

# 大蒜乙醇提取物对几种腐败菌的抑制作用

肖香, 王瑶, 姜松, 周慧, 支竹伟, 董英

(江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212013)

**摘要:** 以肴肉中 3 株特定腐败菌屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*)、中间耶尔森菌 (*Yersinia intermedia*) 和清酒乳杆菌 (*Lactobacillus sakei*) 为受试菌, 采用大蒜提取物与茶多酚的复合物为抑制剂, 研究其对三株腐败菌的抑制机制。结果表明, 以 0.84 mg/mL 的复合物处理即可破坏 3 株菌的细胞超微结构, 从而使处理 10 h 后的 3 株菌电导率显著增加, 均大于 14 ms/cm; 使处理 2 h 后的三株菌 PI 染色率均显著提高, 分别为 36.34% (对照为 0.42%)、99.64% (对照为 3.72%) 和 92.95% (对照为 28.67%); 并使三株菌的细胞膜上硬脂酸含量及胞内苹果酸含量显著变化, 但仅使屎肠球菌胞内蛋白合成发生改变。研究表明, 大蒜提取物与茶多酚复合物通过破坏三株腐败菌的细胞膜和 DNA 结构, 进而改变其胞内外的正常代谢, 最终导致腐败菌的抑制或死亡。大蒜提取物-茶多酚复合物的抑菌机制尚需深入研究。

**关键词:** 肉; 抑菌剂; 特定腐败菌; 抑菌机制

文章编号: 1673-9078(2013)12-2894-2900

## Antibacterial Mechanism of Garlic Extract Against Specific Spoilage Organisms

XIAO Xiang, WANG Yao, JIANG Song, ZHOU Hui, ZHI Zhu-wei, DONG Ying

(School of Food & Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

**Abstract:** The antibacterial mechanism of garlic extract-tea polyphenones complex against 3 strains of specific spoilage organisms (SSOs) -*Enterococcus faecium*, *Yersinia intermedia* and *Lactobacillus sakei* in meat was studied. The results showed that the complex destroyed SSOs cell ultra-structure at a concentration of 0.84 mg/mL and the conductivities of three strains were more than 14 ms/cm which significantly increased than controls after treating 10 h. PI dyeing rates of the three strains raised obviously, being of 36.34% (control 0.42%), 99.64% (control 3.72%) and 92.95% (control 28.67%), respectively, after 2 h complex treatment. The contents of stearic acid in the cytomembrane and intracellular malic acid were also changed much. For the intracellular protein synthesis, only *Enterococcus faecium* was changed. This research showed that, the garlic extract-tea polyphenones complex could destroy the cell membrane and DNA structure of the strains of SSOs, thus changed the normal metabolisms of the intra- and extra-cellular, and eventually led to the spoilage bacteria inhibition or death. The inhibition mechanism of garlic extract-tea polyphenones complex still needs further study.

**Key words:** meat; antibacterial extracts; specific spoilage organism; antibacterial mechanism

真空包装水晶肴肉是引进现代肉制品加工技术生产的一种凝胶型低温肉制品, 在其加工过程中由于原、辅材料种类较多, 来源不同, 且营养丰富, 加之加工过程没有高温杀菌, 极易造成微生物污染, 从而导致产品出现质量问题。这不仅限制了真空包装水晶肴肉产品的货架期及其销售半径, 也影响了肴肉加工企业的生产规模<sup>[1]</sup>。而解决该问题的关键是建立以真空包

收稿日期: 2013-09-21

基金项目: 镇江市科技支撑计划-社会发展 (SH2011015); 江苏省高效优势学科建设项目

作者简介: 肖香 (1980-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向为食品营养与安全

通讯作者: 董英 (1962-), 女, 教授, 研究方向为食品营养与安全

装水晶肴肉中腐败微生物为核心的研究方法与控制技术。课题组前期完成了真空包装水晶肴肉中特定腐败菌 (*Specific spoilage organism*, SSO) 的分离鉴定工作, 得到了 4 °C 贮藏期间的 3 株 SSO: 屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*)、中间耶尔森菌 (*Yersinia intermedia*)、和清酒乳杆菌 (*Lactobacillus sakei*)<sup>[2,3]</sup>; 同时, 课题组前期研究工作发现, 将大蒜提取物和茶多酚复配所得的复合物对 3 株 SSO 的抑菌效果最好。

目前对大蒜提取物抑菌机制的研究主要集中在大蒜素上<sup>[4]</sup>, 关于大蒜粗提物抑菌机制的研究较少。大多数研究认为大蒜素的广谱抗菌作用是由于其对多种巯基依赖性酶系统存在多重抑制效应<sup>[5-6]</sup>。近年来也有部分学者致力于茶多酚对食品中的部分腐败菌和致病

