中强度脉冲电场对大肠杆菌的灭活效果及机理分析

邝金艳,林颖,王丽,李宗军^{*}

(湖南农业大学食品科学技术学院,湖南长沙 410128)

摘要:脉冲电场作为一种非热灭菌方法,已被广泛用于控制微生物污染。该研究探讨了中强度脉冲电场 (Moderate Intensity Pulsed Electric Fields, MIPEF)在不同介质溶液(氯化钠、PBS 和蛋白胨)、氯化钠质量分数(质 量分数 0.85%、0.10%、0.20%和 0.30%氯化钠)、电场强度(0.16、0.20和 0.24 kV/cm)、处理时间(20、40、60、 80 和 100 min)和菌液密度(10^3 、 10^5 、 10^7 和 10^9)的条件下对大肠杆菌的灭活效果。研究考察了经 MIPEF处理的 大肠杆菌的形态变化、胞内大分子物质变化和胞内酶活性。在不同条件处理下发现,MIPEF对大肠杆菌的灭活效果 不同。处理时间与 MIPEF 的灭活效果呈正相关,处理 100 min 时,微生物数减少了 3.08 lg CFU/mL,且温差为 2.10 C。 在不同介质溶液中,MIPEF 对大肠杆菌的杀菌效果不同。随着氯化钠溶液质量分数增大,MIPEF 对大肠杆菌的灭活 效果显著降低。菌液密度越小,MIPEF 的杀菌效果越强。场发射扫描电子显微镜(Field Emission Scanning Electron Microscope, FESEM)和生物透射电镜(Transmission Electron Microscopy, TEM)表明,MIPEF处理后细胞的完整性 遭到破坏。经 MIPEF处理后,包括蛋白质和 DNA 内的大分子物质明显减少。此外,经 MIPEF处理的 100 min 的 样本相比于对照组样本中,ATP 酶(Adenosine Triphosphatase, ATPase)、琥珀酸脱氢酶(Sucinate Dehydrogenase, SDH)和丙酮酸激酶(Pyruvate Kinase, PK)活性显著降低(P<0.05),钠钾泵(Sodium-Potassium Pump, Na⁺K⁺-ATPase)、钙泵(Calcium Pump, Ca²⁺Mg²⁺-ATPase)和 SDH 活性分别下降了 34.21%、32.26%和 86.93%, PK 活性降 低了 88.93 U/g prot.该研究可以为非热杀菌技术在食品工业中的应用及 MIPEF 杀菌机理的挖掘提供参考。

关键词:中强度脉冲电场;大肠杆菌;灭活;非热杀菌 文章编号:1673-9078(2025)03-192-202

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.3.0111

Inactivation Effect of Moderate-intensity Pulsed Electric Field on

Escherichia coli and the Underlying Mechanism

KUANG Jinyan, LIN Ying, WANG Li, LI Zongjun*

(College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: As a non-thermal sterilization method, pulsed electric field has been widely studied for its ability to control microbial contamination. The inactivation effects of moderate-intensity pulsed electric field (MIPEF) on *Escherichia coli* were clarified by using different media solutions (sodium chloride, phosphate-buffered saline, and peptone), mass fractions of sodium chloride (0.85%, 0.10%, 0.20%, and 0.30%), electric field intensities (0.16, 0.20, and 0.24 kV/cm), treatment times (20, 40, 60, 80, and 100 min), and bacterial densities (10³, 10⁵, 10⁷, and 10⁹). The morphological changes, intracellular 引文格式:

邝金艳,林颖,王丽,等.中强度脉冲电场对大肠杆菌的灭活效果及机理分析[J].现代食品科技,2025,41(3):192-202.

KUANG Jinyan, LIN Ying, WANG Li, et al. Inactivation effect of moderate-intensity pulsed electric field on *Escherichia coli* and the underlying mechanism [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(3): 192-202.

收稿日期: 2023-01-23

基金项目:湖南省重点研发计划(2022NK2035)

作者简介: 邝金艳(1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: 1186647408@qq.com

通讯作者:李宗军(1967-),男,博士,教授,研究方向:食品生物技术,E-mail:hnlizongjun@163.com

Modern Food Science and Technology

macromolecules, and intracellular enzyme activities of *E. coli* treated with MIPEF were examined. The inactivation effect of MIPEF on *E. coli* differed under different conditions. The treatment time was positively correlated with the inactivation effect of MIPEF, and the microbial count was reduced by 3.08 lg CFU/mL after 100 min of treatment, with a temperature differential of 2.10 °C . The bactericidal effect of MIPEF on *E. coli* was different in various media solutions. The inactivation effect of MIPEF on *E. coli* decreased significantly as the mass fraction of sodium chloride increased. MIPEF had a greater bactericidal effect when the bacterial density was lower. The results of field emission scanning electron microscopy and transmission electron microscopy demonstrated that cell integrity was compromised following MIPEF treatment. Macromolecular constituents, including proteins and DNA, were significantly reduced following MIPEF treatment. Furthermore, the activities of adenosine triphosphatase (ATPase), succinate dehydrogenase (SDH), and pyruvate kinase (PK) were significantly diminished (P<0.05) in the samples treated with MIPEF for 100 min compared with those in control samples. Furthermore, the activities of Na⁺K⁺-ATPase, Ca²⁺Mg²⁺-ATPase, and SDH were reduced by 34.21%, 32.26%, and 86.93%, respectively, whereas the activity of PK was reduced by 88.93 U/g prot. This study provides a reference for application of non-thermal sterilization technology in the food industry and clarifies the sterilization mechanism of MIPEF.

