

DMDC联合Nisin对模拟果汁中肠膜状明串珠菌细胞膜功能的影响

郭换丽^{1,2}, 余元善¹, 吴继军¹, 徐玉娟¹, 肖更生¹, 温靖¹

(1. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 广东广州 510610)

(2. 江西农业大学生物科学与工程学院, 江西南昌 330045)

摘要: 本文研究了二甲基二碳酸盐(DMDC)和Nisin处理对模拟果汁中肠膜状明串珠菌的杀菌效果及其细胞膜功能的影响。结果表明: DMDC联合Nisin作用于该菌时的部分杀菌浓度指数为0.38, 小于0.50, 两者之间具有很好的协同杀菌作用。扫描电镜分析发现该菌经DMDC和Nisin处理后其细胞形态没有发生明显变化。该菌经DMDC处理后仅有个别菌体细胞的膜通透性出现增加, 而该菌经Nisin处理后, 约7%菌体细胞的膜通透性增加。Nisin处理虽能改变该菌的细胞膜通透性, 增加胞外极性物质的摄入, 但不能明显促进胞内物质的流失, 高浓度的DMDC处理能导致该菌溶液的紫外吸收值增加约60%。DMDC和Nisin两者对该菌细胞内物质的流失、细胞膜的通透性的增加和胞内pH的下降没有相互促进作用, 但DMDC和Nisin的联合作用能促进该菌细胞内脱氢酶的进一步失活。

关键词: 二甲基二碳酸盐; 肠膜状明串珠菌; 杀菌; 细胞膜

文章编号: 1673-9078(2015)2-19-25

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.2.004

Effect of Dimethyl Dicarbonate Combined with Nisin on Cell Membrane

Functions of *Leuconostoc mesenteroides* in Model Juice

GUO Huan-li^{1,2}, YU Yuan-shan¹, WU Ji-jun¹, XU Yu-juan¹, XIAO Geng-sheng¹, WEN-Jing¹

(1. Sericulture & Agri-food Research Institute GAAS, Guangzhou 510610, China)

(2. College of Bioscience and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: The effects of dimethyl dicarbonate (DMDC) and nisin treatment on the inactivation of *Leuconostoc mesenteroides* present in model juice and cell membrane functions were investigated. Combined treatment with DMDC and nisin had a fractional bactericidal concentration index of 0.38 (<0.5) against *L. mesenteroides*, indicating a strong synergistic bactericidal effect of DMDC and nisin. Scanning electron microscopy analysis showed no obvious changes in the cell morphology of *L. mesenteroides* treated with these antibacterial agents. Treatment with nisin alone increased the membrane permeability of approximately 7% of the cell population; this effect was stronger than that of treatment with DMDC alone. Despite this effect on membrane permeability and the resultant increase in the cellular uptake of extracellular polar substances, nisin treatment could not significantly reduce the loss of intracellular substances. The ultraviolet absorption value of *L. mesenteroides* cell suspension increased by approximately 60% after treatment with high concentrations of DMDC. To summarize, DMDC and nisin exhibited a synergistic effect on the inactivation of dehydrogenase activity in *L. mesenteroides*, but not on membrane permeability, loss of intracellular substances, and alteration of intracellular pH.

Key words: dimethyl dicarbonate; *Leuconostoc mesenteroides*; inactivation; cell membrane

二甲基二碳酸盐(Dimethyl dicarbonate, DMDC), 商品名为维果灵, 是我国食品添加剂使用标准中允许使用的一种果汁饮料防腐剂(INS号242), 对微生物

收稿日期: 2014-06-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(31401531); 国家“十二五”科技支撑计划课题(2012BAD31B03); 广州市科技计划项目(2014J4100188)

作者简介: 郭换丽(1987-), 女, 在读硕士生, 研究方向为食品微生物

通讯作者: 肖更生(1965-), 男, 研究员, 研究方向为农产品加工

的致死作用跟菌体内关键酶蛋白被DMDC修饰失活密切相关^[1-2]。在常温甚至低温条件下, DMDC对果汁饮料中很多污染菌具有较强的杀灭能力。果汁经DMDC杀菌处理后, 果汁的营养品质变化很小, 没有任何异味物质生成, 是一种很有潜力的果汁饮料非热杀菌技术^[3-4]。我国食品添加剂使用卫生标准规定DMDC可以在果蔬汁、碳酸饮料和茶饮料中使用, 最大添加量均为250 mg/kg^[2,5]。但研究发现, DMDC对

果汁饮料中不同污染菌的杀菌效果存在显著差异,某些乳酸菌对 DMDC 具有较强的耐受性,特别是肠膜状明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*),因此,果汁中单独添加 DMDC 的杀菌效果往往不理想^[3,6-7]。