菌的研究。关于茶多酚的抑菌机理目前尚不明确,一般认为是多种因素共同作用的结果<sup>[7-8]</sup>。由于不同种类天然产物其抑菌作用机制不同,且不同种类的微生物其组成和特性也不同,因此尚没有一个能涵盖所有天然产物抑菌作用机制的成熟理论。此外,目前国内外对于复合生物抑菌剂的作用机制尚不完全明了,亦未见比较系统的研究报道。因此,本文拟以肴肉中的3株SSO为研究对象,探讨大蒜提取物-茶多酚复合物对其生长特性、形态、细胞壁完整性、细胞膜的通透性和完整性、胞内蛋白质合成、脂肪酸组成及有机酸代谢等方面的影响,为揭示大蒜提取物-茶多酚复合物作用机制提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

受试菌株屎肠球菌、中间耶尔森菌及清酒乳杆菌均为本实验室分离鉴定;大蒜、购自大润发超市镇江店;98%茶多酚购自湖州荣凯植物提取有限公司;氯化钠、大豆蛋白胨、胰蛋白胨等均为BR级,购自中国医药(集团)上海化学试剂有限公司。

### 1.2 仪器及设备

LA-20 高效液相,日本岛津公司;微生物快速鉴定系统,美国MIDI公司;荧光显微镜,上海天达仪器有限公司;DDSF-380F电导率仪,上海精密科学仪器有限公司;Nanodrop超微量分光光度计,美国Thermo Fisher公司;Gallios流式细胞分析仪,美国Beckman公司;垂直蛋白质电泳仪,美国Biorad公司;JSM-7001F扫描电镜,日本电子株式会社;凝胶成像系统 美国Alpha Innotech公司;5430R高速冷冻离心机 德国Eppendorf公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 大蒜提取物-茶多酚复合物的制备

取破碎后的大蒜100g,加100mL20%乙醇于室温下经200W、40kHz超声波辅助提取30min,过滤经旋转蒸发浓缩后定容至100mL;称取2g茶多酚溶解于100mL95%乙醇中,于65℃下经200W、40kHz超声波辅助提取35min,过滤经旋转蒸发浓缩后定容至100mL;将大蒜提取液和茶多酚按体积比1:1复配,并对所得的大蒜提取物-茶多酚复合物进行稀释,控制复合物的终浓度分别为0.42mg/mL(前期试验测定所得的对3株SSO的最低抑菌浓度,Minimum Inhibitory Concentration, MIC)及0.84mg/mL(2MIC)。

#### 1.3.2 受试菌悬液的制备

分别采用营养琼脂PCA培养基(中间耶尔森菌)、MRS培养基(屎肠球菌及清酒乳杆菌)对受试菌进行培养。受试菌株于相应液体培养基中37℃下150r/min摇床培养8h,调整细菌的终浓度约为 $10^6$ cfu/mL。将不同抑菌浓度的大蒜提取物-茶多酚复合物加入到菌悬液中,37℃下150r/min摇床培养,以蒸馏水代替提取物作为对照组。

#### 1.3.3 细胞形态观察

将培养至对数生长期(通过测定3株SSO的生长曲线可知,屎肠球菌、中间耶尔森菌及清酒乳杆菌分别于培养2h、2h及1h后进入对数生长期,12h、12h及8h后进入稳定期)的受试菌株于3000r/min离心5min,弃上清,用生理盐水洗涤菌体三次并用生理盐水重新悬浮,调节菌体浓度为 $10^8$ cfu/mL。在制得的菌悬液中加入2MIC的大蒜提取物-茶多酚复合物,以蒸馏水代替提取物作为对照组,置于37℃下孵育6h。用2.5%戊二醛固定2h后涂片,载玻片预先用APES处理。固定后的载玻片分别用20%、40%、60%、80%、95%和100%的乙醇梯度脱水,之后置于真空干燥箱中烘干过夜。取干燥后的载玻片喷金镀膜,扫描电镜下观察,拍照。

#### 1.3.4 碱性磷酸酶的测定

分别于0、2、4、6、8、10h从受试菌悬液中取出定量培养液,6000r/min离心10min,按碱性磷酸酶试剂盒方法测定上清液中碱性磷酸酶(AKP)的含量。

#### 1.3.5 电导率的测定

分别于0、2、4、6、8、10h从受试菌悬液中取出定量培养液,6000r/min离心10min,测定上清液的电导率值。

#### 1.3.6 细胞损伤率的测定

取培养至对数生长后期的待测菌液,加入2MIC的大蒜提取物-茶多酚复合物,以蒸馏水代替提取物作为对照组。37℃下150r/min摇床培养2h,3000r/min离心5min弃上清,用生理盐水洗涤菌体两次并用生理盐水重新悬浮于同体积的碘化丙啶(propidium iodide, PI)染液中(PI终浓度为50μg/mL),置于4℃避光孵育30min后,离心,PBS洗去多余的PI,再用1mL PBS重悬,过300目筛后上流式细胞仪检测PI染色率。设置未经PI染色的菌悬液为阴性对照,以经过热处理(70℃,10min)后染色的菌悬液为阳性对照。