Key words: moderate-intensity pulsed electric field; Escherichia coli; inactivation; non-thermal sterilization

食源性疾病是影响食品安全和人类健康的最 大因素之一^[1]。许多致病菌已被确定导致食物传 播疾病或食物腐败,如大肠杆菌、单核细胞增生 李斯特菌、金黄色葡萄球菌等。其中大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*)是一种常见的食源性 致病菌,属于革兰氏阴性菌,可通过消化道、呼 吸道等途径感染,引发呕吐、腹泻、腹痛和快速 脱水,对消费者和食品行业都构成严重威胁^[2]。 微生物因素潜在的食品安全问题不容忽视,因此, 杀菌过程是食品工业中不可或缺的工序。杀菌技 术不仅能延长食品储存时间,还可以降低致病菌 污染的风险^[3,4]。

脉冲电场是研究最广泛、最具有发展前景的非 热加工技术之一,为传统的热杀菌提供了新颖的替 代方案^[5,6]。脉冲电场一般由脉冲发生系统和脉冲电 场处理室组成。脉冲电场利用高压脉冲来灭活物料 中的微生物,其处理时间短,温度幅度变化小^[7]。 许多研究表明,脉冲电场能够灭活食品中的细 菌^[8,9]、细菌内生孢子^[10]、真菌^[11]、寄生虫^[12,13]等, 同时能保留食品原有的营养成分和感官属性^[6,14-16]。 脉冲电场技术灭活微生物的国内外研究较为广泛, 但是当前脉冲电场杀菌技术工业化难度大。脉冲电 场设备体积大,造价高,需要较高的电压,电极在 高电压下易电解及操作过程中风险较高^[17,18];脉冲 电场被认为是灭活液体和半固体食品中致病菌和腐 败菌最有前途的非热杀菌技术之一^[16]。脉冲电场技 术单独作用于杀菌有一定的局限性,因此,将电场 技术与其他杀菌技术协同增强杀菌效果,优化杀菌 工艺^[10,19,20]。现今,大多数研究的电压产生的电场 强度高至上万,高压电源的成本较高及改进难度大, 设备体积大。针对上述问题,在避免传统杀菌方式 缺点的同时,中强度脉冲电场(Moderate Intensity Pulsed Electric Fields, MIPEF),电场强度<5 kV/cm,引 起了大多数研究者的关注^[17,21-24],能降低能耗、成 本也更实惠、操作简单、避免热效应且风险低。

■目前,人们普遍认为技术的灭活机理主要集中 在电崩解理论^[25-27]。有部分研究者认为细胞膜类似 于电容器。当施加外部电场时,细胞膜两边的不同 电荷和电解质会在膜的内外集中,对膜造成挤压, 从而减少膜的厚度。如果跨膜电压超过了一个特定 的阈值,细胞膜会开始出现孔洞,形成崩解孔,当 崩解孔面积占微生物细胞膜总面积的比例较小,是 可以逆转的。然而,如果崩解孔面积占比过大,并 且持续受到电场的影响,它们会变得不可逆,导致 细胞膜内的物质与外部物质发生大量自由交换,最 终导致细胞死亡。

本文旨在探索 MIPEF 灭活大肠杆菌的可行性以 及探究 MIPEF 灭活大肠杆菌的机理。因此,本文研 究了 MIPEF 在不同条件下对大肠杆菌的灭活效果, 测定了电场前后温度变化,表明了 MIPEF 是非热杀 菌技术,并采用生物学手段研究了 MIPEF 对大肠杆 菌的细胞结构和酶活性等方面的影响。本研究对非 热杀菌技术在食品工业中的应用具有重要意义,并 将完善 MIPEF 的杀菌机理。

1 材料与方法

1.1 试剂和菌株

大肠杆菌 ATCC 25922,中国微生物菌种保藏 中心;胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB),青岛高科技工 业园海博生物技术有限公司;胰蛋白胨大豆琼脂 (TSA),青岛高科技工业园海博生物技术有限公 司;细菌学蛋白胨,广东环凯微生物科技有限公司; 氯化钠、氯化钾、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾,国药 集团化学试剂有限公司;三磷酸腺苷酶 (Adenosine Triphosphate, ATPase)、琥珀酸脱氢酶 (Succinate Dehydrogenase, SDH)、丙酮酸激酶 (Pyruvate Kinase, PK),南京建成生物工程研究所;所有有机 试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器和设备

高压脉冲电场设备,华南理工大学自制;LMQ. C全自动高压蒸汽灭菌锅,山东新华医疗器械有限 公司;SPX-25085H-II生化培养箱,上海新苗医疗 器械制造有限公司;FE38-standard台式电导率仪, 梅特勒托利多;FEI TECNAI G2 12 生物透射电镜, 赛默飞世尔科技公司;SU8020 场发射扫描电子显微 镜,日本日立公司;SpectraMax® ABS Plus 酶标仪, 美谷分子仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 处理条件与计算过程

从4℃冰箱保存的斜面菌种玻璃试管中挑取少 量菌体,无菌条件下,接种于 50 mL TSB 液体培养 基中,在 37 ℃,120 r/min下,培养 22 h 得到微生 物培养液。将培养好的微生物菌液,以1 mL 的量 接种于 50 mL TSB 液体培养基的锥形瓶中,37 ℃、 120 r/min 培养 6 h 至对数生长期,取培养好的菌液 5 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,用质量分数 为 0.85% 的氯化钠溶液使菌体重悬至适当浓度, 备用。