肠膜状明串珠菌,在分类上属于乳酸菌群,不产芽孢,革兰氏阳性,微好氧,厌氧培养生长良好,呈异型乳酸发酵。前期研究发现,DMDC 联合 Nisin 对果汁中肠膜状明串珠菌具有协同增效杀菌作用^[8]。Nisin 是乳酸菌产生的一种有 34 个氨基酸组成的抗菌肽,在我国食品添加剂使用标准中可允许作为食品防腐剂(INS 号 234)使用,它也是 WHO 公认为最安全的抗菌肽。它能有效的抑制和杀灭果汁中 G⁺细菌的生长,特别是能形成芽孢的细菌。Nisin 的杀菌作用主要跟其能破坏目标菌细胞膜的正常功能有关^[9-10]。细胞膜是包裹于细胞表面,将细胞与外界微环境隔离的屏障,使之能相对独立于外界环境而存在;而且细胞膜上有许多参与细胞生理、生化等生命活动的酶和载体。因此,细胞膜结构的破坏必将导致细胞的死亡。目前,关于 DMDC 与 Nisin 协同杀菌作用的机制研究还未见报道。

本文以肠膜状明串珠菌为目标菌,研究 DMDC 和 Nisin 单独或联合处理后目标菌中细胞膜功能的变化,探明 DMDC 是否能通过促进 Nisin 与细胞膜的相互作用或 Nisin 能否通过促进 DMDC 与关键酶蛋白的作用而实现协同增效杀菌。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料

二甲基二碳酸盐,德国朗盛公司;乳酸链球菌素,浙江银象生物工程有限公司;技术琼脂粉、MRS 肉汤培养基等,广东环凯微生物科技有限公司;肠膜状明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*),实验室保藏;cFDASE 和 PI 等,阿拉丁试剂(上海)有限公司;其它化学试剂,均为国产分析纯。

1.1.2 主要仪器设备

生化培养箱 SPX-250B,上海佳胜实验设备有限公司;洁净工作台 SW-CJ-2FD,苏净集团苏州安泰空气技术有限公司;UV1800 型紫外可见分光光度计,日本岛津公司;BD FACS Aria II S 型流式细胞仪,美国 BD 公司;Cary Eclipse 型荧光分光光度计,美国 VARIAN 公司;S-3000N/H 型扫描电子显微镜,日立集团;TY88-II 超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司;电热恒温水浴锅 HWS24 型,上海

恒科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 含肠膜状明串珠菌的模拟果汁体系的制备

灭菌的 MRS 肉汤接种肠膜状明串珠菌后,在 30 °C 的恒温培养箱中静置培养 12 h,5000 r/min 离心 10 min,收集菌体沉淀;菌体沉淀用 pH7.0 的 PBS 缓冲液(50 mM 磷酸二氢钠,50 mM 磷酸氢二钠,pH7.0)洗涤 1 次,并重新用 pH7.0 的 PBS 缓冲液悬浮至终浓度为 10⁹ CFU/mL 的菌悬液备用。

模拟果汁体系(25 mM 柠檬酸,25 mM 磷酸氢二铵,50 mM 葡萄糖,pH4.5)经热巴氏灭菌处理(100 °C 处理 1 min)后冷却至常温,在无菌操作条件下向其接入适量的上述菌悬液即可。肠膜状明串珠菌在模拟果汁体系中的终浓度为 10⁵~10⁶ CFU/mL。

1.2.2 DMDC 和 Nisin 储备液的制备

将 DMDC 与无水乙醇按 1:1 混匀,配制成 50 % (m/v)的 DMDC 待用,其中使用 50% 酒精作为 DMDC 的空白对照。Nisin 采用 2% 的柠檬酸配置成 4% (m/v)的 Nisin 溶液,煮沸冷却之后放入 4 °C 冰箱内贮藏备用(在冰箱中保存不超过 6 d),其中使用 2% 的柠檬酸作为 Nisin 的空白对照。

1.2.3 DMDC 和 Nisin 对肠膜状明串珠菌的最低杀菌浓度和部分杀菌浓度指数的测定

使用二倍稀释法测定 DMDC 和 Nisin 单独作用时的最低杀菌浓度,DMDC 和 Nisin 使用的最高浓度分别为 500 mg/L 和 300 IU/mL。并采用棋盘稀释法测定模拟体系中 DMDC 联合 Nisin 作用对肠膜状明串珠菌的部分杀菌浓度指数。以 DMDC 或 Nisin 处理后模拟果汁体系中污染菌的残留量小于 10 CFU/mL 的最低浓度组为 DMDC 或 Nisin 最低杀菌浓度^[11-12]。

