

中性体系中超高压-Nisin 协同作用下的细菌致死机理

戚伟民¹, 钱平², 余坚勇², 张晓娟², 张驰羽¹, 卢蓉蓉^{1*}

¹江南大学食品学院, 食品科学与技术国家重点实验室, 无锡 214122

²中国人民解放军总后勤部军需装备研究所, 北京 100010

摘要:【目的】为保证超高压中性食品的杀菌强度, 可以通过添加 Nisin 等细菌素协同杀菌以达到商业无菌要求。本文从分子水平和超微结构揭示二者协同作用下的细胞致死机理, 为超高压杀菌在中性食品中的应用奠定理论基础。【方法】采用 pH7.0 的环境体系, 100–500 MPa 的超高压处理, Nisin 浓度为 200 IU/mL。通过荧光染色法和紫外吸收法检测细胞膜通透性, 傅里叶转换红外光谱法检测细菌细胞壁、蛋白以及核酸的变化, 透射电镜观察细菌在协同作用下的形态变化。【结果】结果发现: 中性条件下, 超高压与 Nisin 协同杀菌作用超过 2.5 个对数值, 协同作用使细菌细胞膜通透性增加了 10%–60%; 同时使细菌细胞膜的磷脂由液晶态向凝胶态转变, 降低了细胞膜的流动性。蛋白质二级结构发生变化, 导致蛋白变性。协同作用还破坏了细胞的正常生理形态, 致使细胞内容物流出。【结论】结果证实, Nisin 是超高压制备中性食品的优良辅助杀菌剂, 能够起到有效的协同杀菌作用。

关键词: 超高压, 乳酸链球菌素, 协同杀菌, 细胞膜通透性, 超微结构

中图分类号: TS205.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011)01-0035-08

超高压加工技术, 简称高压技术或静态高压技术, 是一种新型非热杀菌技术, 它克服了传统热力杀菌对食品品质影响较为严重的弊端, 能够保持食品品质和风味不被破坏, 是一种极具发展前途的杀菌技术^[1–3]。

近年来, 很多研究致力于酸性食品体系的超高压杀菌研究^[4–6], 取得了一定的进展。但在中性食品体系中, 超高压杀菌受到了制约^[7]。这主要是由于超高压处理对革兰氏阴性菌的致死效果较好, 但对耐受性较好的革兰氏阳性菌及其芽孢致死效果较差。前期研究结果显示, 即使使用 600 MPa 的处理压力仍不能使中性食品中的耐压菌达到商业无菌要

求^[8]。

由于超高压在中性条件下无法彻底杀灭食品中的腐败菌, 一系列的栅栏技术被开发应用于超高压杀菌领域, 以此来增强超高压的细菌致死效果。在中性食品中, 超高压与 Nisin 常作为共同使用的抑菌手段。Nisin 是一种具有 34 个氨基酸残基的多肽活性物质, 能有效地杀死或抑制引起食品腐败的革兰氏阳性菌^[9], 尤其是细菌的芽孢。Nisin 作为一种安全高效的抑菌剂, 在食品加工领域得到了广泛的应用。

超高压与 Nisin 协同杀菌已经应用于食品体系中并取得了良好的杀菌效果^[4], 但是, 超高压与

基金项目: 教育部新世纪优秀人才计划 (NCET-09-0436)

* 通信作者。Tel: +86-510-85329061; Fax: +86-510-85912155; E-mail: lurr@jiangnan.edu.cn

作者简介: 戚伟民 (1985–), 男, 山东青岛人, 硕士研究生, 研究方向食品生物技术。E-mail: qwmbobo@163.com

收稿日期: 2010-05-26; **修回日期:** 2010-08-13

Nisin 产生协同杀菌作用的机理一直是一个理论空白。前期研究表明,超高压主要影响细菌的细胞膜渗透性、细胞膜脂质的流动性^[10-12],导致细菌蛋白变性、酶失活、核酸变性以及核糖体的构造改变^[13-15];Nisin 主要导致细菌细胞膜穿孔^[9]。然而,二者的共同作用使得细菌的哪些生理指标发生显著变化,两者对细胞致死的贡献又如何,目前尚不确定。可见,亟需深入研究二者协同杀菌的机理,为超高压与 Nisin 在中性食品体系中的应用提供理论依据。

本文以中性食品中的耐压菌枯草芽孢杆菌作为研究对象,通过研究超高压和 Nisin 对枯草芽孢杆菌细胞膜、蛋白质、核酸等一系列细胞物质的影响,初步探讨超高压与 Nisin 协同杀菌的机理,为 Nisin 在超高压食品中的应用以及超高压在食品领域的应用提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)实验室自行筛选,江南大学食品生物技术研究中心提供。

