

不同菌体肽聚糖对产气荚膜梭菌芽孢萌发的诱导作用

任宏荣, 李苗云, 朱瑶迪, 赵改名, 张佳烨, 赵莉君, 张园园, 王文涛
(河南农业大学食品科学技术学院, 河南郑州 450002)

摘要: 为了研究不同菌体肽聚糖对芽孢萌发的影响, 本研究分别提取了产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*, *C. perfringens*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*, *B. subtilis*) 及金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*) 细胞壁肽聚糖, 以 *C. perfringens* 芽孢为研究对象, 按照 1:10、1:100、1:1000 比例分别加入提取的三种菌体肽聚糖, 并以芽孢浑浊度 (OD_{600})、芽孢折光性、2,6-吡啶二羧酸 (DPA) 的释放量、热抗性损失等指标比较不同菌体肽聚糖对 *C. perfringens* 芽孢萌发的效果。结果显示, 按照一定百分比分别加入三种菌体肽聚糖, 1:10 比例添加 *C. perfringens* 营养体肽聚糖诱导 *C. perfringens* 芽孢萌发效果最佳, 在 60 min 后, 其芽孢浑浊度 (OD_{600}) 下降了 31.71%, DPA 释放率上升可达到 38.29%; 1:10 比例添加 *B. subtilis* 营养体肽聚糖诱导 *C. perfringens* 芽孢萌发效果次之, 其芽孢浑浊度 (OD_{600}) 下降了 24.92%, DPA 释放率上升可达到 30.84%; 而不同比例 *S. aureus* 营养体肽聚糖对 *C. perfringens* 芽孢萌发均无显著影响。本研究可为进一步阐明肽聚糖诱导芽孢萌发的机制提供重要信息。

关键词: 产气荚膜梭菌; 肽聚糖; 芽孢萌发

文章编号: 1673-9078(2020)05-178-184

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.5.024

Induction of Germination of *Clostridium perfringens* Spores by Different Bacterial Peptidoglycans

REN Hong-rong, LI Miao-yun, ZHU Yao-di, ZHAO Gai-ming, ZHANG Jia-ye, ZHAO Li-jun, ZHANG Yuan-yuan, WANG Wen-tao

(College of Food Science and Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In order to study the effect of different bacterial peptidoglycans on spore germination, cell wall peptidoglycans were extracted from *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*), *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) and *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Using *C. perfringens* spores as the research object, the three kinds of extracted bacterial peptidoglycans were added at the ratios of 1:10, 1:100, 1:1000, respectively. Based on the spore turbidity (optical density at 600 nm, OD_{600}), spore refractive index, amount of released pyridine-2,6-dicarboxylic acid (dipicolinic acid [DPA]), loss of heat resistance and other indicators, the effects of different bacterial peptidoglycans on the germination of *C. perfringens* spores were compared. The results showed that among the three kinds of bacterial peptidoglycans added at a certain percentage, the addition of *C. perfringens* peptidoglycan at a ratio of 1:10 induced the greatest extent of germination of *C. perfringens* spores. After 60 min, the OD_{600} decreased by 31.71%, while the DPA release rate increased to 38.29%. The addition of *B. subtilis* vegetative peptidoglycan at a 1:10 ratio induced the germination of *C. perfringens* spores to the second greatest extent, with a decrease of OD_{600} by 24.92%, and the increase of DPA release rate to 30.84%. However, the addition of *S. aureus* vegetative peptidoglycan at different ratios affected insignificantly the germination of *C. perfringens* spores. The results of this study can provide important information for further elucidation of the mechanism

引文格式:

任宏荣, 李苗云, 朱瑶迪, 等. 不同菌体肽聚糖对产气荚膜梭菌芽孢萌发的诱导作用[J]. 现代食品科技, 2020, 36(5): 178-184

REN Hong-rong, LI Miao-yun, ZHU Yao-di, et al. Induction of germination of *Clostridium perfringens* spores by different bacterial peptidoglycans [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(5): 178-184

收稿日期: 2019-09-16

基金项目: 河南省高校创新人才计划项目 (18HASTIT036); 国家自然科学基金面上项目 (31571856); 河南省科技攻关计划项目 (192102110216); 博士科研启动经费 (30601677); 国家现代农业 (肉牛牦牛) 产业技术体系建设专项 (CARS-37)

作者简介: 任宏荣 (1995-), 女, 硕士, 研究方向: 肉品加工与安全控制

通讯作者: 朱瑶迪 (1987-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 肉品加工与安全控制

underlying the germination of peptidoglycan-induced spores.

