

温度、超声、nisin 协同脉冲磁场杀灭 枯草芽孢杆菌的研究

钱静亚^{1,2}, 马海乐^{1,2}, 李树君^{1,3}, 刘斌³, 张弢⁴

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212013) (2. 江苏省农产品生物加工与分离工程技术研究中心, 江苏镇江 212013) (3. 中国农业机械化科学研究院, 北京 100083) (4. 江苏大学京江学院, 江苏镇江 212013)

摘要: 本文对温度 (50~100 °C)、超声 (200 W, 5~30 min)、nisin (100~350 IU/mL) 协同磁场强度为 3.0 T, 脉冲数为 30 个的脉冲磁场杀灭枯草芽孢杆菌进行了研究。结果表明: 先脉冲磁场处理后温度处理时, 温度越高, 杀菌效果越好, 当温度为 100 °C, 枯草芽孢杆菌的残留率最低为 3.17%; 先脉冲磁场处理再采用超声功率 800 W, 工作 5 s 间隙 10 s 的超声处理后, 超声总时间越长杀菌效果越好, 当超声时间为 30 min 时, 枯草芽孢杆菌的残留率最低为 8.18%; 先脉冲磁场处理后 nisin 处理时, 浓度越高杀菌效果越好, 当 nisin 终浓度为 350 IU/mL 时, 枯草芽孢杆菌的残留率最低为 19.21%; 先脉冲磁场处理再温度、超声、nisin 处理的杀菌效果比先温度、超声、nisin 处理后再脉冲磁场处理的杀菌效果要好, 这与扫描电镜的观察结果相吻合。协同杀菌后, 枯草芽孢杆菌的形态发生改变, 细胞产生萎缩现象, 脉冲磁场处理后再用 nisin 协同处理, 枯草芽孢杆菌的内容物出现泄漏。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 脉冲磁场; 温度; 超声; nisin 协同杀菌; 扫描电镜

文章编号: 1673-9078(2013)12-2970-2974

Inactivation of *Bacillus subtilis* by Pulsed Magnetic Field Combined with Temperature, Ultrasonic, and Nisin

QIAN Jing-ya^{1,2}, MA Hai-le^{1,2}, LI Shu-jun^{1,3}, LIU Bin³, ZHANG Chao⁴

(1. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China) (2. Key Lab of Agri-products Physics Processing, Zhenjiang 212013, China) (3. Chinese Academy of Agricultural Mechanization Sciences, Beijing 100083, China) (4. School of Jingjiang, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: The effect of pulsed magnetic field (PMF) with the intensity of 3T and 30 pulses combined with temperature (50~100 °C), ultrasonic (200 W, 5~30 min), and nisin (100~350 IU/mL) on the inactivation of *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) was investigated. The results showed that after pretreated by PMF, the survival rate decreased with the increase of the temperature, ultrasonic power and the nisin concentration, and the lowest survival rate (3.17%) was achieved when *B. subtilis* were treated by PMF followed by the temperature at 100 °C. The survival rate decreased with the the increase of treatment time by ultrasonic and the lowest survival rate of 8.18% was obtained when *B. subtilis* were treated by PMF followed by ultrasonic at the power of 200 W with working time of 5 s and the interval of 10 s for 30 min. Increase in concentration of nisin led to the reduce of survival rate of *B. subtilis*. The combined treatments of PMF followed by nisin at 350 IU/mL exhibited a lowest survival rate of 19.21%. The inactivation effect was better when *B. subtilis* were treated by PMF followed by temperature, ultrasonic, and nisin than treated by temperature, ultrasonic, and nisin followed by PMF, which was in agreement with the phenomenon observed by the SEM. The morphology of *B. subtilis* changed and the cells shrunk after the combined treatments. The release of cytoplasmic contents of *B. subtilis* occurred after the treatments of PMF followed by nisin.