向半径为4 cm 的圆柱形的反应室中加入 50 mL 菌 悬液(两电极间隔 1 cm)。考察室温条件下 (26~28 ℃),不同介质(0.85%氯化钠、0.01 mol/L PBS 和 0.10%蛋白胨)、氯化钠质量分数(0.85%、 1.00%、2.00%和 3.00%)、电场强度(0.16、0.20 和 0.24 kV/cm)、处理时间(20、40、60、80 和 100 min)和菌液密度(10³、10⁵、10⁷ 和 10⁹)对微 生物灭活的影响。MIPEF 处理的波形为指数型衰 减波,基准时间为 25.0 μs,指数衰减波波形占 15.0 μs,触发源为 4.00 V,触发频率为 10 Hz。

未电场处理和经过电场处理的液体菌悬液各吸取1mL,用质量分数为0.85%无菌生理盐水进行梯度稀释,吸取1mL稀释后的菌液于灭菌干燥的玻璃培养皿中后,将50℃TSA培养基倒入无菌玻璃培养皿中与菌液混匀,37℃培养48h,进行菌落计数,试验结果表示为lgN₀-lgN,其中,N₀和N分别表示PEF处理前后的微生物数量(CFU/mL)。同时用电子温度计记录电场处理前后菌液的温度。

根据 MIPEF 在不同条件下对大肠杆菌的灭活 效果,选择不同的处理时间(20、40、60、80和 100 min)作为研究 PEF 灭活大肠杆菌机理的条件。

1.3.2 细胞形态的观察

场发射扫播电子显微镜(Field Emission Scanning Electron Microscopy, FESEM):将电场处理前后离 心收集的(5000 r/min, 5 min, 4℃)大肠杆菌细胞置于 2.5%(*V/V*)的戊二醛溶液中,在4℃条件 下固定过夜。固定后的细胞进行离心收集,并用 0.01 mol/L PBS 缓冲溶液洗涤 3 次,然后用 50%、70%、100%(*V/V*)的乙醇溶液进行脱水(4 500 r/min、5 min)。将脱水后的样品置于 -20 ℃真空冷冻干燥 1 h,样品喷金用于形态学观察。

生物透射电镜(Transmission Electron Microscope, TEM):将电场处理前后离心收集的(5000 r/min, 5 min, 4 ℃) 大肠杆菌细胞置于 2.5% (*V*/*V*) 的戊 二醛溶液中,在4℃条件下固定过夜。倒出固定液, 用 0.1 mol/L, pH 值 7.0 的 PBS 漂洗样品三次, 每 次 15 min。用 1% (V/V) 锇酸溶液固定样品 1~2 h, 小 心取出锇酸废液,用 0.1 mol/L, pH 值 7.0 的磷酸缓 冲液漂洗样品三次,每次15 min,用梯度浓度(包 括 30%、50%、70%、80%、90% 和 95% 五 种 浓 度)的乙醇溶液对样品进行脱水处理,每种浓度处 理 15 min, 再用 100% 的乙醇处理 20 min 最后过 度到纯丙酮处理 20 min,用包埋剂与丙酮的混合液 (V:V=1:1)处理样品1h,用包埋剂与丙酮的混合 液(V:V=3:1)处理样品3h,纯包埋剂处理样品过 夜;将经过渗透处理的样品包埋起来,70℃加热过 夜,即得到包埋好的样品。样品在 LEICA EM UC7 型超薄切片机中切片,获得70~90 nm的切片,切 片经柠檬酸铅染液和醋酸双氧轴染液各染色 5 min 后晾干即可上镜观察,加速电压 100 kV。

2025, Vol.41, No.3

1.3.3 细胞内大分子物质渗出的测定

核酸和蛋白质的含量是借鉴以前的方法并进行 修改^[28]。在波长分别为 260 nm 和 280 nm 的吸光度 (Abs)用来测量液体中核酸和蛋白质浓度。取 50 mL 电场处理后的菌悬液,在4℃下 5 000 r/min 离心 10 min 后收集上清液,上清液置于石英比色皿 中,酶标仪下分别测定 260 nm 和 280 nm 处的吸光 值 (Abs),试验平行三次。

1.3.4 细胞内酶活的测定

将电场处理前后的菌液在冰浴条件下进行超声 处理(功率300W,超2s,间9.9s,共7min)。 采用试剂盒测定不同处理后大肠杆菌的ATPase、 SDH和PK活性,检测方法按照试剂盒说明书进行。

1.3.5 数据处理办法

每项实验均做 3 次平行,并将结果以平均值 ± 标准差(SD)表示,多组间的差异使用单因素方差分析(ANOVA),运用 SPSS 25 软件进行统计分析,采用 Origin 2021 软件作图。

2 结果与分析

表 1 不同溶液的电导率 Table 1 Conductivity of different solutions

	ł	
序号	不同溶液	电导率/(mS/cm)
1	0.01 mol/L PBS	16.29 ± 0.00
2	0.85 wt.% NaCl	15.06 ± 0.01
3	1.00 wt.% NaCl	17.29 ± 0.00
4	2.00 wt.% NaCl	32.82 ± 0.02
5	3.00 wt.% NaCl	47.2 ± 0.02
6	0.10 wt.% 蛋白胨	0.12 ± 0.00

