朱改丽, 刘燚畅, 田鹏, 等. 热物理场中复合抗菌肽对枯草芽孢杆菌芽孢的杀灭作用 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(10): 195−204. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025040376

ZHU Gaili, LIU Yichang, TIAN Peng, et al. Inactivation of *Bacillus subtilis* Spores by Compound Antimicrobial Peptides in Thermal Physical Field[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(10): 195−204. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025040376

· 生物工程 ·

热物理场中复合抗菌肽对枯草芽孢杆菌芽孢的杀灭作用

朱改丽, 刘燚畅, 田　鹏, 张浩杰, 章　中*

（宁夏大学食品科学与工程学院, 宁夏银川 750000）

摘　要: 细菌芽孢是食品中常见微生物，因其具有极端抗性而难以彻底被杀灭。本文旨在探究热物理场中（80、90 ℃）尼生素（Nisin）和 *ε*-聚赖氨酸（*ε*-polylysine，*ε*-PL）复配使用对枯草芽孢杆菌芽孢的协同杀灭效果及其机制，为食品防腐保鲜提供更有效的方法。以 $OD_{600\ nm}$、$OD_{260\ nm}$、$OD_{280\ nm}$ 的变化表征芽孢内容物的释放及内膜损伤情况。利用扫描电镜观察芽孢形态结构的变化，采用傅里叶变换红外光谱法分析芽孢内膜脂质相态、蛋白质二级结构及核酸骨架的变化，测定 Na^+/K^+-ATP 酶活力以评估代谢状态。结果表明：90 ℃ 热处理下，添加 0.5 g/L Nisin、0.25 g/L *ε*-PL 处理后，分别可杀灭 1.59 lg CFU/mL 和 1.22 lg CFU/mL 的芽孢，而 0.5 g/L Nisin 复配 0.25 g/L *ε*-PL 使用后可杀灭 4.28 lg CFU/mL 的芽孢。经上述复配处理后，扫描电镜显示芽孢聚集现象显著加剧。2,6-吡啶二羧酸（2,6-dipicolinic acid，DPA）泄漏率高达 76.03%，表明内膜严重受损。傅里叶变换红外光谱表明：芽孢内膜脂质相态由凝胶态转变为液晶态，核酸骨架被破坏，蛋白质二级结构含量发生显著改变（$P<0.05$），*α*-螺旋和 *β*-折叠含量减少，而 *β*-转角及无规卷曲含量分别增加至 43.81% 和 35.37%。此外，Na^+/K^+-ATP 酶活力显著下降至最低值 6.53 μmol/h/mg（$P<0.05$），芽孢能量代谢受到严重抑制。Nisin 和 *ε*-PL 协同杀灭芽孢的机制主要在于：Nisin 破坏芽孢内膜结构，内膜受损会导致芽孢核心水化，DPA 等关键物质泄漏，*ε*-PL 则通过受损的内膜进入芽孢核心，破坏 DNA 结构，最终导致芽孢死亡。

关键词: 热处理, 尼生素, *ε*-聚赖氨酸, 芽孢, 杀菌

中图分类号: TS201.3　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)10−0195−10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025040376

本文网刊:

Inactivation of *Bacillus subtilis* Spores by Compound Antimicrobial Peptides in Thermal Physical Field

ZHU Gaili, LIU Yichang, TIAN Peng, ZHANG Haojie, ZHANG Zhong*

（College of Food Science and Engineering, Ningxia University, Yinchuan 750000, China）

Abstract: Bacterial spores are common microbes in foods. They are difficult to be inactivated because of their extreme resistances. The synergistic inactivation effects and mechanism of Nisin combined with *ε*-polylysine treatment on *Bacillus subtilis* spores in thermal physical field (80, 90 ℃) were studied, and a more effective method for food preservation was provided. The changes of $OD_{600\ nm}$, $OD_{260\ nm}$, $OD_{280\ nm}$ values were used for characterizing the inner membrane damage and intracellular components release. Scanning electron microscope (SEM) was used for observing the changes in spore morphology and structure. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy was used for analyzing the changes in lipids phase of spore inner membrane, the secondary structure of spore proteins, and nucleic acid backbone. The activity of Na^+/K^+-ATPase was determined to evaluate spore's metabolic condition. The results are as follows: Under 90 ℃ treatment, 1.59 lg CFU/mL or 1.22 lg CFU/mL *Bacillus subtilis* spores were inactivated respectively with addition of 0.5 g/L Nisin or

收稿日期: 2025−04−30

基金项目: 国家自然科学基金（32260633, 31760474）。

作者简介: 朱改丽（2000−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 新型食品杀菌抑菌技术, E-mail: 15101862921@126.com。

*** 通信作者:** 章中（1977−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 新型食品杀菌抑菌技术、果蔬贮藏与加工技术, E-mail: zhangzhong99@126.com。

0.25 g/L ε-polylysine, while 4.28 lg CFU/mL spores were inactivated with combined usage of 0.5 g/L Nisin and 0.25 g/L ε-polylysine. After the combined treatment, SEM images indicated that the aggregation of spores significantly intensified. The 2,6-dipicolinic acid (DPA) release raised up to 76.03%, indicating serious inner membrane damage. FTIR spectroscopy indicated that the lipids in the spore inner membrane changed from a gel state to a liquid crystal state, nucleic acid backbone was damaged, and the content of secondary structures in proteins changed (P<0.05), the α-helix and β-folding content decreased, while the β-turn and random coil content increased respectively to 43.81% and 35.37%. In addition, the activity of Na^+/K^+-ATPase significantly decreased to lowest value 6.53 μmol/h/mg (P<0.05), and the energy metabolism of spores was severely inhibited. The main mechanism of synergistic spore inactivation by Nisin and ε-polylysine was as follows: Nisin destroyed the inner membrane structure of spores, which resulted in core hydration and release of key components such as DPA. ε-Polylysine penetrated the damaged inner membrane, entered the spore core, destroyed DNA structure, and finally caused spore inactivation.

Key words: thermal treatment; Nisin; ε-polylysine; spore; sterilization

芽孢是细菌的休眠态, 普遍存在于水、土壤、空气和变质食物中, 对多种物理(热处理、超高压、辐照等)和化学杀菌技术具有极强的抗逆性, 成为食品工业中较难杀灭的微生物之一[1]。芽孢的萌发生长会引起食品腐败变质或食源性疾病, 例如嗜热杆菌及其芽孢可使乳制品和罐头食品变质, 肉毒芽孢杆菌可在食物中生长并产生致命毒素[2−3]。芽孢的抗逆性与其独特的结构密切相关, 芽孢一般有七层结构, 从内到外依次为核心、内膜、细胞壁、皮层、外膜、芽孢衣、芽孢外壁。芽孢核心含有 DNA、RNA、酶及以螯合形式存在的 DPA。内膜是一道强大的渗透屏障, 在芽孢抵御多种化学物质时发挥着重要作用, 特别是抵御能够破坏芽孢 DNA 的化学物质[4]; 细胞壁与皮层主要由肽聚糖构成, 芽孢衣则是阻碍大分子杀菌物质进入芽孢内部的第一道防线, 而芽孢外壁主要由蛋白质构成, 同时还含有少量的脂质和碳水化合物[5]。

近年来, 食品工业中芽孢灭活技术的研究取得了显著进展。目前使用最广泛的芽孢灭活方法仍是热处理, 但长时间高温加热会对食品的营养和感官品质产生严重负面影响。因此, 联合其他杀菌措施以降低杀菌温度、减少对食品品质的损伤成为研究热点。尼生素(Nisin)是一种由乳酸乳球菌产生的对热稳定的天然抗菌肽, 属于 I 类成孔细菌素。Nisin 具有独特的抗细菌成孔活性, 其活性在脂质 II 存在时会增强[6]。研究表明, Nisin 可抑制多种革兰氏阳性菌(G^+菌)的生长, 包括其芽孢的生长, 同时抑制某些毒素的形成[7−8]。PAN 等[9] 研究发现, 仅 HPCD(8 MPa, 65 ℃)处理 120 min 后, 枯草芽孢杆菌芽孢的灭活率为 79.04%, 而添加 0.35 g/kg Nisin 处理 90 min 后, 芽孢灭活率为 97.82%。ε-聚赖氨酸(ε-PL)也是一种天然抗菌剂, 由白色链霉菌产生, 进入人体后可被分解为赖氨酸, 而赖氨酸是人体必需的八种氨基酸之一[10]。据报道, ε-PL 对蜡样芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌等食源性细菌有良好的抑制作用[11−13]。BI 等[14] 研究发现, 90 ℃ 结合 1 g/L ε-PL 处理 60 min 后, 枯草芽孢杆菌芽孢存活浓度下降了 2.18 lg CFU/mL; 陈乐[15] 研究发现, 200 MPa-75 ℃ 可杀灭 1.52 lg CFU/mL 枯草芽孢杆菌芽孢, 而进一步添加 0.3% ε-PL 处理后可将枯草芽孢杆菌芽孢的杀灭量提高至 2.11 lg CFU/mL。