Key words: *Bacillus subtilis*; pulsed magnetic field; temperature; ultrasonic; nisin; combined treatments; scanning electronic microscope

收稿日期: 2013-09-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31271966); 江苏省普通高校研究生科研创新计划 (CX10B-021X)

作者简介: 钱静亚 (1979-), 女, 博士, 助理研究员, 研究食品微生物

通讯作者: 马海乐 (1963-), 男, 博士, 教授, 主要研究食品物理学加工方法

微生物的污染容易引起食品的腐败变质, 由于传统的热力杀菌技术在杀死微生物的同时, 还会破坏食品的营养成分和天然特性。为了满足人们对高品质食品的要求, 非热杀菌方式成为新的研究方向^[1]。脉冲磁场杀菌 (Pulsed magnetic field) 是一种新型的非热杀菌技术, 杀菌条件温和, 既能保持食品的原有风味,

又有处理时间短、能耗低的优点,对热敏性液体食品如西瓜汁^[2]等具有一定的杀菌效果。但是,任何单一的杀菌技术或多或少都存在某方面的欠缺和不足,因此,利用两种或两种以上杀菌方法联合使用或与天然杀菌剂配合使用是今后杀菌技术的一个重要发展方向。协同杀菌不仅可以提高杀菌效果,降低生产成本,而且能促进非热加工技术的工业化应用。

枯草芽孢杆菌是食品发酵过程中常见的污染菌,虽然不是致病菌,但被枯草芽孢杆菌污染的食品也可能导致人类的食源性疾病。由于外壳坚固,细胞被破坏的难度大,因此,常被作为模式微生物,用于细菌对食品的污染研究中。超高压和中温^[3]、超高压和nisin^[4]、紫外线和乙醇^[5]等的协同作用均能有效的提高枯草芽孢杆菌的杀菌效果。但对于其他方式协同脉冲磁场杀灭枯草芽孢杆菌的研究国内外均未有报道。

超声波指频率大于20 kHz的声波,超声杀菌也是非热杀菌方式之一,微生物的形态和大小会影响超声杀菌的效果,其中,革兰氏阳性菌比革兰氏阴性菌对超声有更大的抵抗性^[6]。在协同杀菌方面,超声和温度^[7]、超声和压力^[8]以及超声和抗菌剂^[9]的联合使用已有报道。

Nisin是乳酸链球菌(*Lactococcus lactis*)某些菌株产生的一种小肽,对热稳定,亦称之为乳酸链球菌肽或乳酸链球菌素,食用后在消化道内被蛋白水解酶消化成氨基酸,不会产生抗性和过敏反应。它是世界卫生组织唯一承认的一种安全的可用于食品防腐的抗菌肽^[10]。nisin与非热加工技术的结合不仅能增强杀菌效应,同时还能保留食品的感官性质。

文章对温度、超声、nisin协同脉冲磁场杀灭枯草芽孢杆菌进行研究,为脉冲磁场杀菌的工业化应用等提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 材料

枯草芽孢杆菌 ATCC6633 购于中国工业微生物菌种保藏管理中心。

1.1.2 主要试剂

牛肉膏、蛋白胨、琼脂:生化试剂,购于国药集团化学试剂有限公司;Nisin:活力1200 IU/mg,购于中国科学院微生物研究所浙江银象生物工程有限公司;Nisin溶液的配制:0.2 g nisin溶解于100 mL 20 mmol/L的稀盐酸中,配制浓度为2 mg/mL的溶液,浸入100 °C沸水中4~4.5 min;溶液再放入冰箱中储存,

nisin溶液在冰箱中保存不超过6 d^[11]。

1.1.3 主要仪器

脉冲磁场设备(江苏大学自主研发);GA99-IIDC超声波细胞粉碎机,无锡市上佳生物科技有限公司;BS2202S型电子天平,北京赛多利斯仪器系统有限公司;YX400Z型电热蒸气压力消毒器,上海三申医疗器械有限公司;SPX-250型生化培养箱,常州国华电器有限公司;QYC-211型恒温培养摇床,上海福玛实验设备有限公司;TDL-5离心机,上海安亭科学仪器厂;JSM-7001F热场发射扫描电子显微镜,日本电子株式会社。