1.1.2 培养基及培养方法:营养肉汤培养基(蛋白胨 10 g/L,牛肉膏 3 g/L,氯化钠 5 g/L,pH 7.2-7.4);营养琼脂培养基(蛋白胨 10 g/L,牛肉膏 3 g/L,氯化钠 5 g/L,琼脂粉 15 g/L,pH 7.2-7.4)

1.1.3 主要试剂和仪器:(1)Nisin 的配制和使用:乳酸链球菌素 Nisin(活力 1200 IU/mg),购自中国科学院微生物研究所浙江银象生物工程有限公司。Nisin(0.2 g)溶解于 100 mL 的稀盐酸(20 mmol/L)中,配制浓度为 2000 IU/mL。溶液浸入沸水(100 ℃)中 4-4.5 min,之后溶液放入冰箱中储存。Nisin 溶液在冰箱中保存不超过 6 d。(2)荧光染料碘化丙锭(Propidium iodide,PI)的配制和使用:PI 购自 Sigma-Aldrich 公司,使用无菌水溶解 PI,至浓度为 300 $\mu\text{mol/L}$,保存至 4 ℃中备用。(3)仪器与设备:超高压处理:UHPF-800MPa-3L 超高压处理装置,内蒙古包头科发新型高技术食品机械有限责任公司生产,高静压腔体内的传压介质为水。高静压腔体最高工作压力为 600 MPa,腔体容积为 3 L。高

压腔外壁为循环水,压力、温度、时间等参数可通过计算机设定并能自动记录数据。F-7000 荧光分光光度计,日本 HITACHI 公司。UV-2450 紫外可见分光光度计,日本 SHIMADZU 公司。NICOLET NEXUS 470 傅里叶变换红外光谱(Fourier Transform Infrared,FT-IR),美国 Thermo Electron 公司。H-7650 HITACHI 透射电子显微镜(Transmission Electron Microscope,TEM),日本 HITACHI 公司。

1.2 细菌菌悬液的制备

枯草芽孢杆菌菌悬液的制备:将活化好的菌株接种到营养肉汤培养基中 37℃ 培养 18 h,6000 r/min 离心 15 min,弃去上清液,收集沉淀的菌体,重悬于磷酸缓冲溶液(0.1 mol/L,pH 7.0)中,4℃ 保存备用。

1.3 细菌菌悬液的超高压处理

用磷酸缓冲溶液(0.1 mol/L,pH 7.0)将菌悬液浓度调整至 $10^8 - 10^9$ CFU/mL,然后在无菌操作条件下将其分装于无菌聚乙烯蒸煮袋中,真空热封口(真空度为 -100 kPa)。防止渗漏,进行二次包装。将样品置于超高压容器,100-500 MPa 加压处理 15 min,每个样品重复 3 次。

1.4 微生物计数

本实验采用 100-500 MPa 的实验条件处理菌悬液,处理温度为常温(20℃),处理时间 15 min。处理之后的菌悬液立即进行菌落计数,以生理盐水作为梯度稀释液,对样品进行梯度稀释计数,37℃ 培养 48 h,进行菌落计数^[16]。

1.5 细菌荧光染色

将菌悬液浓度调整至 $10^8 - 10^9$ CFU/mL,加入荧光染色剂 PI 至终染色浓度为 2.9 $\mu\text{mol/L}$ 。将荧光染色的样品放入超高压装置进行超高压处理。处理过的样品放入 37℃ 暗处孵化 10 min,样品使用 PBS 离心重悬洗涤两次。处理完成的样品使用荧光分光光度计进行检测,激发光波长 495 nm,发射光波长 615 nm,狭缝宽度 10 nm。检测指标为荧光强度^[11]。

使用热处理(90℃,10 min)过的菌悬液的荧光强度作为阳性对照,设定其荧光强度为 100%,其它样品的细胞膜通透率在 0-100% 之间^[10]。

细胞膜通透率(%) = $\frac{\text{样品荧光强度}}{\text{阳性对照荧光强度}} \times 100\%$

1.6 细菌上清液的紫外检测

将压力处理过的样品使用 $10,000 \times g$ 离心 10 min, 取上清液 1 mL, 置于石英比色皿中, 使用紫外分光光度计进行检测, 检测波长 260 nm^[17]。

1.7 细菌全细胞傅里叶变换红外光谱检测

采用 Santivarangkna, C 的样品处理方法^[18], 并做适当改进。将处理前的样品和处理后的样品悬浮于 PBS 中, 样品离心分离 ($10000 \times g$, 5 min), 使用无菌水洗涤二次, 除去 PBS 的杂质影响; 最后重悬浮于无菌水中。取 200 μ L 样品平铺于 ZnSe 晶片上, 在常温烘干水分, 除去水峰的影响。烘干的样品直接使用 FT-IR 光谱检测仪 (Thermo Electron Corp.) 进行检测。检测方法为衰减全反射法 (Attenuated Total Reflection, ATR), 操作参数如下: 检测波数范围为 $4000 - 500 \text{ cm}^{-1}$, 分辨率: 4 cm^{-1} , 扫描次数: 64 次。红外光谱采用 OMNIC 软件进行分析。

