

肉桂醛对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌作用及抑菌机理研究

张贇彬, 刘笑宇, 姜萍萍, 李维迪, 王一非

(上海应用技术学院香料香精技术与工程学院, 上海 201418)

摘要: 研究了肉桂醛对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌作用及其抑菌机理。本文采用滤纸片扩散法测定抑菌圈大小, 双倍稀释法测定最低抑菌浓度、最低杀菌浓度, 以此评价肉桂醛对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌性, 通过扫描电镜观察、胞膜通透性、胞膜完整性、膜电位实验, 阐述肉桂醛抑菌的机理。结果表明: 肉桂醛对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈分别为 21.75 mm、29.37 mm, 最低抑菌浓度均为 0.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 最低杀菌浓度均为 0.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$; 肉桂醛破坏了菌体细胞的形态, 出现形变; 随着肉桂醛浓度的增大, 悬液中相对电导率迅速升高, 表明肉桂醛影响细菌的膜通透性, 而成倍数增长的核酸、蛋白质含量表示胞膜的完整性遭到破坏, 肉桂醛降低菌体膜电位, 影响其代谢活性, 从而抑制细菌生长。肉桂醛主要作用于细胞膜, 适宜作为天然防腐剂, 抑制食品中腐败菌和致病菌的生长, 延长食品货架期。

关键词: 肉桂醛; 抑菌; 细胞膜; 抑菌机理

文章编号: 1673-9078(2015)5-31-35

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.5.006

Mechanism and Antibacterial Activity of Cinnamaldehyde against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

ZHANG Yun-bin, LIU Xiao-yu, JIANG Ping-ping, LI Wei-di, WANG Yi-fei

(School of Perfume and Aroma Technology, Shanghai Institute of Technology, Shanghai 201418, China)

Abstract: The antibacterial activity of cinnamaldehyde against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, and the underlying mechanism were evaluated. Antibacterial activity was determined based on the diameter of inhibition zone (DIZ) that was measured by the disc diffusion method, and by the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC), measured to a series of doubling dilutions. Furthermore, the antibacterial mechanism was explored using scanning electron microscopy, cell membrane permeability and integrity, as well as membrane potential. The DIZ values of *E. coli* and *S. aureus* were 21.75 mm and 29.37 mm, respectively. The MIC (0.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$) and MBC values (0.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$) were the same for both bacteria. Scanning electron microscope images showed that the structure of the bacterial cell was damaged by cinnamaldehyde with consequent morphological changes. With increasing concentration of cinnamaldehyde, the relative electric conductivity increased rapidly, indicating that the permeability of the cell membrane was affected by cinnamaldehyde. Furthermore, the multi-fold increase in nucleic acids and proteins in the cell suspension revealed that cinnamaldehyde damaged the integrity of the bacterial membrane, decreased the membrane potential, and affected the metabolic activity, thus inhibiting bacterial growth. Cinnamaldehyde exerts its main effect on the bacterial cell membrane, and is suitable as a natural preservative to inhibit the growth of food-spoilage and pathogenic bacteria, thus extending the shelf life of food.

Key words: cinnamaldehyde; antibacterial; cell membrane; antibacterial mechanism

由食品腐败菌和致病菌引起的食物污染严重影响着公共社会的健康, 据统计, 全球每年就有 4 到 6 百万人口死于食源性疾病的爆发, 并且, 大量腐败食物造成了资源的浪费, 带来了不良的经济效益。如何抑制食源性腐败菌和致病菌, 延长食品的货架期尤为重

收稿日期: 2014-09-22

基金项目: 上海市部分地方院校能力建设计划项目 (13120503300)

作者简介: 张贇彬 (1973-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然产物提取

要^[1-2]。随着现代食品质量标准的提高, 越来越多的人追寻天然、无化学添加剂的食物, 因此, 对绿色、无害、高效抑菌的添加剂的研究成为了热点^[3]。

肉桂精油产自于传统香辛料-肉桂, 是一种可以赋予食物独特气味, 同时可作为防腐剂的天然物质, 已被广泛运用于食品, 化妆品和医药领域^[4]。肉桂精油具有很好的抑菌作用, Mehmet 等^[5]已证实肉桂精油的高效抑菌性是由于其存在的大量肉桂醛成分, 通过