然而, 尽管 Nisin 或 ε-PL 均能增强热处理对芽孢的杀灭效果, 但其增效幅度有限, 因此本研究提出以下假设: 热物理场中 Nisin 和 ε-PL 复合使用将对枯草芽孢杆菌芽孢产生协同杀灭作用。为验证该假设, 本研究采用平板计数法评估杀菌效果, 并通过检测芽孢紫外吸收物质泄漏量、DPA 泄漏率、Na^+/K^+-ATPase 活力以及芽孢内膜脂质、蛋白质、核酸等生物大分子结构变化, 深入探讨其灭活机理。本研究旨在为食品工业中芽孢的高效灭活提供新的技术思路, 降低杀菌温度, 减少对食品品质的损伤, 同时为天然抗菌剂在食品杀菌中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* spore) 编号 As 1.433, 中国普通微生物菌种保藏管理中心; 营养琼脂 河南九邦生物科技有限公司; 硫酸锰(分析纯) 山东诚泰化工有限公司; 胰酪胨大豆酵母浸膏琼脂培养基(Trypticase soy yeast extract agar, TSA-YE) 深圳逗点生物技术有限公司; 尼生素(Nisin)(纯度 900 IU/mg) 河北创之源生物科技有限公司; ε-聚赖氨酸(ε-PL)(纯度 95%) 山东西亚化学有限公司; 溴化钾(KBr) 光谱纯, 西安天茂宝鼎生物科技有限公司; 2,6-吡啶二羧酸(DPA) 上海源叶生物科技有限公司; 实验所用水均为无菌蒸馏水。

LS-100HD 型立式高压蒸汽灭菌锅 山东德莱赛工业科技有限公司; DRK-150 型生化培养箱 山东德瑞克分析仪器有限公司; LHH-6 型电热恒温水浴锅 常州金坛良友仪器有限公司; SH-6600 型紫外可见分光光度计 江苏盛奥华环保有限公司; TY-16M 型台式高速冷冻离心机 山东天妍仪器有限公司; HD-LG10 型真空冷冻干燥机 山东环美分析仪器有限公司; SU8700 型扫描电子显微镜 深圳市谱塞斯科技有限公司; RMR-2208L 型酶标仪 南京炯创科技有限公司; LJ-FTIR920 型傅里叶变换红外光谱仪 山东蓝景电子科技有限公司; CX-40 型相差

显微镜　宁波舜宇光学科技有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　枯草芽孢杆菌芽孢悬浮液的制备　枯草芽孢杆菌芽孢的培养及菌悬液的制备参考 BI 等[16] 的方法并略作修改。在无菌条件下将至少活化三代以上的枯草芽孢杆菌划线接种至含锰盐的营养琼脂培养基斜面（硫酸锰：0.1538 g/L），于 37 ℃ 下恒温培养 7 d，使用相差显微镜镜检观察到芽孢形成率≥99% 后，用无菌蒸馏水浸透培养基表面并进行洗涤，收集悬浮液至离心管，在 4 ℃、9000 r/min 离心 15 min 后弃上清液和含有细胞碎片的沉淀物顶层，收集底部芽孢，重复 3 次。将纯化的芽孢重悬于无菌蒸馏水中并调节菌悬液浓度约为 1.5×10^9 CFU/mL，于 4 ℃ 下保存，一个月内使用。使用前用无菌水调节菌悬液浓度约至 1.5×10^8 CFU/mL。

1.2.2　热协同 ε-PL 和 Nisin 处理枯草芽孢杆菌芽孢样品制备参考毕可[17] 的方法并加以修改。将 50 mL 芽孢悬浮液加入无菌离心管中，在 4 ℃、9000 r/min 离心 15 min 后弃去上清液。加入配制好的等体积 Nisin 溶液（0.5 g/L）、ε-PL 溶液（0.25 g/L）或 Nisin-ε-PL 复合物（0.25 g/L Nisin-0.125 g/L ε-PL 或 0.5 g/L Nisin-0.25 g/L ε-PL）重悬，使芽孢悬浮液终体积为 50 mL。充分振荡使其混合均匀后，将制备好的样品转移至无菌聚乙烯塑封袋中，密封后分别于置于 80、90 ℃ 水浴锅中热处理 30 min。处理完毕后立即将样品放入冰水中冷却，并进行各项指标的测定。未经处理的芽孢悬浮液记为 CK 组，样品组分别为：80 ℃-0.25g/L Nisin-0.125g/L ε-PL、80 ℃-0.5g/L Nisin-0.25g/L ε-PL、90 ℃、90 ℃-0.25g/L ε-PL、90 ℃-0.5g/L Nisin、90 ℃-0.25g/L Nisin-0.125g/L ε-PL、90 ℃-0.5g/L Nisin-0.25g/L ε-PL。

1.2.3　枯草芽孢杆菌芽孢菌落平板计数　将处理前后的枯草芽孢杆菌芽孢悬浮液进行梯度稀释，取 1 mL 稀释后的样品注入培养皿中，并加入 15~20 mL 的 TSA-YE 培养基，待平板冷却凝固后，倒置于 37 ℃ 恒温培养箱培养 36~48 h 后计数，每组设置三个平行。菌落计数参照 GB 4789.2-2022 菌落总数测定法进行，结果以对数值表示，并按照以下公式计算芽孢的存活率：

$$存活率(\%)=\frac{N}{N_0}\times100 \qquad 式（1）$$

式中：N_0 为芽孢的初始存活浓度，lg CFU/mL，N 为处理后芽孢的存活浓度，lg CFU/mL。

1.2.4　芽孢悬浮液 $OD_{600\ nm}$ 的测定　取 5 mL 处理前后的样品，充分摇匀，于紫外可见分光光度计 600 nm 处测定吸光值。

1.2.5　相差显微镜观察芽孢核心水化情况　将不同处理前后的芽孢悬浮液用无菌磷酸盐缓冲液梯度稀释至适宜浓度（10^6~10^7CFU/mL），以保证单个芽孢在视野中分布均匀且不重叠。取 10 μL 稀释后的样品滴加于洁净载玻片中央，覆盖 20 mm×20 mm、厚 0.15 mm 的盖玻片轻压排除气泡并避免液体溢出。将制备好的样品置于相差显微镜载物台，遵循由低倍（10×）至高倍（40×）再至油镜（100×）的顺序逐级聚焦，以定位芽孢富集且形态清晰的视野。最后在总放大倍数为 1000×的油镜视野下选择合适视野并使用 HAYEAR 成像软件采集图像[18]。

1.2.6　芽孢紫外吸收物质泄露量的测定　取 5 mL 处理前后的样品，在 4 ℃、9000 r/min 离心 15 min 后收集上清液，用紫外可见分光光度计分别测定 260、280 nm 处的吸光值。

1.2.7　DPA 泄漏率的测定　芽孢内 DPA 泄漏量的测定参考李青桓等[19] 的方法并加以修改。DPA 标准曲线的绘制：分别配制 10、20、40、60、80、120、160、180、200 μg/mL 的 DPA 标准溶液，并加入 1 mL DPA 显色剂（100 mL 1 mol/mL 乙酸钠溶液，1 g 硫酸亚铁铵，1 g 抗坏血酸，pH5.5），混合均匀后避光孵育 90 min，于 440 nm 下测定混合液吸光度并绘制标准曲线。标曲回归方程为 y=0.0013x+0.0437，相关系数 R^2=0.997。

