dioxide on proteins and DNA in *Escherichia coli*[J]. *Microbiology*, 2011, 157(3): 709—720.
- [5] Gunes G, Blum L K, Hotchkiss J H. Inactivation of *Escherichia coli* (ATCC 4157) in diluted apple cider by dense-phase carbon dioxide[J]. *Journal of Food Protection*, 2006, 69(1): 12—16.
- [6] Dillow A K, Dehghani F, Hrkach J S, et al. Bacterial inactivation by using near- and supercritical carbon dioxide[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, 96(18): 10344—10348.
- [7] Osman E. Inactivation of *Salmonella typhimurium* by high pressure carbon dioxide[J]. *Food Microbiology*, 2000, 17(2): 225—232.
- [8] Kim S R, Rhee M S, Kim B C, et al. Modeling of the inactivation of *Salmonella typhimurium* by supercritical carbon dioxide in physiological saline and phosphate-buffered saline[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 70(1): 132—141.
- [9] Wei C I, Balaban M O, Fernando S Y, et al. Bacterial effect of high pressure CO₂ treatment on foods spiked with *Listeria* or *Salmonella*[J]. *Journal of Food Protection*, 1991, 54(3): 189—193.
- [10] Kim S R, Park H J, Yim D S, 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] Sirisee U, Hsieh F, Huff H E. Microbial safety of supercritical carbon dioxide processes[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 1998, 22(5): 387—403.
- [12] Hata C, Kumagai H, Nakamura K. Rate analysis of the sterilization of microbial cells in high pressure carbon dioxide[J]. *Food Science and Technology International*, 1996, 2(4): 229—233.
- [13] Enomoto A, Nakamura K, Hakoda M, et al. Lethal effect of high-pressure carbon dioxide on a bacterial spore[J].

- Journal of Fermentation and Bioengineering, 1997, 83(3): 305—307.
- [14] Ballestra P, Cuq J L. Influence of pressurized carbon dioxide on the thermal inactivation of bacterial and fungal spores[J]. LWT - Food Science and Technology, 1998, 31(1): 84—88.
- [15] Spilimbergo S, Bertucco A, Lauro F M, et al. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by supercritical CO₂ treatment[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2003, 4(2): 161—165.
- [16] Watanabe T, Furukawa S, Hirata J, et al. Inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* spores by high-pressure carbon dioxide treatment[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(12): 7124—7129.
- [17] De Beer H, Hugo C J, Jooste P J, et al. *Chryseobacterium vrystaatense* sp. nov., isolated from raw chicken in a chicken-processing plant[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55(5): 2149—2153.
- [18] Vanderzant C, Nickelson R, Judkins P W. Microbial Flora of Pond-Reared Brown Shrimp (*Penaeus aztecus*)[J]. Applied Microbiology, 1971, 21(5): 916—921.
- [19] Lee J S, Pfeifer D K. Microbiological characteristics of Pacific shrimp (*Pandalus jordani*)[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1977, 33(4): 853—859.
- [20] Van Spreekens K. Characterization of some fish and shrimp spoiling bacteria[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1977, 43(3): 283—303.
- [21] Heinsz L J, Harrison M A, Leiting V A. Microflora of brown shrimp (*Penaeus aztecus*) from Georgia coastal waters[J]. Food Microbiology, 1988, 5(3): 141—145.
- [22] Chinivasagam H N, Bremner H A, Thrower S J, et al. Spoilage Pattern of Five Species of Australian Prawns[J]. Journal of Aquatic Food Product Technology, 1996, 5(1): 25—50.
- [23] Ji Hongwu, Zhang Liang, Liu Shucheng, et al. Optimization of microbial inactivation of shrimp by dense phase carbon dioxide. International Journal of Food Microbiology, 2012, 156(1): 44—49.
- [24] Liang Zhang, Shucheng Liu, Hongwu Ji, et al. Inactivation of polyphenol oxidase from Pacific white shrimp by dense phase carbon dioxide. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2011, 12(4): 635—641.
- [25] GB/T 4789.2-2010, 食品安全国家标准-食品微生物学检验-菌落总数测定[S].
- [26] 张良, 刘书成, 章超桦, 等. 神经网络优化牡蛎的高密度 CO₂ 杀菌工艺[J]. 农业工程学报, 2011, 27(12): 369—373.
- Zhang Liang, Liu Shucheng, Zhang Chaohua, et al. Optimization of oyster-associated bacteria inactivation by dense phase carbon dioxide based on artificial neural network[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2011, 27(12): 369—373. (in Chinese with English abstract)
- [27] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. Journal of Biological Chemistry, 1951, 193(1): 265—275.
- [28] Laemmli U K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227(5259): 680—685.
- [29] Spilimbergo S. A Study About the Effect of Dense CO₂ on Microorganisms[D]. Italy: University of Padova, 2002.
- [30] Zhang J, Davis T A, Matthews M A, et al. Sterilization using high-pressure carbon dioxide[J]. Journal of Supercritical Fluids, 2006, 38(3): 354—372.
- [31] Garcia-Gonzalez L, Geeraerd A H, 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.
- [32] Spilimbergo S, Bertucco A. Non-thermal bacterial inactivation with dense CO₂[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2003, 84(6): 627—638.
- [33] Lin H M, Yang Z, Chen L F. Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* by supercritical and subcritical carbon dioxide[J]. Biotechnology Progress, 1992, 8(5): 458—461.
- [34] Werner B G, Hotchkiss J H. Continuous flow nonthermal CO₂ processing: the lethal effects of subcritical and supercritical CO₂ on total microbial populations and bacterial spores in raw milk[J]. Journal of Dairy Science, 2006, 89(3): 872—881.
- [35] Ishikawa H, Shimoda M, Shiratsuchi H, et al. Sterilization of microorganisms by the supercritical carbon dioxide micro-bubble method[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1995, 59(10): 1949—1950.
- [36] Damar S, Balaban M O. Review of dense phase CO₂ technology: microbial and enzyme inactivation, and effects on food quality[J]. Journal of Food Science, 2006, 71(1): 1—11.
- [37] Lin H M, Cao N, Chen L F. Antimicrobial effect of pressurized carbon dioxide on *Listeria monocytogenes*[J]. Journal of Food Science, 1994, 59(3): 657—659.
- [38] Spilimbergo S, Bertucco A, Basso G, et al. Determination of extracellular and intracellular pH of *Bacillus subtilis* suspension under CO₂ treatment[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2005, 92(4): 447—451.
- [39] Bothun G D, Knutson B L, Strobel H J, et al. Liposome fluidization and melting point depression by pressurized CO₂ determined by fluorescence anisotropy[J]. Langmuir, 2005, 21(2): 530—536.
- [40] Kim S R, Kim H T, Park H J, et al. Fatty acid profiling and proteomic analysis of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium inactivated with supercritical carbon