具体为:将已接入肠膜状明串珠菌的模拟果汁体系(25 °C)分装于无菌的 50 mL 测试管中,各管按二倍稀释法和棋盘稀释法的要求依次添加 DMDC 和 Nisin 储备液,充分混合均匀后,30 °C 下保持 3 h。3 h 后,采用稀释倒平板法(MRS 琼脂培养基)测定模拟果汁体系中肠膜状明串珠菌的残留量,平板置于 30 °C 的培养箱中培养 2~3 d,结果以每毫升果汁中菌落数的常用对数值表示。

1.2.4 DMDC 联合 Nisin 对肠膜状明串珠菌细胞膜功能影响的杀菌处理方式

基于 DMDC 和 Nisin 对肠膜状明串珠菌的最低杀菌浓度的测定结果,根据不同的 DMDC 和 Nisin 浓度组合,设计 6 个实验组。各个处理的组的具体设计如

下: 1) 对照组: 不添加 DMDC 和 Nisin; 2) DMDC 和 Nisin 联合处理组: 其浓度分别为 DMDC 和 Nisin 联合处理时的最小杀菌浓度; 3) DMDC 单独处理组 1: 其浓度为 DMDC 单独处理时的最小杀菌浓度; 4) DMDC 单独处理 2: 其浓度为 DMDC 和 Nisin 联合处理时 DMDC 的最小杀菌浓度; 5) Nisin 单独处理组 1: 其浓度为 Nisin 单独处理时的最小杀菌浓度; 6) Nisin 单独处理 2: 其浓度为 DMDC 和 Nisin 联合处理时 Nisin 的最小杀菌浓度。

具体为: 将已接入肠膜状明串珠菌的模拟果汁体系 (25 °C) 分装于无菌的测试瓶中, 各瓶要求依次添加不同浓度的 DMDC 和 Nisin 储备液, 充分混合均匀后, 30 °C 下保持 3 h。3 h 后, 测定模拟果汁体系中肠膜状明串珠菌的残留量及其细胞膜功能的变化。

1.2.5 肠膜状明串珠菌细胞膜通透性的测定

采用 PI(碘化丙啶)单染色法检测细胞膜通透性, 原理参考文献^[13-14]。具体为: 取六组不同处理的含目标菌的模拟果汁体系各 1.0 mL, 菌液浓度为 $10^6 \sim 10^7$ CFU/mL。接着, 在菌液中加入 20 mM 的 PI 染色液 0.75 μ L, 在室温下暗处孵育 15 min 后, 用流式细胞仪检测单个细胞的荧光强度。每个样品检测 10000 个细胞, 采用 488 nm 激发光, 检测 FL3(红)荧光通道(615 nm)。数据采集后用 CellQuest Pro 软件分析。

1.2.6 肠膜状明串珠菌溶液紫外吸收物质的测定

将 DMDC 和 Nisin 单独或联合处理前后的含目标脱氢酶活残留率 / % = 处理后的酶活力(A) / 处理前的酶活力(A0) \times 100%

1.2.9 SEM 观察细胞形态

模拟果汁体系中的肠膜状明串珠菌经将 DMDC 和 Nisin 单独或联合处理后, 在 4 °C、5000 r/min 下离心 10 min, 收集菌体, 并去除上清。加入 3% 戊二醛固定 24 h, 用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (PH7.2) 漂洗数次, 再用 1% 锇酸固定 1.5 h, 用磷酸缓冲液漂洗三次。用 30%、50%、75% 和 95% 乙醇, 顺序脱水各一次, 每次 10 min。以 50%、70%、90% 和 100% 乙酸异戊酯逐级取代乙醇, 每级置换 1~3 min。将菌体喷于铜网上临界点干燥。离子溅射喷金。在扫描电镜上观察并采集图像^[17]。

1.3 统计分析

所有的不同处理均重复三次, 数据结果采用统计软件 SPSS 12.0 进行方差分析, 数值以平均值 \pm 标准差表示。

2 结果与讨论

菌的模拟体系在 4 °C、5000 r/min 下离心 10 min, 上清液作为工作液。以超纯水为空白参比, 在 260 nm 和 280 nm 下分别测其紫外吸光值 (石英比色皿的光程为 1 cm)。

1.2.7 肠膜状明串珠菌胞内 pH 的测定

肠膜状明串珠菌胞内 pH 的测定采用荧光比率法。该方法的基本原理是采用非荧光、亲脂性的 pH 值敏感的荧光染料 5(6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester(cFDASE)对目标菌细胞进行染色, 使其自由跨膜扩散进入细胞, 在细胞内酯酶作用下, 水解形成亲水、能发荧光的 5(6)-carboxyfluorescein succinimidyl ester(cFSE)分子, 其特定激发波长下的荧光强度依赖于细胞内 pH 值。污染菌胞内 cFSE 分子在不同激发波长下的荧光强度可采用荧光光度计检测, 再根据离体或活体校准曲线, 即可得出所测污染菌的胞内 pH 值。具体的操作步骤参考文献^[15]。