Key words: *Clostridium perfringens*; peptidoglycan; spore germination

产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*, *C. perfringens*), 是一种革兰氏阳性(G^+)能产芽孢的厌氧致病菌^[1], 广泛存在于空气、土壤、污水、各种食品以及动物和人类的胃肠道中, 是导致食源性疾病以及人类的食物中毒、非食源性腹泻和创伤性气性坏疽的主要病原菌之一^[2]。其芽孢是在环境胁迫(如低温、干燥或营养缺乏等)下形成的一种微生物休眠体^[3], 且形成的芽孢具有极强的抗逆性^[4,5], 在肉制品杀菌过程中仍可存活, 很难被杀死^[6]。而环境适宜时, 休眠芽孢感知外界萌发信号, 迅速打破其休眠下的抗性, 萌发并快速地生长繁殖, 最终变成营养体细胞, 进而导致食品胀袋、腐败, 造成大量食物浪费和经济损失^[7]。因此, *C. perfringens* 芽孢是引起肉制品腐败变质的关键因素, 目前对芽孢的处理策略主要是“先萌发, 后杀灭”^[8], 且芽孢萌发领域现有的萌发途径, 包括芽孢萌发“多信使, 多受体”假说, 芽孢“单一信使, 单一受体”通路^[3]。影响芽孢萌发的因素有很多^[9], 通过不同萌发处理方式使芽孢快速、高效萌发, 同时失去抗逆性, 便于使用常规方法杀灭, 保证食品安全, 控制由 *C. perfringens* 引起的各种疾病。

肽聚糖是由细菌代谢过程中自身分泌的物质, 是其细胞壁的主要成分, 它是由 N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)和 N-乙酰胞壁酸(MurNac)通过 β -1,4 糖苷键交替连接而成的聚合物^[10], 肽聚糖片段可作为一系列宿主-微生物相互作用的信号。Shah 等人^[11]曾在《Cell》上报道了营养体细胞分裂过程中释放的肽聚糖片段可以诱导 *B. subtilis* 芽孢萌发, 著名芽孢萌发领域专家 Peter Setlow^[12]在同期《Cell》上评论文章称这是一个开创性的新发现。张良^[13]等人研究了适温适压下 *B. subtilis* 细胞壁肽聚糖对 *B. subtilis* 和生孢梭菌(*Clostridium sporogenes*)芽孢萌发的影响, 并通过数学模型揭示芽孢灭活的规律。然而, 目前研究发现, 不同菌体肽聚糖在结构上是有明显差异的^[11], 且目前关于不同菌属的不同结构肽聚糖诱导芽孢萌发的研究较少, 主要集中在炭疽杆菌(*Bacillus anthracis*)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)、*B. subtilis* 等杆菌中^[9], 对于诱导 *C. perfringens* 芽孢萌发方面的研究也鲜有报道, 那么, 不同菌体肽聚糖是否也可以诱导 *C. perfringens* 芽孢萌发。

为了研究不同菌体肽聚糖对芽孢萌发的影响, 本研究选取不同菌属的典型菌株, 主要为梭菌属 *C. perfringens*、杆菌属 *B. subtilis* 和球菌属 *S. aureus*, 分

离提取菌体肽聚糖并利用中红外分析进行结构鉴定; 以 *C. perfringens* 芽孢为研究对象, 并以芽孢浑浊度(OD_{600})、芽孢折光性、2,6-吡啶二羧酸(DPA)的释放量、热抗性损失等指标来比较不同菌体、不同浓度肽聚糖对 *C. perfringens* 芽孢萌发的影响。这为揭示肽聚糖诱导 *C. perfringens* 芽孢萌发的作用机制提供了一定的理论基础, 也为更高效、定向地调控肉制品中 *C. perfringens* 的致病菌保证食品安全提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌种

产气荚膜梭菌(*C. perfringens*): 河南农业大学微生物实验室在真空包装盐焗鸡涨袋中分离所得; 枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*): 河南农业大学微生物实验室提取、鉴定株; 金黄色葡萄球菌(*S. aureus*): 来自于中国科学技术大学孙宝林教授课题组的无私馈赠。

1.1.2 主要试剂

胰蛋白酶 Trypsin(1:250), 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 三氯化铋、六水合物, 上海麦克林生化科技有限公司; 溶菌酶, Sigma-Aldrich 中国; D-环丝氨酸溶液、0.1%无菌蛋白胨水溶液, 青岛高科技工业园海博生物科技有限公司; 无水乙醇、三氯乙酸、乙醚、还原铁粉、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠等其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 主要培养基

庖肉培养基基础、庖肉牛肉粒、液体硫乙醇酸盐培养基(FTG)、胰酪-亚硫酸盐-环丝氨酸琼脂基础(TSC)、产芽孢肉汤、蛋白胨大豆琼脂(TSA)、胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)、酵母浸粉(YE)、营养琼脂培养基, 北京陆桥技术有限责任公司。

1.2 仪器与设备

多功能酶标仪 SpectraMax M2e, 上海美谷分子仪器有限公司; Nikon ECLIPSE 80i 生物显微镜, 日本 NIKON 公司; AW200SG 厌氧工作站, 英国 ELECTROTEK 公司; BIOBASE 生物安全柜, 济南鑫贝西生物技术有限公司; 高速冷冻离心机 ALLEGRA-64A, 美国 Beckman Coulter 公司; 傅里叶变换红外光谱仪 Vertex70, 布鲁克(北京)科技有限公司; Scientz-IID 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科

