

反式肉桂醛对阪崎克罗诺肠杆菌抑制作用的研究

石超, 郭都, 张文婷, 郭凯伦, 温啓吾, 郭晓, 刘志远, 尹术华, 杨保伟, 夏效东

(西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西杨凌 712100)

摘要: 为寻求安全有效的阪崎克罗诺肠杆菌 (*Cronobacter sakazakii*, *C. sakazakii*) 的控制方法, 该文探究了植物源化合物反式肉桂醛(Trans-cinnamaldehyde, TC)对 *C. sakazakii* 的抑制作用及可能的作用机制。试验检测了 TC 对 *C. sakazakii* 的最小抑菌浓度(MIC)及其对 *C. sakazakii* 生长曲线的影响; 利用 LIVE/DEAD 细菌活性检测试剂盒、激光共聚焦显微镜和场发射扫描电镜, 重点分析了 TC 对 *C. sakazakii* 细胞膜完整性及细胞形态的影响; 通过构建复原婴幼儿配方乳模型检测 TC 在 4 °C、25 °C 和 37 °C 对 *C. sakazakii* 的抑制作用, 充分考虑了 TC 的实际应用效果。结果表明: TC 对 *C. sakazakii* 最小抑菌浓度为 0.4~1.0 mg/mL 并可有效延长 *C. sakazakii* 的生长延滞期; 浓度为 MIC 和 2MIC 的 TC 使 *C. sakazakii* 细胞膜完整性降低至 60% 和 46% 并可使其细胞膜皱缩、菌体干瘪; 浓度为 0.4% (V/V) 的 TC 可在 90 min (25 °C) 和 60 min (37 °C) 使复原婴幼儿配方乳中 *C. sakazakii* 的数量降低至检出限以下。本研究结果表明 TC 有潜力作为天然的抗菌物质应用于奶粉等食品中, 从而有效地预防和减少阪崎克罗诺肠杆菌引起的相关食源性疾病。

关键词: 反式肉桂醛; 复原婴幼儿配方乳; 阪崎克罗诺肠杆菌; 最小抑菌浓度; 细胞膜完整性

文章编号: 1673-9078(2017)10-58-66

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.10.009

Inhibitory Activity of Trans-cinnamaldehyde Against *Cronobacter*

sakazakii

SHI Chao, GUO Du, ZHANG Wen-ting, GUO Kai-lun, WEN Qi-wu, GUO-Xiao, LIU Zhi-yuan, YIN Shu-hua,
YANG Bao-wei, XIA Xiao-dong

(College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: In order to find a safe and effective control method for *Cronobacter sakazakii* (*C. sakazakii*), the antimicrobial activity of trans-cinnamaldehyde (TC) against *C. sakazakii* and its possible mechanism of action were investigated in this study. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of TC against *C. sakazakii* and its effect on growth curve of *C. sakazakii* were determined. The effects of TC on cell membrane integrity and cell morphology of *C. sakazakii* were assessed by using LIVE/DEAD BacLight bacterial activity assay kit, laser scanning confocal microscope and field emission scanning electron microscope. The inhibitory effect of TC on *C. sakazakii* at 4 °C, 25 °C and 37 °C was studied by constructing a reconstituted infant formula model (containing 0%, 0.1%, 0.2% or 0.4% TC), and the practical effect of TC was fully considered. The results showed that the MICs of TC against *C. sakazakii* ranged from 0.4 to 1.0 mg/mL and TC could effectively prolong the growth lag phase of *C. sakazakii*. Compared with control group, the membrane integrity of the *C. sakazakii* strain treated with TC at MIC and 2 MIC was dramatically declined to 60% and 46%, respectively. The field emission scanning electron microscope confirmed that the samples treated with TC had more wrinkled surface compared with the smooth surface of the untreated cells. TC at 0.4% (V/V) reduced the number of *C. sakazakii* in the reconstituted infant formula below the detection limit at 25 °C for 90 min or at 37 °C for 60 min. In conclusion, TC had the potential to be used as a natural antimicrobial substance in foods such as milk powder and could be further used in the food to effectively prevent and reduce related foodborne diseases caused by *C. sakazakii*.