由表1可知,不同溶液的电导率各不相同,离 子浓度越大,溶液电导率越大。

2.1 不同MIPEF条件下对大肠杆菌的灭活效果

2.1.1 MIPEF对不同电场强度中大肠杆菌的 灭活效果

由图1可见,随着电场强度的增加(0.16~0.24 kV/cm),大肠杆菌的致死对数差值显著增大(*P*<0.05),表明电场强度显著影响氯化钠溶液中的大肠杆菌致死率。当 MIPEF 处理时间为 60 min,电场强度为 0.16、0.20、0.24 kV/cm 时,大肠杆菌的灭活对数差值分别为 0.14、0.95、1.13 lg CFU/mL,且电场处理后与前温差分别为 0.90、1.20、3.50 ℃。

原因是,当微生物细胞持续暴露于电场时,细胞膜 两侧积聚大量电荷,细胞膜两侧电势差发生变化, 细胞膜通透性增加,进而导致细胞死亡。Caminiti 等^[29]使用实验室规模的 PEF 系统设备处理苹果汁, 脉冲宽度为1 μs。当使用 PEF 时,观察到的微生 物数量分别减少为 1.80 lg CFU/mL(24 kV/cm)、 3.45 lg CFU/mL(34 kV/cm)。Huang 等^[30] 报 道 了 PEF 在葡萄汁中对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的微 生物灭活作用随电场强度的增加而增加,微生物数 量分别减少 3.36 和 2.27 lg CFU/mL(输入能量为 199.6 kJ/kg, 275 μs)。因此,从上文可以看出,电场 强度是影响 PEF 对大肠杆菌杀灭效果的重要因素。



图 1 不同电场强度对 E. coli 的灭活效果 Fig.1 Inactivation of E. coli by different electric field intensities

注:图中不同字母表示差异显著 (P<0.05)。图 2~5 同。

2.1.2 MIPEF对不同处理时间中大肠杆菌的 灭活效果





Fig.2 Inactivation of E. coli by different treatment times

如图 2, MIPEF 对大肠杆菌的杀菌效果随电场 处理时间的延长(20~100 min)而增加。处理时间 为每次放电所放脉冲时间之和,大肠杆菌灭活数随 电场处理时间增加而提高,MIPEF 灭活大肠杆菌效 果明显增强。处理时间越长、脉冲数越增加、介质

温度随之升高。在电场强度(0.20 kV/cm)一定的情况下,MIPEF处理 20 min时,大肠杆菌的数量只减少 0.16 个对数且温度差为 0.40 ℃。当处理时间增加到 100 min时,MIPEF 对大肠杆菌的灭活效果增强,大肠杆菌的数量减少了 3.09 lg CFU/mL,温差为 2.10 ℃。此条件下,MIPEF 反应前与反应后的温差不大于 5 ℃,排除了热效应对大肠杆菌的致死作用,这说明 MIPEF 属于非热加工技术。以上结果表明,随着时间推移,微生物细胞不断暴露在电场作用下,细胞膜两端电势差也会相应发生变化,细胞膜通透性也会发生变化,继而引起细胞的死亡。因此,结果表明,电场强度和脉冲处理时间是影响 MIPEF 对大肠杆菌灭活效果的两个重要因素^[31]。

2.1.3 MIPEF对不同介质中大肠杆菌的灭活 效果



Fig.3 Inactivation of *E. coli* by different media

本研究以质量分数 0.85% NaCl、PBS 和质量分 数 0.10% 蛋白胨溶液为处理介质,研究不同处理介 质中 MIPEF 对大肠杆菌的杀菌效率影响。结果如 图 3 所示,在不同介质条件下,MIPEF 对大肠杆菌 的杀菌效果不同。在相同的电场强度和处理时间下 (0.20 kV/cm, 60 min), 大肠杆菌在质量分数 0.85% NaCl 中呈现出更高的失活状态,微生物数量减少了 0.96 lg CFU/mL。这表明较低的电导率有利于提高 MIPEF 的杀菌效率。其中, PBS 具有盐平衡、可调 整的适宜 pH 值缓冲作用和盐离子浓度的作用,能 够维持生物体细胞膜的稳定状态。蛋白胨溶液中离 子强度小,溶液导电性能差,从以上结果可以发现 并不是电导率越低对 E. coli 杀菌效果越好。电导率 是影响电场灭菌效果的重要因素之一,它影响了反 应室的电阻,进而对电场强度和温度产生影响^[32]。 电导率不同,频率和脉冲能量不同,微生物的灭活 率不同。已有研究表明,电场强度、脉冲频率和电导率等不同参数是相互依赖关系^[33]。处理介质的理化特性可以显著影 MIPEF 的杀菌效果,特别是处理介质的电导率对 MIPEF 杀菌效率影响很大,是因为电导率影响电场强度和细胞膜的渗透性^[34,35]。

