HPTS 结合 Nisin 对枯草杆菌芽孢的杀灭机理

尚彬玲，申 瑾，陈 翔，陈 乐，章 中*

（宁夏大学 食品与葡萄酒学院，宁夏 银川 750021）

摘要：为了探究高压热杀菌技术（high-pressure thermal sterilization，HPTS）结合不同质量浓度乳酸链球菌素（Nisin）对枯草杆菌芽孢的杀灭效果和作用机理，采用平板计数法、紫外分光光度法、流式细胞术及傅里叶变换衰减全反射红外光谱法（ATR-FTIR）对处理后芽孢的存活率、核酸类物质泄漏量、内膜通透性及芽孢成分变化进行了研究。结果表明：HPTS 结合 Nisin 后的杀灭效果高于单独的 HPTS 处理，在 550 MPa、75 ℃结合 500 mg/L Nisin 条件下处理 20 min 后芽孢存活率下降了 6.30；芽孢内膜通透性和内膜损伤增大，内容物泄漏量增加，芽孢核酸、肽聚糖、细胞壁等发生变化。HPTS 结合 Nisin 处理可有效破坏芽孢内膜的水分子通透屏障，改变芽孢膜脂质、核酸、多糖结构，降低芽孢的抗性，影响芽孢的代谢进而灭活芽孢。为 HPTS 结合 Nisin 灭活枯草杆菌芽孢提供了理论基础，并促进了 HPTS 在食品加工中的应用。

关键词：高压热杀菌技术；乳酸链球菌素；芽孢；内膜通透性

中图分类号：TS 201.3　**文章编号：**1673-1689(2022)03-0029-08　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.03.004

Study on Inactivation Mechanism of *Bacillus subtilis* Spores by HPTS Combined with Nisin

SHANG Binling，*SHEN Jin*，*CHEN Xiang*，*CHEN Le*，*ZHANG Zhong**

(School of Food and Wine, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract: In order to explore the inactivation mechanism of *Bacillus subtilis* spores by high-pressure thermal sterilization (HPTS) combined with different mass concentrations of Nisin, the spore survival rate, nucleic acids leakage, inner membrane permeability and spore composition changes after treatment were studied by plate counting, ultraviolet spectrophotometry, flow cytometry and attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR). The results showed that the disinfectant effect of HPTS combined with Nisin was higher than that treated by HPTS alone. The spore survival rate decreased by 6.30 after 20 min under 550 MPa at 75 ℃ combined with 500 mg/L Nisin. It was found that the permeability and damage of spore inner membrane increased, and the content leakage amount increased, while spore nucleic acid, peptidoglycan, cell wall and other components changed. HPTS combined with Nisin treatment could effectively destroy the water permeability barrier of inner spore membrane, change the structure of spore membrane lipid, nucleic acid and polysaccharide, reduce the resistance of spore, affect the metabolism of spore and inactivate the spore. This study provided a theoretical basis for HPTS

收稿日期：2021-01-23

基金项目：国家自然科学基金项目(31760474，31460410)。

* **通信作者：**章　中(1977—)，男，博士，副教授，主要从事非热加工技术研究。E-mail：zhangzhong99@126.com

combined with Nisin to inactivate *Bacillus subtilis* spores, promoting the application of HPTS in food processing.

Keywords: high-pressure thermal sterilization, Nisin, spores, membrane permeability

细菌芽孢是在极端恶劣环境下产生的休眠体，其特殊的多层结构使其自身具有高度抗逆性[1]，甚至在高温条件下依然能够存活。枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)芽孢作为食品中常见的污染菌，不仅耐热而且耐压[2]，这使得其难以被常规的食品杀菌工艺杀灭[3]，进而容易导致食品产生腐败现象，甚至引起食源性疾病[4-5]。因此，亟待寻求一种能够有效将其杀灭的技术，为食品加工技术的发展提供指导。

HPTS 作为一项很有前景的高压加工技术，不仅能对食品中的细菌芽孢起到很好的杀灭效果，而且能够更好地保持食品的色香味以及营养成分[6-7]，被认为是杀灭细菌芽孢的一种有效方法。而抗菌化合物能够提高高压处理对芽孢的灭活效果，天然的抗菌物质受到人们的关注。Nisin 作为一种含 34 个氨基酸残基的天然防腐剂[8]，通过与脂质结合在细胞膜表面形成通透孔道的方式实现灭菌目的[9]，对人体无害并且能够被人体消化吸收，已被广泛应用于食品工业的实际生产[10-11]。曾庆梅等对枯草杆菌芽孢进行 HPTS 处理后，采用透射电镜观察其超微结构，发现经过处理后产生了芽孢外壳被破坏，内含物质完全泄漏，芽孢大量被杀灭的现象[12]。章中等研究表明，HPTS 会对芽孢内膜水分子的通透屏障产生损伤[13-14]。

