

# 热结合乙醇对芽孢的杀灭效果及内膜通透性的影响

郭家俊, 申瑾, 陈翔, 陈乐, 尚彬玲, 章中\*

(宁夏大学 食品与葡萄酒学院, 宁夏 银川 750021)

**摘要:** 研究了热结合乙醇对芽孢杀灭效果及内膜通透性的影响。采用平板计数法、荧光偏振法、分光光度法和流式细胞术对热结合乙醇处理后枯草杆菌芽孢的存活率、内膜流动性、OD<sub>600</sub> 值及内膜通透性进行了研究。结果显示,热结合乙醇能够杀灭芽孢,80 °C 结合体积分数 75% 乙醇处理后,芽孢存活浓度下降约 1 个对数值。60、80 °C 结合 75% 乙醇处理后,芽孢悬浮液的荧光偏振度下降了 0.31,表明芽孢内膜流动性大幅增加。80 °C 结合 75% 乙醇处理后 OD<sub>600</sub> 值下降程度最大,芽孢内膜通透性发生显著变化,流式细胞术结果显示,阳性区域变化 93.69%。研究表明,热结合乙醇处理下,芽孢内膜通透性的改变是芽孢死亡的重要原因之一。

**关键词:** 热;芽孢;内膜;乙醇;杀灭

中图分类号:TS 201.3 文章编号:1673-1689(2021)10-0034-05 DOI:10.3969/j.issn.1673-1689.2021.10.005

## Effect of Heat Combined with Ethanol on Spore Killing and Permeability of Inner Membrane

GUO Jiajuan, SHEN Jin, CHEN Xiang, CHEN Le, SHANG Binling, ZHANG Zhong\*

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

**Abstract:** The effect of heat combined with ethanol on the spore killing efficacy and permeability of inner membrane was studied in this paper. The survival rate, inner membrane fluidity, OD<sub>600</sub> value and inner membrane permeability of *Bacillus subtilis* spores treated by heat combined with ethanol were studied by plate counting, fluorescence polarization, spectrophotometry and flow cytometry. The results showed that heat combined ethanol could kill the spores, and the survival concentration of spore decreased by about one logarithm at 80 °C combined with 75% ethanol. The fluorescence polarization degree of spore suspension decreased by 0.31 at 60 °C and 80 °C combined with 75% ethanol, indicating that the fluidity of spore inner membrane increased greatly. The OD<sub>600</sub> value decreased the most after 80 °C and 75% ethanol treatment, and the permeability of spore inner membrane changed significantly. The results of flow cytometry showed that the positive area changed 93.69%. The results showed that the change of endomembrane permeability was one of the important reasons of spore death.

**Keywords:** heat, spore, inner membrane, ethanol, eliminate

收稿日期: 2019-12-18

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,硕士研究生导师,主要从事非热加工技术方面的研究。E-mail:zhangzhong99@126.com

芽孢是某些细菌在不利于生长繁殖的条件下形成的休眠体,具有极端抗逆性。在食品杀菌过程中,芽孢是最难被杀灭的对象,由于杀菌强度不够,芽孢导致的食品腐败和食物中毒事件时有发生<sup>[1-4]</sup>。常温常压下芽孢内膜具有极端不通透性,水分子都难以自由通过,这种通透屏障是芽孢难以被杀灭的原因之一。研究表明,芽孢内膜受损,水分子穿透芽孢内膜屏障并进入芽孢内核是杀灭芽孢的重要原因之一<sup>[5-8]</sup>。水分子跨膜运输的主要方式为自由扩散,芽孢内膜对水分子的通透性与内膜流动性直接相关,因此研究芽孢内膜流动性十分重要<sup>[9]</sup>。

热能够提高磷脂分子的侧向热运动,改变细胞膜磷脂间氢键作用的强弱及膜磷脂的相态,宏观表现为芽孢内膜流动性的增强,因此热是影响芽孢内膜流动性的重要原因之一<sup>[10-11]</sup>。乙醇具有一定的杀菌效果,乙醇分子也会对芽孢内膜产生影响。将热与乙醇结合,预期能够提高杀灭芽孢的效果,在食品工业中具有一定的应用价值。

作者采用平板计数法、荧光偏振法、分光光度法和流式细胞术,通过对芽孢存活率、荧光偏振度、OD<sub>600</sub>值及芽孢内膜通透性的测定,研究了热结合乙醇对枯草杆菌芽孢内膜通透性和芽孢杀灭效果的影响。