1.2.8 肠膜状明串珠菌脱氢酶活性的测定

采用 CTC [5-氰基-2,3-二-(p-苄基-四唑氯化物)]染色法测定肠膜状明串珠菌经 DMDC 和 Nisin 单独或联合处理前后的脱氢酶活性。该方法的原理是: 由于细菌呼吸活动时的电子递氢的作用, CTC 接受 H⁺ (H⁺ / e)被还原成水不溶解性的具有荧光的胞内沉淀, 胞内荧光强度与脱氢酶活性成正比。细胞内的胞内荧光强度可以用流式细胞仪测定。结果以残留的脱氢酶活性表示, 具体的操作步骤参考文献^[16]。

2.1 DMDC 和 Nisin 对肠膜状明串珠菌的杀菌

效果研究

表 1 DMDC 和 Nisin 对肠膜状明串珠菌的 MBC 和 FBC 值

Table 1 MBC and FBC indices of DMDC and nisin against

	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>		
	MBC (单独处理)	MBC (联合处理)	FBC
DMDC(mg/L)	300.00	37.50	0.38
Nisin(IU/mL)	50.00	12.50	

DMDC、Nisin 单独或联合处理对模拟果汁中肠膜状明串珠的最小杀菌浓度值见表 1。单独处理时候, DMDC 和 Nisin 对模拟果汁中肠膜状明串珠菌的最小杀菌浓度分别为 300.0 mg/L 和 50.00 IU/mL。而 DMDC 与 Nisin 联合处理时, DMDC 和 Nisin 对模拟果汁中肠膜状明串珠菌的最小杀菌浓度分别为 37.50 mg/L 和 12.50 IU/mL。根据 DMDC 和 Nisin 单独或联合作用时

的最小杀菌浓度值,可计算出 DMDC 联合 Nisin 作用时的部分杀菌浓度指数为 0.38,小于 0.50,说明 DMDC 联合 Nisin 对模拟果汁中肠膜状明串珠菌具有很好的协同杀菌作用^[12]。

2.2 DMDC 联合 Nisin 处理对肠膜状明串珠菌细胞膜通透性的影响

本实验采用 PI (碘化丙啶) 单染色法来表示 DMDC 和 Nisin 处理后肠膜状明串珠菌细胞膜通透性的变化。PI (碘化丙啶) 是一种可对 DNA 染色的细胞核染色试剂,不能通过活细胞膜,但却能穿过破损的细胞膜与细胞核内的核酸结合,嵌入双链 DNA 后释放红色荧光。因此,采用流式细胞仪检测经 PI 染色后单个肠膜状明串珠菌细胞的荧光强度,可对细菌的细胞膜通透性变化作定性分析^[17]。

图 1 是肠膜状明串珠菌经上述 6 组不同的 DMDC 联合 Nisin 处理 3 h 后,细胞经 PI 单染后经流式细胞仪分析获得的单染直方图。图 1 中, P2 区为 PI 阳性 (PI⁺)。与对照组相比,肠膜状明串珠菌经低浓度 DMDC (37.5 mg/L) 处理后,其致死率为 3.34%,而 PI⁺细胞的百分比和平均荧光强度没有显著增加,PI⁺细胞约占 23.5%,但经高浓度的 DMDC (最小杀菌浓度) 处理后,其致死率为 100%,其 PI⁺细胞的百分比为 23.7%,与对照组相比没有变化,仅有个别细胞的荧光强度出现明显增加,在荧光强度为 10⁴ 范围处形成一个小峰 (图 1),说明 DMDC 处理仅仅能随机性的导致肠膜状明串珠菌细胞通透性的增加,DMDC 对肠膜状明串珠菌的致死率与细胞膜通透性的增加没有明显的相关性。

与单独的 DMDC 处理不一样,肠膜状明串珠菌经低浓度 Nisin (12.5 IU/mL) 处理后,其致死率为 99.9973%,并且 PI⁺细胞的百分比是单独 DMDC 处理组的两倍,达到 30.0%,PI⁺阳性细胞主要集中在荧光强度为 10⁴ 范围处 (图 1)。当 Nisin 浓度提高到最小杀菌浓度时,PI⁺细胞的百分比也略微升至达到 30.6%,并且 PI⁺阳性细胞的平均荧光强度也 7536 荧光强度单位升高至 7760 荧光强度单位 (图 1)。上述结果说明,肠膜状明串珠菌经 Nisin 处理后,部分细胞的膜通透性增加,Nisin 对肠膜状明串珠菌的致死率与细胞膜通透性的增加有一定的相关性。

