

热结合 Nisin 处理对枯草杆菌芽孢的杀灭效果

陈 乐, 章 中^{*}, 郭家俊, 申 瑾, 陈 翔, 尚彬玲

(宁夏大学食品与葡萄酒学院, 银川 750021)

摘 要: 芽孢是最难被杀灭的微生物, 会造成食品腐败和食物中毒。食品工业上常采用 100 °C 以上的高温来杀灭食品中的芽孢, 但高温热处理会大大影响食品的营养和感官品质。为找到在较低温度下杀灭芽孢的方法, 该研究采用 5 个不同处理的芽孢悬浮液(单独 80 °C 热处理、100 mg/L Nisin 处理、500 mg/L Nisin 处理、80 °C 结合 100 mg/L Nisin 处理、80 °C 结合 500 mg/L Nisin 处理)对芽孢的杀灭效果, 研究并探讨了杀菌机理。采用平板计数法、荧光偏振法、分光光度法和流式细胞术对 Nisin 协同较低温度的热处理后枯草杆菌芽孢的存活率、内膜流动性、吸光度值及内膜通透性进行了研究。研究发现: 单独 80 °C 热处理和单独使用 Nisin 均无法杀灭芽孢, 但是 80 °C 热处理与 Nisin 结合时能够对芽孢产生杀灭作用。80 °C 结合 500 mg/L Nisin 处理 20 min 后, 芽孢存活浓度下降约 1.4 lg (CFU/mL)。80 °C 结合 500 mg/L Nisin 处理 20 min 后, 芽孢悬浮液荧光偏振度显著降低 ($P < 0.05$), 表明芽孢内膜流动性大幅增加; 在此处理条件下芽孢的内容物释放程度最大, 直观表现为吸光度值显著降低 ($P < 0.05$)。80 °C 结合 Nisin 处理后, 芽孢内膜通透性显著增加 ($P < 0.05$), 并且 Nisin 浓度越高, 芽孢内膜通透性越强。试验结果表明: 80 °C 结合不同浓度 Nisin 处理能提高芽孢内膜流动性和通透性, 能有效杀灭细菌芽孢。Nisin 能降低细菌芽孢耐热性, 有利于减少热杀菌处理对食品的负面影响。

关键词: 耐热性; 杀菌; 内膜; 膜流动性; 膜通透性; 乳酸链球菌素; 芽孢

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2020.20.037

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2020)-20-0320-06

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): 320-325. doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2020.20.037 <http://www.tcsae.org>

Chen Le, Zhang Zhong, Guo Jiajun, et al. Effects of heat combining with Nisin treatment on the sterilization of *Bacillus subtilis* spores[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2020, 36(20): 320-325. (in Chinese with English abstract) doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2020.20.037 <http://www.tcsae.org>

0 引 言

芽孢是一些细菌在极端恶劣的环境下形成的休眠体, 具有极强的抗逆性, 可以存活数年甚至数百万年^[1-4]。食品杀菌过程难以彻底将芽孢杀灭, 导致食品腐败及食物中毒的事件时常发生^[5-7]。芽孢含水率极低, 高度脱水及芽孢内膜的极端不通透性使其具有极强抗逆性^[8-11]。研究表明, 水分子透过芽孢内膜, 与芽孢内核水合是杀灭芽孢的重要途径之一^[12-15]。水分子的跨膜运输方式主要是自由扩散, 芽孢内膜的流动性及通透性直接影响水分子通过内膜的难易程度, 因此研究其内膜流动性及通透性十分重要^[16]。

磷脂是构成芽孢内膜的主要成分, 不同条件下磷脂存在不同的状态。研究表明^[17-18]温度升高能够加强磷脂分子的侧向热运动, 改变磷脂间氢键的作用, 同时使磷脂的相态发生转变, 宏观表现为膜流动性及通透性的增强, 因此温度是影响芽孢内膜流动性及通透性的重要原因之一。