综观学者对杀菌技术的研究成果，主要是关注超高压结合 Nisin 对枯草杆菌芽孢的杀菌效果[15]，但有关 HPTS 结合 Nisin 杀菌效果及机理的研究鲜有报道。作者以枯草杆菌芽孢为对象，研究 HPTS 结合 Nisin 对其灭活效果、内膜通透性和核酸蛋白质的影响，探讨 HPTS 结合 Nisin 的杀菌效果和机理，以期为 HPTS 与 Nisin 的实际应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)：来自中国普通微生物菌种保藏管理中心（CGMCC），编号 As 1.433；Nisin（分析纯）：天津市天力化学试剂有限公司产品；碘化丙啶(PI)：北京索莱宝科技有限公司产品。

1.2 仪器与设备

UV-9000S 型双光束紫外可见分光光度计：上海元析仪器有限公司产品；Spectrum Two 型傅里叶变换红外光谱仪：美国 PerkinElmer 公司产品；CyFlow Cube 8 流式细胞仪：日本 SYSMEX(希森美康)株式会社产品；5L HPP 超高压设备：包头科发高压科技有限公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 枯草杆菌芽孢悬浮液的制备 芽孢的制备参照文献[16]的方法，将菌种接入锰盐培养基，37 ℃下划线培养 7 d，重复 3 次。将收集到的芽孢离心洗涤(9 000 r/min 条件下 15 min)3 次。洗涤后的芽孢重悬在无菌水中，调整后的菌悬液浓度约为 1.5×10^9 CFU/mL，4 ℃保存，使用前在 80 ℃下水浴 15 min。

1.3.2 枯草杆菌芽孢悬浮液的 HPTS 处理 取 10 mL 芽孢悬浮液于无菌的聚乙烯真空包装袋中，菌悬液中 Nisin 调整为 100、500 mg/L，真空包装后置于超高压加压釜中，压力为 200、550 MPa，温度为 25、65、75 ℃，处理 20 min 后卸压，样品计数前在 4 ℃下保存 6 h。

1.3.3 枯草杆菌芽孢平板计数方法 对处理前后的芽孢悬浮液进行梯度稀释，平板中加入 1 mL 稀释菌液和培养基混匀后在 37 ℃下倒置培养，24~48 h 后进行计数。

$$r=-\lg(N_t/N_0)$$

式中：r 为芽孢处理前后降低的对数值；N_0 为 HPTS 处理前初始枯草杆菌芽孢活菌数，CFU/mL；N_t 为 HPTS 处理后枯草杆菌芽孢残存活菌数，CFU/mL。

1.3.4 枯草杆菌芽孢内容物泄漏量的测定 将处理前后的芽孢悬浮液在 4 ℃下以 9 000 r/min 离心 15 min，以上清液为测定组，未处理的菌悬液为对照组，无菌水为空白对照，在 260 nm 和 280 nm 下测定吸光度。

1.3.5 流式细胞仪检测枯草杆菌芽孢内膜通透性 将处理前后的芽孢悬浮液浓度稀释到 1×10^6~1×10^7 CFU/mL。加入 PI 染色剂后用流式细胞仪检测前向散射光(FSC)、侧向散射光(SSC)、荧光通道 FL2 和

FL3[17]。采用 488 nm 激发光，PI 标记细胞在 615 nm 处发红色荧光(FL3)。

1.3.6 ATR-FTIR 检测 将处理前后的枯草杆菌芽孢悬浮液进行真空冷冻干燥，将干燥好的样品进行检测，分辨率为 4 cm^{-1}，波长扫描范围为 400~4 000 cm^{-1}，扫描 64 次。得到的光谱数据用 Origin 软件进行分析。

1.4 数据处理及统计分析

所有实验至少重复 3 次，数据通过 SPSS 26 进行显著性分析，采用 Origin 2018 软件绘图，结果以均值±标准误差表示，图表中不同字母表示其相关数据差异显著(P<0.05)。

