不同培养基质和食品添加剂对金黄色葡萄球菌 P 型肠毒素分泌的影响

李响响[1]，杜玄[1]，赵燕英[1]，唐俊妮[1,2]
（1. 西南民族大学生命科学与技术学院，四川成都 610041）
（2. 青藏高原动物遗传资源保护与利用教育部重点实验室，四川成都 610041）

摘要：本研究以产生金黄色葡萄球菌新型肠毒素 P 的食品源分离株 SA-106 为研究对象，采用平板计数和酶联免疫方法研究菌株在 LB 培养基、脱脂乳和无菌熟猪肉中的生长及肠毒素 SEP 的动态分泌；同时探索食品添加剂茶多酚和 Nisin 对菌株 SEP 蛋白分泌影响。结果表明菌株 SA-106 在 LB 液体培养基和脱脂乳中生长时，细菌均能在 12 h 左右进入生长稳定期，在细菌生长过程中，肠毒素 SEP 蛋白分泌呈持续增加趋势，在检测的第 120 h 分别达到 10.28 μg/mL 和 6.59 μg/mL；菌株在猪肉中生长时，24 h 左右进入稳定期，在检测的第 48 h 时，SEP 分泌量可达到 9.12 μg/g。通过比较发现，菌株 SA-106 在熟猪肉和 LB 培养基中生长，SEP 蛋白分泌量较高，在脱脂乳中 SEP 蛋白分泌量稍低，说明不同培养基质对肠毒素蛋白 P 的分泌强度有影响；另外，茶多酚和 Nisin 的添加对细菌的生长和肠毒素 SEP 的产生有一定抑制效果。研究结果对葡萄球菌肠毒素 P 的产生和控制提供一定参考。

关键词：金黄色葡萄球菌；细菌生长；P 型肠毒素分泌；茶多酚；乳酸链球菌素
文章篇号：1673-9078(2020)01-163-168 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.1.023

Effects of Different Culture Media and Food Additives on Staphylococcal Enterotoxin Type P

LI Xiang-xiang[1], DU Xuan[1], ZHAO Yan-ying[1], TANG Jun-ni[1,2]
(1.College of Life Sciences and Technology, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China) (2.Key Laboratory of Qinghai-Tibet Plateau Animal Genetic Resource and Utilization, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China)

Abstract: In this study, the food-source *Staphylococcus aureus* SA-106 strain, which produces new staphylococcal enterotoxin P, was used as a research object. The growth of strain in LB medium, skim milk and sterile cooked pork was studied by plate counting, and the secretion of staphylococcal enterotoxin P was determined by enzyme-linked immunosorbent assay. At the same time, the effects of food additives (tea polyphenols and Nisin) on the secretion of SEP protein were also explored. The results showed that when SA-106 was grown in LB medium and skim milk, the bacteria could enter the growth stationary period at about 12 h; and the secretion of enterotoxin SEP protein continued to increase during the growth, reaching 10.28 μg/mL and 6.59 μg/mL at 120 h, respectively. While when grown in pork, the strain entered the growth stationary period at about 24 h, and the SEP secretion was 9.12 μg/g at 48 h. By comparison, the secretion of SEP protein of strain S-106 was higher in cooked pork and LB medium, and the secretion of SEP protein in skim milk was slightly lower, indicating that different culture medium had an effect on the secretion of enterotoxin protein P. Further, the addition of tea polyphenols and Nisin has a certain inhibitory effect on the growth of bacteria and the production of enterotoxin SEP. This study has a certain reference value for the production and control of staphylococcal enterotoxin P.