Key words: trans-cinnamaldehyde; reconstituted infant formula; *Cronobacter sakazakii*; minimum inhibitory concentration; membrane integrity

收稿日期: 2017-03-12

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(2015BAD16B08); 教育部“新世纪优秀人才支持计划”项目(NCET-13-0488); 中央高校基本科研业务费专项资金项目(2452017146)

作者简介: 石超(1989-), 女, 博士, 研究方向: 食品营养与安全; 郭都(1994-), 女, 硕士生, 研究方向: 食品营养与安全, 共同第一作者

通讯作者: 夏效东(1981-), 男, 教授, 主要从事食品营养与安全研究

阪崎克罗诺肠杆菌 (*Cronobacter sakazakii*) 是一种革兰氏阴性、周生鞭毛具有运动性、无芽孢兼性厌氧的食源性条件致病菌, 属于肠杆菌科细菌的一种^[1]。它与婴幼儿及免疫功能不全的成年人患侵入性感染疾病具有密切关系, 主要的临床感染症状包括坏死性小肠结肠炎、菌血症、败血症和脑膜炎等, 致死率达 50%~80%^[2]。阪崎克罗诺肠杆菌可从广泛的食物来源中分离得到, 包括超高温灭菌奶、奶酪、肉、蔬菜、谷物、药草、香料、面包、饮料和豆腐等^[3]。流行病学表明, 污染的婴幼儿配方奶粉与婴幼儿感染阪崎克罗诺肠杆菌有密切关联^[1]。

世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 曾在 2007 年提出: 为减少婴幼儿乳粉中的微生物风险, 奶粉应当在 70 °C 的热水下进行冲调并尽快冷却到适宜的温度。然而, 家庭中通常难以保证这种较为严格的条件, 操作时难免会造成加热过度导致营养损失或者加热不足导致无法完全杀灭奶粉中的微生物^[4]。对于目前已有的多种用于控制婴幼儿配方奶粉或者其他相关食品中阪崎克罗诺肠杆菌的干预技术, 如近红外辐射加热、紫外线辐射、微波处理等, 这些物理方法都会对婴儿食品中的敏感营养成分造成一定的损失并且受到高成本设备的制约而难以实施^[5]。一些食品企业在食品生产加工过程中通常以添加合成的防腐剂来保证食品安全、延长食品货架期。然而由于合成的物质往往具有潜在的毒性, 近年来, 部分学者将目光投向天然的植物源活性物质, 将其作为食品添加剂从而使其起到抑菌作用^[6]。研究表明, 植物精油具有潜在的抗菌活性, 其主要的抑菌成分是酚酸, 其中丁香子酚, 肉桂醛和柠檬醛都具有较强的抑菌效果^[7,8]。Moreira 等^[9]通过琼脂扩散法测定, 从丁香、茶树中提取的精油对大肠杆菌 O157:H7 有显著的抑制效果。

反式肉桂醛 (Trans-cinnamaldehyde, TC) 是肉桂树皮提取物的主要成分, 已被美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 认证是安全的食品成分并且被批准可用作食品添加剂 (21 CFR 182.60)。反式肉桂醛具有多种生物活性如: 抗癌、抗炎、治疗糖尿病和降低细菌耐药性等^[10]。已有研究表明, 反式肉桂醛对食源性致病菌具有抗菌功效^[11]。Sanla-Ead 等^[12]报道反式肉桂醛对单核细胞增生李斯特氏菌、大肠杆菌 O157:H7、肠炎沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽胞杆菌、粪肠球菌等 10 种食源性致病菌和腐败菌均有不同程度的抑制作用。Baskaran 等^[13]证明反式肉桂醛可抑杀苹果汁及苹果酒中的大肠杆菌 O157:H7。反式肉桂醛虽对多种致病菌具有良好的抗菌活性, 但是其对阪崎克罗诺肠杆菌的抑制作用

及机理鲜有研究。

为寻求安全有效的控制阪崎克罗诺肠杆菌的技术方法, 本研究通过检测反式肉桂醛对阪崎克罗诺肠杆菌的最小抑菌浓度以及其对阪崎克罗诺肠杆菌生长曲线、细胞膜完整性和细胞形态的影响, 并探究其在食品模型-复原婴幼儿配方乳模型中对阪崎克罗诺肠杆菌的抑杀作用, 共同探讨反式肉桂醛对阪崎克罗诺肠杆菌的抑制作用及可能的抑菌机理。旨在为反式肉桂醛作为天然抑菌剂在婴幼儿乳粉及其他食品中的应用提供依据, 也为研究开发复原婴幼儿配方乳中阪崎克罗诺肠杆菌的控制技术提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 菌株与试剂