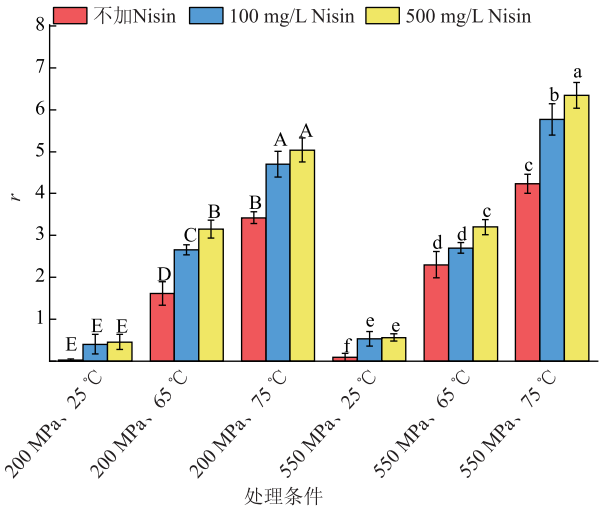
2 结果与分析

2.1 HPTS 结合 Nisin 处理对枯草杆菌芽孢的杀灭效果

图 1 表示 HPTS 结合不同质量浓度 Nisin 对枯草杆菌芽孢的杀灭效果。可以看出，Nisin 为 100 mg/L 时，在 200 MPa 结合 25、65、75 ℃条件下 r 分别为 0.40、2.65、4.70，550 MPa 结合 25、65、75 ℃条件下 r 分别为 0.53、2.70、5.77；Nisin 为 500 mg/L 时，200 MPa 结合 25、65、75℃条件下 r 分别为 0.45、3.15、5.04，550 MPa 结合 25、65、75 ℃条件下 r 分别为 0.56、3.20、6.30。这说明 HPTS 结合 Nisin 后的杀菌效果显著高于 HPTS 单独处理(P<0.05)的效果，同时发现 Nisin 质量浓度越高，其对芽孢的杀灭作用越强。前期实验结果表明[18]，单独采用 80 ℃或 Nisin 无法杀灭芽孢，而 80 ℃结合 500 mg/L 的 Nisin 后，芽孢的存活率下降了约 1.4 lg (CFU/mL)。这是因为 HPTS 能够对芽孢内膜产生一定影响[13-14]，并且Nisin 也能够作用于芽孢内膜，使得 HPTS 结合 Nisin 对芽孢内膜产生协同作用，增加了芽孢内膜的通透性，使水分子进入导致其耐热性下降，继而产生了更好的杀菌效果。

2.2 HPTS 结合 Nisin 处理对枯草杆菌芽孢紫外吸收物质泄漏量的影响

由于细胞内紫外吸收物质(主要为核酸和蛋白质)泄漏量的变化可以反映芽孢内膜的受损程度[19]，HPTS 结合不同质量浓度 Nisin 对枯草杆菌芽孢紫外吸收物质泄漏量的影响见图 2。HPTS 结合不同质量浓度 Nisin 处理后，芽孢的核酸和蛋白质泄漏量



标有不同字母的处理之间具有显著性差异(P<0.05)。

图 1 HPTS 结合 Nisin 处理枯草杆菌芽孢的灭活效果

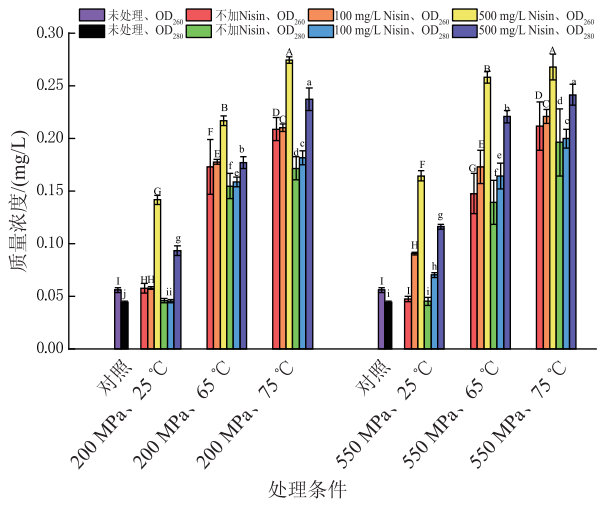
Fig. 1 Inactivation of *Bacillus subtilis* spores treated with Nisin combined with HPTS

均显著增加(P<0.05)；在相同温度和压力处理条件下，Nisin 为 500 mg/L 时芽孢内核酸和蛋白质的泄漏量都显著高于 100 mg/L，说明提高 Nisin 的质量浓度能够使芽孢内核酸和蛋白质的泄漏量增加。这是因为芽孢内膜受到了更大程度的破坏，膜通透性也随之增大。另外，同质量浓度的 Nisin 处理条件下，随着温度升高，芽孢的紫外吸收物质泄漏量呈现逐渐上升的趋势。因此，HPTS 结合不同质量浓度 Nisin 会增大芽孢内膜的受损程度，使芽孢内更多的核酸和蛋白质流出。

2.3 HPTS 结合 Nisin 处理对枯草杆菌芽孢细胞膜损伤的影响

大分子荧光染料 PI 能够在芽孢细胞膜通透性增大到一定程度时透过细胞膜并嵌入双链 DNA，产生红色的荧光，故芽孢内膜通透性的变化可以通过流式细胞仪来反映[20]。图 3 为样品经 PI 染色后的直方图，直方图分为 M1 和 M2 两个区域，其中 M1 区域为阴性区域。可以直观地看出，HPTS 结合不同质量浓度 Nisin 处理后，荧光分布都明显向 M2 区域移动，说明芽孢受到一定程度的损伤，芽孢内膜通透性增加，其与紫外吸收物质泄漏量的研究结果一致。同时，与单独 HPTS 处理相比，HPTS 结合不同质量浓度 Nisin 处理后移向 M2 区域的比例增加，表明 HPTS 结合不同质量浓度的 Nisin 比相同条件下单独 HPTS 处理对芽孢内膜的破坏作用更强，使芽孢