1.2 试验方法

1.2.1 菌液的配制

从冰箱中冷冻保存的试管斜面菌种中挑取少量菌体,无菌条件下,接种于盛有液体培养基的试管中,培养基成分:蛋白胨5 g,牛肉膏3 g,氯化钠5 g,30 °C培养10~12 h,得到枯草芽孢杆菌培养液。然后以3%的接种量接种于盛有液体培养基的三角瓶中,30 °C,160 r/min,培养24 h。无菌条件下,用0.9%的无菌生理盐水稀释到适当的菌液浓度(10⁷ CFU/mL),并在混匀器上混合均匀,装入无菌的5 mL离心管中,以备后面的杀菌实验。

1.2.2 杀菌条件

加热控制杀菌温度分别为:50 °C、60 °C、70 °C、80 °C、90 °C、100 °C,处理30 min。

超声功率200 W,工作时间5 s,间隙时间10 s,处理总时间分别为:5 min、10 min、15 min、20 min、25 min、30 min。

Nisin终浓度分别为:100 IU/mL,150 IU/mL,200 IU/mL,250 IU/mL,300 IU/mL,350 IU/mL。

脉冲磁场:磁场强度为3.0 T,脉冲数为30个。

以不经任何处理的枯草芽孢杆菌菌液为对照。

1.2.3 杀菌结果

枯草芽孢杆菌处理后立即进行菌落总数测定,以无菌生理盐水适当稀释对照及处理后的供试菌悬液,于营养琼脂培养基平板37 °C培养48 h后,进行菌落记数。杀菌结果采用残留率S(%)表示,

$$S = \frac{N}{N_0} \times 100\%$$

注:N:处理后的菌落数;N₀:处理前的菌落数。

1.2.4 电镜样本制作

将未处理和协同处理的菌液在3000 r/min转速下离心15 min进行收集,用无菌水清洗三次后加入2.5%戊二醛溶液固定,4 °C冰箱中过夜;把用戊二醛溶液固定的

菌液分别滴在载玻片上,依次用40%、60%、70%、80%、90%的乙醇溶液梯度脱水,每次15 min,最后在100%的乙醇溶液中脱水两次,每次20 min,处理完后进行真空干燥处理;SCD500离子溅射仪对样品镀膜;热场发射扫描电子显微镜观察拍照。

2 结果与讨论

2.1 温度协同脉冲磁场对枯草芽孢杆菌的杀菌效果的影响

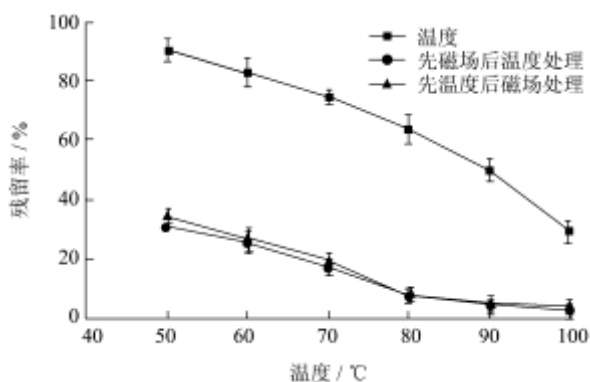


图1 温度协同脉冲磁场对枯草芽孢杆菌的杀菌效果的影响

Fig.1 The combined effect of pulsed magnetic field and temperature on the inactivation of *Bacillus subtilis*