Key words: *Staphylococcus aureus*; bacterial growth; type P enterotoxin secretion; tea polyphenols; Nisin

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*，*S. aureus*)可引起食物中毒、皮肤软组织感染、肺炎、败血症等疾病[1-4]。由金黄色葡萄球菌所造成的食物中毒事件，在许多国家均被广泛报道[5-7]。引起食物中毒病症的主要致病因子是葡萄球菌肠毒素（Staphylococcal enterotoxins，SEs）[8,9]。目前已经发现了 24 种不同的血清型，SEA~SEE 被称为传统肠毒素，SEG~SE*I*Y 被命名为新型肠毒素。其中，SEP 属于新型肠毒素的一

收稿日期：2019-08-05
基金项目：国家重点研发计划项目(2018YFD0500500)；四川省科技计划项目（2019YJ0261）；西南民族大学研究生创新项目（CX2019SZ148）
作者简介：李响响（1995-），女，硕士研究生，研究方向：食品加工与安全
通讯作者：唐俊妮（1971-），女，博士，教授，研究方向：食品安全与食品微生物

种。Kuroda 等[10]首次描述了新型类肠毒素 *selp* 基因，核苷酸序列有 729 个，编码 286 个氨基酸残基。2013 年，Omoe 等[11]进一步证实 *selp* 基因编码的 SE*l*P 蛋白具有让灵长类动物呕吐的活性。因此，将类肠毒素 SE*l*P 蛋白重新定义为肠毒素蛋白 SEP。Chiang 等[12]对 147 株临床分离菌株检测发现 *sep* 基因携带率可高达 27.9%；Calderwood 等[13]的研究发现携带 *sep* 基因的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（Methicillin-resistant *S. aureus*，MRSA）有增加败血症的风险；Wu[14]等对中国社区获得性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（Community-acquired MRSA，CA-MRSA）进行基因调查时发现，基因 *sep* 的携带率为 61.6%，仅次于新型肠毒素基因 *sek* 所占的比例。说明肠毒素 SEP 蛋白引起食物中毒的潜在风险高。由于金黄色葡萄球菌极易污染乳制品和各类熟肉制品[15]。因此，研究肠毒素在这些食品基质中的分泌变化情况十分必要。目前已有的研究中，大多数是针对食物基质中肠毒素基因表达或是传统肠毒素蛋白的分泌研究，如王琼[16]等研究了 *sek* 基因在猪肉中不同时间的表达变化；Valihrach[17]等研究了菌株在牛奶中传统肠毒素蛋白 SEC 的分泌情况；也有学者通过使用添加剂抑制肠毒素的分泌和表达，如 Zhao[18]等研究了茶多酚、壳聚糖等 5 种食物添加剂对菌株肠毒素 I 的分泌影响；王琼[19]等探究了 Nisin、茶多酚等 6 种食品防腐剂对菌株 *sek* 基因表达的影响。还未见对葡萄球菌 SEP 蛋白分泌的相关研究。基于金黄色葡萄球菌新型肠毒素 *sep* 基因流行的广泛性和 SEP 潜在的致病性，本研究以产肠毒素 SEP 的金黄色葡萄球菌分离株为研究对象，研究菌株在不同培养基质中肠毒素 P 的分泌情况，并选择两种常见的食品添加剂-茶多酚和 Nisin，探究两种添加剂对肠毒素 P 蛋白分泌的影响，研究结果为葡萄球菌肠毒素 P 的产生和控制提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验菌株和试剂

金黄色葡萄球菌食品分离株 SA-106，由本实验室分离鉴定保存；脱脂牛奶，蒙牛乳业有限公司；猪肉，购于成都市菜市场；茶多酚（食品级），河南绿邦有限公司；Nisin（食品级），宁波王龙科技股份有限公司；胰蛋白胨大豆肉汤培养基（trypticase soy broth，TSB）、胰酪胨大豆琼脂培养基（tryptose soya agar，TSA）、LB 肉汤、Baird-Parker（BP）琼脂基础，青岛海博生物；磷酸盐缓冲溶液（1×PBS）、含有 Tween-20 的 PBS 缓冲液（PBST），实验室配制；浓硫酸（分析纯），天津市致远化学试剂有限公司；金黄色葡萄球菌肠毒素 P（SEP）蛋白纯品、抗 SEP 单克隆抗体（2.3 mg/mL）、抗 SEP 多克隆兔血清（1.57 mg/mL），实验室自制；辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG，内蒙古苏尔特生物科技公司。