1.8 细菌透射电镜观察

样品使用无菌生理盐水洗涤 2 次, 加 3% 戊二醛固定 2-4 h, 0.1 mol/L pH7.2 磷酸缓冲液漂洗数次, 悬浮液置于电镜专用铜网上, 再用 1% 磷钨酸染色后, 通过透射电子显微镜观察^[19]。

1.9 数据处理方法

文中数据为 3 次平行测定值的平均值。显著性分析采用 SPSS 16.0 (美国 SPSS 公司) 的单因素方差分析 (One-Way ANOVA, Turkey) 在显著性水平 $P = 0.05$ 下进行数据分析与统计。 a, b, c, d 或 A, B, C, D 不同字母代表差异显著, $P < 0.05$ 。

2 结果和讨论

2.1 超高压-Nisin 协同作用对细菌致死率的影响

文献报道^[8], 在中性食品体系中, 革兰氏阳性菌及其芽孢耐压性最强, 枯草芽孢杆菌被鉴别并作为中性超高压食品中的指示菌。本文选择枯草芽孢杆菌, 作为探讨中性条件下细菌致死机理的目标菌。根据 GB2760-2007 的规定, 在 Nisin 在食品体系中的添加量不能超过 200 IU/mL, 本文选择 200 IU/mL 的添加量进行研究。枯草芽孢杆菌在超高压条件下的致死曲线见图 1。由图 1 可见, Nisin 对革兰氏阳性菌具有抑制作用, 在常压下, 200 IU/mL 的 Nisin 可以杀灭 0.8 个 log 的枯草芽孢杆菌。在超高压作用下, Nisin 与超高压产生了协同杀菌作用:

300 MPa 的超高压作用可以杀灭 4 个 log 的菌数, 而在超高压和 Nisin 协同作用下, 可以杀灭 7.5 个 log 的菌数, 协同杀菌作用超过 2.5 个 log, 在 400 MPa 和 500 MPa 条件下, 协同作用分别达到 3 个和 1.2 个 log, 说明超高压能够与 Nisin 产生协同杀菌作用。

由于革兰氏阳性菌比革兰氏阴性菌耐压, 超高压杀菌在应用方面受到了很大的限制, 在 500 MPa 时, 超高压本身并不能达到满意的杀菌效果, 残余 1.5 个 log 的菌, 而当添加 Nisin 之后, 400 MPa 的压力就能够杀灭所有的枯草芽孢杆菌, 说明 Nisin 能够降低超高压杀菌过程的压力, 对于超高压技术的推广, 具有积极作用。

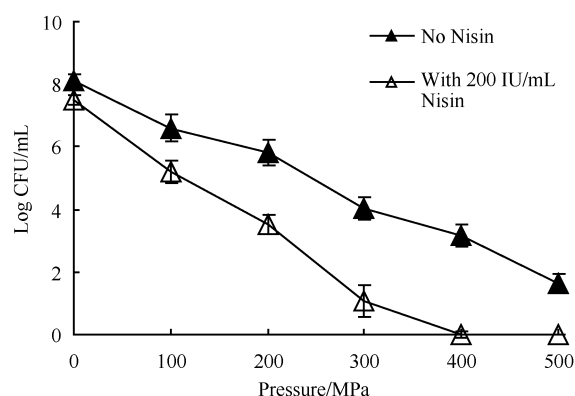


图 1 超高压处理对枯草芽孢杆菌致死曲线

Fig. 1 HHP sterilization curve of *B. subtilis* strain.

2.2 超高压-Nisin 协同作用对细胞膜通透性的影响

PI 是大分子的核酸染料, 几乎无法穿过完整的细胞膜, 只有在细胞膜通透性变大的时候才能穿过, 并与核酸结合发出荧光。由图 2 可以发现, 在常压下, 加入 200 IU/mL 的 Nisin 的样品比不加 Nisin 的

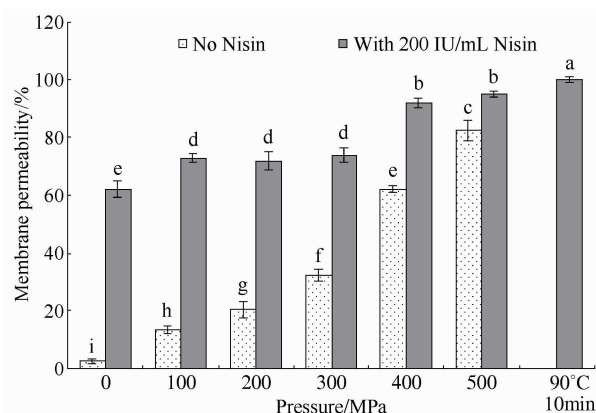


图 2 枯草芽孢杆菌细胞膜通透性变化

Fig. 2 The change of membrane permeabilization of *B. subtilis* strain.