对芽孢悬浮液进行 121 ℃、30 min 热处理后，以其 DPA 的泄漏量为阳性对照。将各处理前后的芽孢悬浮液于 4 ℃、9000 r/min 离心 15 min 后取上清液。将 4 mL 上清液与 1 mL DPA 显色剂振荡混匀后，暗处孵育 90 min，于 440 nm 下测定吸光度，按照标准曲线计算 DPA 泄漏量。DPA 的泄漏率计算公式如下：

$$DPA泄漏率(\%)=\frac{F_b-F_a}{F_0-F_a}\times100 \qquad 式（2）$$

式中，F_a：未处理芽孢样品上清液中 DPA 含量，F_b：处理后芽孢 DPA 的泄漏量，F_0：121 ℃ 处理 30 min 后芽孢 DPA 的泄漏量。

1.2.8　扫描电镜观察处理前后芽孢的形态变化　扫描电镜制样方法参考 LIU 等[20] 的方法并加以修改。将不同处理前后的芽孢悬浮液于 4 ℃、9000 r/min 离心 15 min 后弃上清液。用生理盐水洗涤 2 次，在 2.5% 戊二醛中固定 4 h 后用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液（pH7.0）洗涤 3 次。随后用乙醇 30%、50%、70%、90%、100% 连续脱水 20 min，收集菌泥真空冷冻干燥 8 h 后使用扫描电子显微镜观察芽孢形态。取少量冻干菌粉，用牙签将其均匀分散于导电胶表面[21]。将黏附菌体的导电胶固定于扫描电子显微镜载物台，置于离子溅射仪中进行喷金处理（电流 5 mA，时间 60 s）。镀金完成后，立即将样品转移至扫描电镜腔室，在加速电压 10 kV、工作距离约 8.5 mm 的条件下，利用二次电子探测器（SE2）于 10000×放大倍数下逐步聚焦，并调节亮度与对比度。通过多次调整视野选取代表性区域，最终采集并保存高分辨率图像。

1.2.9 芽孢傅里叶变换红外光谱分析 傅里叶变换红外光谱可用于分析处理前后芽孢内膜蛋白质结构及脂质相态的变化。将不同处理前后的芽孢样品真空冷冻干燥 8 h,并将溴化钾(光谱级)烘干后密封保存。取 1 mg 的冻干菌粉和 200 mg 的 KBr 于玛瑙研钵中研磨成粉末,使用压片机压制成薄片[22]。选择纯 KBr 作为背景,在 4000~500 cm^{-1} 的范围内进行扫描,以 4 cm^{-1} 的分辨率扫描 64 次,并使用 OMNIC、Peak fit、Origin 2025 软件对光谱数据进行采集和分析。

1.2.10 芽孢内膜 Na^+/K^+-ATPase 活力的测定 Na^+/K^+-ATPase 活性的测定参考 PEI 等[23] 的方法并加以修改,取处理前后芽孢悬浮液 10 mL,在 4 ℃、9000 r/min 离心 15 min 后弃上清液,按照 Na^+/K^+-ATP 酶活力检测试剂盒中的说明书依次添加不同试剂,反应结束后使用酶标仪采集 660 nm 下吸光值,以μmol/h/mL 表示 ATP 酶活力。

1.3 数据处理

所有实验至少重复 3 次,使用 IBM SPSS 20.0 软件对数据进行方差分析(ANOVA),并运用 Duncan法进行多重比较和显著性检验(P<0.05),用 Origin 2025 软件进行作图,图中不同小写字母表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 热结合 Nisin、ε-PL 处理对枯草芽孢杆菌芽孢的灭活效果

图 1 为热处理结合 Nisin、ε-PL 及其复合物对枯草芽孢杆菌芽孢的灭活效果,芽孢的初始存活浓度约为 8.26 lg CFU/mL。单独使用 Nisin 或 ε-PL 处理均不能杀灭芽孢;经 90 ℃ 处理 30 min 后,芽孢存活浓度仅下降了 0.42 lg CFU/mL,存活率为 38.02%;相同温度条件下添加0.5 g/L Nisin 或 0.25 g/L ε-PL 处理后,则分别可以杀灭1.59 lg CFU/mL、1.22 lg CFU/mL 芽孢,对应存活率分别为 2.57%、6.03%。

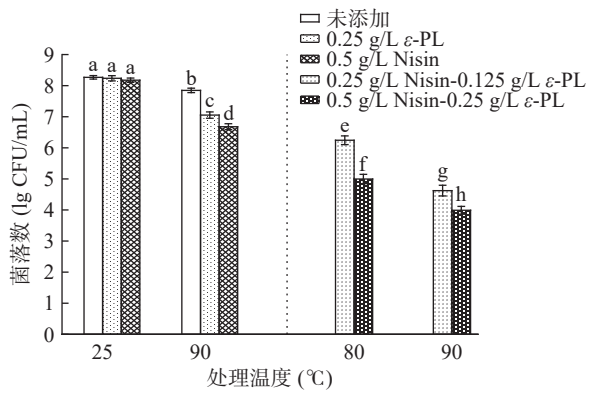


图 1 热结合复合抗菌肽对枯草芽孢杆菌芽孢的灭活效果

Fig.1 Inactivation effects of heat combined with compound antimicrobial peptides treatment on *Bacillus subtilis* spores

注:图中不同小写字母表示差异显著(P<0.05),图 2、图 4~图 6、图 11 同。

然而,当二者以复合物形式共同作用时,杀灭效果随温度及浓度升高而显著增强(P<0.05):添加 0.25 g/L Nisin-0.125 g/L ε-PL 复合物处理后,80、90 ℃ 条件下分别可杀灭 2.03 lg CFU/mL、3.65 lg CFU/mL,存活率分别下降至 0.93%、0.022%;增大浓度至 0.5 g/L Nisin-0.25 g/L ε-PL 后,80 ℃、90 ℃ 分别杀灭 3.27 lg CFU/mL、4.28 lg CFU/mL,存活率进一步降至 0.054%、0.005%。与热结合单一抗菌肽处理相比,添加 Nisin-ε-PL 复合物处理后可显著(P<0.05)降低芽孢的存活浓度,且杀灭效果与温度及复合物浓度呈正相关,并有利于降低芽孢的杀灭温度。上述研究结果验证了前言中所提出的假设:热物理场中 Nisin 和 ε-PL 复合使用将对枯草芽孢杆菌芽孢产生协同杀灭作用。该结论与陈乐等[24] 报道一致,其研究表明仅 80 ℃ 或 Nisin 单独处理均不能有效杀灭芽孢,而 80 ℃ 结合 500 mg/L Nisin 处理 20 min 可使芽孢存活浓度下降约 1.4 lg CFU/mL。为深入探究 Nisin-ε-PL 复合物对枯草芽孢杆菌芽孢的协同杀菌机制,本研究进一步测定了芽孢悬浮液 $OD_{600\ nm}$ 及紫外吸收物质泄漏量,并结合扫描电子显微镜观察分析芽孢形态结构变化,从而揭示芽孢的杀灭机制。

2.2 热结合 Nisin、ε-PL 处理对枯草芽孢杆菌芽孢 $OD_{600\ nm}$ 的影响

Nisin、ε-PL 均可作用于芽孢内膜,使内膜通透性发生改变,导致芽孢核心水化。芽孢悬浮液在 600 nm 处的吸光度($OD_{600\ nm}$)反映了芽孢核心水化程度,可表征内膜对水分子的通透性变化,芽孢核心水化程度与其杀菌抗性呈负相关[25]。图 2 为不同温度结合 Nisin、ε-PL 及其复合物处理前后枯草芽孢杆菌芽孢悬浮液 $OD_{600\ nm}$ 的变化情况。

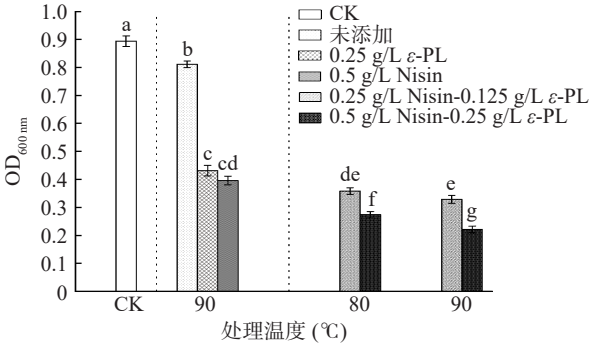


图 2 热结合复合抗菌肽对枯草芽孢杆菌芽孢 $OD_{600\ nm}$ 的影响

Fig.2 Effects of heat combined with compound antimicrobial peptides treatment on the OD_{600} value of *Bacillus subtilis* spores

90 ℃ 分别结合 Nisin、ε-PL 处理后,芽孢悬浮液 $OD_{600\ nm}$ 分别下降至 0.40 和 0.43;80 ℃ 结合 0.25 g/L Nisin-0.125 g/L ε-PL、0.5 g/L Nisin-0.25 g/L ε-PL 复合物处理 30 min 后,$OD_{600\ nm}$ 分别下降至 0.358 和 0.274;90 ℃ 结合 0.5 g/L Nisin-0.25 g/L ε-PL 复合物处理后 $OD_{600\ nm}$ 降到最低值 0.222。Nisin

能够与芽孢的内膜相互作用，嵌入内膜并形成跨膜孔道，从而破坏内膜的完整性，ε-PL 则进一步加剧这种破坏，使得水分子更易于进入芽孢的核心区域，导致核心水化[26−27]。随着核心水化程度的增加，芽孢对杀菌处理的抗性逐渐降低，最终引发芽孢的死亡。实验表明芽孢核心水化的变化情况与杀菌效果是一致的。为了更直观地检测芽孢核心水化的情况，采用了相差显微镜对各处理前后的芽孢样品进行了观察，结果如图 3 所示。