#### 1.3.7 SDS-PAGE电泳

取培养至对数生长后期的待测菌液,加入2MIC

浓度的大蒜提取物-茶多酚复合物,以蒸馏水代替提取物作为对照组。37℃下150 r/min 摇床培养6 h,稀释成相同的吸光度值后取样10 mL于3000 r/min离心5 min,然后用生理盐水洗涤两次,沸水浴10 min,取出后剧烈震荡,10000 r/min离心5 min,取上清液进行SDS-PAGE电泳(分离胶浓度15%,浓缩胶浓度5%),染色、脱色后观察菌体蛋白质表达情况。

### 1.3.8 脂肪酸组成的测定

按照MIDI微生物快速鉴定系统说明书进行。

### 1.3.9 有机酸的测定

有机酸的提取:取培养至对数生长后期的待测菌液,加入2 MIC浓度的大蒜提取物-茶多酚复合物,以蒸馏水代替提取物作为对照组。37℃下150 r/min摇床培养6 h,稀释成相同的吸光度值后取样10 mL于3000 r/min离心5 min,弃上清,沉淀用生理盐水洗涤两次后沸水浴10 min,取出后剧烈震荡,并将其于10000 r/min离心5 min,取上清液过0.22 μm微孔膜过滤后测定上清液中有有机酸生成情况。

色谱条件:色谱柱Hypersil ODS C18柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm);流动相采用乙腈/水/三氟乙酸=5/95/0.1(V/V/V);检测波长为紫外220 nm;流速1.0 mL/min;柱温为30℃。

### 1.4 数据分析

所有试验数据均重复三次,结果以 $\bar{X} \pm SD$ (平均值±标准偏差)表示。采用SPSS 14.0对试验数据进行方差分析,处理间比较采用单因素方差分析(完全随机模型),多重比较采用Tukey法, $p < 0.05$ 即认为存在显著性差异。

流式细胞仪测定的数据采用该仪器自带软件对结果进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 大蒜提取物-茶多酚复合物对SSO细胞形态的影响

采用2 MIC的大蒜提取物-茶多酚复合物对不同受试菌处理后,对其细胞显微结构的影响见图1。经复合物处理后的中间耶尔森菌及清酒乳杆菌,细胞形态扭曲变形,菌体变得细长,细胞表面凹陷,细胞壁和细胞膜发生分离,且细胞内有明显内容物外渗;经复合物处理的屎肠球菌,复合物处理前后细胞形态饱满,细胞表面有粗糙变得十分光滑。这可能是由于复

合物中的活性物质抑制了屎肠球菌细胞壁上荚膜等物质的形成。因为正常细胞膜的外表面会有一层由蛋白质与多糖结合形成糖蛋白,当这种糖蛋白具有一定外形并稳定附着于细胞壁外就形成荚膜,荚膜会使细胞壁的外表面粗糙。荚膜对细胞往往具有一定的保护作用,它在细胞生命活动中具有重要的功能。

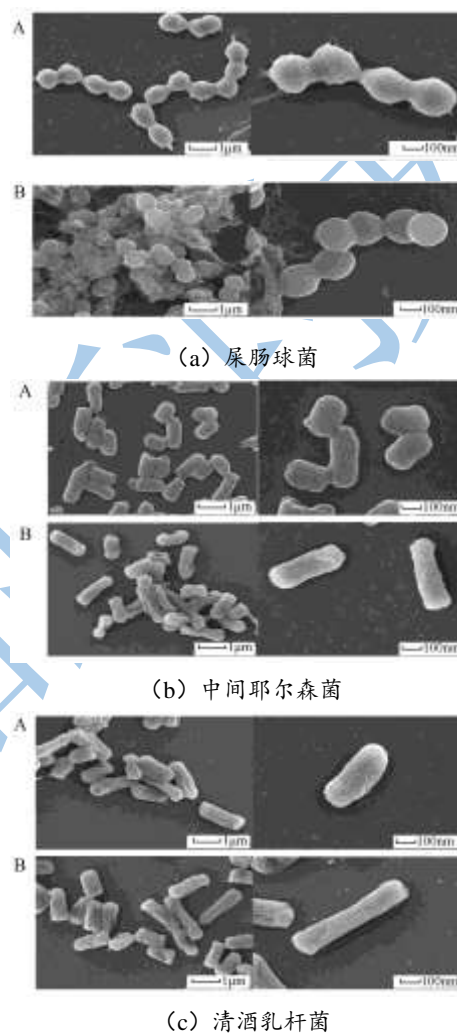


图1 大蒜提取物-茶多酚复合物对SSO细胞形态的影响

Fig.1 Effects of the complex on cellular morphology against different microorganisms