技公司。

1.3 试验方法

1.3.1 *C. perfringens* 菌悬液的制备及芽孢的培养

参考 Kokai-Kun^[14]方法,从 TSC 平板上挑取典型的黑色菌落接种到新制备的 FTG 培养基中,37 °C 厌氧培养 18 h,达到生长稳定期,得到 *C. perfringens* 菌悬液。从 TSC 平板上挑取典型的黑色菌落接种到 10 mL 庖肉培养基,37 °C 厌氧培养 48 h。参考 Banawas S^[15]方法制备芽孢,芽孢产物在 4 °C、7000 r/min 离心 20 min,用无菌水洗涤芽孢两次,并悬浮保存在无菌蛋白胨水中,置于-20 °C 保存备用。

1.3.2 *B. subtilis* 菌悬液的制备

参考张津瑜等^[16]方法,从营养琼脂培养基上挑取典型的 *B. subtilis* 单菌落到营养肉汤中,在 37 °C 摇床培养 24 h,将得到的菌液悬于 20% 甘油中,置于-80 °C 保存。

1.3.3 *S. aureus* 菌悬液的制备

参考卢杨柳等^[17]方法,从 TSA 平板上挑取典型菌落接种到含有 0.6% 酵母浸粉的 TSB 培养基上,于 37 °C、150 r/min 恒温摇床培养至指数后期,收集所得菌悬液,在 4 °C、7000 r/min 离心 20 min,弃去上清液,重复上述步骤,得到约 10⁹ CFU/mL 的菌液并置于 4 °C 保存备用。

1.3.4 不同营养体中肽聚糖的粗提取

参考刘景圣^[18]和杨旭^[19]等方法,采用物理超声波法提取肽聚糖,方法如下:将上述制备的不同细菌菌悬液离心,收集菌体沉淀。在功率 400 W、水浴温度 40 °C 条件下累计超声 30 min 后 1500 r/min 离心 5 min,去除未破碎的菌体沉淀;上清液 10000 r/min,15 min 离心收集沉淀即为细胞壁;将沉淀悬浮在 10% 的 TCA 溶液中,沸水浴 20 min 除去磷壁酸,冷却后,4 °C、10000 r/min 离心 15 min 收集沉淀,蒸馏水洗涤至中性;将获得沉淀悬浮于乙醚中 6 h 以除去脂肪,再于 10000 r/min 离心 15 min 收集沉淀,依次用 75% 乙醇、蒸馏水洗涤,离心取沉淀;采用浓度为 5% SDS,沸水浴 30 min,室温下 10000 r/min 离心 15 min,热蒸馏水反复洗涤沉淀至无 SDS;采用浓度为 3 mg/mL 的胰蛋白酶在 Tris-HCl 缓冲体系(pH 7.8)中 37 °C、120 r/min 摇床震荡处理 12 h,然后将所得混合液在 1500 r/min 离心 5 min,弃去沉淀;所得上清液 4 °C、10000 r/min 离心 15 min,得到沉淀;沉淀用蒸馏水洗涤 3 次,无水乙醇脱水,将样品冻干后得到肽聚糖粗提取物。

1.3.5 中红外光谱分析

参考张津瑜等^[16]的方法,称取 1.5 mg 冻干的肽聚

糖与 200 mg 干燥的 KBr 在玛瑙研钵中混合研磨均匀,置于压片机压模中压片,可得到透明的样品薄片,用傅里叶变换红外谱仪进行红外光谱的扫描,波数范围(4000~400)cm⁻¹,即可得出样品的红外光谱图,用 OPUS 软件导出后使用 OMNIC 8 和 Origin 2018 数据分析软件进行制图分析。

1.3.6 不同来源肽聚糖对 *C. perfringens* 芽孢的诱导萌发处理

将提取的三种菌体肽聚糖溶于无菌水,按 1:10,1:100,1:1000 稀释,各取 1 mL 肽聚糖稀释溶液加入 100 μL 芽孢悬液,置于 37 °C 水浴中孵育 60 min。孵育后立即冷却,测定 OD₆₀₀ 值、热抗性和 DPA 释放量。同时做空白对照。

1.3.7 芽孢悬液浑浊度(OD₆₀₀)和折光性的测定

参考 Saeed Banawas^[20]的方法,每隔 10 min 取 200 μL 芽孢悬液于 96 孔板中,测定 OD₆₀₀ 值,根据芽孢萌发过程中吸光值 OD₆₀₀ 的降低来计算芽孢萌发的程度,并表示为占初始 OD₆₀₀ 的百分比^[13];每隔 20 min 取芽孢悬液滴于载玻片上,然后盖上盖玻片,放置于相差显微镜上观察其折光性。