1.2 实验仪器与设备

HZQ-F160 全温振荡培养箱，上海齐欣科学仪器有限公司；Eppendorf 5804R 型冷冻离心机，成都世纪方舟科技有限公司；Elx-808 型酶标仪，基因（美国）有限公司；96 孔酶标板，Costar 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 金黄色葡萄球菌纯化及种子液制备

取携带肠毒素 *sep* 基因的冻存菌株 SA-106 菌液 50 μL 于 5 mL 的 TSB 肉汤中进行活化，37 ℃，150 r/min 培养过夜，在 BP 平板上划线纯化；再次挑选单菌落于 TSB 液体培养基中，在同样条件下培养过夜。取菌液 500 μL 于 4.5 mL 生理盐水中，进行 10 倍梯度稀释，选择合适的稀释度，并测定菌落数。根据平板计数结果，种子液浓度为 10^8 cfu/mL，将种子液放入 4 ℃冰箱备用。

1.3.2 样品中 SEP 含量测定

采用本实验室已建立的 SEP 夹心双抗酶联免疫方法（Double antibody sandwich ELISA，DAS-ELISA）进行样品中 SEP 蛋白含量的检测，详细检测流程见参考文献[20]。

1.3.3 菌株在 LB 培养基、脱脂乳、无菌熟猪肉中的生长曲线测定和上清液中 SEP 蛋白检测

有研究报道，肠毒素在细菌生长对数期或稳定期开始分泌[21]。本实验为了研究菌株在 LB 培养基和脱脂乳中蛋白产生变化，进行了 0~120 h 的生长监测。

取 1.3.1 中制备的种子液 500 μL，分别加入到 500 mL 的 LB 培养基、灭菌脱脂乳中，放入恒温震荡培养箱中，37 ℃，150 r/min 培养。在培养的 0 h、12 h、24 h、36 h、48 h、60 h、72 h、84 h、96 h、108 h、120 h 的每个时间点上各取 5 mL 培养液，用于细菌平板计数和 SEP 蛋白检测。

对于猪肉样品，菌株在猪肉中的生长和蛋白表达情况进行了 0~48 h 监测。将 1.3.1 中制备的种子液用生理盐水稀释至含有 10^2 cfu/mL 的菌悬液。取 100 μL 菌悬液接种到分别装有 10 g 无菌熟猪肉的锥形瓶中，共制备 21 瓶，每个样品重复三瓶，37 ℃，培养 48 h。在培养的 0 h、8 h、16 h、24 h、32 h、40 h、48 h 分

别取样，用于平板计数和 SEP 蛋白含量测定。

1.3.4 茶多酚和 Nisin 对菌株 SEP 蛋白分泌影响的测定

参考马伊萨兰[22]等的方法，采用微量肉汤稀释法测定茶多酚和 Nisin 对金黄色葡萄球菌 SA-106 的最小抑菌浓度。取 1.3.1 中制备的种子液 500 μL 加入到 500 mL 的 TSB 培养基中，另外，再加入 1/2MIC 的茶多酚或 1/2MIC 的 Nisin 各 500 μL。同时设置对照组，用无菌水代替茶多酚和 Nisin。在恒温震荡培养箱中，37 ℃培养至 120 h。在 0 h、12 h、24 h、36 h、48 h、60 h、72 h、84 h、96 h、108 h、120 h 分别取样，用于平板计数和 SEP 蛋白含量测定。

1.3.5 数据处理分析

数据用 Excel 软件进行处理，不同取样点的蛋白含量用 SPSS 18.0 进行分析，并采用单因素方差分析（analysis of variance，ANOVA）分析组间差异性（p<0.05 为差异具有统计意义）。