在介质 pH 值为 7.0, 水分活度为 1.0, 枯草芽孢杆菌处于稳定生长期时,测得不同温度协同脉冲磁场杀菌的效果如图 1 所示。由图 1 可以看出枯草芽孢杆菌的残留率随着温度的增加而降低,100 °C 时,枯草芽孢杆菌残留率最小为 29.4%; 温度和磁场两种杀菌方式结合后比单独温度杀菌的效果要好很多; 先脉冲磁场杀菌后温度杀菌的效果比先温度后脉冲磁场杀菌效果要略好些,3T30 个脉冲的脉冲磁场杀菌后再采用 100 °C 杀菌, 枯草芽孢杆菌残留率最低为 3.17%。

2.2 超声协同脉冲磁场对枯草芽孢杆菌的杀菌效果的影响

采用功率为 200 W, 超声时间 5 s、间隙时间 10 s 的超声处理时,测得不同超声时间协同脉冲磁场杀菌的效果如图 2 所示。单独超声时,超声时间越长,枯草芽孢杆菌的残留率越低,超声时间在 10~25 min 时,随着时间增加枯草芽孢杆菌残留率大幅下降,在超声时间为 25~30 min 时,残留率下降趋于缓和,30 min 时,残留率最低为 11.82%; 超声和磁场两种杀菌方式结合后比单独超声杀菌的效果要好; 先脉冲磁场后超声处理的杀菌效果比先超声再脉冲磁场处理的杀菌效果略好

些,3T30 个脉冲的脉冲磁场处理后再使用 800 W 超声处理 30 min 后, 枯草芽孢杆菌的残留率最低为 8.18%。

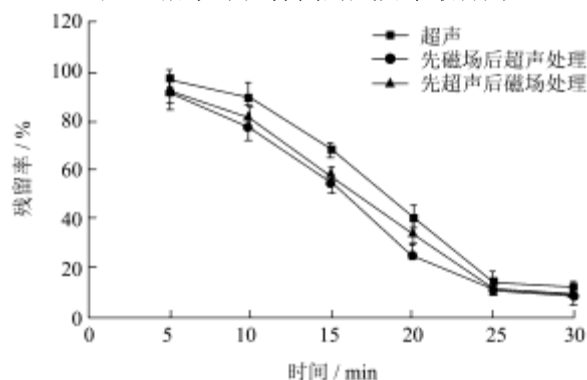


图2 超声协同脉冲磁场对枯草芽孢杆菌的杀菌效果的影响

Fig.2 The combined effect of pulsed magnetic field and ultrasound on the inactivation of *Bacillus subtilis*

2.3 Nisin 协同脉冲磁场对枯草芽孢杆菌的杀菌效果的影响

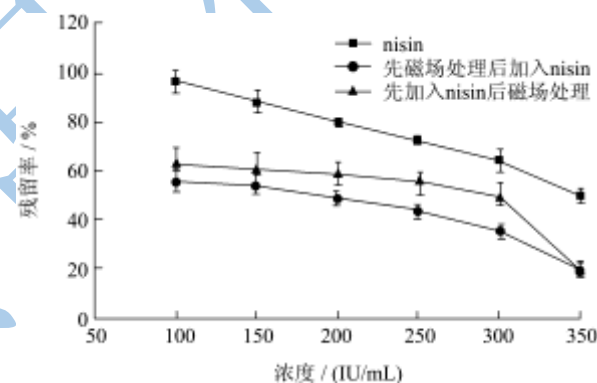


图3 Nisin 协同脉冲磁场对枯草芽孢杆菌的杀菌效果的影响

Fig.3 The combined effect of pulsed magnetic field and nisin on the inactivation of *Bacillus subtilis*

不同浓度 nisin 协同脉冲磁场杀菌的效果如图 3 所示。单独使用 nisin 时, nisin 浓度越高, 枯草芽孢杆菌的残留率越低, 在 350 IU/mL 时出现最低残留值为 49.87%; nisin 和脉冲磁场两种杀菌方式结合后比单独 nisin 杀菌的效果要好, nisin 浓度在 100~250 IU/mL 时, 随着 nisin 浓度增加枯草芽孢杆菌残留率下降幅度相对平缓, 浓度在 250~300 IU/mL 时, 随着 nisin 浓度增加枯草芽孢杆菌残留率下降明显; 先脉冲磁场杀菌后加入 nisin 的杀菌效果比先加入 nisin 再使用脉冲磁场杀菌的效果略好, nisin 终浓度为 350 IU/mL, 残留率最低为 19.21%。