阪崎克罗诺肠杆菌 (*Cronobacter sakazakii*) ATCC 29544、ATCC 12868、ATCC BAA-894 及 ATCC 29004 购于美国模式培养物集存库 (American Type Culture Collection, ATCC)。阪崎克罗诺肠杆菌实验室分离菌株 12-2、14-15、18-7、18-8 和 18-13 由西北农林科技大学食品科学与工程学院食品微生物团队从市售婴儿米粉及婴儿奶粉中分离获得。

反式肉桂醛 (Trans-cinnamaldehyde, TC, HPLC>99%) 购于美国 Sigma 公司; LIVE/DEAD[®] BacLight[™] 细菌活性检测试剂盒购于赛默飞世尔科技公司; 胰蛋白胍大豆肉汤 (Tryptone soya broth, TSB)、胰蛋白胍大豆琼脂 (Tryptone soya agar, TSA) 购于北京陆桥技术股份有限公司; 试验所用其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

低温冷冻离心机 5804 德国 Eppendorf 公司; 分光光度计 Smart Spec[™] plus 美国 BIO-RAD 公司; 激光共聚焦显微镜 A1 日本 Nikon 公司; 场发射扫描电镜 S-4800 日本 Hitachi 公司; 多功能酶标仪 Infinite[™] M200 PRO 瑞士帝肯集团公司; 微生物全自动生长曲线分析仪芬兰 Bioscreen 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 菌种活化及菌液制备

将冻存于 -80 °C 冰箱的阪崎克罗诺肠杆菌 ATCC 29544 等标准菌株及 12-2 等分离菌株活化于 TSA 平板上, 置于 37 °C 培养 12 h, 随后挑取单菌落于 TSB 肉汤中置于 37 °C 摇床培养 12 h (130 r/min)。将得到的菌液离心并用磷酸盐缓冲盐溶液 (phosphate-buffered

saline、PBS、pH 7.2) 清洗一次 (5000 r/min、4 °C、5 min), 用 PBS 调节阪崎肠克罗诺杆菌菌悬液浓度使得菌悬液在 600 nm 处的吸光值 $OD_{600\text{nm}}$ 为 0.5 (约 10^8 CFU/mL), 此时所得菌悬液备用。

1.3.2 复原婴幼儿配方乳液配制

婴幼儿配方奶粉购于陕西省杨凌示范区好又多超市。复原婴幼儿配方乳配制按照商品标识冲调: 将 25.5 g 乳粉溶解于 180 mL 无菌水中, 摇匀后置于 63 °C 水浴锅中进行杀菌 (30 min), 冷却至室温后备用。

1.3.3 反式肉桂醛对阪崎克罗诺肠杆菌最小抑菌浓度 (MIC) 的测定

最小抑菌浓度 (Minimal Inhibitory Concentrations, MICs) 的测定参照 Frankova 等^[14] 采用的琼脂稀释法。具体方法如下: 首先将反式肉桂醛用经高温灭菌冷却至 45 °C 左右的 TSA 培养基配制成浓度为 1.6 mg/mL 和 1 mg/mL 的溶液, 利用等倍稀释法使反式肉桂醛在 24 孔板中的浓度为分别为 1.6 mg/mL、0.8 mg/mL、0.4 mg/mL、0.2 mg/mL、0.1 mg/mL 以及 1 mg/mL、0.5 mg/mL、0.25 mg/mL、0.125 mg/mL 和 0.0625 mg/mL。用移液器吸取 2 μ L 按前述方法 (1.3.1) 制备的菌悬液至 24 孔板各孔中央。同时以不含有反式肉桂醛的培养基作为阴性对照, 含有 0.1 mg/mL 氨苄西林的培养基为阳性对照。将 24 孔板放置于 37 °C 培养箱中培养 24 h 后观测孔板中菌的生长状况, 未长出菌的最小浓度即为最小抑菌浓度 (MIC)。