2 结果与分析

2.1 菌株在 LB 培养基、脱脂乳、无菌熟猪肉中的生长曲线及 SEP 蛋白分泌情况

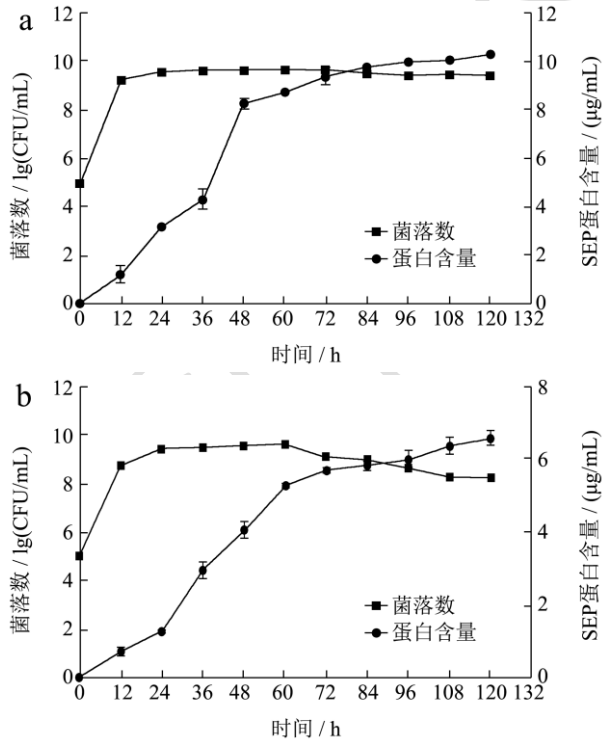


图 1 菌株 SA-106 在 LB 培养基（a）和脱脂乳（b）中的生长曲线及 SEP 蛋白含量变化

Fig.1 The growth curve and SEP protein secretion curve of SA-106 in LB and skim milk

菌株 SA-106 在 LB 培养基和脱脂乳中的生长曲线（0~120 h）及蛋白含量变化分别如图 1a、1b 所示。从图中可以看出，菌株在 LB 和脱脂乳中培养 12 h 左右，细菌的生长均趋于稳定，在 72 h 后脱脂乳中菌落总数出现明显下降趋势。

LB 和脱脂乳培养液中 SEP 的含量在 0~48 h 内都有明显增长，在 48~120 h 内增长较为缓慢，但总的含量一直持续上升。细菌培养的第 120 h 时，SEP 在 LB 培养基和脱脂乳中的含量分别可达到 10.28 μg/mL 和 6.59 μg/mL。

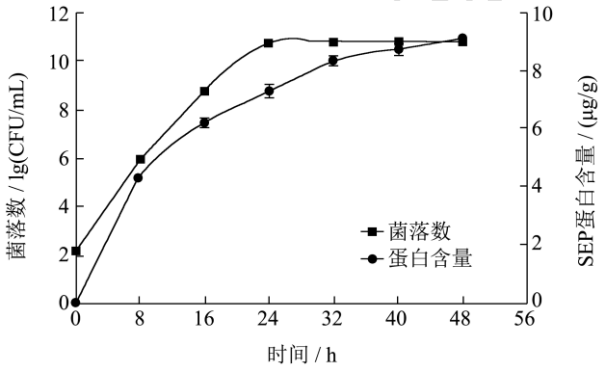


图 2 菌株 SA-106 在熟猪肉中的生长曲线及 SEP 蛋白含量变化

Fig.2 The growth curve and SEP protein secretion curve of SA-106 in sterile cooked pork

菌株 SA-106 在熟猪肉中（0~48 h）的生长曲线及蛋白含量变化如图 2 所示。培养到 24 h 后，细菌进入稳定期。猪肉中分泌的 SEP 含量在 0~48 h 内也呈现持续增长趋势，48 h 时 SEP 含量已达到 9.12 μg/g。

通过比较发现：菌株 SA-106 在熟猪肉和 LB 培养基中，SEP 蛋白的分泌量较高，在脱脂乳中 SEP 蛋白的分泌量稍低，与熟猪肉和 LB 培养基差异显著（p<0.05），说明不同培养基质对肠毒素蛋白 P 的分泌强度具有一定的影响。