样品通透性显著提高($P < 0.05$),由 2.49 %提高至 62.19 %,说明加入 Nisin 能够提高枯草芽孢杆菌的细胞膜通透性,从而导致细菌的死亡,这支持了 Nisin 的细胞膜穿孔理论^[9]。

随着处理压力的提高,细菌细胞膜的通透性改变的菌的比例逐渐增大,至压力为 400 MPa 时荧光强度达到稳定,400、500 MPa 的荧光强度没有显著性差异($P > 0.05$)。在超高压条件下,加入 Nisin 后,细胞膜通透率比未加入 Nisin 的样品显著提高,随着压力的不同,细胞膜通透率的提高在 10% - 60% 之间,说明加入 Nisin 起到了协同杀菌作用。

同时可以看到,当 500 MPa 与 200 IU/mL 的 Nisin 共同作用时,微生物检测已经不能检测到活菌,但菌悬液的荧光强度与阳性对照(90℃,10 min)仍存在差异($P < 0.05$),这与 Moussa 等人的研究结果相吻合^[10]。推测是由于超高压与热处理的杀菌机理不完全相同,超高压与 Nisin 协同并不能使细胞膜成为全透性,细胞膜未被破坏的细菌可能是其它物质的变性导致了细菌活力的丧失。

表 1 枯草芽孢杆菌细胞紫外吸收物质的泄露

Table 1 Relative amount of UV-absorbing substances leaking of *B. subtilis* strain

Nisin (IU/mL)	Control (0.1 MPa)	HHP treatment					Heat (90 °C, 10 min)
		100 MPa	200 MPa	300 MPa	400 MPa	500 MPa	
0	0.35 ± 0.02 ^{a,A}	0.4 ± 0.025 ^{a,A}	0.51 ± 0.018 ^{b,A}	0.74 ± 0.024 ^{c,A}	0.89 ± 0.028 ^{d,A}	1.03 ± 0.016 ^{e,A}	1.17 ± 0.03 ^{f,A}
200	0.4 ± 0.015 ^{a,A}	0.59 ± 0.018 ^{b,B}	0.85 ± 0.024 ^{c,B}	0.9 ± 0.026 ^{c,B}	1.04 ± 0.018 ^{d,B}	1.16 ± 0.014 ^{e,B}	1.25 ± 0.032 ^{f,B}

a, b, c, d represent significant difference of different treatment, $P < 0.05$; A, B, C, D represent significant difference of different Nisin amount, $P < 0.05$.

2.4 超高压-Nisin 协同作用对细菌蛋白核酸物质的影响

傅里叶变换红外光谱技术作为一种综合检测细菌生理状态的有效方法,近年来得到了广泛的应用。通过对细菌不同波数的红外吸收峰的分析,可以分析细菌在热处理、杀菌剂处理等方法后的细菌物质的变化情况^[20-22]。

图 3 反映了不同条件下处理枯草芽孢杆菌样品进行傅里叶红外检测的谱图,红外检测的波长范围为 4000 - 500 cm^{-1} ,黑色曲线为未处理的枯草芽孢杆菌的红外吸收谱图,红色曲线代表采用 500 MPa 和 200 IU/mL 的 Nisin 共同作用后的细菌红外吸收谱图。由图 3 可见,超高压处理前后谱图的变化微小,从谱图中无法分辨峰位的变化情况,必须对得到的原谱图进行数据分析处理。二阶导数处理是红外谱图处理中常见的方法^[20],它可以将原谱图中微小

2.3 超高压-Nisin 协同作用对细菌内核酸物质流出的影响

由于核酸中的碱基都具有共轭双键,所以具有紫外光吸收性质。核酸在紫外光谱区有一条典型的吸收曲线,其吸收高峰在 260 nm 处,所以通过测定 260 nm 处的紫外吸收强度来确定细胞内核酸物质的流出情况。

通过表 1 可以看出,在常压下,加入 Nisin 的样品和未加入 Nisin 的样品紫外吸收物质的泄露没有显著性差异($P > 0.05$),但 PI 荧光染色法显示,两种样品的细胞膜透性已经有显著差异,推测可能是因为虽然细胞膜透性发生了变化,但通透性的变化程度还不足以使胞内的紫外吸收物质渗出细胞外,所以导致两种检测方法得到的实验结果不一致。添加 Nisin 后 100 MPa - 500 MPa 处理的细菌上清液中核酸物质比未加入 Nisin 的样品显著提高,说明加入在超高压条件下加入 Nisin,可以起到协同作用,导致细胞膜的通透性增大,更多的细胞内核酸物质流出到细胞外,从而导致细菌的死亡。