另外,与低浓度 Nisin (12.5 IU/mL) 单独处理相比,当低浓度的 DMDC (37.5 mg/L) 和低浓度的 Nisin (12.5 IU/mL) 联合处理时,其对肠膜状明串珠菌的致死率为 100%,而其处理后 PI⁺细胞的百分比和平均

荧光强度没有显著增加占 31.0% (图 1),说明 DMDC 的添加并不能促进 Nisin 对细胞膜的相互作用而实现细胞膜通透性的升高。

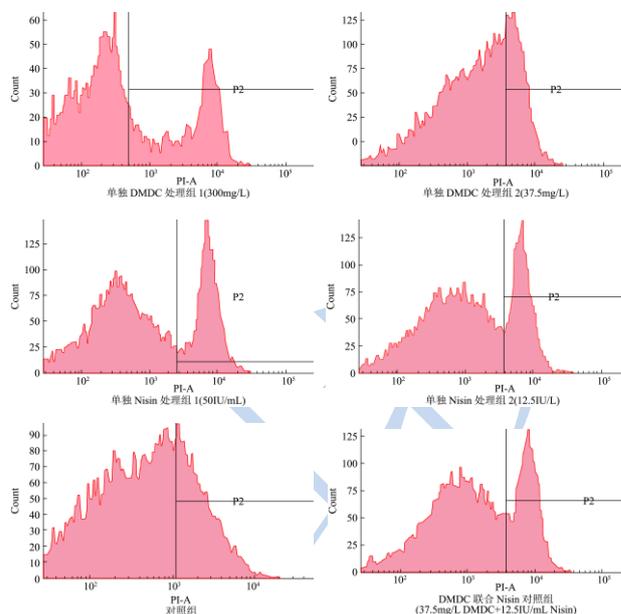


图 1 肠膜状明串珠菌经 DMDC 和 Nisin 单独或联合处理后的 PI 单染直方图分布

Fig.1 Fluorescence histograms (after single staining with PI) of *Leuconostoc mesenteroides* treated with DMDC and nisin alone and in combination

2.3 DMDC 联合 Nisin 处理对肠膜状明串珠菌溶液紫外吸收物质的影响

本实验采用不同处理前后菌液中紫外吸收物质吸光值的变化表征胞内物质流失。存在于细胞内的核酸、蛋白质是维持生命活动的基本物质,是形成细胞结构的生物大分子。由于核酸的嘌呤和嘧啶组分、蛋白质的酪氨酸和色氨酸组分中含有的共轭体系,存在能吸收可见光和紫外光的饱和集团,因此核酸和蛋白质分别在 255~260 nm 和 280 nm 附近有最大吸收。细胞膜完整性和通透性改变,可能导致细胞内紫外吸收物质流失到溶液。由此通过对菌液 A₂₆₀ 和 A₂₈₀ 吸光度的测定可以判断胞内物质是否流出到菌悬液^[17]。

图 2 是肠膜状明串珠菌经不同浓度的 DMDC 和 Nisin 在 30 °C 处理 3 h 后其上清液中紫外吸收物质的变化情况。由图可知,肠膜状明串珠菌经低浓度的 Nisin (12.5 IU/mL) 和最小杀菌浓度的 Nisin 单独处理后,其上清液的 A₂₆₀ 和 A₂₈₀ 在处理前后没有显著变化 (P>0.05),说明 Nisin 处理虽能改变肠膜状明串珠菌的细胞膜通透性,增加胞外极性物质的摄入,但不能明显促进胞内物质的流失。与处理前相比,肠膜

状明串珠菌经最小杀菌浓度的 DMDC 单独处理后, 其上清液的 A_{260} 和 A_{280} 出现明显增加, 增加了 60% ($P < 0.05$), 而经低浓度的 DMDC (37.5 mg/L) 单独或联合低浓度 Nisin (12.5 IU/mL) 处理后其上清液的 A_{260} 和 A_{280} 增加不显著 (图 2)。上述结果说明, 高浓度的 DMDC 处理能导致肠膜状明串珠菌细胞内物质的流失, 但 DMDC 和 Nisin 两者对肠膜状明串珠菌细胞内物质的流失没有相互促进作用。