2.2 茶多酚和 Nisin 亚抑制浓度对菌株 SEP 蛋白分泌影响

通过最小抑菌浓度测试，发现食品添加剂茶多酚和 Nisin 对菌株 SA-106 的最低抑菌浓度分别为 0.10 g/L 和 0.25 g/L。

菌株在对照的 TSB 培养基及分别添加 1/2 MIC 茶多酚和 1/2 MIC Nisin 的培养基中的生长曲线如图 3 所示。在 TSB 培养基中，菌株在 12 h 后生长开始进入稳定期，在 72 h 后，菌株生长有衰退趋势。在添加了茶多酚和 Nisin 的培养基中，菌株的生长受到部分抑制，但抑制效果不显著（p>0.05），细菌在添加了茶多酚和 Nisin 的培养基中，24 h 后开始进入稳定期。

72 h 后抑制效果逐渐失去，三种培养液中细菌的生长趋于相同。

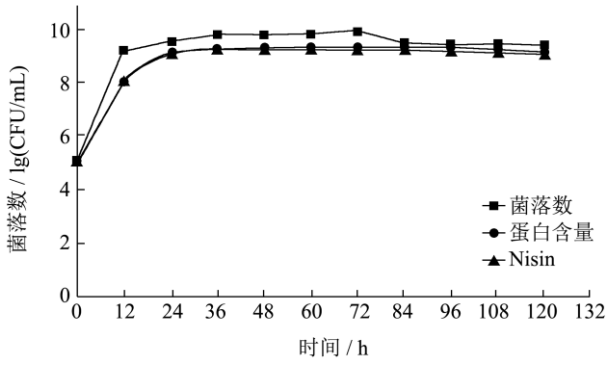


图 3 茶多酚和 Nisin 对菌株 SA-106 生长的影响

Fig.3 Effect of tea polyphenol and nisin on the growth of strain SA-106

采用 DAS-ELISA 检测程序，检测三种培养液中 SEP 蛋白的分泌情况（结果如图 4 所示）。在添加了茶多酚和 Nisin 后，SEP 的分泌受到比较明显的抑制（p<0.05）。在培养的 120 h 时，TSB 培养基中 SEP 蛋白含量可达到 10.12 μg/mL；而添加茶多酚和 Nisin 的培养基中，SEP 蛋白含量分别为 8.23 μg/mL 和 8.02 μg/mL。可见，常见的食品添加剂茶多酚和 Nisin 对金黄色葡萄球菌肠毒素 P 的分泌具有一定的抑制效果。

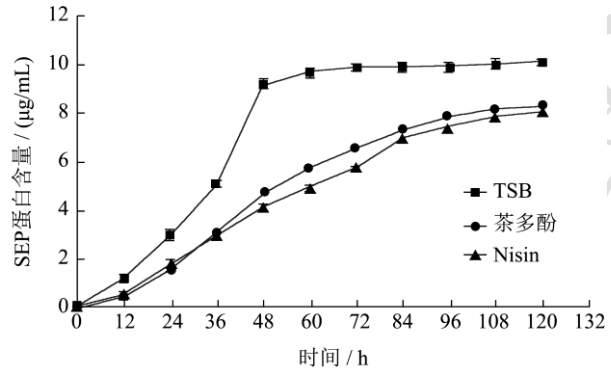


图 4 茶多酚和 Nisin 对菌株 SA-106 蛋白 SEP 分泌的影响

Fig.4 Effect of Tea Polyphenol and NIsin on the Secretion of SEP protein by SA-106