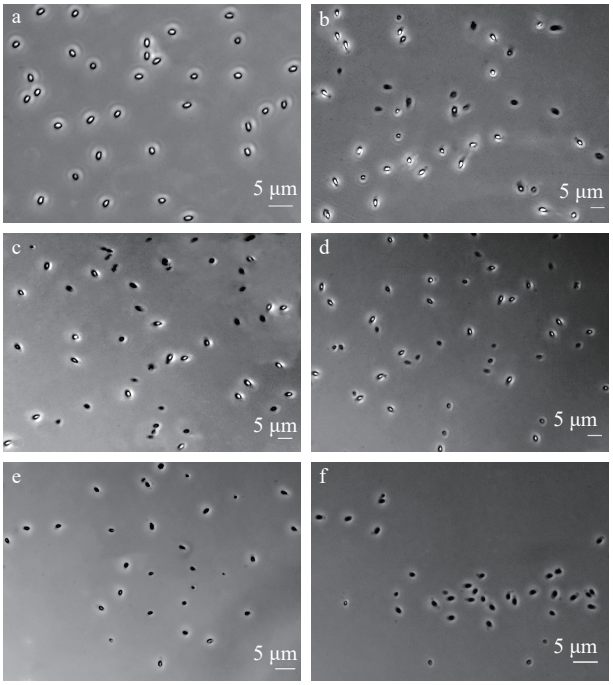


图 3　热结合复合抗菌肽处理后枯草芽孢杆菌芽孢的相差显微镜图像

Fig.3　Phase contrast microscopy images of *Bacillus subtilis* spores after heat combined with compound antimicrobial peptides treatment

注：a. CK; b. 90 ℃; c. 90 ℃-0.25g/L ε-PL; d. 90 ℃-0.5g/L Nisin; e. 90 ℃-0.25g/L Nisin-0.125g/L ε-PL; f. 90 ℃-0.5g/L Nisin-0.25g/L ε-PL。

图 3 为热结合复合抗菌肽处理后枯草芽孢杆菌芽孢的相差显微镜图像。在相差显微镜下，核心未水化的芽孢对光的折射性能较强而呈现为亮点，核心水化的芽孢折射性能降低而呈现为暗点[22]。如图 3a 所示，未处理组芽孢均呈现为亮点，90 ℃ 热处理后，少部分芽孢转变为暗点（图 3b）。90 ℃ 分别结合 ε-PL、Nisin 处理后，更多的芽孢转变为暗点（图 3c、图 3d）。随着 Nisin-ε-PL 复合物的添加，几乎所有的芽孢都转变为暗点（图 3e、图 3f），这表明抗菌肽复合物的添加有利于破坏芽孢内膜结构，使芽孢核心水化程度增加，提高芽孢杀灭效果。为了更深入地探究芽孢内膜的受损情况，本研究进一步针对芽孢紫外吸收物质的泄漏量进行检测分析。

2.3　热结合 Nisin、ε-PL 处理对枯草芽孢杆菌芽孢紫外吸收物质泄漏量的影响

紫外吸收物质泄漏量可反映芽孢内膜对生物大分子的通透性变化情况，核酸和蛋白质的紫外吸收峰分别位于 260 nm 和 280 nm[28]。图 4 和图 5 分别为热结合 Nisin、ε-PL 及其复合物处理前后芽孢样品 $OD_{260\ nm}$ 和 $OD_{280\ nm}$ 的变化情况。

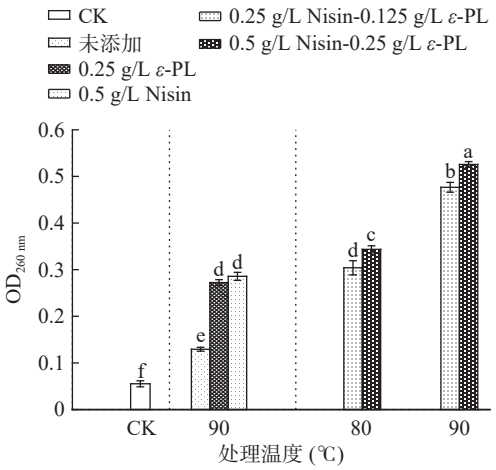


图 4　热结合复合抗菌肽处理对枯草芽孢杆菌芽孢 $OD_{260\ nm}$ 的影响

Fig.4　Effects of heat combined with compound antimicrobial peptides treatment on the OD_{260} value of *Bacillus subtilis* spores

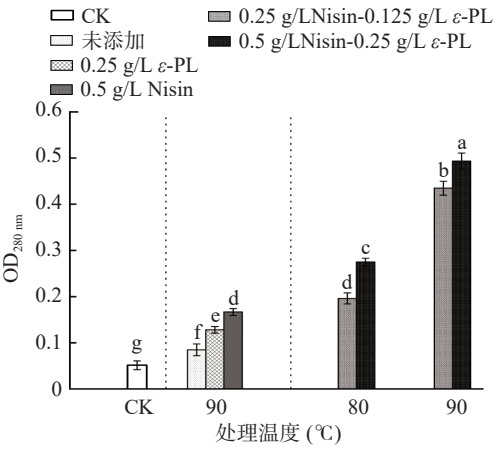


图 5　热结合复合抗菌肽处理对枯草芽孢杆菌芽孢 $OD_{280\ nm}$ 的影响

Fig.5　Effects of heat combined with compound antimicrobial peptides treatment on the $OD_{280\ nm}$ of *Bacillus subtilis* spores

未处理的枯草芽孢杆菌芽孢样品的 $OD_{260\ nm}$ 为 0.055。经 90 ℃ 加热 30 min 后，$OD_{260\ nm}$ 增加了 0.085；80 ℃ 结合 0.25g/L Nisin-0.125 g/L ε-PL 或 0.5 g/L Nisin-0.25 g/L ε-PL 复合物处理后，$OD_{260\ nm}$ 分别增加了 0.25、0.29；90 ℃ 结合 0.25 g/L Nisin-0.125 g/L ε-PL 复合物处理后，$OD_{260\ nm}$ 增加了 0.425，而结合 0.5 g/L Nisin-0.25 g/L ε-PL 复合物处理后，$OD_{260\ nm}$ 达到最大值 0.53。表明 Nisin-ε-PL 复合物可显著增加芽孢内核酸的泄漏量（$P<0.05$），且与 Nisin-ε-PL 复合物浓度及温度相关。

图 5 为热结合 Nisin、ε-PL 及其复合物处理后对枯草芽孢杆菌芽孢样品蛋白质泄漏量的影响，未处理的枯草芽孢杆菌芽孢 $OD_{280\ nm}$ 为 0.051。与 90 ℃ 结合 ε-PL 处理相比，90 ℃ 结合 Nisin 处理后 $OD_{280\ nm}$

更大，表明 Nisin 对枯草芽孢杆菌芽孢蛋白泄漏作用更显著。90 ℃ 结合 0.5 g/L Nisin-0.25 g/L ε-PL 或 0.25 g/L Nisin-0.125 g/L ε-PL 复合物处理后，芽孢悬浮液 $OD_{280\ nm}$ 分别增加了 0.442 和 0.384，这表明热结合 Nisin-ε-PL 复合物处理对枯草芽孢杆菌芽孢的蛋白泄漏具有协同作用。随着温度和 Nisin-ε-PL 复合物浓度的提高，蛋白质泄漏量不断增大，并且蛋白质泄漏量的变化趋势与杀菌效果及核心水化的变化趋势是一致的。Nisin 和 ε-PL 均可作用于芽孢内膜。其中，Nisin 能够渗透膜结构，破坏膜的完整性，诱导胞内物质泄漏；ε-PL 则通过与带负电的细胞壁及细胞膜组分发生静电相互作用，诱导膜去极化，导致细胞膜损伤及胞内物质泄露[29−30]。两者复合作用时，对芽孢内膜的破坏更为严重，进一步加剧芽孢内核酸与蛋白质的泄漏，从而加速芽孢死亡。上述结果表明，Nisin 与 ε-PL 均能损伤芽孢结构的完整性，其复合处理具有协同作用。

2.4 热结合 Nisin、ε-PL 处理对枯草芽孢杆菌芽孢 DPA 释放的影响

DPA 是芽孢内特有的物质，可与金属离子螯合形成稳定的 Ca^{2+}-DPA 络合物，维持芽孢核心的低水分含量，而芽孢内膜损伤会导致 DPA 泄漏，进而引起芽孢核心水化，降低芽孢的杀灭抗性[21]。