2.4 温度、超声、nisin 协同脉冲磁场杀菌对枯草芽孢杆菌形态的影响



图4 未经处理的枯草芽孢杆菌形态 (×10000)

Fig.4 Morphology of *Bacillus subtilis* untreated by PMF

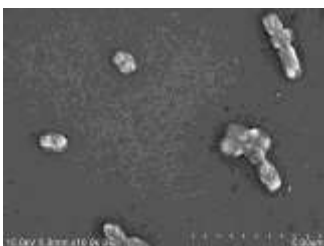


图5 脉冲磁场处理后的枯草芽孢杆菌 (×10000)

Fig.5 Morphology of *Bacillus subtilis* treated by PMF

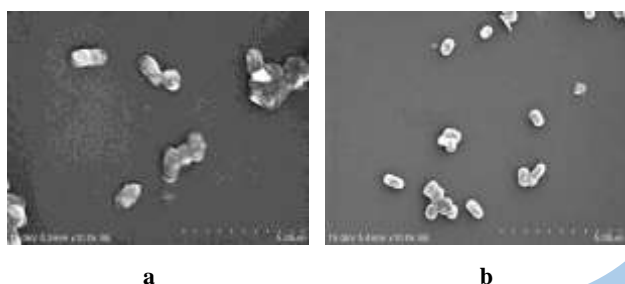


图6 温度协同脉冲磁场处理的枯草芽孢杆菌 (×10000)

Fig.6 Morphology of *Bacillus subtilis* treated by PMF combined with temperature

注: a: 先脉冲磁场后温度处理, b: 先温度后脉冲磁场处理。

未经处理的枯草芽孢杆菌的形态如图4所示, 细胞呈长杆状, 形态圆润, 饱满。单独脉冲磁场 (3.3T30个脉冲数) 作用后, 枯草芽孢杆菌轻微的变形, 细胞产生皱缩现象 (图5)。温度、超声、nisin协同脉冲磁场杀菌后, 枯草芽孢杆菌的形态发生变化, 细胞不再饱满, 呈现一定的萎缩现象。先经脉冲磁场处理后经温度、超声、nisin处理的细胞的变形程度比先经温度、超声、nisin处理后经脉冲磁场处理的更严重。先经脉冲磁场 (3.3T30个脉冲数) 处理后温度 (100 °C) 处理的枯草芽孢杆菌的细胞的萎缩现象比先经温度处理后脉冲磁场处理的更明显, 如图6所示; 先经脉冲磁场处理 (3.3T30个脉冲数) 后超声 (200 W, 工作5s间歇10s, 30 min) 处理的枯草芽孢杆菌的形态如图7 (a) 所示, 细胞变形, 部分细胞不再呈长杆状, 出现内凹现象; 先经超声处理后脉冲磁场处理的细胞的也有内凹现象, 但并不明显, 如图7 (b) 所示; 先经过脉冲磁场 (3.3T30个脉冲数) 处理后再加入nisin (350 IU/mL)

处理后, 枯草芽孢杆菌的表面出现破损现象, 如图8 (a) 所示, 部分细胞出现内容物的大量泄露, 这可能是细胞膜在nisin和脉冲磁场的作用下出现了严重穿孔现象, 而先加入nisin处理后脉冲磁场处理的细胞表面凹凸不平, 也有部分内容物的轻微泄露, 如图8 (b) 所示。