内膜的通透性增加。



标有不同字母的处理之间具有显著性差异(P<0.05)。

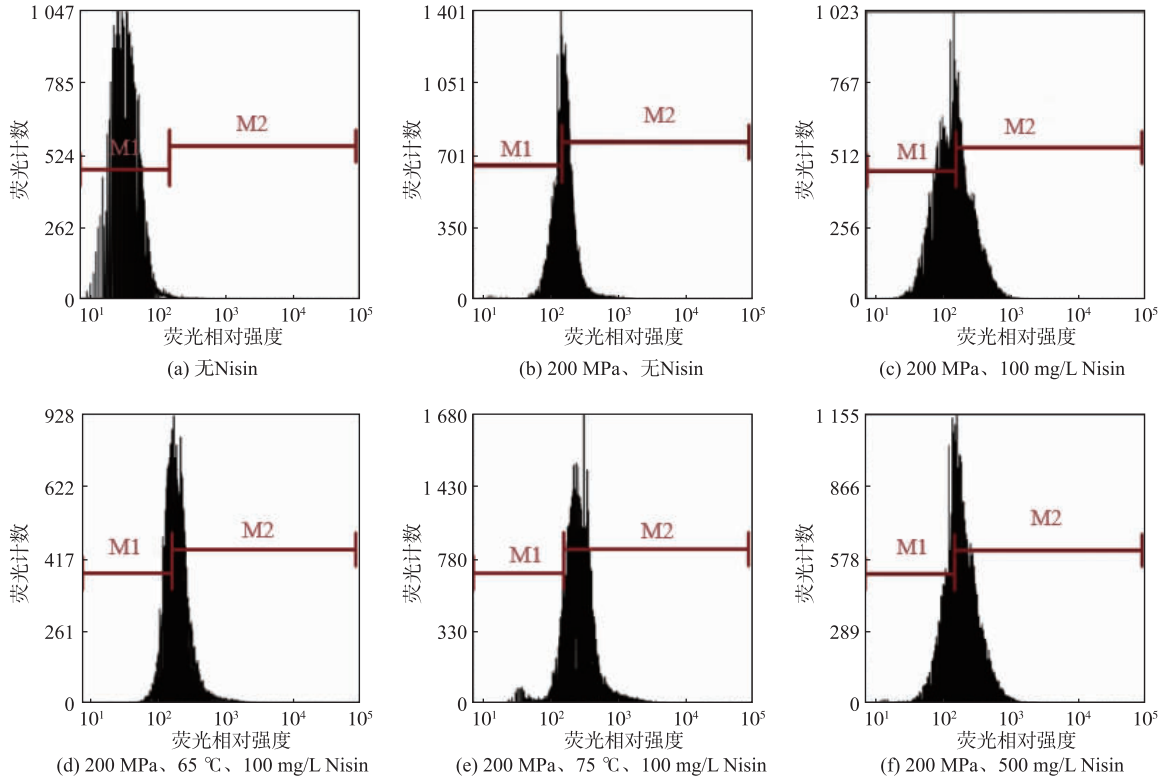
图 2 HPTS 结合不同质量浓度 Nisin 对枯草杆菌芽孢紫外吸收物质泄漏量的影响

Fig. 2 Effect of HPTS combined with Nisin at different mass concentrations on the leakage of UV absorbing substances from *Bacillus subtilis* spores

2.4 红外光谱分析

近年来,傅里叶变换红外光谱技术应用范围很广,由于其能够综合检测细菌生理状态,被作为细菌经过处理后检测细菌物质变化的一项技术[21]。这种检测方法能够对不同的红外吸收峰进行分析,进而得到细菌在经过一些处理后其物质的变化情况[22]。从图 4 可以直观地看出,Nisin 与 HPTS 结合处理后,枯草杆菌芽孢红外光谱的峰形、峰高等基本相似,从这种微小的改变很难分辨出特征峰位的变化情况。

为了更加清楚地分辨处理前后枯草杆菌芽孢红外光谱图中特征峰的变化,有必要对原谱图数据进行处理,可以通过二阶导数的方法对原谱图进行数据分析(见图 5)[22],这种方法可以将原谱图中难以清晰观察到的细小变化分辨开来,从而根据官能团的位移及峰的形状具体分析不同处理条件对细菌芽孢灭活作用的影响。从图 5 可知,3 000~2 800 cm^{-1} 和 1 700~900 cm^{-1} 波段的范围有显著峰位变化,其中包括脂质、蛋白质、多糖区域,这说明细菌芽孢的灭活与芽孢内膜脂质、核酸和肽聚糖的结构有关。