2.1.4 MIPEF对不同氯化钠质量分数中大肠 杆菌的灭活效果





上图 4 结果表明,氯化钠质量分数高的溶液中 大肠杆菌的杀菌效果略差。与质量分数 0.85% NaCl 相比, 3.00% NaCl 溶液的电导率更高, 电导率分别 为15.06 和 47.21 mS/cm。随着溶液质量分数增大, 介质内离子强度增加,介质渗透压升高影响微生物 生理活动,但 MIPEF 对大肠杆菌的灭活效果显著降低, 灭活数量分别为0.97、0.76、0.24和0.17 lg CFU/mL, 且 MIPEF 处理后温度逐渐上升,温度差分别为 1.20、 1.40、1.80 和 2.00 ℃。电导率决定了放电端的负载 的阻值,是电阻率的倒数从而影响场强和温度,低 电导率杀菌效果强。当暴露于具有多种离子的介质 中时,细胞膜的稳定性可以解释在较高的离子强度 下失活水平降低的原因^[36]。表明,MIPEF 对质量分 数为0.85%氯化钠溶液中的大肠杆菌有较好的灭活 效果(0.20 kV/cm,60 min)。一般来说,MIPEF 处 理在低电导率条件下更有效, 电导率差的增加会削 弱微生物的膜结构,因为在 MIPEF 处理过程中,降 低溶液电导率会增加微生物细胞质和介质之间的电 导率差异,由于渗透力会在膜上造成额外压力,进 而使得细胞膜对 MIPEF 处理更加敏感。同时,离子 强度增大,溶液电导率增大,会导致明显的焦耳热 并增加 MIPEF 处理期间的能耗损失,伴随着介质温 度升高,降低了对微生物细胞外部扰动,最终微生 物呈现较低的灭活效果[37],可以发现,电导率高的 氯化钠溶液中 MIPEF 处理前后温度差值越大。

2.1.5 MIPEF对不同菌液密度中大肠杆菌的 灭活效果



图 5 不同菌液密度对 E. coli 的灭活效果

Fig.5 Inactivation of E. coli by different bacterial densities

在相同 MIPEF 强度和处理时间条件(0.20 kV/cm, 60 min)下,细菌密度对大肠杆菌的影响如图 5 所 示, 菌液密度越小, MIPEF 的杀菌效果越强。当细 菌密度为10°CFU/mL时,MIPEF处理后大肠杆菌 数量仅减少 0.18 lg CFU/mL。随着菌液密度的减少, MIPEF 对大肠杆菌的杀灭作用增强。菌液密度为 107、105和103CFU/mL时,微生物数量分别减少0.94、 1.53 和 1.64 个对数。以上结果说明,在 MIPEF 处 理相同时间内,细菌密度越低杀菌效果越好,细菌 密度对杀菌效果有显著影响(P<0.05),且电场处 理前后的温差为1.00℃左右。结果表明,在固定-定条件下,随着菌液密度的降低,杀菌效果不断增 强。在低细胞密度下,单个细胞分散,细菌呈单层 排列,在较高细胞密度下,细菌以多层结构存在。 在 MIPEF 处理下,细菌的顶层即使失活,也可以 成为物理屏障,保护下面的细菌免受电场作用,从 而降低微生物存活率^[38]。Femandez等^[39]研究了初 始细菌浓度对冷大气等离子体(Cold Atmospheric Plasma, CAP) 射流灭活鼠伤寒沙门氏菌的功效的影 响。结果发现,鼠伤寒沙门氏菌的灭活速率与初始 细菌浓度成反比。在较高的细菌密度下会分布不均 匀,形成相当大的团块和多层结构,这可能为 CAP 处理提供物理保护。

2.2 MIPEF对大肠杆菌的灭菌机理初探

2.2.1 MIPEF对大肠杆菌形态变化的影响

对大肠杆菌的微观结构进行观察,结果如图 6、7 所示。FESEM 结果表示,对照组(图 6a1、6a2)的大肠杆菌细胞未见明显变化,整体上呈完整的杆状边界,而 MIPEF 处理下的细胞则出现了形态变形

和聚集。经过 MIPEF (0.20 kV/cm、20 min) 处理 后(图 6b1、6b2), 细菌表面出现了明显的破坏效应, 具体表现为表面空洞化和更严重的开裂。这些结果 证明, PEF 可以通过破坏菌株的形态结构来发挥抑菌 作用。TEM 照片显示了与 FESEM 结果类似的趋势。



图 6 不同处理时间对 E. coli 形态的影响 (场发射扫描电子显微镜) Fig.6 Effect of different treatment times on the morphology of E. coli (FESEM)

注: a 为对照组, b、c、d、e、f分别为 MIPEF 处理 20、40、60、80、100 min。1 为放大10 000 倍, 2 为放大 40 000 倍。箭头代表破损细胞。

2025, Vol.41, No.3



图 7 不同处理时间对 E. coli 形态的影响(生物透射电镜) Fig.7 Effect of different treatment times on the morphology of E. coli (TEM)

注: a 为对照组, b、c、d、e、f 分别为 MIPEF 处理 20、40、60、80、100 min。箭头代表细胞的细胞膜、细胞 壁及细胞质变化。

如图 7 所示,未处理(图 7a1、7a2)的细菌呈 典型的棒状、无破损、光滑,细胞膜完整,细胞质 在菌体中分布均匀。相比之下,经 MIPEF 处理 的细菌则不完整、破碎。在 MIPEF 处理 60 min 后(图7d1、7d2),大肠杆菌的细胞结构发生了很 大变化,部分细胞的细胞壁在某些区域断裂,细胞 内的细胞质不均匀,呈空洞状,细胞壁结构模糊, 细胞壁呈不连续状态,有些细胞甚至完全破碎和 解体。经 MIPEF 处理后,细菌的磷脂双分子层变 形,破坏严重,导致细胞中的内细胞渗漏,加速 了大肠杆菌的凋亡。TEM 和 FESEM 结果表明, MIPEF 处理对大肠杆菌的细胞膜起到了破坏作用, 改变了大肠杆菌的细胞结构,这可视为 MIPEF 对 大肠杆菌的抗菌机制^[40]。Niu等^[9]也发现 MIPEF 处理醋酸杆菌可以观察到细胞结构明显变化,细 胞表面皱缩,有塌陷。