乳酸链球菌素 (Nisin) 是一种有效的天然生物防腐

剂, 是一种天然生物活性抗菌肽, 也被称为尼生素或乳链菌肽, 具有较强的热稳定性和耐酸性。中国已允许 Nisin 作为食品防腐剂在多种食品中使用, 根据 GB2760《食品添加剂使用卫生标准》对食品添加剂的要求, Nisin 在食品中的最大添加量为 500 mg/L。Nisin 主要作用于细胞膜的表面, 造成细菌膜的损伤^[19-21]。Marta 等^[22]研究表明 Nisin 能够抑制牛奶中梭状芽孢杆菌营养细胞和芽孢的生长。通常温度 70~80 °C 就能够杀灭食品中的细菌营养体, 但是细菌芽孢能够耐受更高的温度^[23]。本文将热处理与 Nisin 结合, 采用平板计数法、荧光偏振法、分光光度法和流式细胞术测定了芽孢的存活率、荧光偏振度、吸光度值及内膜通透性, 研究了 Nisin 协同较低温度的热处理对枯草杆菌芽孢的杀灭效果并探讨了杀菌机理。本文通过研究芽孢的内膜变化, 以期降低杀灭芽孢所需的温度, 增强杀灭芽孢的效果, 为食品杀菌提供一定的理论依据并有一定应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC), 编号 As 1.433; 营养琼脂, 天津市大茂化学试剂厂; 硫酸锰 (分析纯), 天津市大茂化学试剂厂; 1, 6-二苯基-1, 3, 5-己三烯 (1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene, DPH), 上海阿拉丁生化

收稿日期: 2020-07-12 修订日期: 2020-10-10

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

作者简介: 陈乐, 主要研究方向为非热加工技术。

Email: chenlechengle@163.com

*通信作者: 章中, 博士, 副教授, 主要研究方向为非热加工技术。

Email: zhangzhong99@126.com

科技股份有限公司; Nisin (分析纯), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI), 北京索莱宝科技有限公司; TSA-YE 培养基, 北京索莱宝科技有限公司。

1.2 仪器与设备

DSX-280B 型高压灭菌锅, 上海申安医疗器械厂; LRH 系列生化培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; 722 型可见分光光度计, 上海驰唐电子有限公司; TGL-10B 型离心机, 上海安亭科学仪器厂; 电子恒温不锈钢水浴锅, 上海宜昌仪器纱筛厂; F-7000 荧光分光光度计, 日本日立有限公司; CyFlow Cube 8 流式细胞仪, 日本 SYSMEX (希森美康) 株式会社。

1.3 方 法

1.3.1 培养基的配制

促芽孢生长锰盐营养琼脂培养基: 取普通营养琼脂培养基 33 g 加入硫酸锰 0.153 8 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 值为 7.0, 加热煮沸 3 次, 分装试管内, 121 °C 灭菌 15 min, 待用。

1.3.2 枯草芽孢杆菌芽孢的培养及菌悬液制备

枯草芽孢杆菌 (As 1.433) 菌种在营养琼脂培养基活化后划线接种到试管斜面促芽孢生长培养基上, 在 37 °C 培养 7 d, 洗涤离心 3 次 (9 000 r/min, 15 min), 菌悬液浓度大约调整在 1.5×10^9 CFU/mL 左右, 在 4 °C 保存^[24]。

1.3.3 DPH (1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene) 配制

以四氢呋喃作溶剂, 配制浓度为 2×10^{-3} mol/L 的 DPH 储备液, 4 °C 密闭保存在棕色瓶中, 使用前用 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 值为 6.8) 将储备液稀释至所需要的浓度^[25]。

1.3.4 DPH 标记芽孢内膜

DPH 标记芽孢内膜参考钱静亚等^[25]的方法并进行了优化。取 8 mL 芽孢悬浮液, 离心 (4 °C, 9 000 r/min, 15 min), 用 PBS 洗涤 1 次后离心 (4 °C, 9 000 r/min, 15 min) 弃上清, 加入 8 mL 浓度为 3×10^{-6} mol/L 的 DPH 溶液, 在 50 °C 下孵育 30 min; 再用 PBS 洗涤 2 次, 离心后菌体悬浮在适量的 PBS 缓冲液中, 使菌体浓度在 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ CFU/mL。

1.3.5 芽孢悬浮液的热结合 Nisin 处理

取标记后的芽孢悬浮液, 离心去上清液后, 分别加入 100 和 500 mg/L Nisin 溶液, 在 80 °C 下处理 20 min。即处理组: 80 °C、100 mg/L Nisin、500 mg/L Nisin、80 °C 结合 100 mg/L Nisin、80 °C 结合 500 mg/L Nisin 温度均为 25 °C; 对照组: 不加 Nisin, 25 °C。

500 mg/L 是国家食品添加剂标准中 Nisin 的最大添加量, 100 mg/L 是与最大添加量相比, 较低的添加量。通常 70~80 °C 温度就能够杀灭食品中的细菌营养体, 但是对细菌芽孢产生杀灭作用就需要更高的温度, 将温度与 Nisin 结合处理, 预期在 80 °C 条件下能够对细菌芽孢产生杀灭作用。

1.3.6 芽孢悬浮液荧光偏振度的测定

荧光偏振度的测定, 参照 Voss 等^[26]的方法, 在 360 nm 激发波长和 430 nm 发射波长下, 采用激发与发射缝宽 10 nm, 测定水平荧光强度和垂直荧光强度并计算荧