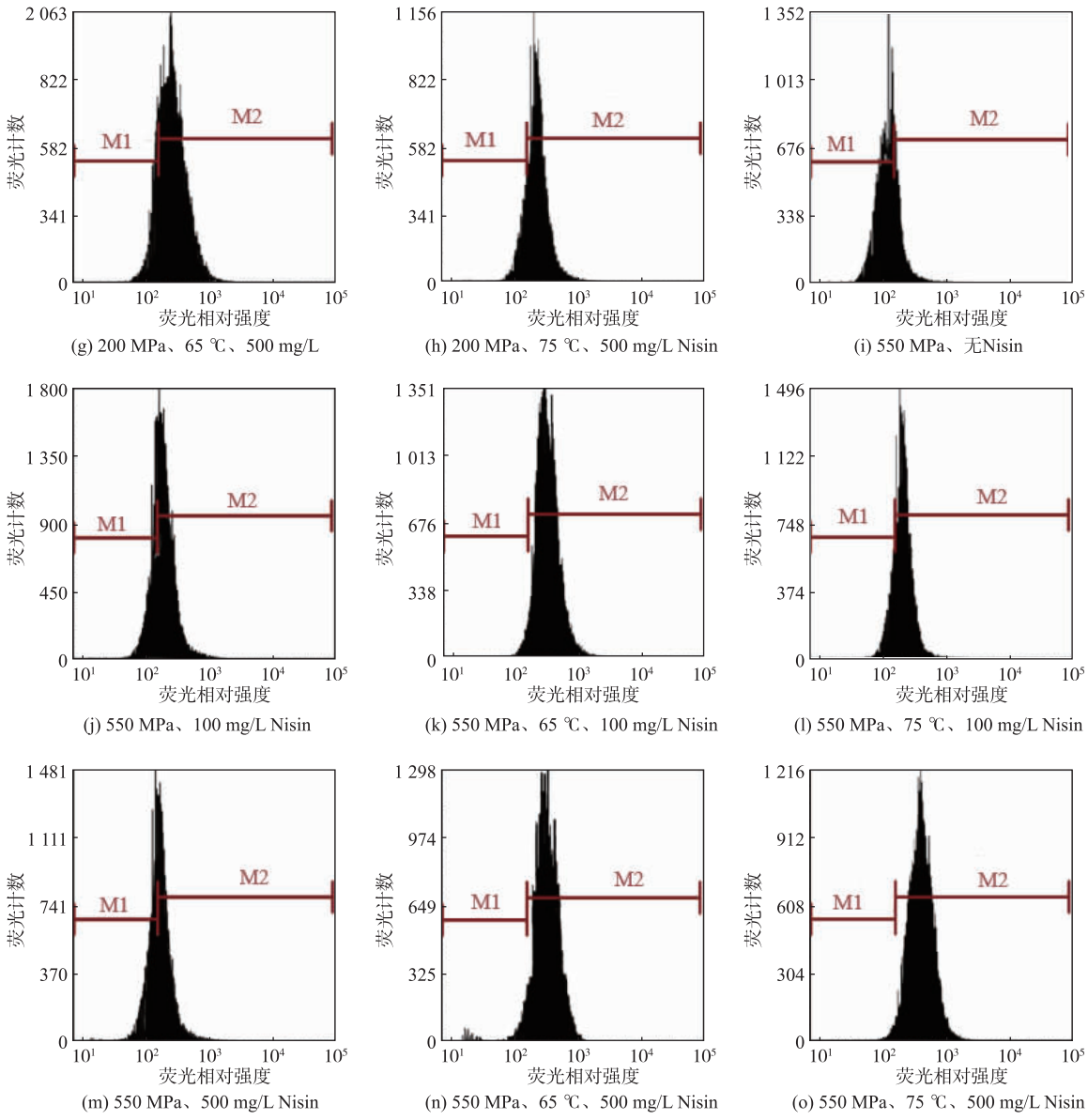


图 3　HPTS 结合不同质量浓度 Nisin 对枯草杆菌芽孢内膜通透性的影响

Fig. 3　Effect of HPTS combined with different mass concentrations of Nisin treatment on the intimal permeability of *Bacillus subtilis*