GC-MS 分析得出肉桂醛含量高达 68.95%。Nutch Sanla-Ead 等^[6]研究了营养肉汤培养基中肉桂醛对食源性菌的抑制作用,通过琼脂扩散法和最低抑菌浓度实验,得出肉桂醛对所有 10 种食源腐败菌和致病菌均有不同程度的抑菌效果,其中,对金黄色葡萄球菌的抑菌效果尤为显著,最低抑菌浓度为 1.56 $\mu\text{L}/\text{mL}$,而对大肠杆菌的最低抑菌则为 12.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 。H. O. Kim 等^[1]发现肉桂醛可以使大肠杆菌 O157:H7 失去活性,当培养基中肉桂醛浓度达到 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,大多数细菌都能在 2 h 内被杀死,肉桂醛对大肠杆菌 O157:H7 的最低抑菌浓度为 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

大量的研究都表明了肉桂醛的良好抑菌性,但探究肉桂醛抑菌机理的研究为之甚少。本文选择大肠杆菌和金黄色葡萄球菌作为革兰氏阴性和革兰氏阳性菌的典型,测定了肉桂醛对两种菌的抑菌圈 (DIZ)、最低抑菌浓度 (MIC) 和最低杀菌浓度 (MBC)。并通过测定肉桂醛对菌体细胞的形态影响,细胞膜完整性影响,膜通透性及膜电位影响对其抑菌机理进行研究。旨在更全面的探究肉桂醛的抑菌作用,为使其更好的运用于食品产业提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验试剂

肉桂醛、吐温 80、罗丹明 123, 购于西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司; 无水乙醇 (分析纯)、叔丁醇 (分析纯)、戊二醛 (优级纯)、考马斯亮蓝 G250, 均购于国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 培养基及菌种

营养肉汤 (NB)、营养琼脂 (NA) 培养基采购自青岛海博生物技术有限公司。实验所用大肠杆菌 ATCC 25922 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 (*Staphylococcus aureus*) 由上海应用技术学院微生物实验室提供, 菌种存于琼脂斜面, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

菌种均在 NB 中活化, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。采用比浊法调整菌液浓度为 1×10^7 cfu/mL, 待用。

1.1.3 主要仪器设备

Quanta200 FEG 扫描式电子显微镜 (SEM), 荷兰 FEI 有限公司; UV759S 紫外-可见分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; BSA423S 电子天平, 德国赛多利斯集团; F-4500 荧光分光光度计, 日本 HITACHI 集团; DSX-280B 不锈钢手提式灭菌锅, 上海申安医疗器械厂; DDS-120W 微机型电导率仪, 上海般特仪器有限公司。

1.2 抑菌试验

1.2.1 测定抑菌圈

参考 Ajay Sharma 等^[7]的方法, 采用滤纸片扩散法测定 DIZ 大小。向培养皿 (90 mm) 中倒入 20 mL 已灭菌的 NB 培养基, 待其凝固后, 加入 100 μL 菌液 (浓度调整为 1×10^7 cfu/mL), 均匀涂布, 静置 5 min。滤纸打成直径为 6 mm 的圆片, 灭菌。将含有 5 μL 肉桂醛的滤纸片置于培养皿表面。静置 5 min, 培养皿于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后用游标卡尺测量抑菌圈大小。吐温 80 作为对照组。

1.2.2 测定 MIC、MBC

本文采用双倍稀释法, 用吐温 80 (纯) 将肉桂醛稀释成一系列双倍浓度梯度的肉桂醛溶液, 分别加入装有 10 mL NB 培养基的试管中, 使得其终浓度为 0.125、0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 。再向每支试管中加入 50 μL 菌液, 充分混匀。所有试管置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 220 r/min 摇床培养 24 h。试管中肉眼不可见浑浊的最低浓度即为 MIC。取 50 μL 混合菌液于 NA 培养皿上, 均匀涂布, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h 后, 无菌体生长的最低浓度即为 MBC。