光偏振度 P , 计算公式为

$$P = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + GI_{VH}} \quad (1)$$

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (2)$$

式中 I_{VV} 为起偏器和检偏器光轴同为垂直方向时测得的荧光强度, I_{VH} 为起偏器和检偏器光轴分别为垂直和水平方向时测得的荧光强度, G 为光栅校正因子, I_{HV} 为起偏器和检偏器光轴分别为水平和垂直方向时测得的荧光强度, I_{HH} 为起偏器和检偏器光轴同为水平方向时测得的荧光强度。荧光偏振度 P 值越小, 流动性越大, 反之则相反。

1.3.7 枯草芽孢杆菌的平板计数

将处理后的芽孢悬浮液进行梯度稀释, 吸取 1 mL 稀释液, 用 TSA-YE 培养基倾注平板计数, 每个平板中倒入 1 mL 稀释菌液和 15~20 mL TSA-YE 培养基, 在 37 °C 下培养 24~48 h, 进行计数并计算存活芽孢浓度, 计算公式为

$$\text{芽孢存活浓度} = \lg N \quad (3)$$

式中 N 为不同处理后的菌落数。

1.3.8 芽孢悬浮液吸光度值的测定

取处理后的枯草芽孢杆菌芽孢悬浮液, 在 600 nm 下测定吸光度值, 该吸光度值常用来估计芽孢内容物的释放情况^[27]。测定前将芽孢悬浮液摇晃均匀。

1.3.9 流式细胞仪检测枯草芽孢杆菌芽孢内膜通透性

取处理前后的枯草芽孢杆菌芽孢悬浮液, 稀释到菌液浓度为 $10^6 \sim 10^7$ CFU/mL。使用 PI 染色后, 用流式细胞仪检测前向散射光 (Forward Scatter, FS)、侧向散射光 (Side Scatter, SS)、荧光通道 FL2 和 FL3^[28]。数据采集后用 FCS Express Version 3.0 软件 (De Novo software, Canada) 分析。

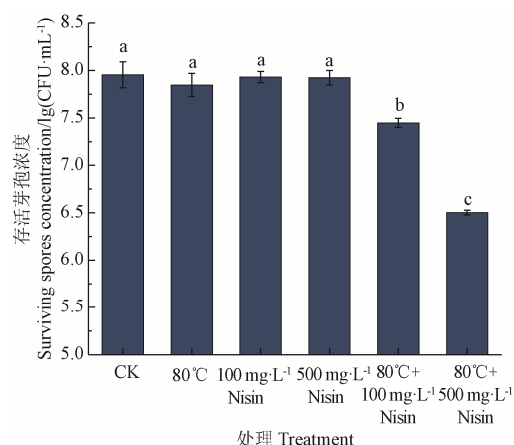
1.3.10 统计分析

所有的试验至少重复 3 次, 数据通过 SPSS 17.0 进行分析, 以 $P < 0.05$ 表示差异性显著, 采用 Origin 2018 软件作图。

2 结果与分析

2.1 热结合 Nisin 处理对枯草芽孢杆菌芽孢的杀灭作用

如图 1 所示, 与未经任何处理的对照相比, 单独使用 80 °C 热处理或 Nisin 处理都无法对芽孢产生杀灭作用。热结合 Nisin 能够杀灭芽孢, 80 °C 结合 100 mg/L Nisin 处理 20 min 后, 芽孢存活浓度下降了 0.5 lg (CFU/mL), 80 °C 结合 500 mg/L Nisin 处理 20 min 后, 芽孢存活浓度下降程度最大, 下降了约 1.4 lg (CFU/mL), 并且 Nisin 浓度越高, 对芽孢造成的杀灭作用越强。温度能够对内膜磷脂产生一定影响, 同时 Nisin 能够作用于芽孢内膜, 热结合 Nisin 对芽孢内膜的影响可能存在协同作用, 导致芽孢内膜通透性增加, 水分子进入芽孢内部, 导致其耐热性下降, 从而被杀灭。因此, 以下试验以芽孢内膜为研究对象, 采用荧光偏振法、分光光度法及流式细胞术对芽孢悬浮液荧光偏振度、吸光度值和芽孢内膜通透性进行研究, 探究芽孢内膜流动性及通透性的变化是否是导致其被杀灭的重要原因之一。



注: 标有不同字母的处理之间具有显著性差异 ($P < 0.05$), 下同。

Note: There were significant differences among the treatments marked with different letters ($P < 0.05$), the same below.