## 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;DPH:上海阿拉丁生化科技股份有限公司;无水乙醇:分析纯,天津市天力化学试剂有限公司;碘化丙啶(PI):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;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:日立(日本)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 枯草杆菌芽孢菌悬液的制备** 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℃培养7d,洗涤离心3次后,菌悬液浓度大约调整在 $1.5 \times 10^9$  CFU/mL左右,4℃保存<sup>[12]</sup>。

**1.3.2 DPH的配制** 将DPH溶液的浓度配制为 $2 \times 10^{-3}$  mol/L(以四氢呋喃为溶剂),在4℃下棕色瓶中密闭保存,使用前用0.02 mol/L PBS缓冲液(pH 6.8)将储备液稀释至所需要的浓度<sup>[12]</sup>。

**1.3.3 DPH标记芽孢内膜** DPH标记芽孢内膜参照钱静亚<sup>[13]</sup>的方法并进行了优化。取8 mL芽孢悬浮液,离心,用PBS缓冲液洗涤1次后离心弃上清液,加入8 mL浓度为 $3 \times 10^{-6}$  mol/L的DPH溶液,在50℃下水浴30 min,再用PBS缓冲液洗涤2次,离心后将芽孢在PBS缓冲液中的浓度调整为 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  CFU/mL。

**1.3.4 热结合乙醇处理芽孢悬浮液** 取标记后的芽孢悬浮液,离心弃上清液,分别加入体积分数30%、75%的乙醇溶液,在60、80℃下处理20 min。

**1.3.5 芽孢悬浮液荧光偏振度的测定** 标记后的芽孢悬浮液在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,测定垂直荧光强度和水平荧光强度,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; $I_{VH}$ 为起偏器光轴为垂直方向和检偏器光轴为水平方向时测得的荧光强度; $G$ 为光栅校正因子; $I_{HV}$ 为起偏器光轴为水平方向和检偏器光轴为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。

**1.3.6 枯草芽孢杆菌的平板计数** 将处理前后的芽孢悬浮液梯度稀释,吸取1 mL稀释液加入平板中,再倒入15~20 mL培养基混匀,待凝固后在37℃下倒置培养24~48 h,计算菌落总数对数值。

**1.3.7 芽孢悬浮液OD<sub>600</sub>值的测定** 取处理后的枯草杆菌芽孢悬浮液,测定600 nm处的吸光值,根据

吸光值变化检验芽孢萌发情况。

**1.3.8 流式细胞仪检测枯草杆菌芽孢内膜通透性** 取处理前后的枯草杆菌芽孢悬浮液,将菌液浓度稀释到  $10^6\sim 10^7$  CFU/mL。用 PI(Propidium iodide, 碘化丙啶) 染色后,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<sup>[14]</sup>。数据采集后用 FSC Express Version 3.0 软件(De Novo software, Canada)分析。

**1.3.9 统计分析** 所有的实验重复 3 次,数据通过 SPSS 17.0 进行分析,采用 Origin 2018 软件作图,以不同字母标注显著差异( $P<0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 热结合乙醇处理对枯草杆菌芽孢的杀灭作用

如图 1 所示,与对照相比,80、60 °C 结合体积分数 30%乙醇处理后,芽孢存活率下降约 0.12 个对数。60 °C 结合 75%乙醇与 80 °C 结合 75%乙醇处理,都使芽孢存活率下降 0.23 个对数。可以看出,80 °C 结合 75%乙醇处理对芽孢有最好的杀灭效果,芽孢存活率下降了 1 个对数。热结合乙醇对芽孢有显著的杀灭效果。为解释这一实验结果,对热结合乙醇处理后芽孢悬浮液的荧光偏振度、 $OD_{600}$  值及芽孢内膜通透性进行研究。