1.3.8 芽孢 DPA(2,6-吡啶二羧酸)释放量的测定

参考 Cabrera-Martinez^[21]的方法,采用荧光法测量 DPA 释放。芽孢经肽聚糖孵育后,迅速置于冰浴中冷却,在 4 °C、7000 r/min 条件下离心 3 min,测定上清液 DPA 量。取 100 μL 上清液于 96 孔板,并加入 100 μL TbCl₃·6H₂O,通过酶标仪在激发波长 270 nm,发射波长 545 nm 处测定荧光值。未处理样品和 100 °C 沸水浴处理 60 min 的样品分别作为阴性对照和阳性对照,芽孢萌发释放 DPA 的百分比通过公式(1)进行计算:

$$\text{DPA释放率} = \frac{F_1 - F_0}{F_2 - F_0} \times 100\% \quad (1)$$

其中 F_0 、 F_1 和 F_2 分别为未处理、萌发剂处理和沸水浴处理 60 min 后样品的荧光强度。

1.3.9 芽孢热抗性的测定

参考 J. Wei^[22]的方法:每 20 min 取样一次,置于 80 °C 水浴中处理 20 min,然后迅速在冰上冷却,无菌蛋白胨水进行梯度稀释后,用 TSC 培养基在 37 °C 厌氧培养 24 h,记录菌落数并转化为 log₁₀(CFU/mL)。

1.4 数据处理

所有试验均重复三次。方差分析(ANOVA)用 SPSS16.0 软件进行显著性分析($p \leq 0.05$);绘图使用 Origin 8.5 软件。

2 结果与讨论

2.1 不同菌体肽聚糖提取物中红外光谱分析

鉴定

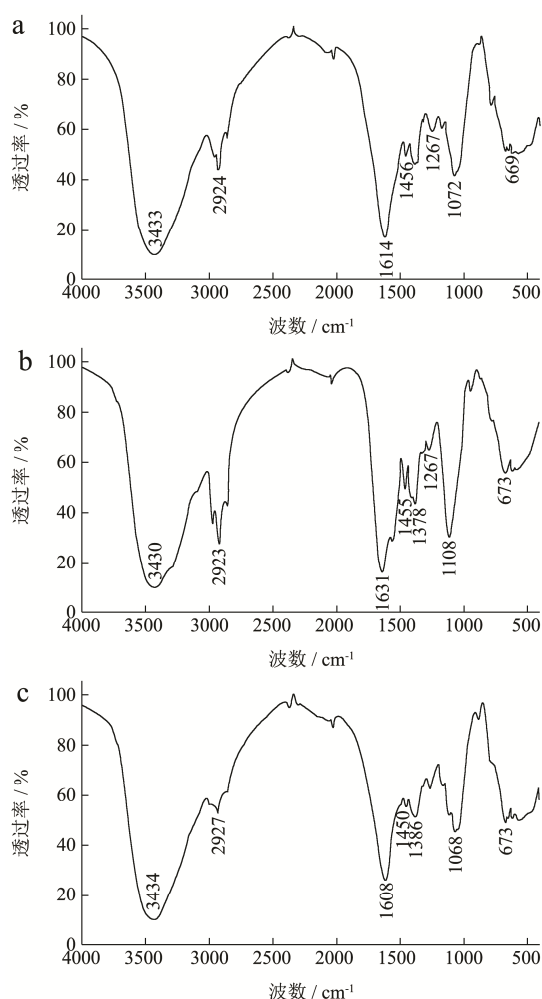


图1 *C. perfringens* (a)、*B. subtilis* (b)和 *S. aureus* (c) 菌体肽聚糖提取物红外光谱图

Fig.1 Infrared spectrum of peptidoglycan in the cell wall of *C. perfringens*(a)、*B. subtilis*(b) and *S. aureus*(c)

C. perfringens、*B. subtilis* 和 *S. aureus* 营养体肽聚糖提取物红外光谱分别在 3443、3430、3434 cm^{-1} 处有一个强吸收峰, 这是由 N-H 键伸缩振动引起, 表明有酰胺 A 带; 在 1614、1631、1608 cm^{-1} 处有强吸收峰, 为酰胺键 C=O 伸缩振动, 表明有酰胺 I 带; 在 1456、1455、1450 cm^{-1} 尖谱带区域内存在 N-H 面内变角振动, 表明肽聚糖中有酰胺 II 带; 在 1072、1108、1068 cm^{-1} 为糖苷键 C-O-C 以及糖环的伸缩振动峰。酰胺 I 带、酰胺 II 带、酰胺 A 带是肽链的几个特征带^[23]。这些峰的出现均反映出提取物含有 N-乙酰葡萄糖胺、N-乙酰胞壁酸和多肽成分, 有典型的肽聚糖结构特征。