未经处理的枯草芽孢杆菌芽孢结构完整，无 DPA 泄漏。单独 90 ℃ 热处理 30 min 后芽孢 DPA 泄漏量较少，然而，当添加 Nisin、ε-PL 处理后可导致大量 DPA 泄漏，且随着抗菌肽浓度的增加 DPA 泄漏量显著增加（$P<0.05$）。如图 6 所示，90 ℃ 处理后 DPA 泄漏率仅为 10.6%，添加 0.5 g/L Nisin 或 0.25 g/L ε-PL处理后，DPA 泄漏率分别增加至 54.88%、43.17%；90 ℃ 结合 0.25 g/L Nisin-0.125 g/L ε-PL 或 0.5 g/L Nisin-0.25 g/L ε-PL 处理 30 min 后，枯草芽孢杆菌芽孢的 DPA 泄漏率分别增加至 71.5% 和 76.03%，这一结果与紫外吸收物质泄漏趋势相吻合，表明内膜屏障的完整性已遭受不可逆破坏。DPA 位于芽孢的核心区域，其泄漏进一步证实了热物理场下 Nisin 和 ε-PL 能够破坏芽孢内膜的结构，导致芽孢内部关键物质被释放，核心水化程度加剧最终促使芽孢死亡[31]。为进一步检测芽孢结构的损伤情况，使用扫描电镜对芽孢形态进行了观察和分析。

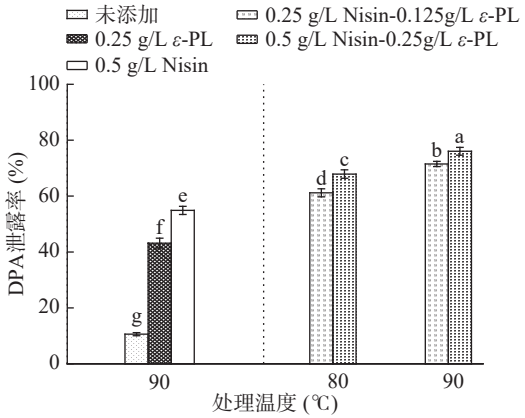


图 6 热结合复合抗菌肽处理对枯草芽孢杆菌芽孢 DPA 泄漏率的影响

Fig.6 Effects of heat combined with compound antimicrobial peptide treatment on the DPA leakage rate of *Bacillus subtilis* spores

2.5 热结合 Nisin、ε-PL 处理对枯草芽孢杆菌芽孢形态的影响

芽孢的形态结构变化可反映热结合抗菌肽处理下芽孢的受损情况，扫描电镜能够直观地呈现处理前后芽孢形态结构的变化。图 7 为不同处理条件下枯草芽孢杆菌芽孢的扫描电镜结果。

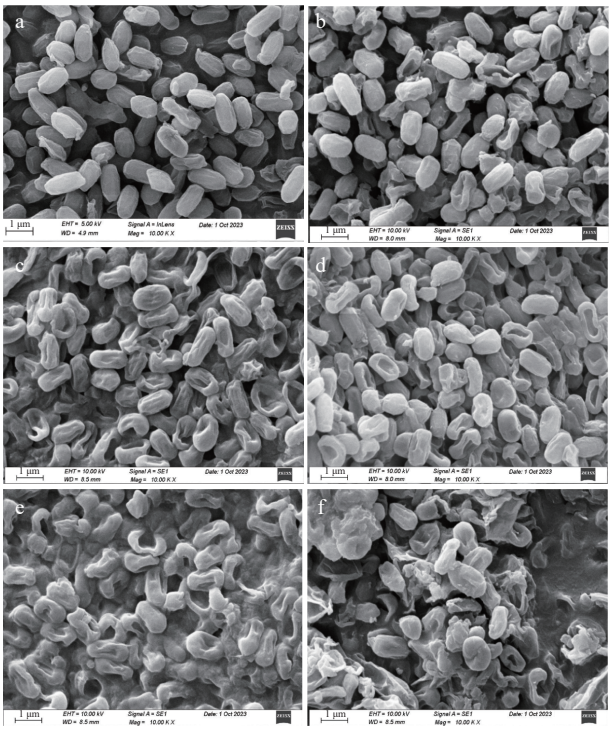


图 7 热结合复合抗菌肽处理后枯草芽孢杆菌芽孢形态变化（1 μm）

Fig.7 Morphological changes of *Bacillus subtilis* spores after heat combined with compound antimicrobial peptides treatment (1 μm)

注：a. CK；b. 90 ℃；c. 90 ℃-0.25 g/L ε-PL；d. 90 ℃-0.5 g/L Nisin；e. 90 ℃-0.25 g/L Nisin-0.125 g/L ε-PL；f. 90 ℃-0.5 g/L Nisin-0.25 g/L ε-PL。

从上述图扫描电镜结果可见，未处理的枯草芽孢杆菌芽孢表面光滑，形态结构完整，整体呈椭圆状。经 90 ℃ 热处理后，芽孢表面开始出现褶皱、凹陷等形态变化。经 90 ℃ 结合 0.5 g/L Nisin 或 0.25 g/L ε-PL 处理后，芽孢表面凹陷更严重，少量芽孢出现破损，而 90 ℃ 结合 0.5 g/L Nisin-0.25 g/L ε-PL 复合物处理后，芽孢凹陷数量最多，破损程度最深，芽孢衣、细胞壁等结构遭到破坏，并伴有明显的聚集和粘连现象，这表明添加 Nisin-ε-PL 复合物能有效提高热处理对芽孢形态结构的破坏。据报道，Nisin 通过其 N 端的两个硫氨酸环与脂质 II 结合，从而中断肽聚

糖的合成过程，抑制细胞壁形成，同时破坏细胞膜的结构[32]。而 ε-PL 的作用靶点亦为内膜，进一步加剧了内膜的通透性变化[33]。此外，已有研究表明，热处理可以改变芽孢衣蛋白质网络的结构，破坏其屏障功能，从而使 Nisin 和 ε-PL 能够穿透受损芽孢衣，作用于芽孢的内部结构和物质，最终使芽孢失活[34]。刘蔚等[35]的研究也报道了 ε-PL 可使枯草芽孢杆菌芽孢细胞壁受损，进而破坏芽孢结构的完整性。综上所述，热处理联合 Nisin 和 ε-PL 复合物能有效破坏枯草芽孢杆菌芽孢的完整结构，且破损程度与抗菌肽复合物浓度相关。

2.6　热结合 Nisin、ε-PL 处理前后枯草芽孢杆菌芽孢的 FTIR 分析

芽孢内膜损伤机制可能与内膜脂质分子的结构改变有关。为进一步从分子水平研究热结合复合抗菌肽处理对芽孢内膜的破坏作用，并分析其对芽孢关键生物大分子的影响，采用了傅里叶变换红外光谱仪对芽孢样品进行了检测分析。FTIR 光谱技术能够有效检测处理前后芽孢内生物大分子的结构变化，特别是内膜脂质、核酸及蛋白质等关键物质的结构改变[36]。通过分析特征化学基团对应的特征吸收峰位置及峰强度的变化，可揭示热结合复合抗菌肽处理对芽孢关键物质的影响。

2.6.1　处理前后枯草芽孢杆菌芽孢样品的 FTIR

图 8 显示了经热联合抗菌肽（Nisin-ε-PL 复合物）处理后枯草芽孢杆菌芽孢的傅里叶变换红外光谱（FTIR）原谱图。由图 8 可见，经过不同处理后芽孢样品的 FTIR 光谱图峰形、峰强度及峰位置发生变化，以下选取了 3000~2800 cm^{-1}、1700~1600 cm^{-1}、1300~900 cm^{-1} 三个特征波段进行分析，分别用于研究热结合抗菌肽处理后枯草芽孢杆菌芽孢内膜脂质、蛋白质及核酸的变化情况。

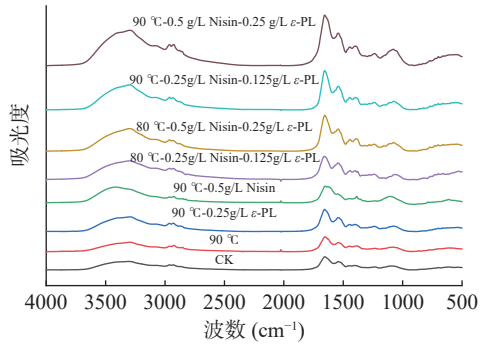


图 8　热结合复合抗菌肽处理后枯草芽孢杆菌芽孢的 FTIR 光谱图（4000~500 cm^{-1}）

Fig.8　FTIR spectra of *Bacillus subtilis* spores after heat combined with compound antimicrobial peptides treatment (4000~500 cm^{-1})