3 结论

3.1 本研究以保存的食品源金黄色葡萄球菌分离株 SA-106 为研究对象，探究菌株在 LB 培养基、脱脂乳和无菌熟猪肉中的生长，以及不同培养基质中肠毒素 SEP 蛋白分泌的情况。同时，本研究也探究了两种常见食品添加剂茶多酚和 Nisin 对菌株生长及 SEP 蛋白分泌的影响。从实验结果来看，菌株在 LB 培养基中生长 120 h 时，肠毒素 SEP 蛋白的含量高达 10.28 μg/mL，相同培养条件下，菌株在脱脂乳中 120 h 时，蛋白的含量为 6.59 μg/mL，比在 LB 培养基中的分泌量低。这一结果与 Valihrach[17]等的实验结果相类似，他们的研究也认为菌株在牛奶中 *sec* 的表达量低于在实验室培养基中的表达量。目前还不清楚牛奶中抑制肠毒素分泌的具体原因。菌株在无菌熟猪肉中的 SEP 蛋白分泌量比 LB 培养基和脱脂乳更高，差异显著。王琼等[16]对菌株在猪肉中肠毒素 *sek* 基因表达研究发现，在培养 12~120 h 内，肠毒素 *sek* 基因全程都有表达，且出现了两次高峰期，一次发生在细菌生长的对数期，一次发生在细菌的稳定生长后期；杨静等[23]的研究表明菌株在五香牛肉中培养时，传统肠毒素基因 *sea*~*see* 均有检出，且基因的相对表达水平均在培养过程中出现二次提高现象。分析这些研究，我们认为肠毒素基因在肉类基质中可以获得更好的表达，部分解释了猪肉中 SEP 蛋白分泌量高的原因。

3.2 通过在培养基中添加亚抑制浓度的茶多酚和 Nisin 后，菌株的生长和蛋白分泌均受到抑制，但菌株的生长抑制不那么明显，相反，两种常见的添加剂对肠毒素 SEP 蛋白的分泌抑制更明显一些。培养的 48 h，细菌在 TSB 中分泌量为 10.12 μg/mL，添加茶多酚和 Nisin 后，SEP 蛋白分泌量分别为 8.23 μg/mL 和 8.02 μg/mL。王琼等[19]发现，茶多酚和 Nisin 可以有效抑制肠毒素基因在转录水平上的表达；Shimamura[24]等研究表明多酚类添加剂可以显著减少肠毒素 SEA 的表达；杨丹茹等[25]的研究也认为茶多酚对肠毒素 SEK 蛋白分泌抑制效果明显。这些研究与本实验的结果吻合。文献报道了茶多酚是通过抑制微生物的粘附和破坏细胞结构达到抑菌效果[26]；Nisin 是通过在细胞膜上形成孔洞结构抑制细菌的生长代谢和增殖活性[27,28]。以后可以进一步深入开展茶多酚和 Nisin 对肠毒素蛋白抑制机制方面的研究。

3.3 基于金黄色葡萄球菌新型肠毒素 SEP 流行的广泛性和潜在的致病性[13,14]，对食品安全的威胁大，因此，应该给予重视。特别是肠毒素 SEP 能够在脱脂乳、肉类等常见食品中分泌且表达量高。茶多酚和 Nisin 可以在一定程度上抑制 SEP 的分泌，但并不能完全抑制。在后续的研究中，还需要寻找更加有效的防控措施，进一步降低金黄色葡萄球菌肠毒素 P 引起食物中毒的风险。

参考文献

[1] Alarcón B, Vicedo B, Aznar R. PCR-based procedures for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* and their application in food [J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 100(2): 352-364

[2] Kaasch A J, Michels G. *Staphylococcus aureus* bloodstream

infection: When is transthoracic echocardiography sufficient? [J]. JACC: Cardiovas Imaging, 2015, 8(8): 932-933

[3] Jans C, Merz A, Johler S, et al. East and West African milk products are reservoirs for human and livestock-associated *Staphylococcus aureus* [J]. Food Microbiology, 2017, 65: 64-73

[4] Thapaliya D, Forshey B M, Kadariya J, et al. Prevalence and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* in commercially available meat over a one-year period in Iowa, USA [J]. Food Microbiology, 2017, 65: 122-129

[5] Miwa N, Kawamura A, Masuda T, et al. An outbreak of food poisoning due to egg yolk reaction-negative *Staphylococcus aureus* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 64(3): 361-366