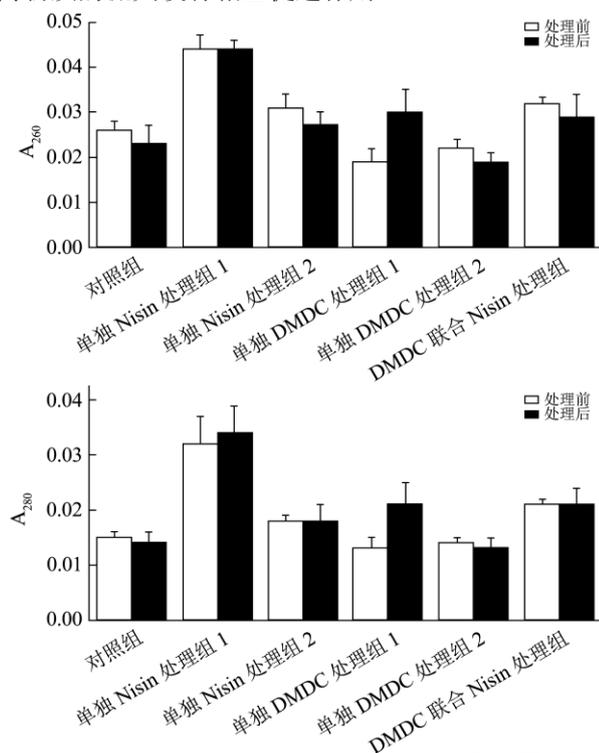


图 2 肠膜状明串珠菌经 DMDC 和 Nisin 处理后其溶液中紫外吸收物质的变化

Fig.2 Changes in UV absorption values of *Leuconostoc mesenteroides* cell suspensions treated with DMDC and nisin alone and in combination

2.4 DMDC 联合 Nisin 对肠膜状明串珠菌胞内 pH 值的影响

细胞内 pH 值对细胞生理活动有重要的影响, 不仅能调节酶活性还可以调节细胞内 ATP 合成、DNA 复制、RNA 和蛋白质合成以及细胞生长等一些重要的代谢过程^[5]。通过对胞内 pH 的测定可以来判断细胞膜对 H^+ 通透性的影响。表 2 提供了肠膜状明串珠菌经不同浓度的 DMDC 和 Nisin 在 30 °C 处理 3 h 后其细胞内 pH 的变化情况。

正常的肠膜状明串珠菌的胞内 pH 为 6.7 左右, 经 pH 4.5 的模拟果汁处理 3 h 后菌体的胞内 pH 降至 4.92, 说明肠膜状明串珠菌长期处于低的 pH 环境中,

其胞内 pH 也会发生变化。肠膜状明串珠菌经低浓度的 DMDC (37.5 mg/L) 单独处理 3 h 后, 其胞内 pH 值的下降比对照组多 0.25 个 pH 单位, 并且当 DMDC 浓度达到最低杀菌浓度 (300 mg/L) 时, 其胞内 pH 值下降至 4.54 (表 2)。肠膜状明串珠菌经低浓度的 Nisin (12.5 IU/mL) 和最低杀菌浓度的 Nisin (50 IU/mL) 单独处理 3 h 后, 其胞内 pH 值分别下降至 4.7 和 4.59 (表 2)。另外, 当低浓度的 DMDC (37.5 mg/L) 和低浓度的 Nisin (12.5 IU/mL) 联合处理 3 h 后, 其胞内 pH 值下降至 4.75。与单独低浓度的 DMDC 和低浓度的 Nisin 单独处理相比, DMDC 和 Nisin 联合处理时, pH 的下降程度没有单独处理时多 (表 2), 说明 DMDC 和 Nisin 的联合作用并不能促进肠膜状明串珠菌细胞内 pH 的进一步减低。

2.5 DMDC 联合 Nisin 对肠膜状明串珠菌脱氢酶活性的影响

表 2 提供了肠膜状明串珠菌经 DMDC 和 Nisin 处理后其胞内脱氢酶的残留率的变化, 正常的肠膜状明串珠菌经 pH 4.5 的模拟果汁处理 3 h 后, 其胞内的脱氢酶活力下降了 16.18%, 说明低的 pH 环境中能导致肠膜状明串珠菌的胞内脱氢酶发生部分失活。肠膜状明串珠菌经最低杀菌浓度的 DMDC 处理 3 h 后, 其胞内脱氢酶活的残留率比经最低杀菌浓度的 Nisin 处理 3 h 的要低 12.70%, 说明脱氢酶活对 DMDC 更敏感。

另外, 当低浓度的 DMDC (37.5 mg/L) 和低浓度的 Nisin (12.5 IU/mL) 联合处理 3 h 后, 其胞内脱氢酶活的残留率为 42.71%。与单独低浓度的 DMDC 和低浓度的 Nisin 单独处理相比, DMDC 和 Nisin 联合处理时, 胞内脱氢酶活下降程度明显高于单独处理时的 (表 2), 说明 DMDC 和 Nisin 的联合作用能促进肠膜状明串珠菌细胞内脱氢酶的进一步失活。