2.6.2　热结合 Nisin、ε-PL 处理对内膜磷脂分子的影响

图 9 为不同处理后枯草芽孢杆菌芽孢在 3000~2800 cm^{-1} 范围内 FTIR 光谱图，表征了芽孢内膜脂质的变化。2872 和 2962 cm^{-1} 处的吸收峰分别对应酰基链-CH_3 的对称和反对称伸缩振动，而 2854 和 2927 cm^{-1} 处的吸收峰则分别表示-CH_2 的对称和反对称伸缩振动[37]。-CH_3 和-CH_2 基团振动的变化通常与生物膜中脂质分子的堆积变化有关，而-CH_2 基团振动峰向更高波数位移与膜流动性的增加有关[38]。由图 9 可知，与未处理的枯草芽孢杆菌芽孢相比，经过热处理后，芽孢在 2927、2872 cm^{-1} 处的吸收峰发生轻微位移，而添加 Nisin、ε-PL 处理后，吸收峰增强，位移更明显。其中，90 ℃ 结合 0.5 g/L Nisin 处理后，芽孢在 2854 cm^{-1} 处的吸收峰蓝移 4 cm^{-1}。添加 Nisin-ε-PL 复合物处理后，随着温度的升高，吸收峰峰强明显增大。80 ℃ 结合 0.5 g/L Nisin-0.25 g/L ε-PL 复合物处理 30 min 后，芽孢在 2927、2872 cm^{-1} 处的吸收峰分别蓝移 5、4 cm^{-1}，而温度升高至 90 ℃ 后，2927、2872 cm^{-1} 处的吸收峰分别蓝移 7、5 cm^{-1}，且所有吸收峰的强度均有所增强，表明抗菌肽复合物的添加使枯草芽孢杆菌芽孢内膜进一步受到损伤，内膜磷脂分子结构被破坏，导致次甲基链发生了更密集的堆积，官能团分子间氢键作用减弱，脂肪酰基链构象发生紊乱，膜磷脂相态由凝胶态转变为液晶态[39]。吸收峰强度的变化是由于化学键振动过程中偶极矩的变化，而偶极矩变化的增大则导致分子结构更加不稳定[40]。Nisin 通过与细胞壁的中间体物质-脂质Ⅱ结合形成大分子后，破坏内膜结构；ε-PL 则通过静电作用与内膜磷脂基团结合，插入磷脂双层后破坏疏水尾链的有序排列，进而改变脂质相态，增加内膜流动性及通透性，最终实现杀菌目的[41]。

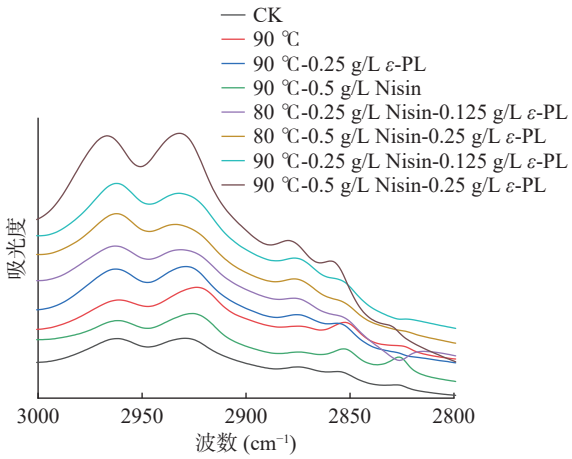


图 9　热结合复合抗菌肽处理后枯草芽孢杆菌芽孢的 FTIR 光谱图（3000~2800 cm^{-1}）

Fig.9　FTIR spectra of *Bacillus subtilis* spores after heat combined with compound antimicrobial peptides treatment (3000~2800 cm^{-1})

2.6.3　热结合 Nisin、ε-PL 处理对核酸和肽聚糖大分子的影响

图 10 为热结合 Nisin、ε-PL 及其复合物处理后在 1300~900 cm^{-1} 波段枯草芽孢杆菌芽孢的红外光谱图，主要表征了芽孢核酸主链和肽聚糖层结构的变化。其中，1232 cm^{-1} 处的吸收峰为磷酸二

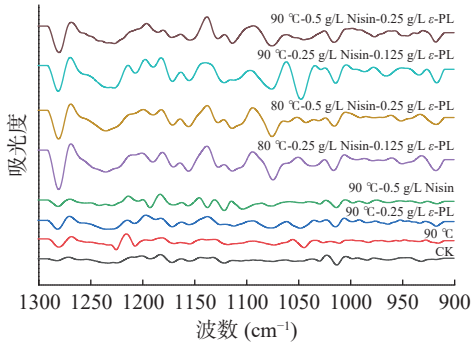


图 10 热结合复合抗菌肽处理后枯草芽孢杆菌芽孢的二阶导数 FTIR 光谱图(1300~900 cm^{-1})

Fig.10 Second-order derivative FTIR spectra of *Bacillus subtilis* spores after heat combined with compound antimicrobial peptides treatment (1300~900 cm^{-1})

酯键中 P=O 的伸缩振动, 而 1072 cm^{-1} 处的吸收峰为肽聚糖 C-O-C 对称伸缩振动, 这些峰的变化反映了核酸骨架和肽聚糖层的结构改变[42]。为深入分析核酸和肽聚糖的结构变化, 对 1300~900 cm^{-1} 波段的FTIR光谱数据进行了二阶导数处理。

经过热结合抗菌肽处理后, 在 1300~900 cm^{-1} 波段的 FTIR 光谱的吸收峰强度和位置发生明显变化。与未处理组相比, 仅 90 ℃ 处理后, 1232 和 1072 cm^{-1} 处吸收峰位置和强度均未出现明显变化, 添加 Nisin 或 ε-PL 处理后, 在 1232 和 1072 cm^{-1} 处的吸收峰强度增大, 发生轻微位移; 80 ℃ 结合 0.5 g/L Nisin-0.25 g/L ε-PL 复合抗菌肽处理后, 在 1232 和 1072 cm^{-1} 处的吸收峰分别蓝移 4、5 cm^{-1}, 温度升高至 90 ℃ 后, 分别蓝移 5、6 cm^{-1}, 表明热结合复合抗菌肽处理加剧了芽孢内核酸的变性, 核酸骨架被破坏, 肽聚糖层结构的稳定性也降低。芽孢皮层和细胞壁主要由肽聚糖构成, 肽聚糖结构的稳定性对芽孢的耐热性起着关键作用[43], 当肽聚糖结构的稳定性受到破坏时, 芽孢对杀菌处理的抗性会显著降低, 从而使芽孢更容易被杀灭。Nisin 可导致芽孢内膜损伤, 促进 ε-PL 进入芽孢核心, 破坏 DNA结构, 进一步导致 DNA 吸收峰强度和位置发生改变[44]。BI 等[14] 研究发现, 热联合 ε-PL 处理下枯草芽孢杆菌芽孢内膜也可被破坏, ε-PL 进入芽孢核心导致 DNA 变性, 这与本文研究结果是一致的。

2.6.4 热结合 Nisin、ε-PL 处理对芽孢蛋白质二级结构的影响 傅里叶红外光谱在 1700~1600 cm^{-1} 波段的吸收峰主要表征蛋白质酰胺 I 带的变化, 通过对酰胺 I 带进行曲线拟合分析可以得到蛋白质二级结构含量的变化[45]。

蛋白质结构的稳定性决定了其生理功能, 表 1 为热结合抗菌肽处理后枯草芽孢杆菌芽孢蛋白质二级结构含量的变化。由表可知, 经过不同条件处理后, 枯草芽孢杆菌芽孢蛋白质二级结构发生显著变化(P<0.05), 且二级结构含量的变化与复合物浓度增加或温度升高的趋势一致, 具体表现为 α-螺旋、β-折叠含量减少, 而 β-转角及无规则卷曲含量增多。如与未处理组相比, 经过 90 ℃ 热处理之后, α-螺旋、β-折叠含量下降至 23.93%、27.12%, β-转角和无规卷曲含量分别增加至 32.58%、18.61%。分别添加 Nisin 或 ε-PL处理后, β-转角含量分别进一步增加至 38.36%、35.29%, 无规卷曲含量分别进一步增加至 22.24%、20.61%。80 ℃ 结合 0.25g/L Nisin-0.125 g/L ε-PL 复合物处理后, β-转角及无规则卷曲的含量分别增加至 41.44%、28.23%, 而升高温度至 90 ℃ 后, 二者含量进一步增加至 43.50%、34.15%, 表明热结合复合抗菌肽处理导致蛋白质二级结构伸展, 从有序态向无序态转变, 蛋白质的稳定性降低, 进而影响其功能[46]。芽孢衣的主要成分为蛋白质, 当其二级结构向无序态转变时, 芽孢衣蛋白质网络结构会变得松散, 其通透屏障功能受损, 导致 Nisin 和 ε-PL 能穿过受损芽孢衣而进入核心区域, 作用于芽孢内部的靶标[40]。