图1 热结合 Nisin 处理对枯草芽孢杆菌存活芽孢浓度的影响

Fig.1 Effects of heat treatment combined with Nisin on surviving spores rate of *Bacillus subtilis*

2.2 热结合 Nisin 处理对枯草芽孢杆菌芽孢悬浮液荧光偏振度的影响

作为一种较为敏感的荧光探针, DPH 常用于研究生物膜的流动性, 通常标记于磷脂双分子层内, 外界环境改变时, 磷脂特性的改变会使荧光偏振度发生变化, 宏观表现为膜流动性的改变, 荧光偏振度越低, 膜流动性越强^[26,29-30]。热结合 Nisin 处理后, 芽孢悬浮液荧光偏振度如图 2。从图中可以看出, 80 °C 热处理或 Nisin 处理都能够增加芽孢内膜的流动性, 但 80 °C、100 mg/L Nisin 和 80 °C 结合 100 mg/L Nisin 处理间, 荧光偏振度没有显著差异 ($P > 0.05$)。500 mg/L Nisin 处理和 80 °C 结合 500 mg/L Nisin 处理后, 荧光偏振度下降程度最大, 但两者间没有显著差异 ($P > 0.05$)。Nisin 可直接作用芽孢内膜, 影响其荧光偏振度, 并且 Nisin 浓度越高, 对芽孢悬浮液荧光偏振度影响越大, 芽孢内膜流动性越强。而 80 °C 的热处理对芽孢内膜的影响较小, 500 mg/L 浓度的 Nisin 对芽孢悬浮液荧光偏振度的影响远大于 80 °C 热处理对芽孢悬浮液荧光偏振度的影响。

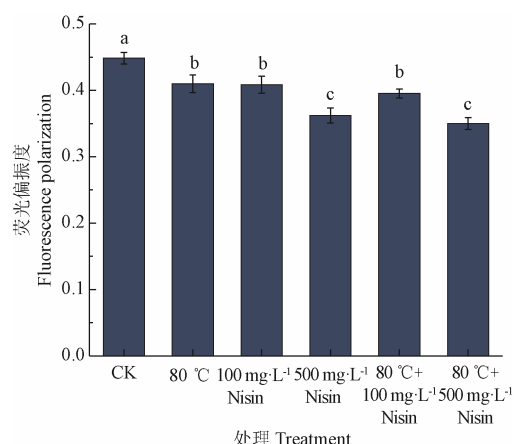


图2 热结合 Nisin 处理对枯草芽孢杆菌芽孢悬浮液荧光偏振度的影响

Fig.2 Effects of heat treatment combined with Nisin on fluorescence polarization of *Bacillus subtilis* spores suspension

2.3 热结合 Nisin 处理对枯草芽孢杆菌芽孢悬浮液吸光度值的影响

芽孢内容物的释放与芽孢内膜通透性密切相关, 芽孢悬浮液的吸光度值常用来估计芽孢内容物的释放情况, 芽孢内容物释放程度越大, 吸光度越低^[27,31-32]。热结合 Nisin 处理后, 芽孢悬浮液吸光度值变化如图 3。不同处理后, 芽孢悬浮液吸光度值显著降低 ($P < 0.05$)。Nisin 单独处理后, 芽孢悬浮液吸光度值显著低于单独的 80 °C 热处理 ($P < 0.05$), 并且 Nisin 浓度越高, 吸光度值下降程度越大。80 °C 结合 500 mg/L Nisin 处理后, 吸光度值下降程度最大。Nisin 能够作用于芽孢内膜, 在膜的表面形成通透的孔道, 导致芽孢内容物的释放。