2.2.2 MIPEF对大肠杆菌细胞内大分子物质的影响

图 8 显示了处理液上清液的 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 值。 随着 MIPEF 处理时间的延长,细菌上清液中的核酸 和蛋白质含量明显增加 (*P*<0.05)。结果表明,随 着电场处理时间的增加,处理过的细菌上清液中的 核酸和蛋白质浓度呈线性增加。与此同时,细胞内 核酸和蛋白质的浓度逐渐下降。这说明 MIPEF 对大 肠杆菌的细胞壁和细胞膜有破坏作用,且破坏程度 与处理时间有关,在 100 min 内,随着处理时间的 增加,细胞膜破坏程度越高。

细胞质内容物的渗漏是细菌细胞质膜受损的典 型表现。当细胞膜受到破坏时,钾和磷酸盐等小 离子往往首先渗出,其次是 DNA、RNA、蛋白 质等大分子物质。核酸因含有嘌呤环和嘧啶环, 在 260 nm 的紫外区有特征峰;蛋白质因含有色氨酸 和酪氨酸残基,在280 nm的紫外区有特征吸收峰, 浓度与吸光值成正比^[28]。也就是说,除了细胞内离 子的渗漏外,核酸、蛋白质等大分子物质也会发生 渗漏,细胞通透性明显增强。这些离子和生物大分 子都是维持细胞正常生命周期所必需的,它们在细 胞内受到细胞膜的保护,形成屏障,发挥正常的功 能作用。然而,当对细胞施加电场时,细胞膜的屏 障功能受损,各种重要物质泄漏,细胞代谢异常, 最终导致细胞死亡。这些结果表明, 微生物细胞膜 发生了不可逆损伤,导致蛋白质和一些重要分子等 细胞成分的损失,进而导致细胞死亡。

2025, Vol.41, No.3



2.2.3 MIPEF对大肠杆菌内酶活的影响

ATPase 是一种高能磷酸化合物,对细菌的能量 代谢非常重要,还对 SDH 和 PK 在内的主要呼吸代 谢酶的活性进行了测定。结果表明,在 MIPEF 处理 条件下,酶活性呈下降趋势(图 9)。





大肠杆菌的 ATPase 活性在不同处理下的变化 见图 9a 和 9b。从图中可以看出, MIPEF 处理后, ATP 相关酶如 Na⁺ K⁺-ATPase 和 Ca²⁺Mg²⁺-ATPase 的 活性受到抑制。与对照组相比,经 PEF 处理 100 min 的细菌的 Na⁺K⁺-ATPase 和 Ca²⁺Mg²⁺-ATPase 活性 分别下降了 34.21% 和 32.27%。与对照组相比,脉 冲电场处理后大肠杆菌的 SDH 酶活性明显降 低(图9c)。电场处理20min后,SDH活性值从 45.79 U/mg prot 降至 34.20 U/mg prot。 电场处理 60、80 和 100 min 后,观察到 SDH 活性分别降低 了 71.09%、78.88% 和 86.93%。如图 9d 所示, PEF 处理 20 min 组的 PK 活性变化范围较窄。随着处理 时间的延长, PK 活性在 100 min 内呈下降趋势。在 60、80 和 100 min 时, PK 活性分别降低了 33.35、 48.81 和 88.93 U/g prot。经 PEF 处理的细菌的 PK 活性明显降低 (P<0.05)。ATP 与能量代谢、细胞 功能和生命活动密切相关。ATPase 是促进 ATP 生 成和代谢的最重要酶之一。它的主要作用方式是为 细胞提供辅助因子和能量,将 ATP 催化为二磷酸腺 苷(Adenosine Diphosphate, ADP),从而为细胞提 供能量^[41]。ATPase 活性的降低会阻碍碳水化合物的 代谢,从而阻碍细胞生长,甚至导致细胞死亡。经 MIPEF 处理的 E. coli 中 ATPase 活性水平的降低表 明 ATPase 的活性被 PEF 破坏。SDH 是参与三羧酸

循环(Tricarboxylic Acid Cycle, TCA)的关键酶, 是细胞膜上唯一参与氧化磷酸化的多亚基酶。琥珀 酸是由琥珀酰-CoA转化形成,然后在SDH的催化 下转化为延胡索酸并同时产生FADH2^[42]。由于SDH 在呼吸代谢中的重要作用,SDH已成为一些抑菌剂 的作用靶点^[43]。同时,糖酵解途径与ATP的形成有 联系。PK将磷酸烯醇式丙酮酸和ADP分别转化为 丙酮酸和ATP。在丙酮酸脱氢酶系统的作用下,丙 酮酸发生氧化脱羧形成乙酰辅酶A。乙酰辅酶A与 草酰乙酸反应生成柠檬酸,开启TCA。目前的数据 支持了呼吸障碍和能量限制可能是PEF抑制*E. coli* 的重要靶标之一。