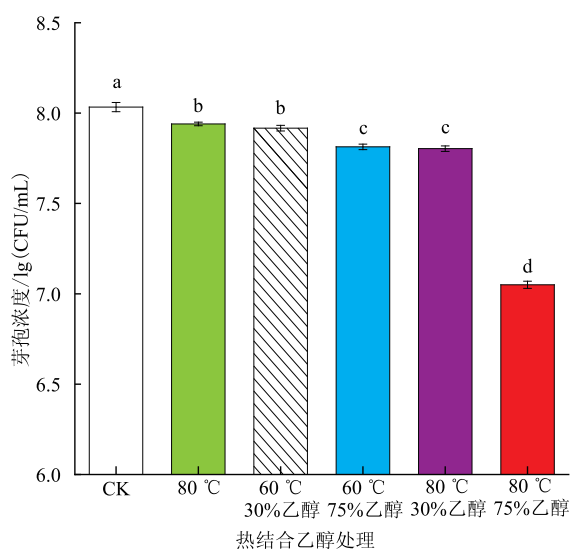


图 1 热结合乙醇处理后枯草杆菌芽孢存活浓度的变化  
Fig. 1 Change of survival concentration of *Bacillus subtilis* spores after heat treatment combined with ethanol

### 2.2 热结合乙醇处理对枯草杆菌芽孢悬浮液荧光偏振度的影响

DPH 是一种较为敏感的荧光探针,能够插入到磷脂双分子层中,在不同条件下,磷脂的活动的变化会导致荧光偏振度的改变,宏观表现为膜流动性的变化<sup>[15-17]</sup>。热结合乙醇处理后,芽孢悬浮液荧光偏振度见图 2。与对照相比,80、60 °C 结合体积分数 30%乙醇和 80 °C 结合 30%乙醇处理后,荧光偏振度显著下降,芽孢内膜流动性显著上升( $P<0.05$ ),但 3 种处理之间没有显著差异( $P>0.05$ )。60、80 °C 结合 75%乙醇处理后,芽孢悬浮液荧光偏振度下降更为显著。从结果可以看出,热结合乙醇处理时,乙醇体积分数对芽孢内膜流动性的改变至关重要。热能够提高磷脂分子的侧向热运动,改变膜脂的相态,宏观表现为芽孢内膜流动性的增强<sup>[9-10]</sup>,这在文献[14]的研究中也有过报道。磷脂的醇溶性质也会对芽孢内膜流动性产生重要影响,内膜流动性的增强使其通透性提高,水分子更易进入到芽孢内部,从而杀灭芽孢。

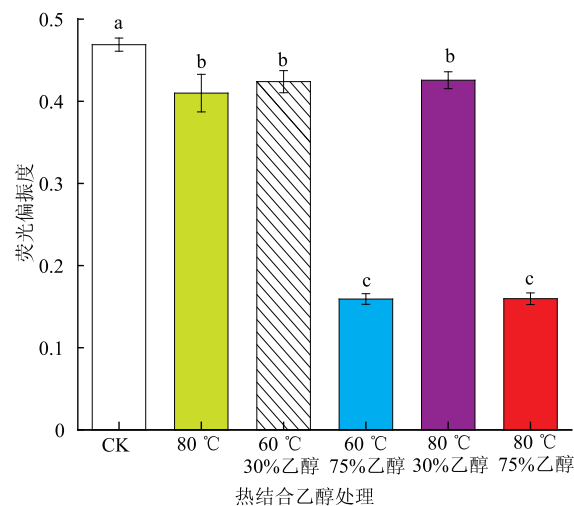


图 2 热结合乙醇处理对枯草杆菌芽孢悬浮液荧光偏振度的影响

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

### 2.3 热结合乙醇处理对枯草杆菌芽孢悬浮液 $OD_{600}$ 值的影响

芽孢内膜通透性的改变,会使芽孢内的物质更容易释放出来,芽孢悬浮液的  $OD_{600}$  值可以用来估计芽孢内容物的释放情况。当芽孢内容物释放后,

芽孢悬浮液的折光性会发生变化,OD<sub>600</sub>值降低<sup>[18-19]</sup>。热结合乙醇处理后,芽孢悬浮液 OD<sub>600</sub> 值变化见图3。80、60 °C结合 30%乙醇和 80 °C结合 30%乙醇处理后,芽孢悬浮液 OD<sub>600</sub> 值显著下降( $P<0.05$ ),但 3 种条件下的 OD<sub>600</sub> 值之间差异不明显( $P>0.05$ )。热结合 75%乙醇处理后的 OD<sub>600</sub> 值显著低于热结合 30%乙醇处理 ( $P<0.05$ ),80 °C结合 75%乙醇处理后的 OD<sub>600</sub> 值下降最多。热结合乙醇处理下,温度越高、乙醇体积分数越高,芽孢内膜通透性变化越大,OD<sub>600</sub> 值下降程度越大,内容物释放程度越高。