注: a-屎肠球菌, b-中间耶尔森菌, c-清酒乳杆菌;图中A组为对照组, B组为大蒜提取物-茶多酚复合物处理组。

很多抑菌剂对微生物的作用主要是影响细胞壁的形成<sup>[9]</sup>,抑菌剂通过抑制细菌细胞壁中多糖的合成,或者与多糖及糖蛋白相结合的机制破坏细胞壁结构,达到抑制或杀灭细菌的目的。由细胞形态的图片可以判断大蒜提取物-茶多酚复合物能够改变中间耶尔森菌及清酒乳杆菌细胞壁的完整性,可以造成细胞发生壁膜分离,且能导致细胞内容物的外泄,从而对细胞的存活率有一定的影响;能够抑制屎肠球菌细胞壁荚

膜的生物合成从而会影响其生理活性。

## 2.2 大蒜提取物-茶多酚复合物对 SSO 细胞壁

### 完整性的影响

大蒜提取物-茶多酚复合物对不同受试菌悬液胞外碱性磷酸酶含量影响见图 2。碱性磷酸酶位于菌体细胞的细胞壁和细胞膜之间,通常情况下不向外分泌,只有当菌体细胞壁的完整性发生改变后,碱性磷酸酶才会将其释放到菌体细胞体外。因此菌液中碱性磷酸酶含量的变化可以反映出大蒜提取物-茶多酚复合物是否影响菌体细胞壁的完整性。由于颜色的深浅和样品中的碱性磷酸酶呈正相关,因此用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度 (OD 值) 可直接反映样品中碱性磷酸酶的含量变化。

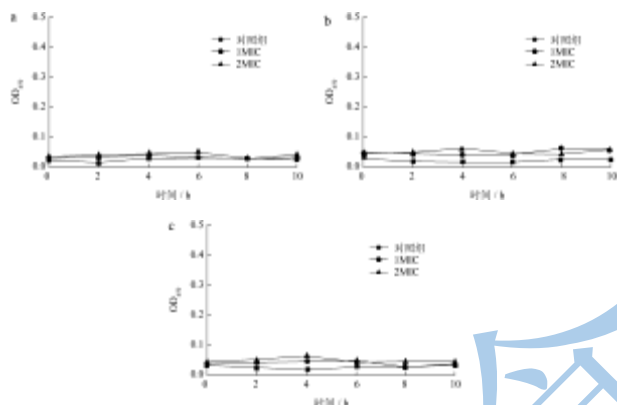


图2 大蒜提取物-茶多酚复合物对 SSO 胞外碱性磷酸酶含量的影响

Fig.2 Effects of the complex on AKP contents against different microorganisms

注: a-屎肠球菌, b-中间耶尔森菌, c-清酒乳杆菌。

由图 2 可知,大蒜提取物-茶多酚复合物处理受试菌后,对照组和处理组在整个培养周期内,菌体胞外检测到的碱性磷酸酶的含量均维持在较低的水平 (OD<sub>450</sub> 值均低于 0.1),这说明释放到菌体胞外的碱性磷酸酶的数量很少,因此可以推测大蒜提取物-茶多酚复合物对受试菌株细胞壁的完整性影响较弱。

## 2.3 大蒜提取物-茶多酚复合物对 SSO 细胞膜

### 通透性的影响

大蒜提取物-茶多酚复合物对不同受试菌悬液胞外电导率的影响见图 3。由图可知,在整个培养周期内,对照组的电导率基本保持不变,处理组的电导率均随着时间的延长而增加。对于屎肠球菌,复合物处理 2 h 后胞外电导率即显著高于对照组 ( $p < 0.05$ ), 2

MIC 组在处理 6 h 后胞外电导率显著高于 1 MIC 组,处理 10 h 后对照组的电导率为 11.47 ms/cm,而 2 MIC 组的电导率达到了 15.03 ms/cm;对于中间耶尔森菌而言,复合物处理 6 h 后胞外电导率电导率即显著高于对照组 ( $p < 0.05$ ), 1 MIC 组在处理 6 h 后胞外电导率显著高于 2 MIC 组,处理 10 h 后对照组的电导率为 11.60 ms/cm,而 2 MIC 组的电导率达到了 14.33 ms/cm;对于清酒乳杆菌而言,复合物处理 6 h 后胞外电导率即显著高于对照组 ( $p < 0.05$ ), 2 MIC 组在处理 6 h 后胞外电导率显著高于 1 MIC 组,处理 10 h 后对照组的电导率为 11.53 ms/cm,而 2 MIC 组的电导率达到了 14.52 ms/cm。