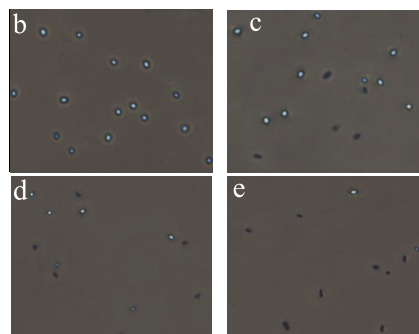
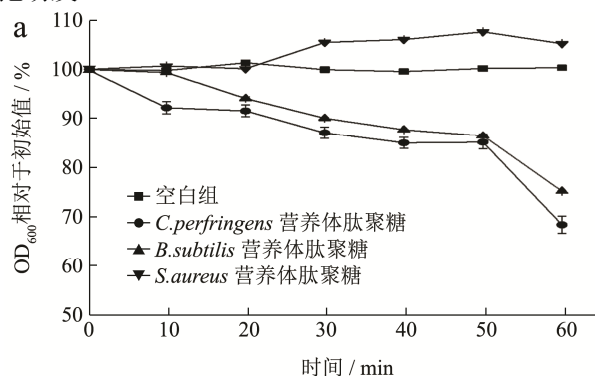
此鉴定结果与张悦等^[24]对双歧杆菌肽聚糖的结构分析及张津瑜等^[16]对 *B. subtilis* 芽孢皮层肽聚糖的结构分析一致。经过结构分析确定提取肽聚糖的结构与已知肽聚糖的结构相吻合, 表明提取物含有肽聚糖。

2.2 不同菌体肽聚糖提取物对 *C. perfringens*

芽孢萌发的影响

2.2.1 芽孢悬液浊度(OD_{600})和折光性的测定

芽孢萌发时, 其核心吸水膨胀, 折光性发生变化, 因此, 随着萌发的继续, 其 OD_{600} 值会呈现下降趋势, 通过相差显微镜观察其亮度逐渐变暗。结果如图 2 所示, 加入 *C. perfringens* 营养体肽聚糖促进 *C. perfringens* 芽孢萌发的效果最显著, *B. subtilis* 营养体肽聚糖萌发效果次之, 孵育 60 min 后, 芽孢悬浮液 OD_{600} 值分别下降 31.71%, 24.92%。而加入 *S. aureus* 营养体肽聚糖的 OD_{600} 值随时间的变化并无显著下降, 基本趋于平缓, 表明 *S. aureus* 营养体肽聚糖并不能很好的诱导 *C. perfringens* 芽孢萌发。相差显微镜图验证 OD_{600} 结果, 在 0-60 min 内, 随着时间的增加, *C. Perfringens* 和 *B. subtilis* 营养体肽聚糖诱导的芽孢折光性降低, 芽孢中心由相亮逐渐变为相暗, 芽孢萌发; 而 *S. aureus* 营养体肽聚糖诱导的芽孢则始终为相亮, 芽孢未萌发。这也表明 *C. Perfringens* 和 *B. subtilis* 营养体肽聚糖可以诱导 *C. perfringens* 芽孢萌发, 而 *S. aureus* 营养体肽聚糖不能显著的诱导 *C. perfringens* 芽孢萌发。



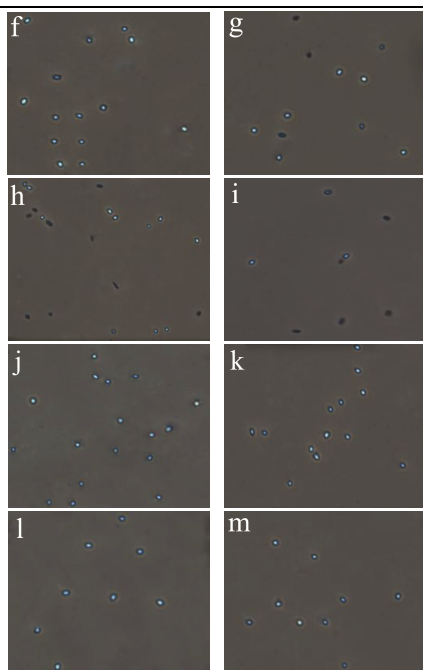


图2 不同菌体营养体肽聚糖最佳萌发浓度对 *C. perfringens* 芽孢 OD₆₀₀ 值 (a) 及折光性 (b~m) 变化的影响

Fig.2 Change in OD₆₀₀ value (a) and refractivity (b~m) from *C. perfringens* spore induced by optimum germination concentration of different vegetative peptidoglycan

注: b~e: *B. subtilis* 营养体肽聚糖; f~i: *C. perfringens* 营养体肽聚糖; j~m: *S. aureus* 营养体肽聚糖。孵育时间 b、f、j: 0 min; c、g、k: 20 min; d、h、l: 40 min; e、i、m: 60 min。