### 2.4 热结合乙醇处理后枯草杆菌芽孢内膜通透性的变化

进一步采用流式细胞术对芽孢内膜通透性进行研究。PI 可以透过受损细胞膜与内部 DNA 结合后发出强烈红色荧光。将热结合乙醇处理后的芽孢用 PI 进行染色,流式细胞仪检测后的结果见图 4。与对照相比,80 °C处理后芽孢内膜通透性发生了改变,阳性区域变化为 34.78%;60 °C结合 30%、75%乙醇处理后,阳性区域变化分别为 68.50%和 78.73%;80 °C结合 30%、75%乙醇处理后,阳性区域

变化为 71.44%和 93.69%。热结合乙醇处理后,芽孢内膜通透性显著提高,80 °C结合 75%乙醇处理后,芽孢内膜通透性变化最大,表明热结合乙醇处理的过程中,温度及乙醇体积分数越高,芽孢内膜通透性越强。

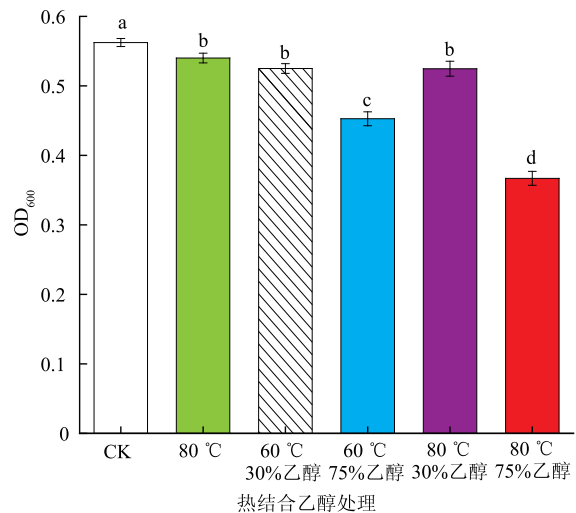


图 3 热结合乙醇处理对枯草杆菌芽孢悬浮液 OD<sub>600</sub> 值的影响  
Fig. 3 Effect of heat treatment combined with ethanol on OD<sub>600</sub> value of suspension of *Bacillus subtilis* spores

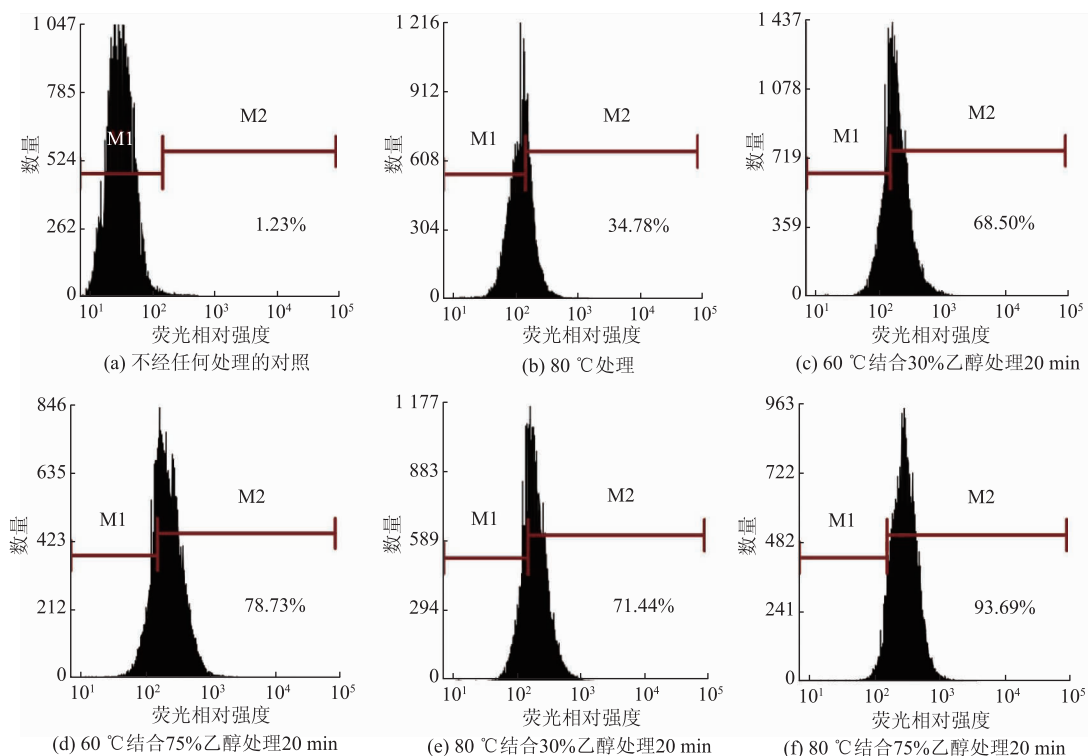


图 4 热结合乙醇处理对枯草杆菌芽孢内膜通透性的影响

Fig. 4 Effect of heat treatment combined with ethanol on the permeability of spore inner membrane