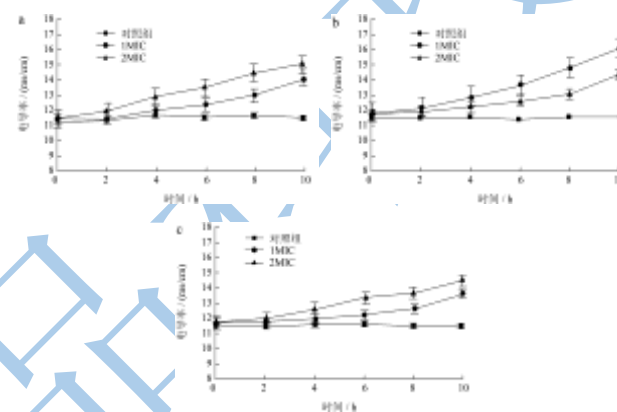


图3 大蒜提取物-茶多酚复合物对 SSO 电导率的影响

Fig.3 Effects of the complex on electrical conductivity against different microorganisms

注: a-屎肠球菌, b-中间耶尔森菌, c-清酒乳杆菌。

1 MIC 对中间耶尔森菌电导率影响更明显,而 2 MIC 对屎肠球菌及清酒乳杆菌的电导率影响更明显,这可能是由于不同菌株之间细胞结构的差异性造成的。对于中间耶尔森菌而言,2 MIC 组可能由于活性物质浓度达到一定程度后会发生聚集现象导致其不能顺利通过细胞膜,影响了活性物质的作用效果,从而使  $K^+$  等电解质不能大量外泄,因而电导率反而出现下降。KONG Ming 等人也曾通过研究发现壳聚糖对大肠杆菌胞外电导率的影响与壳聚糖的抑菌效果并不总是相关<sup>[10]</sup>。

细胞膜是细菌的保护屏障,当微生物处于不利的环境中或受到药物毒害时,菌体的保护屏障会被打破,导致细胞膜的流动性降低和半透性丧失,此时细胞内的  $K^+$  等电解质会大量外泄,造成培养液电导率的改变,因此电导率的变化可以反映细胞膜通透性的变化。在整个培养周期内,受试菌的电导率均随着时间的延长而增加,这说明大蒜提取物-茶多酚复合物对受试菌株的杀菌能力可能是由于微生物细胞膜通透性的改变造成的。

## 2.4 大蒜提取物-茶多酚复合物对 SSO 细胞损伤率的影响

通过电镜及电导率的检测结果可以确定大蒜提取物-茶多酚复合物能够作用于细菌的细胞膜,致使细胞膜的通透性增加从而引起细菌的死亡。然而并不能有效揭示大蒜提取物-茶多酚复合物破坏不同受试菌细菌膜结构的作用效力。为了进一步揭示大蒜提取物-茶多酚复合物对于受试菌细胞膜完整性的损伤情况,我们选择 PI 细胞活性染色试剂对细胞进行检测。PI 是一种阳离子核酸染料,正常情况下不能进入具有完整细胞膜的活细胞,只有细菌在死亡或凋亡的情况下,生物膜的完整性被破坏后,PI 才能掺入细胞的双链核苷酸中。进入细胞内的 PI 增多,荧光强度就会增强,根据发出荧光的强弱即 PI 染色率即可判断其细胞膜受损伤的程度,从而间接反映细胞的损伤状态。