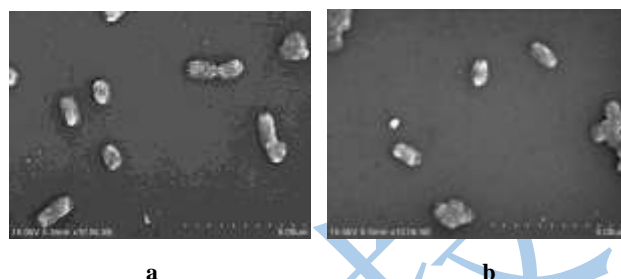


图7 超声协同脉冲磁场处理的枯草芽孢杆菌 (×10000)

Fig.7 Morphology of *Bacillus subtilis* treated by PMF combined with ultrasound

注: a: 先脉冲磁场后超声处理, b: 先超声后脉冲磁场处理。

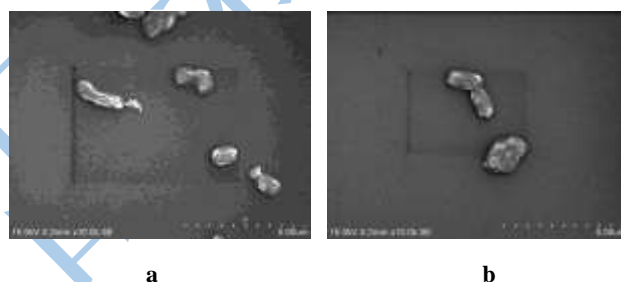


图8 nisin协同脉冲磁场处理的枯草芽孢杆菌 (×10000)

Fig.8 Morphology of *Bacillus subtilis* treated by PMF combined with nisin

注: a: 先脉冲磁场后nisin处理, b: 先nisin后脉冲磁场处理。

脉冲磁场引起的生物学效应主要发生在细胞膜上, 细胞膜的破坏和细胞不可逆的变形是细菌死亡的原因之一^[2]。超声能使细菌失活的原因在于其产生的空化作用及其引起的物理和化学效应^[12], 物理效应涉及到空化作用产生的强烈冲击波和剪切力, 这种力学效应已运用在破碎微生物的细胞膜和释放细胞内容物上^[13]; 化学效应是由于自由基的形成, 空化作用在液体中产生的高温和高压能够将水分解成为自由基, 自由基能够攻击细胞膜并造成内容物的泄露^[12]。膜穿孔理论在乳酸链球菌肽的杀菌机理上应用的最为广泛, 它认为乳酸链球菌肽使细胞膜穿孔, 破坏质子动力势和pH的平衡, 造成离子等内容物的泄露和ATP的水解, 最终导致细胞的死亡^[14]。扫描电镜的结果很好的吻合了这几种理论。协同杀菌能增强细胞的变形和细胞膜的破坏程度, 因此提高了枯草芽孢杆菌的杀菌率。先经脉冲磁场处理后经温度、超声、nisin处理的枯草芽孢

杆菌的杀菌效果比先经温度、超声、nisin处理后经脉冲磁场处理的杀菌效果更好的原因可能是磁场对细胞膜的破坏作用更强,因此更有利于温度、超声和nisin发挥作用。

3 结论

3.1 温度单独杀菌, 100 °C时枯草芽孢杆菌残留率最小为29.4%; 3T30个脉冲数的脉冲磁场杀菌后再采用100 °C杀菌, 枯草芽孢杆菌残留率最低为3.17%。

3.2 超声单独杀菌, 200 W超声处理30 min, 枯草芽孢杆菌残留率最小为11.82%; 3T30个脉冲数的脉冲磁场杀菌后再使用超声杀菌, 枯草芽孢杆菌的残留率最低为8.18%。

3.3 Nisin 单独杀菌, 350 IU/mL时出现最低残留值为49.87%; 3T30个脉冲数的脉冲磁场杀菌后加入终浓度为350 IU/mL的nisin, 枯草芽孢杆菌的残留率最低为19.21%。

3.4 协同杀菌的效果比单独杀菌的效果要显著, 且先用脉冲磁场处理再采用温度、超声、nisin处理的杀菌效果比先采用温度、超声、nisin处理后采用脉冲磁场处理的杀菌效果要略好些。