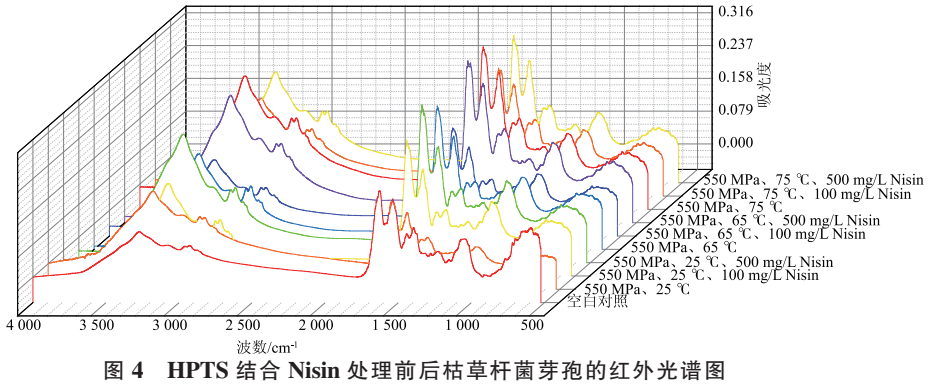


图 4　HPTS 结合 Nisin 处理前后枯草杆菌芽孢的红外光谱图

Fig. 4　Infrared of *Bacillus subtilis* spores before and after the treatment of HPTS combined with Nisin

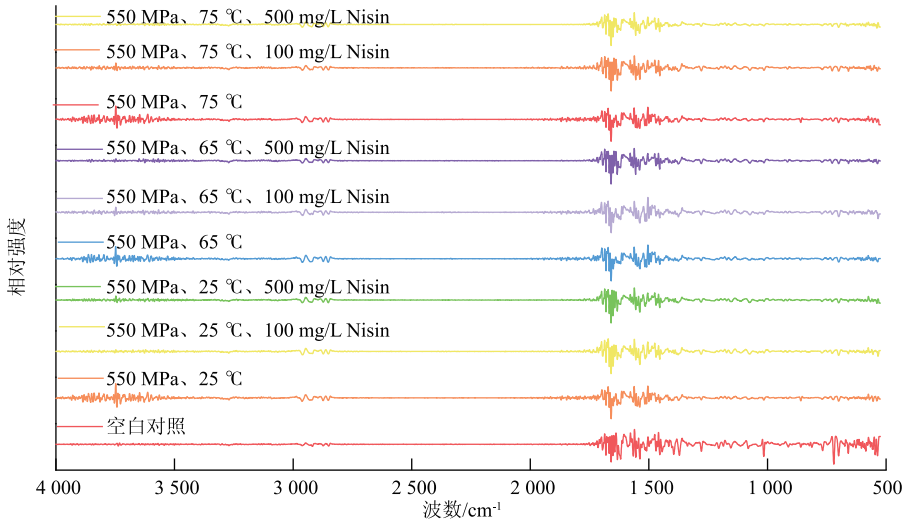


图 5　HPTS 结合 Nisin 处理前后枯草杆菌芽孢的二阶导数光谱图

Fig. 5　Secondary-derivative of *Bacillus subtilis* spores before and after the treatment of HPTS combined with Nisin

2.5　二阶导图谱分析

图 6 为 HPTS 与 Nisin 处理前后枯草杆菌芽孢在 3 000~2 800 cm^{-1} 的二阶导数红外光谱图。可以看出，不同处理条件下红外光谱有一些共同的特征峰变化(3 000~2 800 cm^{-1} 区域主要代表膜脂质，2 855 cm^{-1} 和 2 925 cm^{-1} 处分别能够反映—CH_3 和—CH_2 对称和反对称伸缩振动的变化情况[23]，—CH_2 的位移可以反映膜脂质性质[24])，前人研究显示，如果脂肪酰基链被“融化”而达到高度构象紊乱，则峰移至更高的波数[22]。因此，该结果表明 HPTS 与 Nisin 结合处理后引起了细胞膜脂肪酰基链的变化；同时，HPTS 与 Nisin 共同处理后，2 852 cm^{-1} 波段的峰位向高波数段移动，并且与未处理组相比，2 929 cm^{-1} 波段的峰位移向低波数段，表明不同质量浓度 Nisin 结合 HPTS 处理能够使枯草杆菌芽孢的细胞膜磷脂分子的疏水尾链混乱度增大。