2.7 热结合 Nisin、ε-PL 处理对芽孢细胞膜 Na^+/K^+-ATP 酶活力的影响

前文的实验结果已表明热结合复合抗菌肽会破坏芽孢内膜, Na^+/K^+-ATP 酶作为一种关键的细胞膜酶, 其活性可能也会受到内膜损伤的影响, 该酶主要负责钠离子和钾离子的跨膜转运, 并在维持细胞膜的

表 1 热结合抗菌肽处理对枯草芽孢杆菌芽孢蛋白质二级结构的影响

Table 1 Effects of heat combined with compound antimicrobial peptides treatment on the secondary structure of *Bacillus subtilis* spore's proteins

处理组	二级结构(%)			
	α-螺旋	β-折叠	β-转角	无规卷曲
CK	26.24±0.02^{a}	28.49±0.01^{a}	31.05±0.02^{h}	15.45±0.01^{h}
90 ℃	23.93±0.02^{b}	27.12±0.04^{b}	32.58±0.04^{g}	18.61±0.06^{g}
90 ℃-0.25g/L ε-PL	20.64±0.05^{c}	25.86±0.06^{c}	35.29±0.05^{f}	20.61±0.06^{f}
90 ℃-0.5g/L Nisin	18.49±0.07^{d}	22.57±0.04^{d}	38.36±0.05^{e}	22.24±0.05^{e}
80 ℃-0.25g/L Nisin-0.125g/L ε-PL	16.27±0.03^{e}	15.12±0.01^{e}	41.44±0.01^{d}	28.23±0.02^{d}
80 ℃-0.5g/L Nisin-0.25g/L ε-PL	14.51±0.02^{f}	12.85±0.04^{f}	41.72±0.01^{c}	33.25±0.02^{c}
90 ℃-0.25g/L Nisin-0.125g/L ε-PL	13.34±0.05^{g}	10.47±0.02^{g}	43.50±0.05^{b}	34.15±0.04^{b}
90 ℃-0.5g/L Nisin-0.25g/L ε-PL	12.48±0.06^{h}	10.12±0.02^{h}	43.81±0.06^{a}	35.37±0.05^{a}

注: 同列不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。

生理功能上起着至关重要的作用[47]。

如图 11 所示，未经处理芽孢的 Na^+/K^+-ATP 酶活力为14.18 μmol/h/mg。随着处理温度和抗菌肽浓度的升高，Na^+/K^+-ATP 酶活力显著（$P<0.05$）下降，这可能是与内膜受损有关[17]。90 ℃ 结合 Nisin 或 ε-PL 处理 30 min后，Na^+/K^+-ATP 酶活力分别下降了 2.3、1.75 μmol/h/mg。80 ℃ 结合 0.25 g/L Nisin-0.125 g/L ε-PL 或 0.5 g/LNisin-0.25 g/L ε-PL 复合抗菌肽处理后，Na^+/K^+-ATP 酶活力分别下降了 3.93、5.58 μmol/h/mg；90 ℃结合 0.5 g/L Nisin-0.25 g/L ε-PL 复合抗菌肽处理后，Na^+/K^+-ATP 酶活力降到最低值 6.53 μmol/h/mg，表明复合抗菌肽进一步破坏了内膜上的 Na^+/K^+-ATP酶活力，ATP 无法合成，进而导致芽孢能量代谢受阻，这与前述实验中复合抗菌肽能协同破坏芽孢内膜的结果一致。毕可[17] 研究发现：热结合 ε-PL 处理枯草芽孢杆菌芽孢后，芽孢内膜上 Na^+/K^+-ATP 酶活力显著下降。KATO 等[48] 报道，Na^+/K^+-ATP 酶活力的快速下降会导致细胞膜内外 H^+梯度的差异，进而改变细胞膜的通透性。以上报道与本实验研究结果一致。由此可见，热结合 Nisin 和 ε-PL 复合物对芽孢产生的破坏作用是多方面的，除了对芽孢结构的损伤，也包括对芽孢能量代谢的破坏。

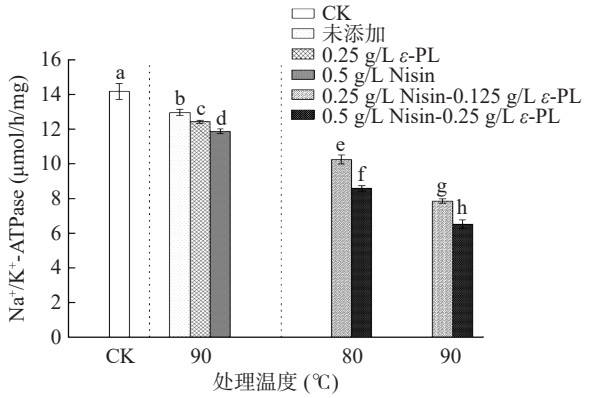


图 11　热结合复合抗菌肽处理对枯草芽孢杆菌芽孢 Na^+/K^+-ATP 酶活力的影响

Fig.11　Effects of heat combined with compound antimicrobial peptides treatment on the activity of Na^+/K^+-ATPase in *Bacillus subtilis* spores

3　结论

在热物理场中，Nisin 和 ε-PL 能穿过受损芽孢衣并对芽孢产生显著的协同杀灭效果（$P<0.05$），且其对枯草芽孢杆菌芽孢的杀菌作用是多方面的，既破坏了芽孢的结构，又损伤了芽孢的关键物质。热结合复合抗菌肽处理后，在结构方面，芽孢发生塌陷和破裂，芽孢衣蛋白质网络的屏障功能受损，内膜严重破损导致其通透性大幅度增加，芽孢核心高度水化；而在关键物质方面，芽孢蛋白质二级结构向无序态转变，膜磷脂出现相态变化且其酰基链发生紊乱，DNA 发生变性，Na^+/K^+-ATP 酶活力降低。本研究探讨了热结合复合抗菌肽处理对细菌芽孢的杀菌机理，为食品工业提供了更为有效的杀菌新技术。未来研究可进一步验证该技术在各种食品体系中的应用效果。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] CHO W, CHUNG M. *Bacillus* spores: A review of their properties and inactivation processing technologies[J]. Food Science and Biotechnology, 2020, 29(11): 1447−1461.
[2] PALANISAMY N, SEALE B, TURNER A, et al. Low frequency ultrasound inactivation of thermophilic bacilli (*Geobacillus* spp. and *Anoxybacillus flavithermus*) in the presence of sodium hydroxide and hydrogen peroxide[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2019, 51: 325−331.
[3] GAO Y L, JU X R. Exploiting the combined effects of high pressure and moderate heat with nisin on inactivation of *Clostridium botulinum* spores[J]. Journal of Microbiological Methods, 2008, 72(1): 20−28.
[4] SETLOW P. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals[J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 101(3): 514−525.
[5] FARAG M A, MESAK M A, SAIED D B, et al. Uncovering the dormant food hazards, a review of foodborne microbial spores' detection and inactivation methods with emphasis on their application in the food industry[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 107: 252−267.
[6] SCHERER K M, SPILLE J, SAHL H, et al. The lantibiotic nisin induces lipid II aggregation, causing membrane instability and vesicle budding[J]. Biophysical Journal, 2015, 108(5): 1114−1124.
[7] KMIHA S, AOUADHI C, AZIZA K, et al. Comparison of synergistic effect of nisin and monolaurin on the inactivation of three heat resistant spores studied by design of experiments in milk[J]. Journal of Food Quality, 2021, 2021(1): 9977646.
[8] TAYLOR L Y, CANN D D, WELCH B J. Antibotulinal properties of nisin in fresh fish packaged in an atmosphere of carbon dioxide[J]. Journal of Food Protection, 1990, 53(11): 953−957.
[9] PAN Y, LIU L, LI X D, et al. Effect of nisin auxiliary to high-pressure CO_2 treatment on the structure and intracellular component leakage from *Bacillus subtilis* spores[J]. Food Science of Animal Products, 2023, 1(3): 9240029.
[10] 胡思嘉, 李新福, 熊强. ε-聚赖氨酸作为天然防腐剂在食品中的应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2022, 43(6): 452−459.
[HU S J, LI X F, XIONG Q. Research progress in the application of ε-Polylysine as a natural preservative in food[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(6): 452−459.]
[11] LI Y Q, HAN Q, FENG J L, et al. Antibacterial characteristics and mechanisms of ε-poly-lysine against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*[J]. Food Control, 2014, 43: 22−27.
[12] YANG H, LI Q Y, YANG L L, et al. The competitive release kinetics and synergistic antibacterial characteristics of tea polyphenols/ε-poly-l-lysine hydrochloride core–shell microcapsules against *Shewanella putrefaciens*[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2020, 55(12): 3542−3552.
[13] LIU J N, CHANG S L, XU P W, et al. Structural changes and antibacterial activity of epsilon-poly-l-lysine in response to pH and phase transition and their mechanisms[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(4): 1101−1109.
[14] BI K, LIU Y, XIN W S, et al. Combined treatment of ε-polylysine and heat damages protective structures and spore inner membranes to inactivate *Bacillus subtilis* spores[J]. Food Microbiology, 2023, 109: 104137.
[15] 陈乐. HPTS 结合 ε-聚赖氨酸对芽孢灭活作用及动力学研