2.6 DMDC 联合 Nisin 对肠膜状明串珠菌形态的影响 (SEM)

图 3 提供了肠膜状明串珠菌经 DMDC 和 Nisin 处理后的扫描电镜 (SEM) 图片。与对照组相比, 经单独 DMDC 处理后, 肠膜状明串珠菌的表面形态没有明显差异, 均呈规则的豆形、细胞膜完整、细胞表面光滑 (图 3); 而经单独 Nisin 处理或 Nisin 联合 DMDC 处理 3 h 后, 肠膜状明串珠菌表面均覆盖了一层 Nisin 颗粒, 外形仍比较规则, 细胞没有发生明显破损和裂痕 (图 3)。上述结果说明, DMDC 和 Nisin 处理对

肠膜状明串珠菌的细胞形态并未造成影响, 细胞膜没有发生破损。

表 2 肠膜状明串珠菌经 DMDC 和 Nisin 处理后的细胞胞内 pH 和脱氢酶的残留率/%

Table 2 Intracellular pH and residual amount of dehydrogenase (%) in *Leuconostoc mesenteroides* cells treated with DMDC and nisin alone and in combination

处理方式	添加浓度	胞内 pH 值	脱氢酶残留率/%
对照组	不添加 DMDC 和 Nisin	4.92±0.03 ^a	83.82±1.10 ^e
单独 DMDC 处理组 1	300 mg/L 的 DMDC	4.54±0.03 ^c	48.52±0.91 ^e
单独 DMDC 处理组 2	37.5 mg/L 的 DMDC	4.67±0.01 ^b	52.51±0.72 ^d
单独 Nisin 处理组 1	50 IU/mL 的 DMDC	4.59±0.03 ^c	61.22±0.91 ^b
单独 Nisin 处理组 2	12.5 IU/mL 的 Nisin	4.70±0.02 ^b	67.93±0.73 ^c
DMDC 联合 Nisin 处理组	37.5 mg/L DMDC + 12.5 IU/mL Nisin	4.75±0.07 ^b	42.71±0.82 ^f

注: 显著性水平为 0.05。

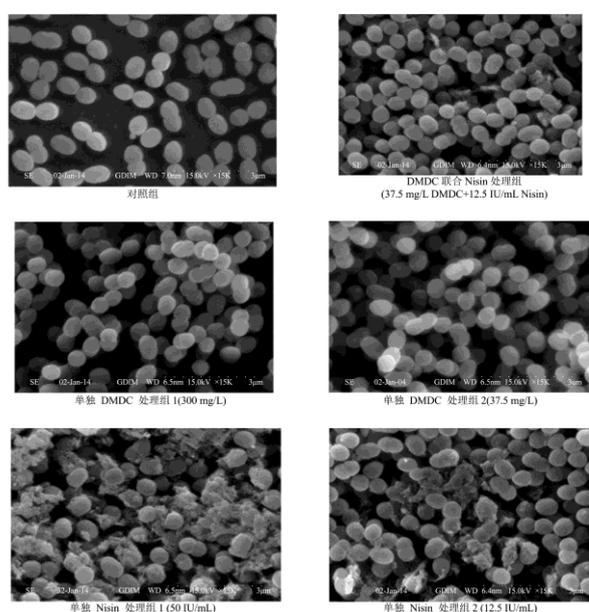


图 3 肠膜状明串珠菌经 DMDC 和 Nisin 处理后的 SEM 图

Fig.3 SEM images of *Leuconostoc mesenteroides* cells treated with DMDC and nisin alone and in combination

3 结论

3.1 单独处理时候, DMDC 和 Nisin 对模拟果汁中肠膜状明串珠菌的最小杀菌浓度分别为 300.00 mg/L 和 50.00 IU/mL。而 DMDC 与 Nisin 联合处理时, DMDC 和 Nisin 对模拟果汁中肠膜状明串珠菌的最小杀菌浓度分别为 37.50 mg/L 和 12.50 IU/mL。DMDC 联合 Nisin 作用时的部分杀菌浓度指数为 0.38, 小于 0.50, 说明 DMDC 联合 Nisin 对模拟果汁中肠膜状明串珠菌具有很好的协同杀菌作用。

3.2 DMDC 和 Nisin 处理对肠膜状明串珠菌的细胞形态并未造成影响, 细胞膜没有发生破损。DMDC 处理仅仅能随机性的导致肠膜状明串珠菌细胞通透性的增加, 而肠膜状明串珠菌经 Nisin 处理后, 大部分细胞

的膜通透性增加。Nisin 处理虽能改变肠膜状明串珠菌的细胞膜通透性, 增加胞外极性物质的摄入, 但不能明显促进胞内物质的流失, 高浓度的 DMDC 处理能导致肠膜状明串珠菌细胞内物质的流失。