1.3.4 反式肉桂醛对阪崎克罗诺肠杆菌 ATCC 29544 生长曲线的影响

反式肉桂醛对阪崎克罗诺肠杆菌生长曲线的影响的测定方法参照 Qiu 等^[15] 的方法并进行一定的修改, 具体如下: 按照前述方法 (1.3.1) 制备菌悬液, 将得到的菌液肉汤离心并用 TSB 肉汤清洗两次 (5000 r/min、4 °C、5 min)。用 TSB 肉汤将离心所得的细菌团块重悬浮并调节菌液的吸光值 $OD_{600\text{nm}}=0.5$, 在此浓度基础上将菌液稀释 200 倍 (约 10^6 CFU/mL)。向蜂窝培养板中每孔加入 125 μ L 菌悬液, 并加入 125 μ L 不同浓度的反式肉桂醛溶液 (使用 TSB 配制), 使得混合溶液中反式肉桂醛的终浓度分别为 MIC、1/2MIC、1/4MIC 和 1/8MIC。设置不添加反式肉桂醛的菌液孔以及 TSB 肉汤孔分别作为对照组和背景空白对照组。将蜂窝培养板至于微生物全自动生长曲线分析仪培养 24 h, 设置生长仪培养温度为 37 °C 并每间隔 1 h 测定一次各孔在 600 nm 波长下的吸光值。

1.3.5 反式肉桂醛对阪崎克罗诺肠杆菌 ATCC 29544 细胞膜完整性的影响

细胞膜完整性的检测参照 Sanchez 等^[16] 的方法。利

用 LIVE/DEAD[®] BacLight[™] 细菌活性试剂盒对该指标进行检测。该试剂盒提供两种不同的核酸染料: SYTO[®]9 染料和碘化丙啶 (PI)。SYTO 9 染料为小分子染料, 可穿透活细胞及细胞膜不完整的细菌并与其核酸结合发出绿色荧光。相反, PI 染料仅能穿透受损细胞膜, 将细胞膜受损的细胞染色为红色, 并可覆盖 SYTO 9 的绿色荧光。因此, 当在细菌悬液中添加 SYTO 9 与 PI 两种染料时, 细胞膜完整的菌体呈现绿色, 细胞膜不完整的菌体呈现红色。

具体试验方法如下: 将所得阪崎克罗诺肠杆菌 ATCC 29544 菌株按 1.3.1 方法活化。随后将菌液肉汤离心 (5000 r/min、4 °C、5 min) 并用 0.85% NaCl 溶液清洗两次后弃去上清液。将细菌团块溶解于 0.85% NaCl 溶液当中。将所得上述菌液分别取 1 mL 溶解于 20 mL 0.85% NaCl 溶液和 70% 的异丙醇中孵育 1 h (每 15 min 震荡一次) 分别制备活菌及死菌细胞悬液。随后将菌悬液离心 (10000 r/min、10 min), 用 0.85% NaCl 溶液重悬浮并将活菌死菌溶液按适当比例混合制备为标准样品, 使活菌比例为: 0%、10%、50%、90% 和 100%。

将 100% 活菌溶液分别用 0、MIC 和 2 MIC 浓度的反式肉桂醛在 37 °C 培养箱中避光进行处理 15 min。随后将菌液迅速离心 (10000 r/min、4 °C、2 min) 并将上清液彻底去除后加入等量的 0.85% NaCl 将细菌团块重悬浮备用。将 100 μ L 标准样品及试验样品加入黑色 96 孔酶标板中, 将 SYTO 9 和 PI 混合染料加入每孔并轻柔混合。将样品置于 25 °C 避光孵育 10 min, 随后使用多功能酶标仪检测荧光强度。绿色荧光染料 SYTO 9 的激发/发射波长为 485/542 nm, 红色荧光染料 PI 的激发/发射波长为 485/610 nm。通过检测不同活菌比例标准样品绿色荧光强度, 建立绿色荧光强度与细胞膜完整细菌性 (活菌百分比) 之间的线性关系, 计算出样品细胞膜完整细菌百分比。

1.3.6 激光共聚焦显微镜观察反式肉桂醛对阪崎克罗诺肠杆菌 ATCC 29544 细胞膜完整性的影响

细菌培养参照 1.3.1, 将所得的菌液肉汤离心 (5000 r/min、4 °C、5 min), 并用 0.85% NaCl 清洗两次, 离心参数同上。首先, 将所得菌液分别用 0、MIC 和 2 MIC 浓度的反式肉桂醛进行处理: 将菌液药液混合物至于 37 °C 培养箱中避光培养 15 min。随后, 将所得混合液迅速离心 (10000 r/min、4 °C、2 min) 并将上清液彻底去除后加入等量的 0.85% NaCl 将细菌团块重悬浮。最后加入 SYTO/PI 的混合染料, 充分吹打混匀, 于暗处孵育 10 min 后, 在激光共聚焦显微