- dioxide[J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 134(3): 190—195.
- [41] Hong S I, Pyun Y R. 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.
- [42] Li H, Deng L, Chen Y, et al. Inactivation, morphology, interior structure and enzymatic activity of high pressure CO₂-treated *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2012, 14(1): 99—106.

Sterilizing effect of dense phase carbon dioxide on dominant spoilage bacteria from shrimp and its mechanism

Liu Shucheng, Zhang Liang, Ji Hongwu^{*}, Ou Xiaojuan, Zhang Chaohua, Hao Jiming

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Product Processing and Safety, Key Laboratory of Advanced Processing of Aquatic Product of Guangdong Higher Education Institution, College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: Dense phase carbon dioxide (DPCD) is a non-thermal pasteurization method that affects microorganisms and enzymes through molecular effects of CO₂ under pressures below 50MPa and temperature below 60°C. The DPCD sterilization technique could be one of the most promising techniques for sterilizing foods without exposing them to adverse effects of heat, thereby retaining their fresh physical, nutritional, and sensory qualities. In order to investigate the sterilization effect and mechanism of aquatic product spoilage bacteria induced by dense phase carbon dioxide (DPCD), using a strain of *Litopenaeus vannamei* dominant spoilage bacteria (*Chryseobacterium sp.* LV1) as the research object, the effects of temperature (30-55°C), pressure (5-25 MPa), time (5-60 min) on sterilization were studied and the changes of *Chryseobacterium sp.* LV1 physicochemical properties were analyzed before and after DPCD treatment. The results showed that DPCD had a good bactericidal effect on *Chryseobacterium sp.* LV1. The sterilization effect is enhanced with increasing temperature, pressure and time, and the sterilization effect of supercritical CO₂ was better than that of subcritical CO₂. Under DPCD conditions of 45°C/15 MPa /30 min or 55°C/15 MPa /30 min, the total bacterial count decreased by 5 logs; the pH value of the bacterial suspension decreased from 6.97 to 5.58 and 5.56; the content of extracellular protein increased from the initial 78.69 to 151.91 and 157.40 µg/mL; and the absorbance value from 200 to 800 nm increased. These results indicated that DPCD could result in intracellular protein and nucleic acid leakage of *Chryseobacterium sp.* LV1 because of permeability changes in its cell membrane. The SDS-PAGE electrophoretogram of *Chryseobacterium sp.* LV1 proteins showed that DPCD could reduce the solubility of *Chryseobacterium sp.* LV1 soluble protein because of soluble protein denaturation. The results detected by the API ZYM system kit showed that DPCD could inactivate 14 enzymes related to the metabolism of *Chryseobacterium sp.* LV1. The agarose gel electrophoretogram of *Chryseobacterium sp.* LV1 DNA showed that DPCD could not degrade the DNA of *Chryseobacterium sp.* LV1. Therefore, changes in the physicochemical properties of *Chryseobacterium sp.* LV1 induced by DPCD may be one of the main mechanisms of DPCD sterilization. The research results will provide a reference for the application of DPCD in the processing of shrimp.

Key words: physical properties, chemical properties, bacteria, dense phase carbon dioxide, sterilization effect, spoilage bacteria

(责任编辑: 刘丽英)