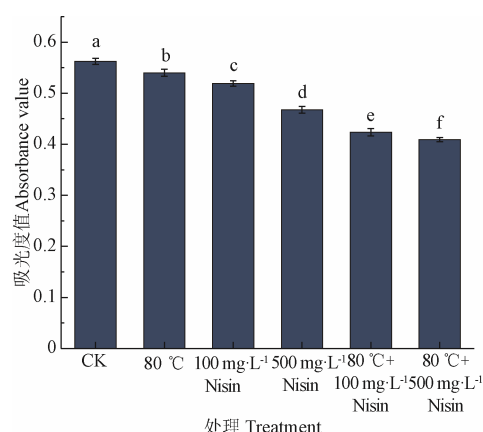
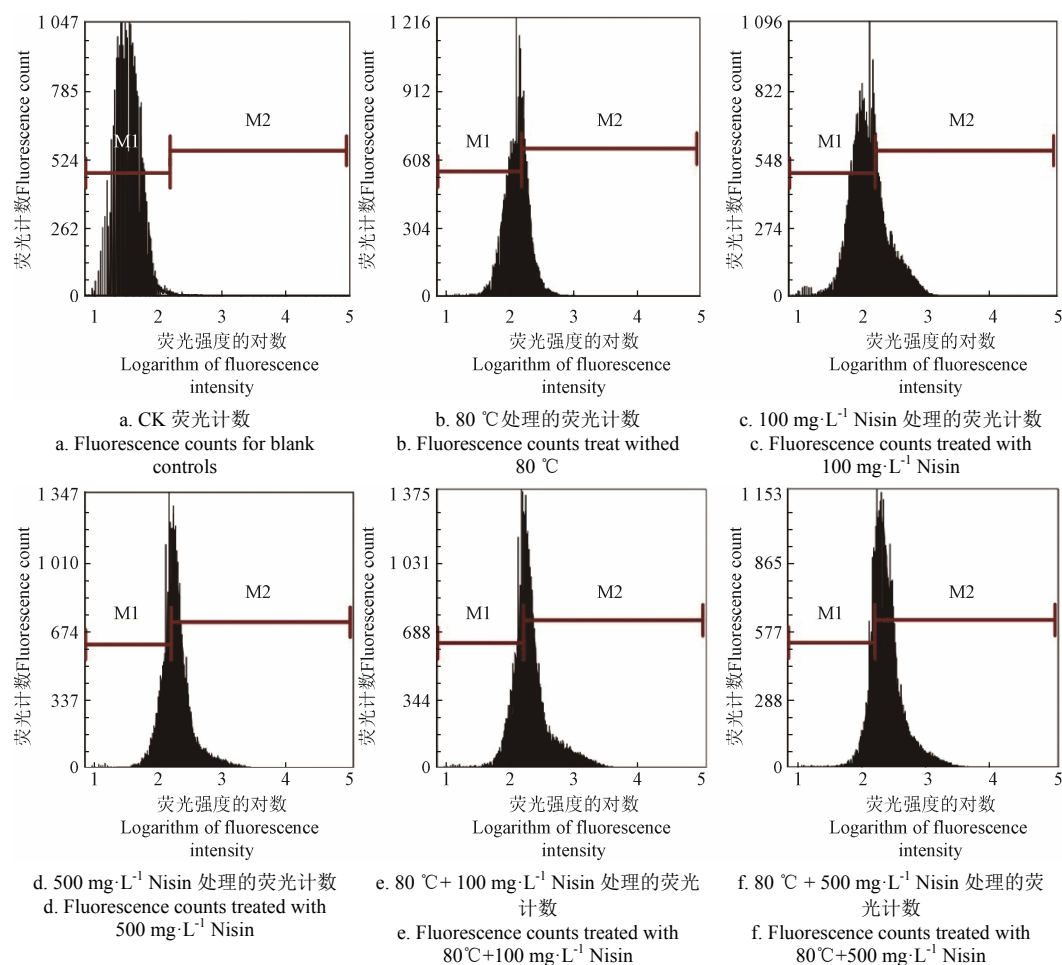


图3 热结合 Nisin 处理对枯草芽孢杆菌芽孢悬浮液吸光度值的影响

Fig.3 Effects of heat treatment combined with Nisin on absorbance value of *Bacillus subtilis* spores suspension

2.4 热结合 Nisin 处理后枯草芽孢杆菌芽孢内膜通透性的变化

进一步采用流式细胞术研究芽孢内膜损伤情况。当膜受到损伤时, PI 能够透过受损的细胞膜进入到细胞内部, 结合 DNA 后发出强烈的荧光。将热结合 Nisin 处理后的芽孢用 PI 染色, 流式细胞术检测结果如图 4, 以对照芽孢为标准将流式细胞术直方图分为 M1 阴性和 M2 阳性区域, 对照芽孢未经任何处理, 芽孢内膜完整, 无损伤情况, 其 DNA 无法被 PI 染色, 其荧光分布基本在 M1 阴性区域。经过杀菌处理后, 芽孢内膜遭到破坏, PI 透过受损的芽孢内膜进入芽孢内部, 与芽孢 DNA 结合, 发出强烈荧光, 流式细胞术直方图表现为荧光区域分布均从 M1 阴性区域向 M2 阳性区域移动。80 °C 处理后, 阳性区域占比 34.78%。100 mg/L Nisin 处理后, 阳性区域占比 35.45%, 500 mg/L Nisin 处理后, 阳性区域占比 62.74%。80 °C 结合 100 mg/L Nisin 处理后, 阳性区域占比 64.51%, 80 °C 结合 500 mg/L Nisin 处理后, 阳性区域占比 81.18%。结果表明, 热结合 Nisin 处理, 会使芽孢内膜破损, 增加芽孢内膜的通透性。相比热处理或 Nisin 单独作用, 热结合 Nisin 处理后, 芽孢内膜通透性显著增加 ($P < 0.05$), Nisin 浓度越高, 芽孢内膜通透性越强。温度对芽孢内膜的影响及 Nisin 对芽孢内膜的作用可能是导致芽孢内膜通透性变化的主要原因。



注：M1 表示荧光强度较低的阴性区域，M2 表示荧光强度较高的阳性区域。

Note: M1 is the negative area with low fluorescence intensity, M2 is the positive area with high fluorescence intensity.