3.5 扫描电镜观察各个处理后的枯草芽孢杆菌形态后发现: 单独脉冲磁场处理的枯草芽孢杆菌细胞有轻微的皱缩现象; 先经脉冲磁场处理后温度处理的枯草芽孢杆菌, 细胞有收缩现象; 先经脉冲磁场处理后超声处理的枯草芽孢杆菌, 部分细胞出现内凹现象; 先经脉冲磁场处理再加入nisin处理, 枯草芽孢杆菌的部分细胞出现内容物的泄漏。先经脉冲磁场处理后经温度、超声、nisin处理的细胞的变形程度比先经温度、超声、nisin处理后经脉冲磁场处理的更严重。

参考文献

[1] Fernández A, Thompson A. The inactivation of *Salmonella* by cold atmospheric plasma treatment [J]. Food Research International, 2012, 45(2): 678-684

[2] 马海乐, 邓玉林, 储金宇. 西瓜汁的高强度脉冲磁场杀菌试验研究及杀菌机理分析[J]. 农业工程学报, 2003, 19(3): 163-166
MA Hai-le, DENG Yu-lin, CHU Jing-yu. Sterilization of watermelon juice with high voltage pulse magnetic field and its mechanism analysis [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2003, 19(3): 163-166

[3] Minh H N T, Dantigny P, Perrier-Cornet J M, et al. Germination and inactivation of *Bacillus subtilis* spores induced by moderate hydrostatic pressure [J]. Biotechnology

and Bioengineering, 2010, 107(5): 876-883

[4] Qi W M, Qian P, Yu J Y, et al. Combined Effect of High Hydrostatic Pressure and Nisin on Loss of Viability, Membrane Damage and Release of Intracellular Contents of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* [J]. International Journal of Food Engineering, 2010, 6(5): Article 3

[5] Cho W I, Cheigh C I, Chung M S, et al. The combined effect of UV irradiation and ethanol extract from *Torilis Japonica* fruit on inactivation of *Bacillus Subtilis* spores [J]. Journal of Food Safety, 2012, 32(4): 474-480

[6] Drakopoulou S, Terzakis S, Fountoulakis M S, et al. Ultrasound-induced inactivation of gram-negative and gram-positive bacteria in secondary treated municipal wastewater [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2009, 16(5): 629-634

[7] Butz P, Tauscher B. Emerging technologies: Chemical aspects [J]. Food Research International, 2002, 35(2-3): 279-284

[8] Chemat F, Zill-e-Huma, Khan M K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2011, 18(4): 813-835

[9] Antonio B, Milena S, Maria R C. Ultrasound and Antimicrobial Compounds: A Suitable Way to Control *Fusarium oxysporum* in Juices [J]. Food Bioprocess Technology, 2013, 6(5): 1153-1163

[10] Cao-Hoang L, Grégoire L, Chaine A, et al. Importance and efficiency of in-depth antimicrobial activity for the control of listeria development with nisin-incorporated sodium caseinate films [J]. Food Control, 2010, 21(9): 1227-1233

[11] Lee J, Kaletunç G. Inactivation of *Salmonella Enteritidis* strains by combination of high hydrostatic pressure and nisin [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 140(1): 49-56

[12] Koda S, Miyamoto M, Toma M, et al. Inactivation of *Escherichia coli* and *Streptococcus mutans* by ultrasound at 500 kHz [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2009, 16(5): 655-659

[13] Cameron M, McMaster L D, Britz T J. Electron microscopic analysis of dairy microbes inactivated by ultrasound [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2008, 15(6): 960-964

[14] De Arauz L J, Jozala A F, Mazzola P G, et al. Nisin biotechnological production and application: a review [J]. Trends in Food Science and Technology, 2009, 20(3-4): 146-154