究[D]. 银川: 宁夏大学, 2021. [CHEN L. HPTS combined with ε-polylysine for spore inactivation and kinetic study[D]. Yinchuan: Ningxia University, 2021.]
[16] BI K, ZHANG Z, SHANG B L, et al. Glucose protects the cell membrane, Na+/K+-ATPase, nucleic acids, and proteins in *Bacillus subtilis* spores under high pressure thermal sterilization[J]. FEMS Microbiology Letters, 2022, 369(1): 1−6.
[17] 毕可. 热力场中化学物质对枯草杆菌芽孢杀灭作用的影响[D]. 银川: 宁夏大学, 2022. [BI K. The effect of chemical substances in a thermal field on the killing of *Bacillus subtilis* spores[D]. Yinchuan: Ningxia University, 2022.]
[18] 李佳佳. 热物理场耦合 ε-PLH 对枯草芽孢杆菌芽孢灭活机制的研究[D]. 银川: 宁夏大学, 2024. [LI J J. Study on the sporicidal mechanism of *Bacillus subtilis* spores by thermophysical field coupled ε-PL[D]. Yinchuan: Ningxia University, 2024.]
[19] 李青桓, 辛伟山, 李佳佳, 等. 高压热杀菌处理时 D-果糖对枯草芽孢杆菌芽孢灭活的抑制机制[J]. 食品科学技术学报, 2024, 42(4): 145−155. [LI Q H, XIN W S, LI J J, et al. Inhibitory mechanism of D-fructose on inactivation of *Bacillus subtilis* spores during high-pressure thermal sterilization treatment[J]. Journal of Food Science and Technology, 2024, 42(4): 145−155.]
[20] LIU K W, ZHOU X J, FU M. Inhibiting effects of epsilon-poly-lysine (ε-PL) on *Pencillium digitatum* and its involved mechanism[J]. Postharvest Biology and Technology, 2017, 123: 94−101.
[21] 李佳佳, 杨杰, 章中, 等. PATS 结合山梨酸钾对枯草杆菌芽孢的灭活机理[J]. 农业工程学报, 2023, 39(22): 287−295. [LI J J, YANG J, ZHANG Z, et al. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by combined treatment of PATS and potassium sorbate[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2023, 39(22): 287−295.]
[22] LI J J, YANG J, XIN W S, et al. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by a combination of high-pressure thermal treatment and potassium sorbate[J]. Food Microbiology, 2023, 115: 104345.
[23] PEI Q H, LI Y, GE X Z, et al. Multipath effects of berberine on peach Brown rot fungus *Monilinia fructicola*[J]. Crop Protection, 2019, 116: 92−100.
[24] 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. [CHEN L, ZHANG Z, GUO J J, 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, 2020, 36(20): 320−325.]
[25] 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 D, CHEN F, HU X S. Research prowess on the spore germination[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(6): 221−228.]
[26] VUKOMANOVIĆ M, ŽUNIČ V, KUNEJ Š, et al. Nano-engineering the antimicrobial spectrum of lantibiotics: activity of nisin against gram negative bacteria[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 4324.
[27] PRINCE A, SANDHU P, ROR P, et al. Lipid-II independent antimicrobial mechanism of nisin depends on its crowding and degree of oligomerization[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 37908.
[28] 章中, 杨杰, 申瑾, 等. 高压热杀菌结合酸对枯草杆菌芽孢的杀灭作用[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(12): 9−15. [ZHANG Z, YANG J, SHEN J, et al. Effects of high-pressure thermal sterilization combining with acid on the sterilization of *Bacillus subtilis* spores[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(12): 9−15.]
[29] QU M, ZHANG X, ZHU X Q, et al. Inhibitory effects of nisin and ε-polylysine on the microbial cell structure and physiological function of *Bacillus amyloliquefaciens* and applications in bread preservation[J]. Food Bioscience, 2025, 74: 107942.
[30] NING H Q, LI Y Q, LIN H, et al. Apoptosis-induction effect of ε-poly-lysine against *Staphylococcus aureus* and its application on pasteurized milk[J]. LWT, 2021, 137: 110493.
[31] LI J J, YANG J, XIN W S, et al. Inactivation of Bacillus subtilis spores by a combination of high-pressure thermal treatment and potassium sorbate[J]. Food Microbiology, 2023, 115: 12.
[32] CHRIST K, WIEDEMANN I, BAKOWSKY U, et al. The role of lipid II in membrane binding of and pore formation by nisin analyzed by two combined biosensor techniques[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2007, 1768(3): 694−704.
[33] YE R S, XU H Y, WAN C X, et al. Antibacterial activity and mechanism of action of ε-poly-L-lysine[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2013, 439(1): 148−153.
[34] MENG J, GONG Y, QIAN P, et al. Combined effects of ultra-high hydrostatic pressure and mild heat on the inactivation of *Bacillus subtilis*[J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 68: 59−66.
[35] 刘蔚, 周涛. ε-聚赖氨酸抑菌机理研究[J]. 食品科学, 2009, 30(9): 15−20. [LIU W, ZHOU T. Action mechanism of antimicrobial ε-Poly-L-lysine[J]. Food Science, 2009, 30(9): 15−20.]
[36] GIRARDEAU A, PASSOT S, MENEGHEL J, et al. Insights into lactic acid bacteria cryoresistance using FTIR microspectroscopy[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2022, 414(3): 1425−1443.
[37] YU C, IRUDAYARAJ J. Spectroscopic characterization of microorganisms by Fourier transform infrared microspectroscopy[J]. Biopolymers, 2005, 77(6): 368−377.
[38] MODUGNO C, PELTIER C, SIMONIN H, et al. Understanding the effects of high pressure on bacterial spores using synchrotron infrared spectroscopy[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 10: 3122.
[39] GEORGET E, KAPOOR S, WINTER R, et al. *In situ* investigation of *Geobacillus stearothermophilus* spore germination and inactivation mechanisms under moderate high pressure[J]. Food Microbiology, 2014, 41: 8−18.
[40] ZHANG H J, ZHANG Z, WU S R, et al. Synergistic effects of nisin, ultrasound, and heat treatments on the inactivation of *Bacillus subtilis* spores[J]. LWT, 2025, 216: 117333.
[41] HYLDGAARD M, MYGIND T, VAD B S, et al. The antimicrobial mechanism of action of epsilon-poly-l-lysine[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(24): 7758−7770.
[42] AL-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.
[43] RAO L, LIAO X J, SETLOW P. *Bacillus* spore wet heat resistance and evidence for the role of an expanded osmoregulatory spore cortex[J]. Letters in Applied Microbiology, 2016, 63(4): 247−253.
[44] LIU H X, PEI H B, HAN Z N, et al. The antimicrobial effects and synergistic antibacterial mechanism of the combination of ε-Polylysine and nisin against Bacillus subtilis[J]. Food Control, 2015, 47: 444−450.
[45] KORKMAZ F, KÖSTER S, YILDIZ Ö, et al. *In situ* opening/closing of OmpG from *E. coli* and the splitting of *β*-sheet signals in ATR-FTIR spectroscopy[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2012, 91: 395−401.
[46] GENCCELEP H, SARICAOGLU F T, ANIL M, et al. The effect of starch modification and concentration on steady-state and dynamic rheology of meat emulsions[J]. Food Hydrocolloids, 2015, 48: 135−148.
[47] HAN Y J, SUN Z C, CHEN W X. Antimicrobial susceptibility and antibacterial mechanism of limonene against listeria monocytogenes[J]. Molecules, 2019, 25(1): 33.
[48] KATO M, HAYASHI R, TSUDA T, et al. High pressure - induced changes of biological membrane[J]. European Journal of Biochemistry, 2002, 269(1): 110−118.