[6] Gallina S, Bianchi D M, Bellio A, et al. Staphylococcal poisoning foodborne outbreak: epidemiological investigation and strain genotyping [J]. Journal of Food Protection, 2013, 76(12): 2093-8

[7] Johler S, Weder D, Bridy C, et al. Outbreak of staphylococcal food poisoning among children and staff at a Swiss boarding school due to soft cheese made from raw milk [J]. Journal of Dairy Science, 2015, 98(5): 2944-2948

[8] Johler S, Tichaczek-Dischinger P S, Rau J, et al. Outbreak of Staphylococcal food poisoning due to SEA-producing *Staphylococcus aureus* [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2013, 10(9): 777-781

[9] Yan X, Wang B, Tao X, et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning in Shenzhen, China [J]. Applied Environmental Microbiology, 2012, 78(18): 6637-6642

[10] Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, et al. Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Lancet, 2001, 357(9264): 1225-1240

[11] Omoe K, Hu D L, Ono H K, et al. Emetic Potentials of newly identified staphylococcal enterotoxin-like toxins [J]. Infection and Immunity, 2013, 81(10): 3627-3631

[12] Chiang Y C, Liao W W, Fan C M, et al. PCR detection of Staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan [J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 121(1): 66-73

[13] Calderwood Ms, Desjardins Ca, Sakoulas G, et al. Staphylococcal enterotoxin P predicts bacteremia in hospitalized patients colonized with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Infectious Diseases, 2014, 209(4): 571-577

[14] Wu D, Li X, Yang Y, et al. Superantigen gene profiles and presence of exfoliative toxin genes in community-acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Chinese children [J]. International Journal of Infectious Diseases, 2011, 15(1): 36-36

[15] 向红,周藜,廖春,等.金黄色葡萄球菌及其引起的食物中毒的研究进展[J].中国食品卫生杂志,2015,27(2):196-199
XIANG Hong, ZHOU Li, LIAO Chun, et al. Progress of *Staphylococcus aureus* and food poisoning [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2015,27(2):196-199

[16] 王琼,唐俊妮,汤承,等. 金黄色葡萄球菌新型肠毒素 sek 基因在 3 株食品分离菌株中的表达[J].食品科学,2016,37(13):140-146
WANG Qiong, TANG Junni, TANG Cheng, et al. Temporal expression of staphylococcal enterotoxin K (sek) gene in three isolates from food samples [J]. Food Science, 2016, 37(13):140-146

[17] Valihrach L, Alibayov B, Zdenkova K, et al. Expression and production of staphylococcal enterotoxin C is substantially reduced in milk [J]. Food Microbiology, 2014, 44(6):54-59

[18] ZHAO Y, ZHU A, TANG J, et al. Comparative Effects of Food Preservatives on the Production of Staphylococcal Enterotoxin I from *Staphylococcus aureus* Isolate [J]. Journal of Food Quality, 2017, vol. 2017, Article ID 9495314

[19] 王琼,唐俊妮,汤承,等.6 种食品防腐剂对金黄色葡萄球菌抑菌效果及肠毒素基因表达的影响[J].食品科学,2016,37(21):151-156
WANG Qiong, TANG Jun-ni, TANG Cheng, et al. Inhibitory effect of six food antiseptics on the growth and staphylococcal enterotoxin (SE) gene expression of *Staphylococcus aureus* [J]. Food Science, 2016, 37(21): 151-156

[20] 杜玄,赵燕英,刘骥,等.金黄色葡萄球菌肠毒素 P 双抗夹心酶联免疫检测方法研究[J].现代食品科技,2018,34(4):264-269
DU Xuan, ZHAO Yan-ying, LIU Ji, et al. Development of a double-antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxin P [J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(4): 264-269

[21] Derzelle S, Dilasser F, Duquenne M, et al. Differential temporal expression of the staphylococcal enterotoxins genes during cell growth [J]. Food Microbiology, 2009, 26(8): 896-904