的差别分辨开来,有利于谱图的分析利用。

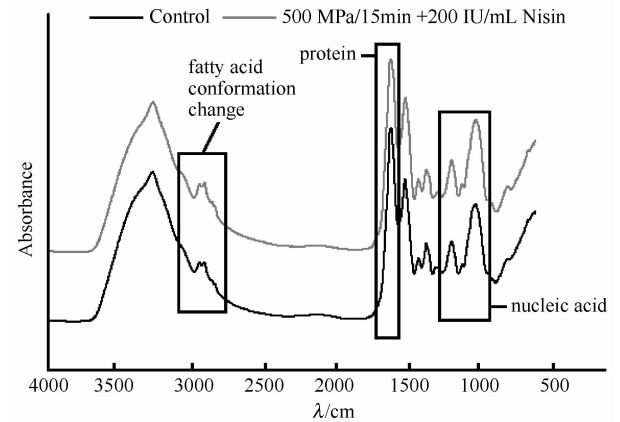


图 3 超高压-Nisin 协同处理枯草芽孢杆菌的红外谱图
Fig. 3 Representative FT-IR spectra of control and HHP-Nisin treated samples of *B. subtilis* strain.

由图 4-A 可见 2919 cm^{-1} 处的红外吸收峰发生了明显的变化,从未处理前的 2919 cm^{-1} 处移动到

2922 cm^{-1} 处;2850 cm^{-1} 的红外吸收峰也移动到了2852 cm^{-1} 处,而且,超高压与 Nisin 协同操作的红外吸收峰变化更加强烈。这两个吸收峰能够反映细胞膜的相变化^[22]。图 4-A 表明,枯草芽孢杆菌在经过超高压处理后,部分细菌的细胞膜的磷脂的脂肪链从液晶态向凝胶态发生了变化,细胞膜脂肪酸烃链和膜蛋白的流动性降低,细胞内外的物质转运能力降低,细胞信号传导性被破坏。Ulmer 等人研究了

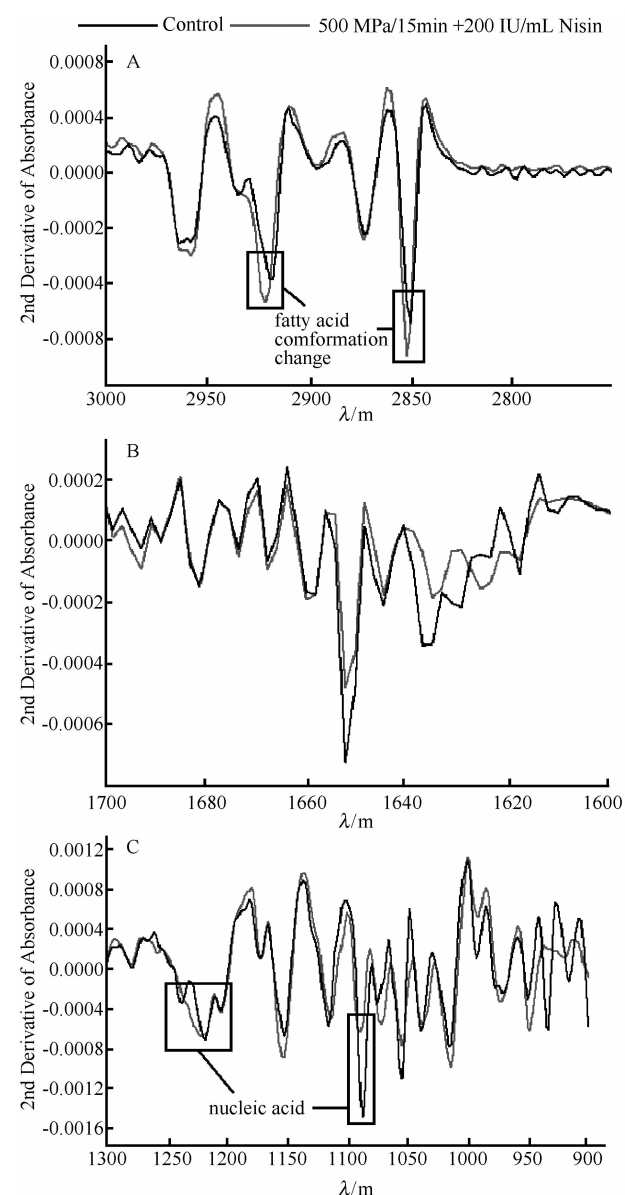


图 4 超高压-Nisin 协同处理枯草芽孢杆菌二阶导红外谱图

Fig. 4 Representative second-derivative FT-IR spectra of control and HHP-Nisin treated samples of *B. subtilis* strain. A: 3000 – 2800 cm^{-1} ; B: 1700 – 1600 cm^{-1} ; C: 1300 – 900 cm^{-1} .