1.3 抑菌机理

1.3.1 扫描电镜

菌种接于 NB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h (浓度调整为 1×10^7 cfu/mL)。取 10 mL 菌悬液分别加入 0 MIC、1 MIC、1 MBC 浓度的肉桂醛, 所有样品均置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 h。取出菌液用磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4) 冲洗两次, 加入戊二醛溶液 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 4 h。使用呈梯度浓度的酒精溶液 (30%、50%、70%、80%、90%、100%) 脱水, 叔丁醇置换酒精。镀膜后上 SEM 观察。

1.3.2 测定膜通透性

通过测定菌液中相对电导率的变化来表示肉桂醛对膜通透性的影响。参考 Wen-Rui Diao 等^[8]的方法, 菌种于 NB 培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h, 4000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 用 5% 葡萄糖溶液洗至菌液的相对电导率与 5% 葡萄糖溶液的相对电导率相当, 此菌液作为等渗菌。向 5% 葡萄糖溶液中分别加入不同浓度的肉桂醛 (0 MIC、1 MIC 和 1 MBC), 混均, 测其相对电导率记为 L_1 。取等渗菌液分别加入不同浓度的肉桂醛 (0 MIC、1 MIC 和 1 MBC), 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 6 h, 每 1 h 取出测定相对电导率, 记为 L_2 。将悬于 5% 葡萄糖溶液的菌液沸水浴 5 min 冷却后, 测定相对电导率记为 L_0 。菌种膜通透性的相对电导率根据如下公式计算:

相对电导率 (%) = $100 \times (L_2 - L_1) / L_0$

1.3.3 测定细胞膜完整性

根据 Lv 等^[9]的方法, 菌液在 4000 r/min 下离心 15 min, 收集菌体, 用磷酸缓冲液冲洗 3 次后重悬于磷酸缓冲液。取 100 mL 重悬液分别加入 450 μL 不同浓度的肉桂醛 (0 MIC、1 MIC 和 1 MBC), 37 °C 下培养 3 h。随后, 菌悬液在 8000 r/min 离心 3 min, 取上清液测定 260 nm 下的吸光度, 所得的吸光度值即为菌液中核酸的含量。另取上清液, 采用考马斯亮蓝法, 测定其蛋白质含量。

1.3.4 测定膜电位

膜电位的大小可反映出菌体细胞的代谢活性, 参考 Novo 等^[10], 采用罗丹明 123 荧光染色法测定膜电位。菌种在 NB 培养基中 37 °C 活化培养 24 h, 调整菌液浓度为 1×10^7 cfu/mL。分别加入 0 MIC, 1 MIC 和 1 MBC 浓度的肉桂醛, 220 r/min 震荡培养 3h 后加入磷酸盐缓冲液冲洗两次。用磷酸盐缓冲液配置浓度为 1 mg/mL 的罗丹明 123 母液, 分别加入菌液中, 使得终浓度为 2 μg/mL, 避光孵育 30 min。之后, 菌液用磷酸盐缓冲液充分洗净, 重悬。样品放于双层石英比色皿中, 用荧光分光光度计测平均荧光强度。测定的激发波长为 480 nm, 发射波长为 530 nm。所得的罗丹明 123 荧光强度与膜电位大小线性相关。

1.3.5 统计与分析

本文中所有实验均平行三次。所有数据均以平均值(mean)±标准差(SD)表示。运用 SAS 8.0 软件统计, 采用单因素方差分析 (ANOVA) 进行显著性差异分析 (P < 0.05)。数据图由 Origin 8.0 软件完成。