镜下观察荧光并拍照分析。

1.3.7 反式肉桂醛对阪崎克罗诺肠杆菌 ATCC 29544 细胞形态的影响

场发射扫描电镜观察反式肉桂醛对阪崎克罗诺肠杆菌细胞形态的影响参照Li^[17]的方法。按照 1.3.1 所述方法制备菌悬液,使用浓度为MIC和 2 MIC的反式肉桂醛在 37 °C下处理菌悬液,试验对照组为在菌悬液中加入与反式肉桂醛等体积的TSB肉汤。在处理 2 h 和 4 h时分别取出样品,将菌液离心并用PBS清洗菌体两次(5000 r/min、4 °C、5 min)。去除上清液,向每个样品中加入 2.5%戊二醛-PBS溶液将菌体重悬浮并于 4 °C固定过夜。随后将菌体依次用PBS、无菌水进行清洗,置于 1%锇酸溶液中重悬浮并固定 5 h。随后使用不同浓度(30%、50%、70%、80%、90%和 100%)的乙醇逐步洗脱,每次 10 min。最后将滴有乙醇菌液的玻片置于扫描电镜载物台上并真空干燥,使用场发射扫描电镜观察细菌细胞形态并拍照。

1.3.8 反式肉桂醛对复原婴幼儿配方乳中阪崎克罗诺肠杆菌的抑制作用

阪崎克罗诺肠杆菌 ATCC 29544、ATCC 12868 及 ATCC BAA-894 菌株活化及菌液制备如方法 1.3.1 所述。将三种菌液各取 1 mL 等体积混合制成混合菌液备用。将如上述 1.3.2 方法配制的复原婴幼儿配方乳分装于试管中,每管乳液接种 100 μL 混合菌液,使复原婴幼儿配方乳中阪崎克罗诺肠杆菌的浓度约为 7 log CFU/mL。向复原婴幼儿乳液中添加反式肉桂醛溶液使反式肉桂醛的终浓度为 0.1%、0.2%和 0.4% (V/V)。同时以不含反式肉桂醛的样品作为对照组。随后将样品分别置于 4 °C、25 °C和 37 °C进行孵育。在 0、20、40、60、90、120、180 和 240 min 时将样品直接或用 PBS 溶液进行等倍稀释后涂布于 TSA 平板培养基上,于 37 °C恒温培养 24 h 后记录细菌总数。每组设置三个平行。

1.3.9 实验数据处理

所有试验重复三次,数据结果以平均值±标准差表示。使用 SPSS 19.0 软件对试验数据进行统计分析。不同处理间 $p < 0.05$ 认为差异显著, $p < 0.01$ 则认为差异极显著。

2 结果

2.1 反式肉桂醛对阪崎克罗诺肠杆菌最小抑

菌浓度 (MIC) 的测定

表 1 反式肉桂醛对阪崎克罗诺肠杆菌的最小抑菌浓度

Table 1 Minimum inhibitory concentrations of trans-cinnamaldehyde against different strains of *Cronobacter sakazakii*

| 菌株 | 来源 | 最小抑菌浓度 / (mg/mL) |
|--------------|--------|------------------|
| ATCC 29544 | 儿童喉咙 | 0.40 |
| ATCC 12868 | 婴幼儿奶粉 | 0.50 |
| ATCC BAA-894 | 人体临床标本 | 0.50 |
| ATCC 29004 | 婴幼儿奶粉 | 0.50 |
| 18-13 | 婴幼儿奶粉 | 0.60 |
| 12-2 | 婴幼儿米粉 | 1.00 |
| 14-15 | 婴幼儿奶粉 | 1.00 |
| 18-7 | 婴幼儿奶粉 | 1.00 |
| 18-8 | 婴幼儿米粉 | 1.00 |

反式肉桂醛对阪崎克罗诺肠杆菌不同菌株的 MIC 结果如表 1 所示。通过测定反式肉桂醛对 4 株标准菌株以及 5 株实验室分离菌株的 MIC, 试验表明肉桂醛对阪崎克罗诺肠杆菌有一定的抑菌作用。研究发现反式肉桂醛对标准菌株的抑制作用明显强于分离菌株。反式肉桂醛对从儿童喉咙中分离出的标准菌株 ATCC 29544 的 MIC 为 0.4 mg/mL。对其他标准菌株, 反式肉桂醛的 MIC 为 0.5 mg/mL, 而对分离菌株, 其 MIC 为 0.6 mg/mL~1.0 mg/mL。为进一步探究反式肉桂醛对阪崎克罗诺肠杆菌的抑制作用, 我们选择阪崎克罗诺肠杆菌标准菌株 ATCC 29544 进行后续研究。