超高压对植物乳杆菌细胞膜的相变化的影响,结果发现,当压力 >200 MPa 时,部分植物乳杆菌细胞膜的脂肪酸由液晶态向凝胶态转变,流动性降低,从而影响了细胞的正常生理活动,导致细菌死亡,本研究的结果与 Ulmer 等人的结果相符合^[22]。

由图 4-B 可以发现,超高压可能改变了细菌蛋白的二级结构。其中 1653 cm^{-1} 的峰代表蛋白质 α 螺旋结构,1636 cm^{-1} 和 1618 cm^{-1} 代表蛋白质的 β 折叠结构^[21]。由图可见,在经过超高压处理后,细菌蛋白的结构发生了改变,上述峰形发生了明显的变化,表明蛋白质发生了变性^[18]。原因是由于 Nisin 的加入使得细菌的细胞质更加容易流出到细胞外,失去细胞壁保护的蛋白更加容易在超高压作用下发生变性。

由图 4-C 可以发现,超高压前后,1220 cm^{-1} 与 1080 cm^{-1} 处的吸收峰发生了明显的变化,这两处吸收峰分别代表 P = O 反对称和对称伸缩振动^[20],主要反映了细菌核酸物质结构的变化,说明超高压确实能够导致细菌内核酸物质的变性。

除此之外,1200 – 900 cm^{-1} 的吸收峰变化主要是由 C-O-C 伸缩振动导致的,可以反映细胞壁肽聚糖层在处理前后的变化^[18]。从图 4-C 明显可以看出,枯草芽孢杆菌在超高压前后肽聚糖层发生了明显的变化,而加入 Nisin 之后,肽聚糖层的变化似乎更加强烈(980 cm^{-1} ,950 cm^{-1})。肽聚糖层是革兰氏阳性菌细胞壁的主要成分,肽聚糖结构的改变可能使细菌细胞壁破裂导致细胞死亡。

2.5 超高压-Nisin 协同作用对细菌形态的影响

图 5 直观地反映了不同的处理条件下枯草芽孢杆菌的超微结构。由图 5-A 可以看出,未处理的枯草芽孢杆菌呈短棒状,细胞壁的结构完整。图 5-B 图为加入 200 IU/mL 的 Nisin 后细菌的形态,可以看出,细菌周围覆盖了一层细微颗粒,说明菌悬液加入 Nisin 后,Nisin 附着于细菌的细胞膜上,根据 Nisin 的穿孔理论,Nisin 能够使革兰氏阳性菌细胞膜产生微小空洞,导致细胞死亡^[9]。同时可以看到,Nisin 导致细胞膜破损,细胞质流出。图 5-C 为经过 500 MPa/15 min 处理后的枯草芽孢杆菌,可以看到,细菌的细胞膜出现破裂,细胞质流出,但细胞边缘尚具有一定的完整性。从图 5-D 看到,当 Nisin 与超高压具有协同增效的作用,细菌的细胞壁和细胞膜完全被破坏,细菌边缘的完整性已经完全遭到了破坏。