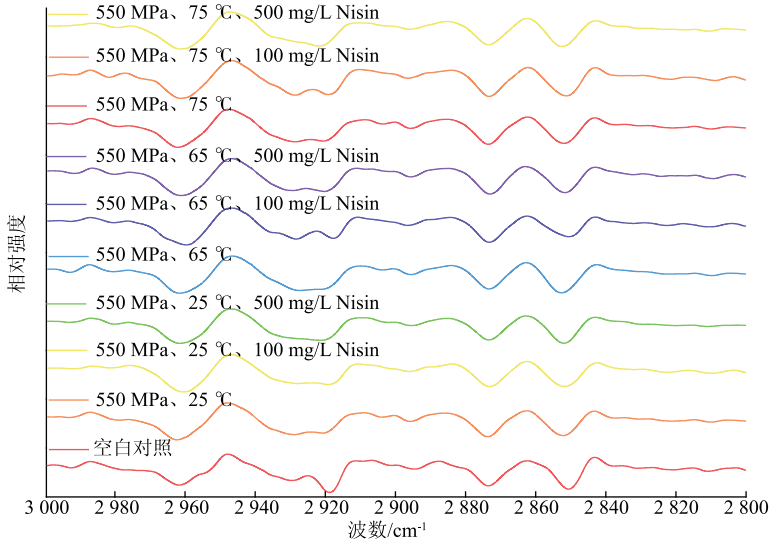


图 6　HPTS 结合 Nisin 处理前后枯草杆菌芽孢在 3 000~2 800 cm^{-1} 的二阶导数红外光谱图

Fig. 6　Secondary-derivative FT-IR spectra of *Bacillus subtilis* spore nucleic acid treated by HPTS combined with Nisin at 3 000~2 800 cm^{-1}

HPTS 结合 Nisin 处理前后枯草杆菌芽孢 1 300~900 cm^{-1} 处的二阶导数红外光谱图见图 7。其中波段 1 300~900 cm^{-1} 主要代表细胞核酸，能够表征细胞壁成分的振动特征，1 232 cm^{-1} 和 1 082 cm^{-1} 吸收峰对应的官能团分别是核酸磷酸二酯主链的反对称伸缩和对称伸缩振动，与核酸变性相关[21-22]。

可以看出，1 232 cm^{-1} 与 1 080 cm^{-1} 处的吸收峰发生了明显变化，这是因为 HPTS 结合 Nisin 能够导致细菌芽孢内核酸物质的变性。1 080 cm^{-1} 和 1 232 cm^{-1} 特征峰都向低波数段移动，说明细胞内核酸分子中的 PO_4^{2-}基团氢键化程度发生了改变[25]，使氢键减弱，峰位向低波数段移动。

研究表明，肽聚糖是芽孢细胞壁的主要成分，也是使芽孢具有耐压性的关键结构，1 200~900 cm^{-1} 区域内的吸收峰主要是 C—O—C 伸缩振动引起的，可以从吸收峰的变化观察肽聚糖层在处理前后的变化[25]。从图 7 可见，在 HPTS 结合 Nisin 处理前后芽孢的肽聚糖层发生了明显的变化，肽聚糖层结构的改变可能引起了细胞壁结构的改变进而导致菌体死亡。

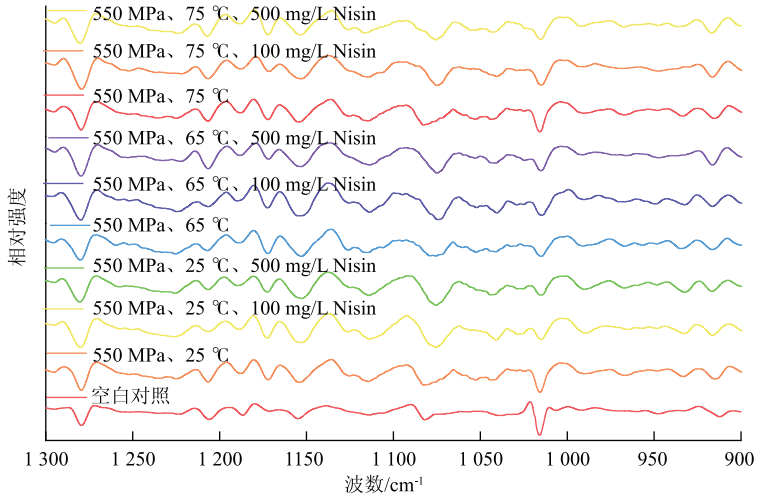


图 7　HPTS 结合 Nisin 处理前后枯草杆菌芽孢 1 300~900 cm^{-1} 处的二阶导数红外光谱图

Fig. 7　Secondary-derivative FT-IR spectra of *Bacillus subtilis* spore nucleic acid treated by HPTS combined with Nisin at 1 300~900 cm^{-1}

3 结　语

通过对细菌芽孢内膜损伤程度、内膜通透性、芽孢成分等指标进行检测，探讨了 HPTS 结合不同质量浓度 Nisin 对细菌芽孢的灭活效果及机理，发现 HPTS 与 Nisin 有协同杀菌的作用，杀菌效果优于单独的 HPTS 处理。综合采用紫外吸收法、流式细胞术及红外光谱方法对 HPTS 结合 Nisin 后的共同作用机理进行了研究，发现 Nisin 加入后，枯草杆菌芽孢紫外吸收物质的泄露量显著增大，对芽孢内膜的损伤程度更大，内膜通透性增加，两者共同作用后能够导致核酸物质发生变性，进而影响芽孢的生理代谢，最终导致枯草杆菌芽孢的死亡。

参考文献：

[1] PAREDES-SABJA D，SETLOW P，SARKER M R. Germination of spores of *Bacillales* and *Clostridiales* species：mechanisms and proteins involved[J]. **Trends in Microbiology**，2011，19(2)：85-94.