根据目前的研究结果,总结 MIPEF 灭活 E. coli 的潜在机制,并在图 10 中绘制示意图。简单地说, MIPEF 可以有效地破坏 E. coli 细胞壁和细胞膜,影 响细胞完整性,从而引起细胞内成分的泄漏。此外, MIPEF 的存在导致能量和呼吸代谢紊乱,这可能是 杀菌作用的主要机制。



Fig.10 Schematic illustration of the antibacterial mechanism by MIPEF

3 结论

本文研究了 MIPEF 对 E. coli 的灭活效果及 机理研究。结果发现,不同条件下 MIPEF 对大 肠杆菌的灭活效果不同,其中处理时间是影响 E. coli 灭活效果最重要的因素,随着处理时间的延长, E. coli 致死率增加。最后通过平板计数、细胞 膜完整性、细胞形态和胞内酶活测定分析,发现 MIPEF 对 E. coli 抑菌机理是通过改变细胞膜的 通透性,破坏细胞形态结构,细胞内容物泄露, 抑制酶活性,影响细胞呼吸和能量代谢,从而导 致细胞生长受到抑制或裂解死亡,其综合效应如 图 10 所示。但对于 MIPEF 处理过程中细胞内生 物大分子之间的互作及其对微生物的影响还待进一步研究。

参考文献

- GEZAHEGN Z, AKHTAR M S, WOYESSA D, et al. Antibacterial potential of *Thevetia peruviana* leaf extracts against food associated bacterial pathogens [J]. Journal of Coastal Life Medicine, 2015, 3(2): 150-157.
- [2] YANG B, HUANG Z, HE Z J, et al. protective effect of *Bifidobacterium bifidum* FSDJN7O5 and *Bifidobacterium breve* FHNFQ23M3 on diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* [J]. Food & Function, 2021, 12(16): 7271-7282.
- [3] XU F Y, FENG X M, SUI X, et al. Inactivation mechanism of *Vibrio parahaemolyticus* via suercritical carbon dioxide treatment [J]. Food Research International, 2017, 100: 282-288.
- [4] YOO J H, BAEK K H, HEO Y S, et al. Synergistic bactericidal effect of clove oil and encapsulated atmospheric pressure plasma against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* and its mechanism of action [J]. Food Microbiology, 2021, 93: 103611-103618.
- [5] AGUILO-AGUAYO I, OMS-OLIU G, SOLIVA-FORTUNY R, et al. Changes in quality attributes throughout storage of strawberry juice processed by highintensity pulsed electric fields or heat treatments [J]. LWT -Food Science and Technology, 2009, 42(4): 813-818.
- [6] DALVI-ISFAHAN M, HAMDAMI N, XANTHAKIS E, et al. Review on the control of ice nucleation by ultrasound waves, electric and magnetic fields [J]. Journal of Food Engineering, 2017, 195: 222-234.
- [7] RAVISHANKAR S, ZHANG H, KEMPKES M L. Pulsed electric fields [J]. Food Science and Technology International, 2008, 14(5): 429-432.
- [8] SCHOTTROFF F, GRATZ M, KROTTENTHALER A, et al. Pulsed electric field preservation of liquid whey protein formulations–influence of process parameters, pH, and protein content on the inactivation of *Listeria innocua* and the retention of bioactive ingredients [J]. Journal of Food Engineering, 2019, 243: 142-152.
- [9] NIU D B, WANG L H, ZENG X A, et al. Effect of ethanol adaption on the inactivation of *Acetobacter* sp. by pulsed electric fields [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2019, 52: 25-33.
- [10] SIEMER C, TOEPFL S, HEINZ V. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by pulsed electric fields (PEF) in combination with thermal energy-I. Influence of processand product parameters [J]. Food Control, 2014, 39: 163-171.

- [11] ZHU N, YU N, ZHU Y, et al. Identification of spoilage microorganisms in blueberry juice and their inactivation by a microchip pulsed electric field system [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 8160-8167.
- [12] MARTINEZ J M, ABAD V, QUILEZ J, et al. Pulsed electric fields (PEF) applications in the inactivation of parasites in food [J]. Trends in Food Science & Technology, 2023, 138: 470-479.
- [13] ABAD V, ALEJANDRE M, HERNANDEZ-FERNANDEZ E, et al. Evaluation of Pulsed Electric Fields (PEF) parameters in the Inactivation of *Anisakis* Larvae in Saline Solution and Hake Meat [J]. Foods, 2023, 12(2): 264-277.
- [14] EL KANTAR S, BOUSSETTA N, LEBOVKA N, et al. Pulsed electric field treatment of citrus fruits: Improvement of juice and polyhenols extraction [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2018, 46: 153-161.
- [15] WANG J, WANG Q J, XU L, et al. Effects of extremely low frequency pulsed electric field (ELF-PEF) on the quality and microstructure of tilapia during cold storage [J]. LWT, 2022, 169: 113937.
- [16] GHOSHAL G. Comprehensive review on pulsed electric field in food preservation: gaps in current studies for potential future research [J]. Heliyon, 2023, 9(6): e17532. 17545.
- [17] MACHADO L F, PEREIRA R N, MARTINS R C, et al. Moderate electric fields can inactivate *Escherichia coli* at room temperature [J]. Journal of Food Engineering, 2010, 96(4): 520-527.
- [18] YANG N N, HUANG K, LYU C, et al. Pulsed electric field technology in the manufacturing processes of wine, beer, and rice wine: A review [J]. Food Control, 2016, 61: 28-38.
- [19] JIN T Z, GUO M M, YANG R J. Combination of pulsed electric field processing and antimicrobial bottle for extending microbiological shelf-life of pomegranate juice [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2014, 26: 153-158.
- [20] PYATKOVSKYY T J, SHYNKARYK M V, MOHAMED H M, et al. Effects of combined high pressure (HPP), pulsed electric field (PEF) and sonication treatments on inactivation of *Listeria innocua* [J]. Journal of Food Engineering, 2018, 233: 49-56.
- [21] ZHU N, WANG Y L, ZHU Y, et al. Design of a treatment chamber for low-voltage pulsed electric field sterilization [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2017, 42: 180-189.
- [22] BOUDJEMA N, KHERAT M, DROUICHE N, et al. Investigation of the mechanisms of *Escherichia coli* cells sterilization by the application of an electric field [J]. International Journal of Environmental Science and