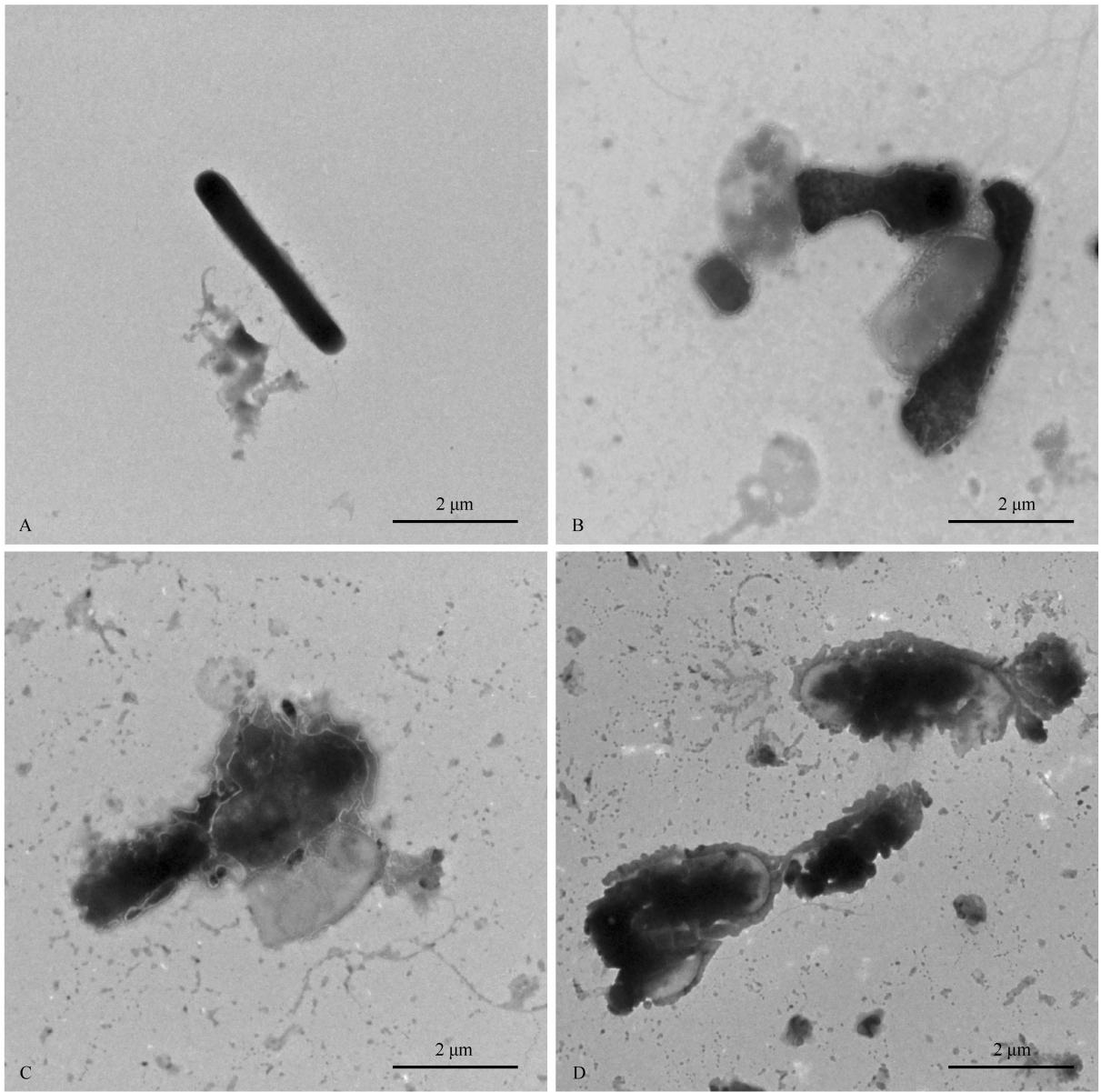


图 5 超高压-Nisin 协同处理枯草芽孢杆菌超微结构变化

Fig. 5 Ultramicroscopic structure of control and HHP-Nisin treated samples of *B. subtilis* strain. A: control; B: With 200 IU/mL Nisin; C: 500 MPa/15 min; D: 500 MPa/15 min + 200 IU/mL Nisin.

3 结论

本文通过对细菌细胞膜通透性、细胞蛋白质与核酸变性、细胞超微结构等生理指标的检测,研究了超高压与 Nisin 协同杀菌对细菌细胞的损伤机理,得到如下几点结论:

(1)对于革兰氏阳性菌,超高压和 Nisin 共同作用具有协同杀菌作用,压力为 300 MPa 时,协同杀菌

效果超过 2.5 个 log。

(2)综合使用荧光探针法、紫外吸收法、红外光谱法以及透射电镜对超高压与 Nisin 的协同作用机理进行探讨,结果发现,Nisin 能够附着于枯草芽孢杆菌的菌体表面,显著提高细菌细胞膜的通透性,超高压操作能够破坏细菌的细胞壁,导致细胞质流出,并能够导致细菌蛋白和核酸物质的变性,最终导致细菌菌体形态的破坏细菌的死亡。