图 4 热结合 Nisin 处理对枯草芽孢杆菌芽孢内膜通透性的影响

Fig.4 Effects of heat treatment combined with Nisin on the permeability of inner membrane of *Bacillus subtilis* spores

热结合 Nisin 处理后，芽孢内膜流动性、芽孢悬浮液吸光度值及芽孢流式细胞仪检测结果是一致的，均表明热结合 Nisin 处理下芽孢死亡与芽孢内膜通透性的变化相关。

3 结 论

1) 采用不同的处理方法(单独 80 °C、100 mg/L Nisin、500 mg/L Nisin、80 °C 结合 100 mg/L Nisin、80 °C 结合 500 mg/L Nisin) 对芽孢悬浮液进行处理，平板计数结果表明，单独使用 80 °C 热处理或 Nisin 处理都无法对芽孢产生杀灭作用。80 °C 结合 500 mg/L Nisin 处理 20 min 后，芽孢存活浓度下降程度最大。

2) 对不同处理的芽孢悬浮液的荧光偏振度分析发现，与对照组比较，单独 80 °C、不同浓度的 Nisin、温度结合不同浓度 Nisin 处理后，荧光偏振度均显著下降 ($P < 0.05$)，但 500 mg/L 浓度的 Nisin 对芽孢悬浮液荧光偏振度最大，并远大于 80 °C 热处理对芽孢内膜的影响。

3) 对芽孢悬浮液的吸光度值及内膜通透性分析发现，不同处理后吸光度值显著降低 ($P < 0.05$)，并且 Nisin 浓度越高，吸光度值下降程度越大。80 °C 结合 500 mg/L Nisin 处理后，吸光度值下降程度最大。相比热处理或 Nisin 单独作用，热结合 Nisin 处理后，芽孢内膜通透性

显著增加 ($P < 0.05$)，Nisin 浓度越高，芽孢内膜通透性越强。

综上所述，芽孢内膜是有关芽孢高杀菌抗性的关键结构，本试验针对芽孢内膜展开研究，发现 Nisin 和 80 °C 热处理两者结合处理可有效破坏芽孢内膜的水分子通透屏障，推测水分子更易通过芽孢内膜进入到芽孢核心。随着芽孢核心水分含量的增加，芽孢耐热性大大降低，80 °C 热结合 Nisin 处理就能有效杀灭芽孢，为保证食品安全提供了理论依据和新的技术手段。

[参 考 文 献]

- [1] Trunet C, Ngo H, Coroller L. Quantifying permeabilization and activity recovery of *Bacillus* spores in adverse conditions for growth[J]. Food Microbiology, 2019, 81: 115-120.
 - [2] Fan Lihua, Ismail Balarabe Bilyaminu, Hou Furong, et al. Thermosonication damages the inner membrane of *Bacillus subtilis* spores and impels their inactivation[J]. Food Research International, 2019, 125: 108514. 1-108514. 8.
 - [3] 朱瑶迪, 张佳烨, 李苗云, 等. 肽聚糖对肉制品中产气荚膜梭菌芽孢萌发率影响及预测[J]. 农业工程学报, 2020, 36(4): 287-293.
- Zhu Yaodi, Zhang Jiaye, Li Miaoyun, et al. Effect of different Peptidoglycan on *Clostridium perfringens* spore germination and quantitative prediction[J]. Transactions of