3.3 DMDC 和 Nisin 两者对肠膜状明串珠菌细胞内物质的流失、细胞膜的通透性的增加和胞内 pH 的下降没有相互促进作用, 但 DMDC 和 Nisin 的联合作用能促进肠膜状明串珠菌细胞内脱氢酶的进一步失活。

参考文献

[1] 程银棋, 余元善, 吴继军, 等. 二甲基二碳酸盐联合动态超高压对模拟果汁的杀菌效果研究[J]. 现代食品科技, 2013, 29(10):2405-2409
CHEN Yin-qi, YU Yu-shan, WU Ji-jun, et al. Inactivation of microorganisms in model fruit juice system by dynamic ultra-high pressure combined with dimethyl carbonate [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(10): 2405-2409

[2] 中华人民共和国国家标准. 食品安全国家标准食品添加剂使用标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011
The national standard of the People's Republic of China. The national food safety standards of food additive use standard [S]. Beijing: China Standard Publishing House, 2011

[3] Costa A, Barata A, Mafeito-Ferreira M, Loureiro V. Evaluation of the inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against wine microorganisms [J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 25: 422-427

[4] 章亚东, 蒋自伟. 二碳酸二甲酯的分解动力学研究[J]. 郑州大学学报(工学版), 2011, 32(5):34-37
ZHANG Ya-dong, JIANG Zi-wei. Study on the kinetics of decomposition reaction of dimethyl dicarbonate [J]. Journal of Zhengzhou University (Engineering Science), 2011, 32(5):

- 34-37
- [5] Basaran-Akgul N, Churey J J, Basaran P, Worobo R W. Inactivation of different strains of *Escherichia coli* O157:H7 in various apple ciders treated with dimethyl dicarbonate (DMDC) and sulfur dioxide (SO₂) as an alternative method [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 26: 8-15
- [6] 郭换丽,余元善,肖更生,等.二甲基二碳酸盐对荔枝汁的杀菌效果及其耐受菌的分鉴定[J].*广东农业科学*,2014,41(5): 155-158
GUO Huan-li, YU Yuan-shan, XIAO Geng-sheng, et al. Inactivation of indigenous microorganisms in the litchi juice by dimethyl carbonate (DMDC) and identification of resistant microorganisms to DMDC [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2014, 41(5): 155-158
- [7] Yu Y, Wu J, Xiao G, et al. Combined effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) and Nisin on indigenous microorganisms of litchi juice and its microbial shelf life [J]. *Journal of Food Science*, 2013, 78(8): 1236-1241
- [8] Nieto-Arribas P, Sesena S, Poveda J M, et al. Genotypic and technological characterization of leuconostoc isolates to be used as adjunct starters in manchego cheese manufacture [J]. *Food Microbiology*, 2010, 27: 85-93
- [9] Panchalee P, Matthew T, Michael D, et al. Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in apple and carrot juices using high pressure homogenization and nisin [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 129: 316-320
- [10] 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-xiao, ZHOU Xu-xiao, et al. Antimicrobial mechanism of Nisin [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2007, 7(2): 128-133
- [11] Spoorthi N J, Vishwanatha T, Reean V, et al. Antibiotic synergy test: checkerboard method on multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *International Research Journal of Pharmacy*, 2011, 2(12): 196-198
- [12] Botelh M G. Fractional inhibitory concentration index of combinations of antibacterial agents against cariogenic organisms [J]. *Journal of Dentistry*, 2000, 28: 565-570
- [13] Amor K B, 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: 5209-5216
- [14] Díaz M, Herrero M, García L A, et al. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2010, 48: 385-407
- [15] 高瑀珑,鞠兴荣,邱伟芬,等.超高压对单核细胞增生李斯特氏菌细胞膜损伤及其氧化磷酸化的影响[J].*中国农业科学*,2011,44(11):2325-2333
GAO Yu-long, JU Xing-rong, QIU Wei-fen, et al. Effects of high-hydrostatic pressure on the membrane damage and oxidative phosphorylation of *Listeria monocytogenes* [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44(11): 2325-2333
- [16] Sieracki M E, Cucci T, Nicinski J. Flow cytometric analysis of 5-Cyano-2,3-Diethyl tetrazolium chloride activity of marine bacterioplankton in dilution cultures [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 7: 2409-2417
- [17] 廖红梅.高压二氧化碳对苹果汁中微生物的杀菌效果及对大肠杆菌结构、蛋白质和DNA的影响[D].博士学位论文, 中国农业大学, 2010
LIAO Hong-mei. Inactivation of microorganisms in apple juice by high pressure carbon dioxide and its effects on structure, protein and DNA of *E. coli* [D]. Ph. D. Dissertation, China Agricultural University, 2010