参考文献

- [1] 赵俊芳,高愿军,吴广辉.超高压技术在蔬菜加工中的应用.保鲜与加工(*Storage & process*),2008,8 (1): 9-11.
- [2] Norton T, Sun DW. Recent advances in the use of high pressure as an effective processing technique in the food industry. *Food and Bioprocess Technology*, 2008, 1 (1): 2-34.
- [3] Verlent I, Hendrickx M, Rovere P, Moldenaers P, Van LA. Rheological properties of tomato-based products after thermal and high-pressure treatment. *Journal of Food Science*, 2006, 71 (4): 243-248.
- [4] Pathanibul P, Taylor TM, Davidson PM, Harte F. Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in apple and carrot juices using high pressure homogenization and Nisin. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 129 (3): 316-320.
- [5] Kumar S, Thippareddi H, Subbiah J, Zivanovic S, Davidson PM, Harte F. Inactivation of *Escherichia coli* K-12 in apple juice using combination of high-pressure homogenization and Chitosan. *Journal of Food Science*, 2009, 74 (1): 8-14.
- [6] Torres JA, Velazquez G. Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of foods. *Journal of Food Engineering*, 2005, 67 (1): 95-112.
- [7] 姜斌,胡小松,廖小军,张燕,吴继红,孙志健.超高压对鲜榨果蔬汁的杀菌效果.农业工程学报(*Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*), 2009, 25 (5): 234-238.
- [8] 何红艳,钱平,卢蓉蓉,余坚勇,陈卫,赵建新,田丰伟,戚伟民,陈潇.超高压低酸性罐头中腐败菌的致死特性.食品与发酵工业(*Food and Fermentation Industries*), 2009, 35 (6): 18-22.
- [9] 黄琴,马国霞,周绪霞,李伟芬.乳链菌肽的抑菌机制.中国食品学报(*Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*), 2007, 7 (2): 128-133.
- [10] Moussa M, Perrier-Cornet J-M, Gervais P. Damage in *Escherichia coli* cells treated with a combination of high hydrostatic pressure and subzero temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73 (20): 6508-6518.
- [11] Pagan R, Mackey B. Relationship between membrane damage and cell death in pressure-treated *Escherichia coli* cells: differences between exponential- and stationary-Phase cells and variation among strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66 (7): 2829-2834.
- [12] Klotz B, Manas P, Mackey BM. The relationship between membrane damage, release of protein and loss of viability in *Escherichia coli* exposed to high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 137 (2): 214-220.
- [13] Niven GW, Miles CA, Mackey BM. The effects of hydrostatic pressure on ribosome conformation in *Escherichia coli*: an in vivo study using differential scanning calorimetry. *Microbiology*, 1999, 145 (2): 419-425.
- [14] Macgregor RB. The interactions of nucleic acids at elevated hydrostatic pressure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 2002, 1595 (1): 266-276.
- [15] Ritz M, Freulet M, Orange N, Federighi M. Effects of high hydrostatic pressure on membrane proteins of *Salmonella typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, 55 (1): 115-119.
- [16] 曾庆梅,潘见,谢慧明,杨毅,徐慧群,黄训端,赵阳楠.超高压灭活枯草芽孢杆菌(AS 1.140)的参数优化.农业工程学报(*Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*), 2005, 21 (4): 158-162.
- [17] Aronsson K, Ronner U, Borch E. Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Saccharomyces cerevisiae* in relation to membrane permeabilization and subsequent leakage of intracellular compounds due to pulsed electric field processing. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 99 (1): 19-32.
- [18] Santivarangkna C, Wenning M, Foerst P, Kulozik U. Damage of cell envelope of *Lactobacillus helveticus* during vacuum drying. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 102 (3): 748-756.
- [19] Kaletunc G, Lee J, Alpas H, Bozoglu F. Evaluation of structural changes induced by high hydrostatic pressure in *Leuconostoc mesenteroides*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70 (2): 1116-1122.
- [20] Al-Qadiri HM, Al-Alami NI, Al-Holy MA, Rasco BA. Using fourier transform infrared (FT - IR) absorbance

- spectroscopy and multivariate analysis to study the effect of Chlorine-Induced bacterial injury in water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56 (19): 8992-8997.
- [21] Yu C, Irudayaraj J. Spectroscopic characterization of microorganisms by Fourier transform infrared microspectroscopy. *Peptide Science*, 2005, 77 (6): 368-377.
- [22] Ulmer HM, Herberhold H, Fahsel S, Ganzle MG, Winter R, Vogel RF. Effects of pressure-induced membrane phase transitions on inactivation of HorA, an ATP-dependent multidrug resistance transporter, in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68 (3): 1088-1095.

Synergistic inactivation of *Bacillus subtilis* by high hydrostatic pressure and Nisin at neutral pH

Weimin Qi¹, Ping Qian², Jianyong Yu², Xiaojuan Zhang², Chiyu Zhang¹,
Rongrong Lu^{1*}

¹School of Food Science and Technology State Key Laboratory, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

²Quartermaster Research Institute of the General Logistic Department, Beijing 10010, China

Abstract: [**Objective**] High hydrostatic pressure (HHP) could be synergized with Nisin in neutral food system to achieve commercial sterilization. The mechanism of synergistic inactivation by HHP treatment and Nisin was investigated at molecular level alongside ultramicroscopic structure. [**Methods**] *Bacillus subtilis* strain was subjected to HHP (100 – 500 MPa for 15 min) alone and in combination with Nisin (200 IU/mL) in PBS (pH 7.0). Membrane permeability was studied by fluorescent dye and ultraviolet absorption. Membrane lipid, protein and DNA changes were detected by Fourier Transform Infrared. Transmission Electron Microscope (TEM) was used to detect the morphological changes. [**Results**] In neutral food system, the combined effect of HHP and Nisin reduced the population of the bacteria by 2.5 log, while at the same time increasing the membrane permeability by 10% – 60%. The physical state of membrane phospholipid molecules changed from liquid crystalline to gel state with a decrease in membrane fluidity. Treatments at elevated pressures were observed to cause protein denaturalization. Results from TEM demonstrate that cell content leaked owing to the synergistic effect. [**Conclusion**] This confirms that Nisin is an effective bactericide when combined with HHP in neutral food and that the two inactivation methods have a synergistic effect.

Keywords: high hydrostatic pressure, nisin, synergistic inactivation, membrane permeability, ultramicroscopic structure

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Program for New Century Excellent Talents in University (NCET-09-0436)

* Corresponding author. Tel: +86-510-85329061; Fax: +86-510-85912155; E-mail: lurr@jiangnan.edu.cn

Received: 26 May 2010/ Revised: 13 August 2010