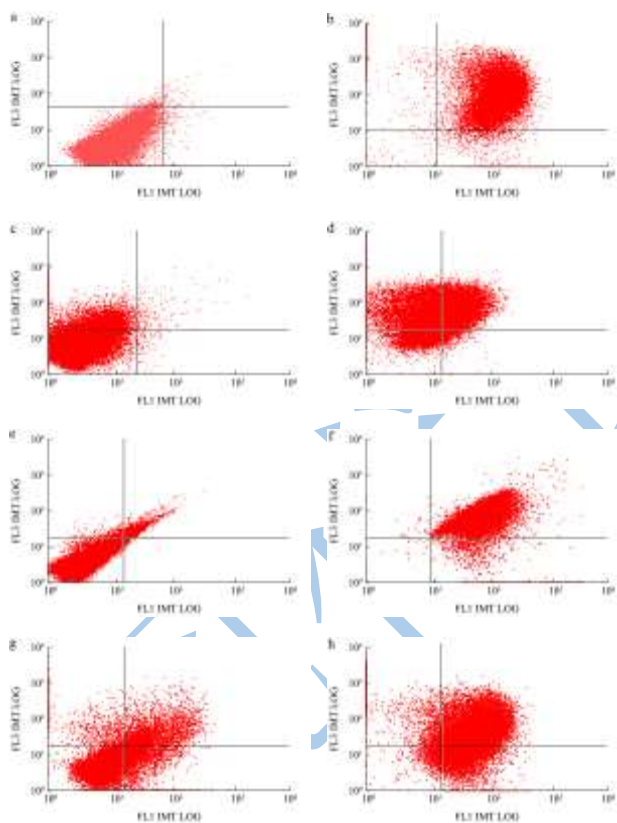


图4 大蒜提取物-茶多酚复合物处理 SSO 的 PI 单染后流式细胞仪检测结果

### Fig.4 PI dying of complex treatment and the control

注: a: 对照, b: 阳性对照, c: 屎肠球菌对照组, d: 屎肠球菌处理组, e: 中间耶尔森菌对照组, f: 中间耶尔森菌处理组, g: 清酒乳杆菌对照组, h: 清酒乳杆菌处理组; 左上象限为实验误差, 左下象限为正常细胞, 右上象限为细胞早期凋亡, 右下象限为细胞晚期凋亡。

由图4可知,未经处理的屎肠球菌细胞 PI 染色率为 0.42%, 大蒜提取物-茶多酚复合物处理 2 h 后屎肠球菌细胞 PI 染色率为 36.34%; 未经处理的中间耶尔森菌细胞 PI 染色率为 3.72%, 大蒜提取物-茶多酚复合物处理 2 h 后中间耶尔森菌细胞 PI 染色率为 99.64%; 未经处理的清酒乳杆菌细胞 PI 染色率为 28.67%, 大蒜提取物-茶多酚复合物处理 2 h 后清酒乳杆菌细胞 PI 染色率为 92.95%。

因此可以推断大蒜提取物-茶多酚复合物对不同受试菌细胞膜的完整性均有破坏作用,其中对 G<sup>-</sup>菌(中间耶尔森菌)的破坏作用要强于 G<sup>+</sup>菌(屎肠球菌、清酒乳杆菌); 两株 G<sup>+</sup>菌中对杆菌细胞膜的破坏作用要强于球菌。细胞膜可能是大蒜提取物-茶多酚复合物作用的重要靶点之一。

## 2.5 大蒜提取物-茶多酚复合物对 SSO 蛋白质合成的影响

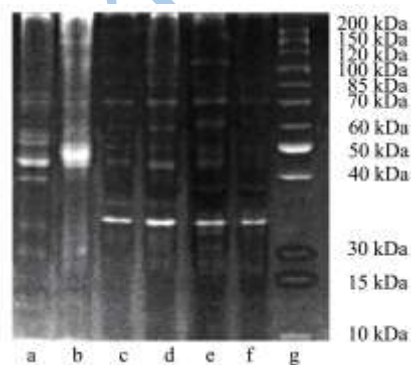


图5 大蒜提取物-茶多酚复合物处理 SSO 的蛋白质 SDS-PAGE 电泳

### Fig.5 SDS-PAGE of different microorganisms after treating with the complex

注: a: 屎肠球菌的对照组, b: 屎肠球菌的处理组, c: 中间耶尔森菌的对照组, d: 中间耶尔森菌的处理组, e: 清酒乳杆菌的对照组, f: 清酒乳杆菌的处理组, g: maker。

大蒜提取物-茶多酚复合物作用下不同微生物蛋白质的 SDS-PAGE 电泳如图5。对于杆菌中间耶尔森菌(图5c、图5d)和清酒乳杆菌(图5e、图5f)而言,大蒜提取物-茶多酚复合物处理后,蛋白质的含量和组成无明显变化;对于球菌屎肠球菌(图5a、图5b)而言,大蒜提取物-茶多酚复合物处理后,蛋白质的含量和组成发生了显著变化,表现为蛋白质的含量下降,种类减少。与处理前的样品(图5a)相比,处理后的样品(图5b)中 50 kDa 以下的多条蛋白质的谱带变淡甚至消失,并且在 40 和 50 kDa 之间有新的高浓度的蛋白质谱带产生。这说明大蒜提取物-茶多酚复合物

影响了屎肠球菌的蛋白组成。

据此推断,大蒜提取物-茶多酚复合物通过改变屎肠球体内某些关键的结构或功能蛋白合成产生对屎肠球菌的抑制作用;而对中间耶尔森菌和清酒乳杆菌的蛋白质合成却未见显著影响。其中的差异尚有待进一步研究。