2.2.2 芽孢 DPA 释放量的测定

对于休眠的芽孢, 芽孢核含有大量的 2,6-吡啶二羧酸 (DPA), 芽孢萌发的主要特征之一是 DPA 释放, DPA 的释放率与芽孢萌发率有关^[25], 因此, 可以通过 DPA 的释放率来表征不同菌体肽聚糖对 *C. Perfringens* 芽孢萌发的影响。结果如图 3 所示, 用 *C. perfringens* 营养体和 *B. subtilis* 营养体肽聚糖诱导 *C. perfringens* 芽孢萌发, 其芽孢核心 DPA 的释放率逐渐

增大, 孵育 60 min 后, 芽孢 DPA 的释放量分别为 38.29% 和 30.84%。表明 *C. perfringens* 营养体和 *B. subtilis* 营养体肽聚糖均可诱导 *C. perfringens* 芽孢萌发, 且 *C. perfringens* 营养体肽聚糖效果较好。而 *S. aureus* 营养体肽聚糖并不能诱导 *C. perfringens* 芽孢显著萌发, 其芽孢悬液上清液 DPA 释放率基本不变。

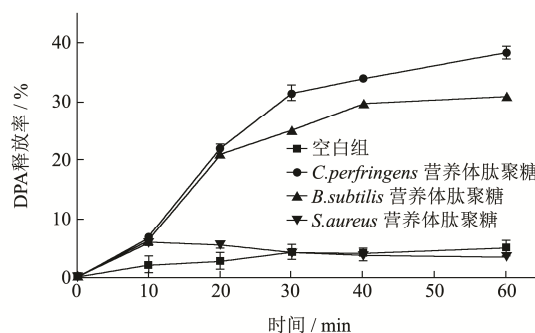


图3 不同菌体营养体肽聚糖最佳萌发浓度对 *C. perfringens* 芽孢 DPA 释放的影响

Fig.3 DPA release from *C. perfringens* spore induced by optimum germination concentration of different vegetative peptidoglycan

2.2.3 芽孢热抗性的测定

萌发的芽孢会释放 DPA, 同时会失去热抗性^[25], 所以可以通过热抗性损失来表征不同菌体肽聚糖对 *C. Perfringens* 芽孢萌发的影响, 结果如表 1 所示, 1:10 稀释的 *C. perfringens* 营养体和 *B. subtilis* 营养体肽聚糖对 *C. Perfringens* 芽孢的热抗性具有显著影响 ($p<0.05$), 对芽孢萌发具有促进作用。在 20 min 时芽孢热抗性已显著下降, 表明 *C. perfringens* 芽孢已经开始萌发。 *C. perfringens* 营养体肽聚糖诱导效果与其他菌体肽聚糖之间存在显著性差异 ($p<0.05$), 诱导芽孢萌发的效果最好, 且其热抗性损失最大。而 *S. aureus* 营养体肽聚糖在不同时刻的热抗性损失没有显著性差异, 表明并不能诱导 *C. perfringens* 芽孢萌发。

表 1 不同菌体营养体肽聚糖对芽孢热抗性的影响

Table 1 Effect of different vegetative peptidoglycan on spore heat resistance loss

时间/min	热抗性平板计数/[log(CFU/mL)]					
	0	20	40	60	80	100
空白	6.01±0.01 ^{bAB}	6.02±0.01 ^{cB}	6.01±0.01 ^{bAB}	5.99±0.01 ^{bA}	6.01±0.02 ^{cAB}	6.01±0.01 ^{bAB}
<i>C. perfringens</i>	6.79±0.00 ^{cC}	6.36±0.02 ^{dA}	6.34±0.04 ^{cA}	6.46±0.01 ^{cB}	6.43±0.05 ^{dB}	6.47±0.03 ^{cB}
<i>B. subtilis</i>	6.04±0.01 ^{bE}	5.92±0.01 ^{bD}	5.87±0.02 ^{aC}	5.83±0.01 ^{aB}	5.80±0.01 ^{aA}	5.82±0.02 ^{aAB}
<i>S. aureus</i>	5.82±0.05 ^{aA}	5.86±0.04 ^{aA}	5.84±0.02 ^{aA}	5.83±0.02 ^{aA}	5.88±0.04 ^{bA}	5.86±0.04 ^{aA}

注: 平均值±标准差; 不同大写字母代表不同时间之间的显著性差异 ($p<0.05$), 不同小写字母代表不同菌株之间的显著性差异 ($p<0.05$)。

在肉制品工业生产中, *C. perfringens* 芽孢是引起肉制品腐败变质的关键因素之一, 如何快速、高效地诱导 *C. perfringens* 芽孢萌发, 使其抗逆性消失, 在其