- the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2020, 36(4): 287-293. (in Chinese with English abstract)
- [4] Paul Christophe, Filippidou Sevasti, Jamil Isha, et al. Bacterial spores, from ecology to biotechnology[J]. Advances in Applied Microbiology, 2018, 106: 79-111.
 - [5] Voundi Steve Olugu, Nyegue M, Bougnom Blaise Pascal, et al. The Problem of Spore-forming Bacteria in Food Preservation and Tentative Solutions[M]. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2017: 139-151.
 - [6] 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 Xiaosong. Research progress on the spore germination[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(6): 221-228. (in Chinese with English abstract)
 - [7] 何树祥. 运用光学新技术探究理化因子对苏云金芽孢杆菌芽孢萌发的影响[D]. 桂林: 广西师范大学, 2017.
He Shuxiang. Exploring the Effects of Physical and Chemical Factors on Spore of *Bacillus thuringiensis* by Using New Optical Technology[D]. Guilin: Guangxi Normal University, 2017. (in Chinese with English abstract)
 - [8] Leggett M J, McDonnell G, Denyer S P, et al. Bacterial spore structures and their protective role in biocideresistance[J]. Journal of Applied Microbiology, 2012, 113(3): 485-498.
 - [9] Cowan Ann E, Olivastro Elizabeth M, Koppel Dennis E, et al. Lipids in the inner membrane of dormant spores of *Bacillus* species are largely immobile[J]. Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America, 2004, 101(20): 7733-7738.
 - [10] Genest P C, Barbara S, Elizabeth M, et al. Killing of spores of *Bacillus subtilis* by peroxydinitrite appears to be caused by membrane damage[J]. Microbiology, 2002, 148: 307-314.
 - [11] Setlow P. Spores of *Bacillus subtilis*: Their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals[J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 101(3): 514-25.
 - [12] Dong W, Green J, Korza G, et al. Killing of spores of *Bacillus* species by cetyltrimethylammonium bromide[J]. Journal of Applied Microbiology, 2019, 126: 1391-1401.
 - [13] Lee S Y, Chung H J, Kang D H. Combined treatment of high pressure and heat on killing spores of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice concentrate[J]. Journal of Food Protection, 2006, 69(5): 1056-1060.
 - [14] Aldrete-Tapia J A, Torres J. Antonio. Enhancing the inactivation of bacterial spores during pressure-assisted thermal processing[J]. Food Engineering Reviews, 2020.
 - [15] Zhang Zhong, Jiang Bin, Liao Xiaojun, 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.
 - [16] Takuya Inokuchi, Noriyoshi Arai. Relationship between water permeation and flip-flop motion in a bilayer membrane[J]. Physical Chemistry Chemical Physics Pccp, 2018, 20(44): 28155-28161.
 - [17] 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. (in Chinese with English abstract)
 - [18] E. 西姆. 膜生物化学[M]. 北京: 科学出版社, 1985.
 - [19] 廖涵. 乳酸链球菌素(Nisin)与超高压结合对 *E. coli* 的协同杀菌效应[J]. 食品工业科技, 2019, 40(20): 82-87.
Liao Han. Synergistic effects of Nisin and HPP on the inactivation of *Escherichia coli*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(20): 82-87. (in Chinese with English abstract)
 - [20] 刘洪霞. ϵ -聚赖氨酸、Nisin 和纳他霉素的抑菌特性及协同抑菌机理研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2013.
Liu Hongxia. The Inhibition Activity and Synergistic Mechanism of ϵ -Polylysine, Nisin and Natamycin[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2013. (in Chinese with English abstract)
 - [21] Modugno Chloe, Kmiha Souhir, Simonin Helene, et al. High pressure sensitization of heat-resistant and pathogenic foodborne spores to nisin[J]. Food Microbiology, 2019, 84: 103244.
 - [22] Marta Ávila, Natalia Gómez-Torres, Marta Hernández, et al. Inhibitory activity of reuterin, nisin, lysozyme and nitrite against vegetative cells and spores of dairy-related Clostridium species[J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 172: 70-75.
 - [23] 胡长利, 向新华, 韩晓旭, 等. 耐热芽孢杆菌(*Bacillus sporothermodurans*)的研究进展概述[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(7): 2795-2801.
Hu Changli, Xiang Xinhua, Han Xiaoxu, et al. Research and development of *Bacillus sporothermodurans*[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2015, 6(7): 2795-2801. (in Chinese with English abstract)
 - [24] 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.
Zhang Zhong, Sun Jing, Zhang Jinyu, et al. Effects of high pressure thermal sterilization on the activity of cortex-lytic enzyme extracted from *Bacillus subtilis* spores[J]. Science and Technology of Food Industry. 2018, 39(15): 90-95. (in Chinese with English abstract)
 - [25] 钱静亚, 马海乐, 李树君, 等. 脉冲磁场对枯草芽孢杆菌细胞膜流动性的影响[J]. 农业机械学报, 2013, 44(11): 202-207.
Qian Jingya, Ma Haile, Li Shujun, et al. Effects of the pulsed magnetic field on membrane fluidity of *Bacillus subtilis*[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery. 2013, 44(11): 202-207. (in Chinese with English abstract)
 - [26] Voss Dnielle, Montville Thomas J. 1, 6-Diphenyl-1, 3, 5-hexatriene as a reporter of inner spore membrane fluidity in *Bacillus subtilis* and *Alicyclobacillus acidoterrestris*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2014, 96: 101-103.
 - [27] Hue Nguyen Thi Minh, Dantigny Philippe, Gervais Patrick, et al. Germination and inactivation of *Bacillus subtilis* spores induced by moderate hydrostatic pressure[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2010, 107: 876-83.
 - [28] Amor Kaouther Ben, Breeuwer Pieter, Verbaarschot Patrick, et al. Multiparametric flow cytometry and cell sorting for the