[2] 曾庆梅，潘见，谢慧明，等.超高压灭活枯草芽孢杆菌(AS1.140)的参数优化[J]. 农业工程学报，2005，21(4)：158-162.

[3] 于勇，毛明，王为民，等.食品中产芽孢细菌的杀菌技术研究现状与趋势[J].中国食品学报，2012，12(4)：160-167.

[4] 白妍，葛雨珺，向迎春，等.非热杀菌技术杀灭食品中芽孢效能及机理研究进展[J].食品科学，2019，40(15)：314-322.

[5] LOVDAL I S，HOVDA M B，GRANUM P E，et al. Promoting *Bacillus cereus* spore germination for subsequent inactivation by mild heat treatment[J]. **Journal of Food Protection**，2011，74(12)：2079-2089.

[6] KNORR D，FROEHLING A ，JAEGER H ，et al. Emerging technologies in food processing[J]. **Annual Review of Food Science and Technology**，2011，2(1)：203-235.

[7] SEVENICH R，MATHYS A. Continuous versus discontinuous ultra-high-pressure systems for food sterilization with focus on ultra-high-pressure homogenization and high-pressure thermal sterilization：a review[J]. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**，2018，17(3)：646-662.

[8] DAESCHEL M A. Applications of bacteriocins in food systems[M]. British: Butterworth-Heinemann, 1990: 91-104.
[9] MASSCHALCK B, HOUDT R, MICHIELS C W. High pressure increases bactericidal activity and spectrum of lactoferrin, lactoferricin and nisin[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2001, 64(3): 325-332.
[10] STEVENS K A, SHELDON B W, KLAPES N A, et al. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1992, 57(12): 3613-3615.
[11] DELVES-BROUGHTON J, BLACKBURN P, EVANS R J, et al. Applications of the bacteriocin, nisin[J]. **Antonie van Leeuwenhoek**, 1996, 69(2): 193-202.
[12] 曾庆梅, 谢慧明, 潘见, 等. 超高压处理对枯草芽孢杆菌超微结构的影响[J]. 高压物理学报, 2006, 20(1): 83-87.
[13] 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.
[14] 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.
[15] MARTÍN M F, BARBOSA-CÁNOVAS G V, SWANSON B G. Food processing by high hydrostatic pressure[J]. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2002, 42(6): 627-645.
[16] 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.
[17] BUZRUL S, ALPAS H, LARGETEAU A, et al. Modeling high pressure inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in whole milk[J]. **European Food Research and Technology**, 2008, 227(2): 443-448.
[18] 陈乐, 章中, 郭家俊, 等.热结合 Nisin 处理对枯草杆菌芽孢的杀灭效果[J]. 农业工程学报, 2020, 36(20): 328-333.
[19] HONG S I, PYUN Y R. Membrane damage and enzyme inactivation of *Lactobacillus plantarum* by high pressure CO_2 treatment [J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2001, 63(1): 19-28.
[20] MOUSSA M, PERRIER-CORNET J M, GERVAIS P. Damage in *Escherichia coli* cells treated with a combination of high hydrostatic pressure and subzero temperature[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2007, 73(20): 6508-6518.
[21] 戚伟民, 钱平, 余坚勇, 等. 中性体系中超高压 -Nisin 协同作用下的细菌致死机理[J]. 微生物学报, 2011, 51(1): 35-42.
[22] HAL-QADIRI H M, AL-ALAMI N I, AL-HOLY M A, et al. Using fourier transform infrared (FT-IR) absorbance spectroscopy and multivariate analysis to study the effect of chlorine-induced bacterial injury in water[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2008, 56(19): 8992-8997.
[23] ULMER H M, HERBERHOLD H, FAHSEL S, et al. Effects of pressure-induced membrane phase transitions on inactivation of HorA, an ATP-dependent multidrug resistance transporter, in *Lactobacillus plantarum*[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2002, 68(3): 1088-1095.
[24] KAPOOR S, WERKMÜLLER A, DENTER C, et al. Temperature-pressure phase diagram of a heterogeneous anionic model biomembrane system: results from a combined calorimetry, spectroscopy and microscopy study[J]. **Biochimicaet Biophysica Acta**, 2011, 1808(4): 1187-1195.
[25] SUBRAMANIAN A, AHN J, BALASUBRAMANIAM V M, et al. Monitoring biochemical changes in bacterial spore during thermal and pressure-assisted thermal processing using FT-IR spectroscopy[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2007, 55(22): 9311-9317.