2 结果与讨论

2.1 肉桂醛的抑菌性

表 1 肉桂醛对大肠杆菌及金黄色葡萄球菌的 DIZ、MIC 和 MBC

Table 1 Diameter of the inhibition zone (DIZ), minimum inhibitory concentration (MIC), and minimum bactericidal concentration (MBC) of cinnamaldehyde against *E. coli* and *S. aureus*

| 菌种 | DIZ/mm | MIC/(μL/mL) | MBC/(μL/mL) |
|---------|--------|-------------|-------------|
| 大肠杆菌 | 22±1 | 0.25 | 0.5 |
| 金黄色葡萄球菌 | 29±1 | 0.25 | 0.5 |

如表 1 所示, 肉桂醛对所选的两菌种均有良好的抑菌效果。肉桂醛作用于大肠杆菌和金黄色葡萄球菌时的抑菌圈大小分别为 21.75 mm 和 29.37 mm。另外, 肉桂醛对两种菌的最低抑菌浓度均为 0.25 μL/mL, 最低杀菌浓度均为 0.5 μL/mL, 这与 H. O. Kim 等^[11]的

结果相符。值得注意的是, 大肠杆菌对肉桂醛的耐受性要优于金黄色葡萄球菌, 其抑菌圈小于金黄色葡萄球菌, 这可能是由于革兰氏阴性菌 (大肠杆菌) 所存在的高脂多糖含量双层膜结构所致^[11], 这要比革兰氏阳性菌 (金黄色葡萄球菌) 的单层膜结构更能抵制肉桂醛的侵入。

2.2 肉桂醛的抑菌机理

2.2.1 扫描电镜

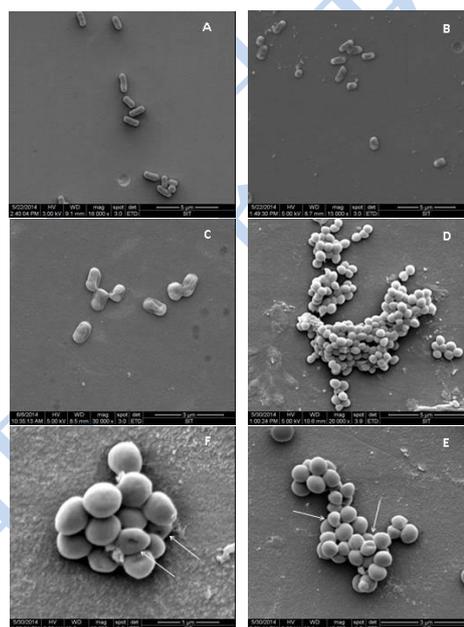


图 1 大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的扫描电镜图

Fig.1 Scanning electron microphotographs of *E. coli* and *S. aureus*

注: A、D 分别为大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的对照组; B、E 分别为大肠杆菌和金黄色葡萄球菌添加 1 MIC 浓度的肉桂醛组; C、F 分别为大肠杆菌和金黄色葡萄球菌添加 1 MBC 浓度的肉桂醛组。

大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的扫描电镜图如图 1 所示, 较为直观的表现出肉桂醛对菌体形态的影响。无肉桂醛添加的对照组中菌体细胞完整 (A、D), 胞膜平滑。当加入 1 MIC 浓度的肉桂醛时 (B、E), 大肠杆菌菌体细胞大量塌陷, 胞膜表面不平整, 金黄色葡萄球菌失去了圆滑的球状形态。当更大浓度 (1 MBC) 的肉桂醛作用于菌种时 (C、F), 菌体开始溶胀, 扭曲, 胞膜褶皱, 金黄色葡萄球菌菌体中间出现了凹陷, 形态遭到严重破坏。

肉桂醛具有疏水性, 可以透过细胞壁, 破坏细胞质膜的结构。正如结果所示, 肉桂醛破坏了胞膜的平滑形态, 使菌体细胞溶胀, 这种变化可能是由于肉桂醛引起了胞膜组分的溶解和转变^[12], 从而抑制菌种的