萌发的薄弱环节以便使用常规的方法将其杀灭, 保证食品的安全是现在研究的热点^[26]。通过本研究发现不同菌属肽聚糖, 可诱导芽孢萌发的能力以及效率均具

有显著差异。同时相关研究发现,不同菌属肽聚糖具有不同的结构,下一步在该研究的基础上,可以进一步分析 *C. perfringens* 以及 *B. subtilis* 营养体肽聚糖结构之间的差异,为进一步高效诱导芽孢萌发提供思路。同时三种菌体肽聚糖对 *C. perfringens* 芽孢萌发的动态变化过程及其诱导萌发的作用机制还不明确,因此后续可以开展肽聚糖诱导芽孢萌发的作用机制及其动力学规律深入探究。

3 结论

C. perfringens 营养体、*B. subtilis* 营养体肽聚糖均能够诱导 *C. perfringens* 芽孢萌发,其中 *C. perfringens* 营养体肽聚糖效果最佳,而 *S. aureus* 营养体肽聚糖对 *C. perfringens* 芽孢萌发无显著影响。该结论为揭示肽聚糖诱导 *C. perfringens* 芽孢萌发的作用机制提供了一定的科学依据,也为更高效、定向地调控 *C. perfringens* 致病菌,保证食品安全提供了理论基础。

参考文献

- [1] United States Department of Agriculture, Food Safety Inspection Service [USDA-FSIS]. Introduction to the microbiology of food processing [N]. Small Plant News Guidebook Series. 2012-08-01(9-24)
- [2] Monma C, Hatakeyama K, Obata H, et al. Four foodborne disease outbreaks caused by a new type of enterotoxin-producing clostridium perfringens [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2015, 53(3): 859-867
- [3] 梁栋,陈芳,胡小松.芽孢萌发研究进展[J].中国食品学报, 2018,18(6):221-228
LIANG Dong, CHEN Fang, HU Xiao-song. Research progress on the spore germination [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(6): 221-228
- [4] Setlow P. Spores of *Bacillus subtilis*: Their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals [J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 101(3): 514-525
- [5] Raju D, Setlow P, Sarker M R. Antisense-RNA-Mediated decreased synthesis of small, acid-soluble spore proteins leads to decreased resistance of *Clostridium perfringens* spores to moist heat and UV radiation [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(7): 2048-2053
- [6] Sarker M R, Shivers R P, Sparks S G, et al. Comparative experiments to examine the effects of heating on vegetative cells and spores of *Clostridium perfringens* isolates carrying plasmid genes versus chromosomal enterotoxin genes [J]. Applied and Environment Microbiology, 2000, 66(8): 3234-3240
- [7] Rahayu W P, Fardiaz D, Kartika G D, et al. Estimation of economic loss due to food poisoning outbreaks [J]. Food Science & Biotechnology, 2016, 25(1): 157-161
- [8] Talukdar P K, Udampijitkul P, Hossain A, et al. Inactivation strategies for *Clostridium perfringens* spores and vegetative cells [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 83(1): AEM. 02731-16
- [9] Setlow P. Germination of spores of the Orders *Bacillales* and *Clostridiales* [J]. Annual Review of Microbiology, 2017, 71(1): 459
- [10] Vollmer W, Blanot D, Pedro M A D. Peptidoglycan structure and architecture [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2008, 32(2): 149-167
- [11] Shah I M, Laaberki M, Popham D L, et al. A eukaryotic-like Ser/Thr kinase signals bacteria to exit dormancy in response to peptidoglycan fragments [J]. Cell, 2008, 135(3): 486-496
- [12] Setlow P. Dormant spores receive an unexpected wake-up call [J]. Cell, 2008, 135(3): 410-412
- [13] 张良.高静压与温度协同杀灭芽孢的效果与机制研究[D].北京:中国农业大学,2015
ZHANG Liang. Research on effectiveness and mechanism of spore inactivation by high hydrostatic pressure combined with heat [D]. Beijing: China Agricultural University, 2015
- [14] Kokai-Kun J F, Songer J G, Czczulin J R, et al. Comparison of Western immunoblots and gene detection assays for identification of potentially enterotoxigenic isolates of *Clostridium perfringens* [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1994, 32(10): 2533-2539
- [15] Banawas S, Paredes-Sabja D, Korza G, et al. The *Clostridium perfringens* germinant receptor protein GerKC is located in the spore inner membrane and is crucial for spore germination [J]. Journal of Bacteriology, 2013, 195(22): 5084-5091
- [16] 张津瑜,孙静,郭洪伟,等.枯草杆菌芽孢皮层肽聚糖的提取与结构分析[J].食品科技,2018,43(4):10-14
ZHANG Jin-yu, SUN Jing, GUO Hong-wei, et al. Extraction and structure analysis of cortical peptidoglycan of *Bacillus subtilis* spores [J]. Food Science and Technology, 2018, 43(4): 10-14
- [17] 卢杨柳,马静一,艾志录,等.含肉桂醛猪肉糜中金黄色葡萄球菌热失活模型的建立[J].中国食品学报,2019,19(9):195-201
LU Yang-liu, MA Jing-yi, AI Zhi-lu, et al. Thermal