### 2.6 大蒜提取物-茶多酚复合物对 SSO 脂肪酸组成的影响

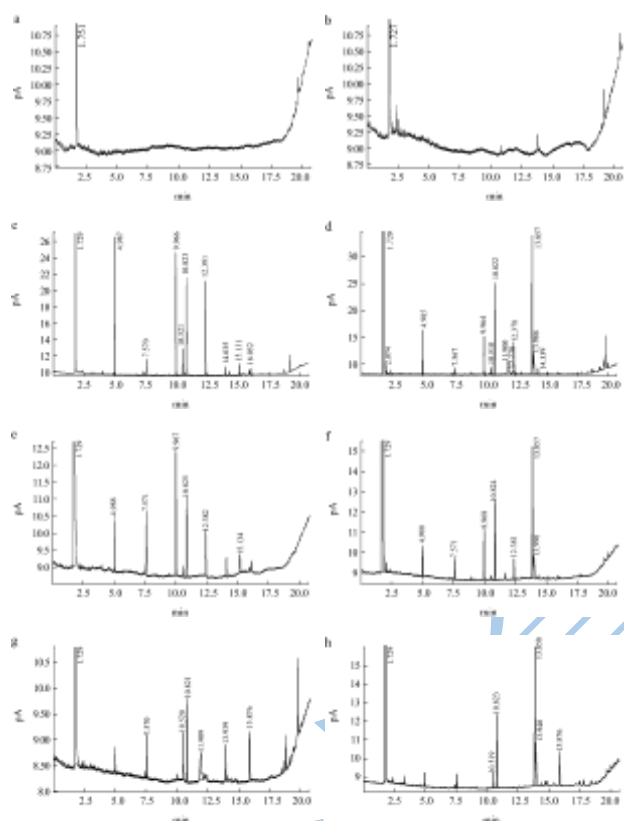


图6 大蒜提取物-茶多酚复合物处理 SSO 的脂肪酸组成

Fig.6 Fatty acid gas chromatogram after treating with the complex

注: a: 处理前的空白对照, b: 处理后的空白对照, c: 屎肠球菌对照组, d: 屎肠球菌处理组, e: 中间耶尔森菌对照组, f: 中间耶尔森菌处理组, g: 清酒乳杆菌对照组, h: 清酒乳杆菌处理组。

大蒜提取物-茶多酚复合物对不同微生物脂肪酸组成的影响如图6。由图可知,大蒜提取物-茶多酚复合物作用于受试菌株后,使样品中各脂肪酸的出峰时间和峰强度发生变化,这说明复合物处理后改变了3株SSO的脂肪酸组成。脂肪酸组成的一个重要变化为大蒜提取物-茶多酚复合物处理会导致细胞膜上饱和脂肪酸含量增加。如:复合物处理3株SSO后均产生了峰面积较大的保留时间为13.857的硬脂酸(图6d、6f、

6h)。

脂肪酸作为细菌细胞膜的重要组成成分对外界环境的变化十分敏感,常被用作评估微生物生存状态的指标<sup>[11]</sup>。细胞膜的膜脂结构对于维持细胞膜的功能及对细胞的生长繁殖也有着十分重要的作用。而细胞的膜脂结构与所含脂肪酸成分密切相关,脂肪酸组成的改变必然会影响到膜蛋白活性和膜功能<sup>[12]</sup>。通常细胞膜中的不饱和脂肪酸组分多少是与细胞膜的流动性相关的,饱和脂肪酸含量高,则会降低细胞膜的流动性。细胞膜的流动性是膜结构的基本特征之一,其改变可严重影响细胞功能特性和凋亡通道的诱导效应<sup>[13]</sup>。

大蒜提取物-茶多酚复合物对受试菌细胞膜上脂肪酸组成的影响进一步说明了细胞膜可能是其作用的重要靶点。

### 2.7 大蒜提取物-茶多酚复合物对 SSO 有机酸代谢的影响

表1 大蒜提取物-茶多酚复合物处理 SSO 的胞内有机酸含量的测定 (mmol/L)

Table 1 Organic acids in the cell-supernatants after treating with the complex						
菌株	苹果酸	乳酸	乙酸	柠檬酸	琥珀酸	富马酸
<i>E. faecium</i> s(CK)	0.00	2.15	2.44	0.72	0.94	0.02
<i>E. faecium</i> s(2MIC)	1.46	2.75	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Y. intermedia</i> (CK)	0.00	0.54	0.76	0.83	0.31	0.00
<i>Y. intermedia</i> (2MIC)	0.36	0.92	0.00	0.47	0.00	0.00
<i>L. sakei</i> (CK)	0.13	2.27	0.00	0.12	0.00	0.00
<i>L. sakei</i> (2MIC)	0.55	2.60	0.00	0.00	0.00	0.00

大蒜提取物-茶多酚复合物对不同微生物有机酸代谢的影响见表1。由表中可知,对照组样品中屎肠球菌和中间耶尔森菌胞内未检测到苹果酸,而2MIC处理组屎肠球菌胞内苹果酸的含量增加至而1.46 mmol/L,中间耶尔森菌胞内苹果酸的含量则增加至而0.36 mmol/L。此外,大蒜提取物-茶多酚复合物处理后也能够增加3株SSO胞内乳酸的含量,而乙酸、柠檬酸、琥珀酸和富马酸的含量则显著下降。