[22] 马伊萨兰,张荣,王洪志,等.食品中金黄色葡萄球菌生物被

膜形成基因分析及影响因素研究[J].食品工业科技, 2017, 38(15):129-133
MA Yi-sa-lan, ZHANG Rong, WANG Hong-zhi, et al. Analysis of biofilm formation related genes and its influence factors for *Staphylococcus aureus* food isolates [J]. Food Industry and Technology, 2017, 38(15): 129-133

[23] 杨静.食源性金黄色葡萄球菌肠毒素基因在液体培养基和牛肉制品中的表达研究[D].南京:南京农业大学,2013
YANG Jing. Research on the expression of food-borne Staphylococcus enterotoxins genes in liquid culture and beef product [D]. Nanjing: Nanjing Agriculture University, 2013

[24] Shimamura Y, Hirai C, Sugiyama Y, et al. Inhibitory effects of food additives derived from polyphenols on staphylococcal enterotoxin A production and biofilm formation by *Staphylococcus aureus* [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2017, 81(12): 2346-2352

[25] 杨丹茹,赵燕英,唐俊妮.金黄色葡萄球菌肠毒素 SEK 的纯化及 DAS-ELISA 检测方法的建立与应用[J].现代食品科技,2019,35(3):225-233
YANG Dan-ru, ZHAO Yan-ying, TANG Jun-ni. Prokaryotic expression, purification, development and application of a double-antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay for staphylococcal enterotoxin K [J]. Modern Food Science and Technology. 2019, 35(3): 225-233

[26] 徐芃,刘东成.茶多酚抗氧化和抑菌机制的研究 [J].中国医药导报,2008,5(23):21-22
XU Peng, LIU Dong-cheng. Antiseptic mechanism of tea polyphenol [J]. China Medical Herald, 2008, 5(23): 21-22

[27] 黄琴,马国霞,周绪霞,等.乳链菌肽的抑菌机制[J].中国食品学报,2007,7(2):128-133
HUANG Qin, MA Guo-xia, ZHOU Xu-xia, et al. Antibacterial mechanism of nisin [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2007, 7(2): 128-133

[28] 吕淑霞,白泽朴,代义,等.乳酸链球菌素(Nisin)抑菌作用及其抑菌机理的研究[J].中国酿造,2008,9:87-91
LYU Shu-xia, BAI Ze-pu, DAI Yi, et al. Study on antibacterial function and mechanism of nisin [J]. China Brewing, 2008, 9: 87-91

（上接第 119 页）

[27] Babalar M, Asghari M, Talaei A, et al. Effect of pre- and postharvest salicylic acid treatment on ethylene production, fungal decay and overall quality of Selva strawberry fruit [J]. Food Chemistry, 2007, 105(2):449-453

[28] Sabzi A, Hadavi E, Hekmati J. Effect of different levels of malic acid and salicylic acid in preservative solution on the quality and vase life of cut rose flowers cultivars (Utopia) [J]. International Journal of Agriscience, 2012, 2(5): 451-456

（上接第 162 页）

[14] Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013 [J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(1): 490-495

[15] Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server [J]. Methods in Molecular Biology, 1999, 112: 531-552

[16] Thompson J D, Gibson T J, Frédéric Plewniak. The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876-4882

[17] Robert X, Gouet P. Deciphering key features in protein structures with the new endscript server [J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(W1): 320-324

[18] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(12): 2725-2729

[19] Temml V, Kaserer T, Kutil Z, et al. Pharmacophore modeling for COX-1 and -2 inhibitors with ligandscout in comparison to discovery studio [J]. Future Medicinal Chemistry, 2014, 6(17): 1869-1881

[20] Pettersen E F, Goddard T D, Huang C C, et al. UCSF Chimera-A visualization system for exploratory research and analysis [J]. Journal of Computational Chemistry, 2004, 25(13): 1605-1612

[21] Bowie J, Luthy R, Eisenberg D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure [J]. Science, 1991, 253(5016): 164-170

[22] Baldauf S L. Phylogeny for the faint of heart: A tutorial [J]. Trends In Genetics, 2003, 19(6): 345-351