- assessment of viable, injured, and dead *Bifidobacterium* cells during bile salt stress[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(11): 5209-5216.
- [29] Trevors Jack. Fluorescent probes for bacterial cytoplasmic membrane research[J]. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2003, 57(2): 87-103.
- [30] Gharib Riham, Fourmentin Sophie, Charcosset Catherine, et al. Effect of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on lipid membrane fluidity, stability and freeze-drying of liposomes[J]. *Journal of Drug Delivery and Technology*, 2018, 44: 101-107.
- [31] Wuytack E Y, Soons J, Poschet F, et al. Comparative study of pressure and nutrient induced germination of *Bacillus subtilis* spores[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(1): 257-61.
- [32] Farkas J, Andrassy E, Simon A, et al. Effect of pasteurizing levels of high hydrostatic pressure on *Bacillus subtilis* luxAB spores[J]. *Acta Alimentaria*, 2003, 32(4): 373-381.

Effects of heat combining with Nisin treatment on the sterilization of *Bacillus subtilis* spores

Chen Le, Zhang Zhong^{*}, Guo Jiajun, Shen Jin, Chen Xiang, Shang Binling

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

Abstract: Bacterial spores are the most difficult microorganisms to be inactivated, which can cause food spoilage and poisoning in food production. High-temperature treatment above 100 °C is often used to inactivate bacterial spores in food, but the heat treatment at high temperature inevitably affects the nutrition and sensory quality of products. In this study, a lower-temperature heat treatment combined with Nisin on bacterial spores was proposed to explore the inactivation effects and mechanism, in order to find a feasible way to inactivate bacterial spores with lower-temperature. A plate-counting method, fluorescence polarization method, spectrophotometry and flow cytometry were used to determine the survival rate, fluorescence polarization degree, the absorbance value and inner membrane permeability of the spore samples. The results showed that: 1) The 80 °C treatment or Nisin alone cannot inactivate bacterial spores, but the 80 °C heat treatment combined with Nisin can effectively inactivate bacterial spores. After treated at 80 °C with 500 mg/L Nisin for 20 min, the survival concentration of bacterial spores decreased by about 1.4 lg (CFU/mL). 2) The fluorescent probe DPH was used to mark the inner membrane of bacterial spores, and further to analyze the fluidity of bacterial spores in the inner membrane. The results showed that the heat treatment combined with Nisin can significantly improve the fluidity of the inner membrane. Nisin can directly affect the degree of fluorescence polarization in the inner membrane. With higher Nisin concentration, the influence of Nisin on the degree of fluorescence polarization of inner membrane was stronger, whereas, the influence was smaller in the heat treatment at 80 °C. The effects of 500 mg/L Nisin on the bacterial spores were much stronger than that of heat at 80 °C. 3) The content release of spore was closely related to the inner membrane permeability of bacterial spores, and the absorbance value of spore suspension was often used to estimate the release of spore's content. The higher release degree of spore's content caused more significant decrease of the absorbance value of spore suspension. After 80 °C thermal treatment combined with Nisin, the absorbance value of spore suspension was significantly lower than that of thermal or Nisin treatment alone. After the treatment with 80 °C heat and 500 mg/L Nisin for 20 min, the absorbance value of spore suspension was the lowest. 4) The spores treated with heat combined with Nisin were stained with PI (Propidium Iodide), whereas, the changes of inner membrane permeability were studied by flow cytometry. The 80 °C thermal treatment combined with Nisin can significantly increase the permeability of inner membrane. Compared with heat or Nisin used alone, the permeability of inner membrane increased significantly after thermal treatment combined with Nisin. The higher Nisin concentration caused the higher permeability of inner membrane. It was found that Nisin had significant effects on the fluidity and permeability of inner membrane for the spore, where the 80 °C thermal treatment combined with different concentrations of Nisin had synergistic effect to improve the permeability of inner membrane. With the increase in the permeability of inner membrane, water was easier to enter the core of bacterial spores, which reduced the heat resistance of bacterial spores. The 80 °C thermal treatment combined with 500 mg/L Nisin can effectively inactivate bacterial spores, while the addition of Nisin greatly reduced the temperature required for inactivation of bacterial spore. The findings can contribute to reduce the damages of thermal sterilization on the nutritional and sensory quality in food production.

Keywords: heat resistance; sterilization; inner membrane; membrane fluidity; membrane permeability; Nisin; spores