热结合乙醇处理后,芽孢内膜流动性、芽孢悬浮液 OD<sub>600</sub> 值及芽孢流式细胞仪检测结果是一致的,均表明热结合乙醇处理条件下芽孢死亡和芽孢内膜通透性的变化相关。

### 3 结 语

热结合高体积分数乙醇处理能够对芽孢产生杀灭效果,在食品工业中具有一定的应用价值。80℃结合 75%乙醇处理后,芽孢存活率下降了约 1 个对数值。热结合乙醇能够使芽孢内膜流动性增强,

60、80℃结合 75%乙醇处理使芽孢内膜流动性大幅增加。热结合乙醇处理后,芽孢悬浮液 OD<sub>600</sub> 值都呈现下降趋势,说明芽孢内膜通透性提高,芽孢内容物更容易释放出来,80℃结合 75%乙醇处理后,OD<sub>600</sub> 值下降程度最大。流式细胞术结果显示,80℃结合 75%乙醇处理后,芽孢内膜通透性变化最大,阳性区域变化为 93.69%。结果表明,热结合乙醇处理对芽孢的杀灭效果与芽孢内膜通透性的变化密切相关,芽孢内膜通透性的增大是芽孢死亡的重要原因之一。

### 参 考 文 献:

- [1] 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.
- [2] VOUNDI S, NYEGUE M, BOUGNOM B, et al. The problem of spore-forming bacteria in food preservation and tentative solutions[M]. New Jersey: John Wiley & Sons Inc, 2017.
- [3] 于勇,毛明,王为民. 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] FLINT S, GONZAGA Z J, GOOD J, et al. *Bacillus thermoamylovorans*—a new threat to the dairy industry—a review[J]. **International Dairy Journal**,2017,65:38-43.
- [5] 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**,2006,69:1056-1060.
- [6] SEVENICH R, REINEKE K, HECHT P, et al. Impact of different water activities (aw) adjusted by solutes on high pressure high temperature inactivation of *Bacillus amyloliquefaciens* spores[J]. **Frontiers in Microbiology**,2015,6:1-11.
- [7] 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**,2012,160:99-104.
- [8] DONG W, GREEN J, KORZA G, et al. Killing of spores of *Bacillus* species by cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)[J]. **Journal of Applied Microbiology**,2019,126(5):1391-1401.
- [9] INOKUCHI T, ARAIN. Relationship between water permeation and flip-flop motion in a bilayer membrane[J]. **Physical Chemistry Chemical Physics**,2018,20(44):28155-18161.
- [10] E.西姆. 生物学研究概说——膜生物化学[M]. 北京:科学出版社,1985.
- [11] FARKAS J, ANDRÁSSY É, SIMON A, et al. Effects of pasteurizing levels of high hydrostatic pressure on *Bacillus subtilis* luxAB spores[J]. **Acta Alimentaria – ACTA ALIMENT**,2003,32(4):373-381.
- [12] 章中,孙静,张津瑜. 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;407(15):96-101.
- [13] 钱静亚,马海乐,李树君. 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.
- [14] BEN AMOR K, BREEUWER P, VERBAARSCHOT P, 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.
- [15] VOSS D, MONTVILLE T. 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(1):101-103.
- [16] TREVORS J T. Fluorescent probes for bacterial cytoplasmic research[J]. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**,2003,57(2):87-103.
- [17] GHARIB R, FOURMENTIN S, CHARCOSSET C, et al. Effect of hydroxypropyl-β-cyclodextrin on lipid membrane fluidity, stability and freeze-drying of liposomes[J]. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**,2018,44:101-107.
- [18] WUYTACK E Y E, SOONS J J, POSCHET F F, et al. Comparative study of pressure and nutrient-induced germination of *Bacillus subtilis* spores[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,2000,66(1):257-261.
- [19] MINH H, 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.