生长。扫描电镜图从形态学方面表明了肉桂醛的抑菌机理。

2.2.2 膜通透性

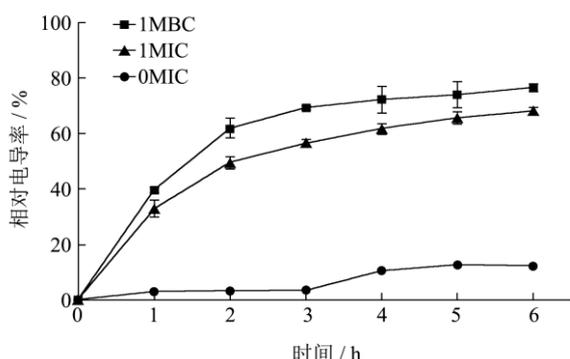


图2 肉桂醛对大肠杆菌膜通透性的影响

Fig.2 Effects of cinnamaldehyde on permeability of cell

membrane of *E. coli*

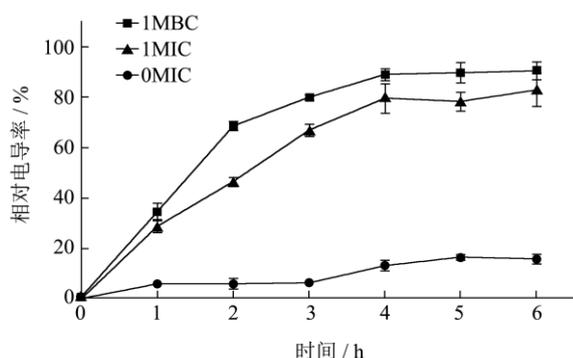


图3 肉桂醛对金黄色葡萄球菌膜通透性的影响

Fig.3 Effects of cinnamaldehyde on permeability of the *S.*

aureus cell membrane

菌悬液中相对电导率的变化反映肉桂醛对菌体膜通透性的影响,如图2、3所示,与肉桂醛反应的前4个小时,菌液中相对电导率迅速增大,之后,增长趋于平缓,相对电导率稳定。并且,相对电导率随着肉桂醛浓度的增加而增大。金黄色葡萄球菌的相对电导率要略高于大肠杆菌的相对电导率。

菌体细胞质膜形成一道屏障,可允许 K^+ 、 Na^+ 、 H^+ 等小分子物质通过,这些小分子在维持胞膜功能、酶活性和菌体正常代谢方面起到至关重要的作用。这种对小分子物质的渗透作用受控于膜结构和成分^[13]。肉桂醛作用于胞膜,使这种离子稳态遭到破坏,电解质的大量泄漏瓦解了细胞质膜的屏障,影响菌体的代谢,最终导致菌体死亡。0 MIC 浓度的曲线在 3h 之后略有升高,可能是由于正常菌体的细胞自身溶解和死亡所致。

2.2.3 膜完整性

菌体核酸、蛋白质等内溶物质的释放可表明肉桂醛对菌体膜完整性的影响,测定结果如表2所示。加

入了 1 MIC 浓度的肉桂醛后,大肠杆菌和金黄色葡萄球菌在 260 nm 下的吸光度迅速增大,由空白组 (0 MIC) 的 0.01 分别增至 0.22、0.38,当加入更大浓度的肉桂醛 (1 MBC) 后,增长趋势继续加大,大肠杆菌和金黄色葡萄球菌分别增至 0.47、0.72。蛋白质的释放趋势同核酸,肉桂醛的加入使悬液中蛋白质含量成倍数增长,较空白组的 6.01、10.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$,两种受试菌悬液中的蛋白质分别增加了 4.5、4.6 倍 (1 MIC) 和 11.3、8.9 倍 (1 MBC)。此内溶物质释放趋势与 Suxia Shen 等^[14]的结果相同。