细胞代谢途径中,柠檬酸、琥珀酸和富马酸是三羧酸循环中的代谢产物,其含量甚至降低至无法检出,说明大蒜提取物-茶多酚复合物可能抑制三羧酸循环中柠檬酸合成酶等关键酶的活性,而三羧酸循环被抑制以后乳酸通过丙酮酸羧化支路积累苹果酸,因此导致代谢无法正常进行。大蒜提取物-茶多酚复合物抑制的关键酶还需进一步的试验验证。

### 3 结论

3.1 大蒜提取物-茶多酚复合物可以破坏三株 SSO 的细胞超微结构及细胞膜的完整性, 并可使细胞膜的通透性增加、流动性减弱, 且能改变细胞内有机酸的代谢。

3.2 大蒜提取物-茶多酚复合物对三株 SSO 的作用机制有所不同: 大蒜提取物-茶多酚复合物对中间耶尔森菌和清酒乳杆菌胞内蛋白质的合成无显著影响, 但能显著影响屎肠球菌胞内某些关键的结构或功能蛋白的合成。

3.3 大蒜提取物-茶多酚复合物对不同 SSO 蛋白质合成的具体差异及其抑制的三羧酸循环中的关键酶还需进一步的试验确证。

### 参考文献

- [1] Borch E, Kant-muemans M, Blixt Y. Bacterial spoilage of meat products and cured meat [J]. International journal of food microbiology, 1996, 33: 103-120
- [2] XIAO Xiang, DONG Ying, ZHU Ying, et al. Bacterial diversity analysis of Zhenjiang Yao meat during refrigerated and vacuum-packed storage by 454 pyrosequencing [J]. Current microbiology, 2013, 66(4): 398-405
- [3] 肖香,董英,祝莹,等.真空包装水晶肴肉加工及贮藏过程中的菌相研究[J].食品科学,2013,34(15):204-207  
XIAO Xiang, DONG Ying, ZHU Ying, et al. Bacterial Diversity of Vacuum-packed Zhenjiang Yao Meat during Different Process Stages and Refrigerated Storage [J]. Food Science, 2013, 34(15): 204-207
- [4] Ogita A, Fujita K, Taniguchi M, et al. Enhancement of the fungicidal activity of amphotericin B by allicin, an allyl-sulfur compound from garlic, against the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model system [J]. Planta medica, 2006, 72 (13): 1247-1250
- [5] Ogita A, Fujita K, Tanaka T. Enhancement of the fungicidal activity of amphotericin B by allicin: effects on intracellular ergosterol trafficking [J]. Planta medica, 2008, 75 (3): 222-226
- [6] Ogita A, Nagao Y, Fujita K, et al. Amplification of vacuole-targeting fungicidal activity of antibacterial antibiotic polymyxin B by allicin, an allyl sulfur compound from garlic [J]. The Journal of Antibiotics, 2007, 60 (8): 511-518
- [7] 钱丽红,陶妍,谢晶.茶多酚对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的抑菌机理[J].微生物学通报,2010,37(11):1628-1633  
QIAN Li-Hong, TAO Yan, XIE Jing. Antimicrobial Mechanisms of Tea Polyphenol Against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Microbiology, 2010, 37 (11): 1628-1633
- [8] Cho Y, Schiller N, Kahng H, et al. Cellular responses and proteomic analysis of *Escherichia coli* exposed to green tea polyphenols [J]. Current microbiology, 2007, 55 (6): 501-506
- [9] Campos D A, Ribeiro A C, Costa E M, et al. Study of antimicrobial activity and atomic force microscopy imaging of the action mechanism of cashew tree gum [J]. Carbohydrate polymers, 2012, 90(1): 270-274
- [10] KONG Ming, CHEN Xi-guang, LIU Cheng-sheng, et al. Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against *E. coli* [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2008, 65: 197-202
- [11] Bergé J P, Barnathan G. Fatty acids from lipids of marine organisms: molecular biodiversity, roles as biomarkers, biologically active compounds, and economical aspects [J]. Marine biotechnology I, 2005, 96: 49-125
- [12] Chapkin R S, Wang N, Fan Y Y, et al. Docosahexaenoic acid alters the size and distribution of cell surface microdomains [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2008, 1778 (2): 466-471
- [13] 邱小文,韦娜,蒋薇,等.n-6/n-3 多不饱和脂肪酸不同比例对乳腺癌细胞膜脂组成和膜功能的影响[J].实用医学杂志, 2012, 28(15):2493-2495  
QIU Xiao-wen, WEI Na, JIANG Wei, et al. Effects of different ratios of n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid on membrane lipid composition and membrane function in human breast cancer cell lines [J]. The Journal of Practical Medicine, 2012, 28 (15): 2493-2495