- inactivation model of *Staphylococcus aureus* in ground pork contained cinnamaldehyde [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(9): 195-201
- [18] 刘景圣,蔡丹,孙涛.嗜酸乳杆菌细胞壁肽聚糖的分离提取[J].吉林农业大学学报,2008,4:605-609
- LIU Jing-Sheng, CAI Dan, SUN Tao. Extraction of peptidoglycan in *Lactobacillus acidophilus* cell wall [J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2008, 4: 605-609
- [19] 杨旭,朱静静,潘道东,等.嗜酸乳杆菌肽聚糖的六种提取方法比较研究[J].食品工业科技,2016,37(15):66-70,75
- YANG Xu, ZHU Jing-jing, PAN Dao-dong, et al. Comparison of six extraction methods of peptidoglycan in *Lactobacillus acidophilus* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(15): 66-70, 75
- [20] Saeed B, Sarker M R. L-lysine (pH 6.0) induces germination of spores of *Clostridium perfringens* type F isolates carrying chromosomal or plasmid-borne enterotoxin gene [J]. Microbial Pathogenesis, 2018, 123: 227-232
- [21] Cabrera-Martinez R M, Tovar-Rojo F, Vepachedu V R, et al. Effects of overexpression of nutrient receptors on germination of spores of *Bacillus subtilis* [J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(8): 2457-2464
- [22] Wei J, Setlow P, Hoover D G. Effects of moderately high pressure plus heat on the germination and inactivation of *Bacillus cereus* spores lacking proteins involved in germination [J]. Letters in Applied Microbiology, 2009, 49(5): 646-651
- [23] Hamm P, Lim M, Hochstrasser R M. Structure of the amide I band of peptides measured by femtosecond nonlinear-infrared spectroscopy [J]. The Journal of Physical Chemistry B, 1998, 102(31): 6123-6138
- [24] 张悦,宋晓玲,黄健.双歧杆菌肽聚糖结构及分子量的分析[J].微生物学通报,2007,34(4):676-681
- ZHANG Yue, SONG Xiao-Ling, HUANG Jie. Structure and molecular weight analysis of *Bifidobacterium* peptidoglycan [J]. Microbiology China, 2007, 34(4): 676-681
- [25] Izabela Porebska, Barbara Sokolowska, Łukasz Wozniak. Dipicolinic acid release and the germination of *Alicyclobacillus acidoterrestris* Spores under Nutrient Germinants [J]. Polish Journal of Microbiology, 2017, 66(1): 67-74
- [26] He L, Chen Z, Wang S, et al. Germination, outgrowth, and vegetative-growth kinetics of dry-heat-treated individual spores of *Bacillus species* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(7): 1698-1702

(上接第 128 页)

- [17] Fik M, Leszczyńska-Fik A. Microbiological and sensory changes in minced beef treated with potassium lactate and sodium diacetate during refrigerated storage [J]. International Journal of Food Properties, 2007, 10(3): 589-598
- [18] 贺羽,王帅,金益,等.天然保鲜剂对低温肉制品的保鲜作用[J].江苏农业科学,2019,47(1):177-182
- HE Yu, WANG Shuai, JIN Yi, et al. Fresh-keeping effect of natural preservatives on low-temperature meat products [J]. Jiangsu Agricultural Science, 2019, 47(1): 177-182
- [19] Georgantelis D, Ambrosiadis I, Katikou P, et al. Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 °C [J]. Meat Science, 2007, 76(1): 172-181
- [20] Claus J R, Du C. Nitrite-embedded packaging film effects on fresh and frozen beef color development and stability as influenced by meat age and muscle type [J]. Meat Science, 2013, 95(3): 526-535
- [21] Frédérique B, Yvesm, Philippe G, et al. Influence of vitamin E on lipid and protein oxidation induced by H₂O₂-activated MetMb in microsomal membranes from turkey muscle [J]. Meat Science, 2002, 61(8): 389-395
- [22] Bekhit A E D, Cassidy L, Hurst R D, et al. Post-mortem metmyoglobin reduction in fresh venison [J]. Meat Sci, 2007, 75(1): 53-60
- [23] Feng T, Du Y, Li J, et al. Enhancement of antioxidant activity of chitosan by irradiation [J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 73(1): 126-132
- [24] 夏秀芳,孔保华,于长青.几种天然香辛料提取物延长冷却肉货架期的研究[J].食品与机械,2008,3:55-59
- XIA Xiu-fang, KONG Bao-hua, YU Chang-qing. Study on extending the shelf life of chilled meat with several natural spice extracts [J]. Food and Machinery, 2008, 3: 55-59
- [25] 张慧芸,郭新宇.丁香精油-壳聚糖复合可食性膜对生肉糜保鲜效果的影响[J].食品科学,2014,35(18):196-200
- ZHANG Hui-yun, GUO Xin-yu. Effect of clove essential oil-chitosan composite edible film on fresh meat fresh meat preservation effect [J]. Food Science, 2014, 35(18): 196-200