表2 肉桂醛对大肠杆菌及金黄色葡萄球菌的内溶物释放影响

Table 2 Effect of cinnamaldehyde on cellular constituent release from *E. coli* and *S. aureus*

| 菌种 | 肉桂醛浓度 | 核酸($A_{260\text{nm}}$) | 蛋白质/ $(\mu\text{g}/\text{mL})$ |
|---------|-------|------------------------------|--------------------------------|
| 大肠杆菌 | 0 MIC | 0.01 \pm 0.00 ^c | 6.01 \pm 1.00 ^c |
| | 1 MIC | 0.22 \pm 0.01 ^b | 32.78 \pm 4.05 ^b |
| | 1 MBC | 0.47 \pm 0.11 ^a | 73.76 \pm 4.43 ^a |
| 金黄色葡萄球菌 | 0 MIC | 0.01 \pm 0.01 ^c | 10.01 \pm 2.98 ^c |
| | 1 MIC | 0.38 \pm 0.00 ^b | 56.19 \pm 0.51 ^b |
| | 1 MBC | 0.72 \pm 0.02 ^a | 99.56 \pm 4.22 ^a |

注:同种菌的一组数中不同小写字母代表数值间差异显著, $P < 0.05$ 。

细胞膜的完整性是菌体正常生长代谢的一个主要影响因素。核酸、蛋白质类的大分子物质贯穿于整个胞膜和胞质当中,是重要的单位结构物质^[7],核酸、蛋白质的释放则表明细胞膜完整性遭到了破坏,本实验中,从此方面阐述肉桂醛的抑菌机理。不同浓度的肉桂醛作用于胞膜,损坏了完整的细胞膜,致使核酸、蛋白质大量泄漏,影响细胞的正常生长,从而抑制了细菌的繁殖。

2.2.4 膜电位

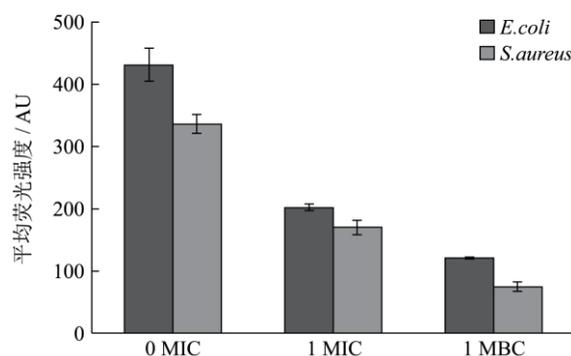


图4 肉桂醛对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌膜电位的影响

Fig.4 Effect of cinnamaldehyde on the membrane potential of *E.*

coli and *S. aureus*

大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的膜电位大小由罗丹明 123 的荧光强度表示,结果如图4,空白组 (0 MIC)

中大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的平均荧光强度分别为429.7 AU、336 AU, 加入1 MIC浓度的肉桂醛后, 菌液中平均荧光强度迅速降低, 两种菌种分别下降了53.11%、49.51%。继续加大肉桂醛浓度达到1 MBC时, 大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的平均荧光强度分别下降了72.07%、77.87%。另外, 金黄色葡萄球菌的平均荧光强度低于大肠杆菌。

膜电位, 是细胞膜内外两边的电位差, 是反映菌体细胞代谢和生命活力的重要指标, 作为质子动能势的一部分参与ATP的合成^[10]。正常细胞膜两侧会形成不同浓度的离子电位, 肉桂醛则引起细胞膜电位去极化, 膜电位降低。罗丹明123是一种亲脂性阳离子荧光物质, 依靠跨膜电位进入细胞基质。罗丹明123的荧光强度大小可反映膜电位的变化。罗丹明123通过跨膜电位进入正常的菌体细胞, 肉桂醛的加入破坏了菌体细胞的膜电位, 使罗丹明123释放出来, 平均荧光强度迅速降低。结果表明肉桂醛降低细胞膜电位, 影响菌体细胞的代谢活性, 从而抑制其生长。