2.2 反式肉桂醛对阪崎克罗诺肠杆菌 ATCC 29544 生长曲线的影响

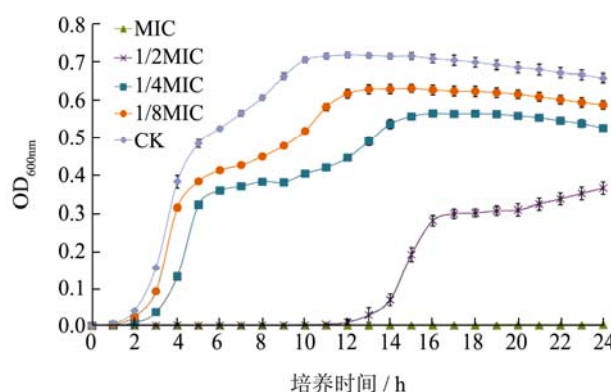


图 1 反式肉桂醛对阪崎克罗诺肠杆菌 ATCC 29544 生长曲线的影响

Fig.1 Effects of trans-cinnamaldehyde on the growth curves of *C. sakazakii* ATCC 29544

反式肉桂醛对阪崎 Fig.罗诺肠杆菌 ATCC 29544 生长曲线的影响如图 1 所示。当反式肉桂醛浓度为 MIC 时, 阪崎 Fig.罗诺的生长几乎完全被抑制。当反式肉桂醛浓度为 1/2 MIC 时, 阪崎 Fig.罗诺肠杆菌在前 12 h 内几乎没有生长。由图 1 可知, 阪崎 Fig.罗诺肠杆菌最大菌体密度随反式肉桂醛的浓度的增加而逐渐降低, 且呈浓度依赖效应。由此进一步得出, 反式肉桂醛对阪崎 Fig.罗诺肠杆菌具有一定的抑制作用。

2.3 反式肉桂醛对阪崎 Fig.罗诺肠杆菌细胞膜完整性的影响

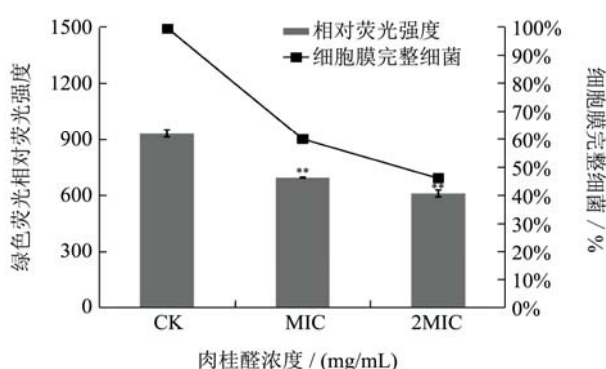


图2 反式肉桂醛对阪崎 Fig.罗诺肠杆菌 ATCC 29544 细胞膜完整性的影响

Fig.2 Effects of trans-cinnamaldehyde on the membrane integrity of *C. sakazakii* ATCC 29544

注: 误差线表示标准差 (n=3), **表示 $p<0.01$ 。

试验首先通过检测不同活细菌浓度标准样品的绿色荧光强度, 建立了绿色荧光强度与细胞膜完整细菌性 (活菌百分比) 之间的线性关系, 得到绿色荧光强度与活菌百分比的标准曲线的拟合方程为: $y=602.14x+333.8$; $R^2=0.9985$ 。由图 2 可得, 未经过反式肉桂醛处理的对照组中的阪崎 Fig.罗诺肠杆菌中细胞膜完整性约为 99%, 经过浓度为 MIC 的反式肉桂醛处理后, 阪崎 Fig.罗诺肠杆菌的细胞膜完整性下降至 60%左右, 当反式肉桂醛浓度为 2 MIC 时, 阪崎 Fig.罗诺肠杆菌细胞膜完整性比例为 46%, 两个试验组与对照组均有极显著差异 ($p<0.01$)。由此可以说明, 反式肉桂醛可通过破坏阪崎 Fig.罗诺肠杆菌细胞膜的完整性从而实现抑菌作用。