Technology, 2019, 16(10): 6259-6266.

- [23] AL-HILPHY A R, ABDULSTAR A R, GAVAHIAN M. Moderate electric field pasteurization of milk in a continuous flow unit: Effects of process parameters, energy consumption, and shelf-life determination [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2021, 67: 102568-102576.
- [24] WANG L H, PYATKOVSKYY T, YOUSEF A, et al. Mechanism of *Bacillus subtilis* spore inactivation induced by moderate electric fields [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2020, 62: 102349.
- [25] ZIMMERMANN U. Electrical breakdown, electropermeabilization and electrofusion [J]. Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, 2025, 105: 175-256.
- [26] 周丽珍,李冰,李琳,等.高压脉冲电场杀菌机理及影响 因素研究新进展及相关问题探讨[J].食品研究与开发, 2006,7:213-217.
- [27] 魏新劳,李家辉,延二宝,等.脉冲电场灭菌机理分析及细 菌失活模型的研究[J].电机与控制学报,2011,15(1):6-12.
- [28] ZHAO J, PENG T, LIANG S B, et al. Antibacterial activity and action mechanism of microencapsulated dodecyl gallate with methyl-β-cyclodextrin [J]. Food Control, 2020, 109: 106953-106962.
- [29] CAMINITI I M, PALGAN I, NOCI F, et al. The effect of pulsed electric fields (PEF) in combination with high intensity light pulses (HILP) on *Escherichia coli* inactivation and quality attributes in apple juice [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2011, 12(2): 118-123.
- [30] HUANG K, YU L, WANG W, et al. Comparing the pulsed electric field resistance of the microorganisms in grape juice: Application of the Weibull model [J]. Food Control, 2014, 35(1): 241-251.
- [31] MENDES-OLIVEIRA G, JIN T Z, CAMPANELLA O H. Modeling the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium in juices by pulsed electric fields: The role of the energy density [J]. Journal of Food Engineering, 2020, 282: 110001-110010.
- [32] KHAN I, KHAN J, MISKEEN S, et al. Prevalence and control of *Listeria monocytogenes* in the food industry-a review [J]. Czech Journal of Food Sciences, 2016, 34(6): 469-487.
- [33] MENESES N, JAEGER H, MORITZ J, et al. Impact of insulator shape, flow rate and electrical parameters on inactivation of *E. coli* using a continuous co-linear PEF system [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2011, 12(1): 6-12.
- [34] WOUTERS P C, DUTREUX N, SMELT J P P M, et al.

Modern Food Science and Technology

2025, Vol.41, No.3

Effects of pulsed electric fields on inactivation kinetics of *Listeria innocua* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(12): 5364-5371.

- [35] ALVAREZ I, RASO J, PALOP A, et al. Influence of different factors on the inactivation of *Salmonella senftenberg* by pulsed electric fields [J]. International Journal of Food Microbiology, 2000, 55(1-3): 143-146.
- [36] TSONG T Y. Electroporation of cell membranes [J]. Biophysical Journal, 1991, 60(2): 297-306.
- [37] JIN T Z, GUO M M, ZHANG H Q. Upscaling from benchtop processing to industrial scale production: More factors to be considered for pulsed electric field food processing [J]. Journal of Food Engineering, 2015, 146: 72-80.
- [38] KAMGANG-YOUBI G, HERRY J M, BRISSET J L, et al. Impact on disinfection efficiency of cell load and of planktonic/adherent/detached state: case of *Hafnia alvei* inactivation by Plasma Activated Water [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 81(3): 449-457.

- [39] FERNANDEZ A, SHEARER N, WILSON D R, et al. Effect of microbial loading on the efficiency of cold atmospheric gas plasma inactivation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium [J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 152(3): 175-180.
- [40] ZHU Y L, LI C Z, CUI H Y, et al. Antimicrobial mechanism of pulsed light for the control of *Escherichia coli* O157:H7 and its application in carrot juice [J]. Food Control, 2019, 106: 106751.
- [41] PEI Q H, LI Y, GE X Z, et al. Multipath effects of berberine on peach Brown rot fungus *Monilinia fructicola* [J]. Crop Protection, 2019, 116: 92-100.
- [42] AKRAM M. Citric acid cycle and role of its intermediates in metabolism [J]. Cell Biochemistry and Biophysics, 2014, 68(3): 475-478.
- [43] GUO F Y, CHEN Q, LIANG Q P, et al. Antimicrobial activity and proposed action mechanism of linalool against *Pseudomonas fluorescens* [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 562094-5620104.