3 结论

绿色, 健康, 无化学防腐剂添加的天然食品已盛行全球, 越来越多的人青睐于天然、安全的食品。肉桂醛作为提取于肉桂中的天然物质, 具有良好的抑菌效果, 正好迎合了这种趋势。本文选择肉桂醛做抑菌物质, 研究了肉桂醛作用于大肠杆菌和金黄色葡萄球菌时的抑菌性, 得出结果: 肉桂醛对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌有很好的抑菌效果, 其最低抑菌浓度均为0.25 $\mu\text{L/mL}$, 最低杀菌浓度均为0.5 $\mu\text{L/mL}$, 抑菌圈大小分别为21.75 mm、29.37 mm。另外, 本文从多方面阐述了肉桂醛的抑菌机理: 扫描电镜图显示出肉桂醛破坏了菌体细胞的形态, 细胞表面褶皱, 胞体扭曲, 凹陷; 肉桂醛影响了菌体胞膜的通透性, 小分子物质泄漏, 离子稳态瓦解; 由于肉桂醛的作用, 胞膜完整性遭到破坏, 大量核酸、蛋白质释放, 菌体生长繁殖受阻; 肉桂醛降低菌体细胞膜电位, 影响细菌的新陈代谢活性, 最终导致其死亡。本实验为将肉桂醛作为高效、低成本的抑菌剂, 更好的应用于食品产业提供了理论依据。为了更有针对性的利用肉桂醛抑制食品腐败菌, 还需要进行肉桂醛对不同菌种的深入研究。

参考文献

[1] H O Kim, S W Park, H D Park. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by cinnamic aldehyde purified from *Cinnamomum cassia* shoot [J]. Food Microbiology, 2004, 21(1): 105-110

[2] Esmail Abdollahzadeh, Masoud Rezaei, Hedayat Hosseini. Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat [J]. Food Control, 2014, 35(1): 177-183

[3] P Goñ, P López, C Sánchez. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils [J]. Food Chemistry, 2009, 116(4): 982-989

[4] Sara Burt. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review [J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 94(3): 223-253

[5] Mehmet Unlue, Emel Ergene, Gulhan Vardar Unlu, et al. Composition, antimicrobial activity and *in vitro* cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae) [J]. Food and Chemical Toxicology, 2010, 48(11): 3274-3280

[6] Nutch Sanla-Ead, Anuvat Jangchud, Vane Chonhenchob, et al. Antimicrobial activity of cinnamaldehyde and eugenol and their activity after incorporation into cellulose-based packaging films [J]. Packaging Technology and Science, 2012, 25(1): 7-17

[7] Ajay Sharma, Vivek K, Bajpai, Kwang-Hyun Baek. Determination of antibacterial mode of action of *Allium Sativum* essential oil against foodborne pathogens using membrane permeability and surface characteristic parameters [J]. Journal of Food Safety, 2013, 33(2): 197-208

[8] Wen-Rui Diao, Qing-Ping Hu, Hong Zhang, et al. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill) [J]. Food Control, 2014, 35(1): 109-116

[9] Fei Lv, Hao Liang, Qipeng Yuan, et al. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms [J]. Food Research International, 2011, 44(9): 3057-3064

[10] David Novo, Nancy G Pelmutter, Richard H Hunt, et al. Accurate flow cytometric membrane potential measurement in bacteria using diethyloxycarbocyanine and a ratiometric technique [J]. Cytometry, 1999, 35: 55-63

[11] Anis Ben Hsouna, Mohamed Trigui, Riadh Ben Mansour, et al. Chemical composition, cytotoxicity effect and antimicrobial activity of *Ceratonia siliqua* essential oil with preservative effects against *Listeria* inoculated in minced beef meat [J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 148(1): 66-72

[12] Souren Paul, R C Dubey, D K Maheswari, et al.

Trachyspermum ammi (L) fruit essential oil influencing on membrane permeability and surface characteristics in inhibiting food-borne pathogens [J]. Food Control, 2011, 22(5): 725-731

[13] Sean D cox, Cindy M Mann, Julie L Markham, et al. Determining the antimicrobial actions of tea tree oil [J].

Molecules, 2001, 6: 87-91

[14] Suxia Shen, Tiehua Zhang, Yuan Yuan, et al. Effects of cinnamaldehyde on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* membrane [J]. Food Control, 2015, 47: 196-202

现代食品科技