2.4 激光共聚焦显微镜观察反式肉桂醛对阪崎 Fig.罗诺肠杆菌细胞膜完整性的影响

图 3 为激光共聚焦显微镜观察反式肉桂醛对阪崎 Fig.罗诺肠杆菌 ATCC 29544 细胞膜完整性的结果。结

果表明: 对照组 (图 3a) 的菌体在观察视野下几乎全部表现为绿色荧光, 即对照组样品细胞膜保持完整。经浓度为 MIC 的反式肉桂醛处理后的阪崎 Fig.罗诺肠杆菌 (图 3b) 在观察视野下可观察到较多黄色及红色荧光, 说明阪崎 Fig.罗诺肠杆菌在此浓度的反式肉桂醛处理下, 细胞膜完整性遭到一定的破坏。经浓度为 2 MIC 的反式肉桂醛处理的样品 (图 3c) 在视野中几乎没有绿色荧光, 且有较多的红色荧光, 说明在该浓度的反式肉桂醛作用下, 阪崎 Fig.罗诺肠杆菌细胞膜完整性的破坏程度更高。由此, 结合 LIVE/DEAD[®]细菌活性检测试剂盒试验进一步说明反式肉桂醛可通过改变阪崎 Fig.罗诺肠杆菌细胞膜完整性抑制其生长。

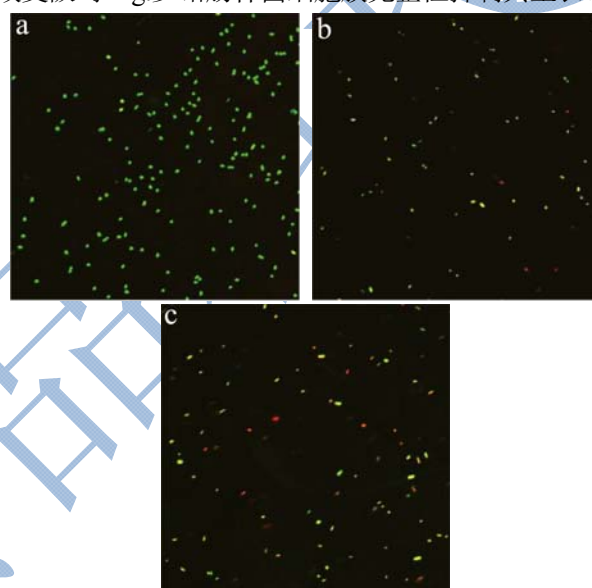


图3 激光共聚焦显微镜观察反式肉桂醛对阪崎 Fig.罗诺肠杆菌 ATCC 29544 细胞膜完整性的影响

Fig.3 Effects of trans-cinnamaldehyde on the membrane integrity of *C. sakazakii* ATCC 29544 by confocal laser scanning microscope

注: 放大倍数: 800×; a 表示未经反式肉桂醛处理; b 表示经浓度为 MIC 的反式肉桂醛处理; c 表示经浓度为 2 MIC 的反式肉桂醛处理。

2.5 场发射扫描电子显微镜观察反式肉桂醛对阪崎 Fig.罗诺肠杆菌细胞形态的影响

图 4 为场发射扫描电子显微镜观察反式肉桂醛对阪崎 Fig.罗诺肠杆菌细胞形态的影响。结果显示, 反式肉桂醛明显改变了阪崎 Fig.罗诺肠杆菌的细菌形态。未经反式肉桂醛处理的对照组中阪崎 Fig.罗诺肠杆菌呈现典型的杆菌形态, 其表面光滑且菌体饱满 (图 4a 和图 4d)。而经浓度为 MIC 的反式肉桂醛处理后, 菌体出现了较为明显的凹陷、干扁及皱缩的现象 (图

4b 和图 4e)。经浓度为 2 MIC 的反式肉桂醛处理后的阪崎 Fig.罗诺肠杆菌出现了更加明显的细胞膜皱缩、菌体中心干瘪的现象(图 4c 和图 4f)。阪崎 Fig.罗诺肠杆菌细胞形态受损的程度随反式肉桂醛浓度增加而增大。试验结果表明,反式肉桂醛可改变阪崎 Fig.罗诺肠杆菌的菌体形态。

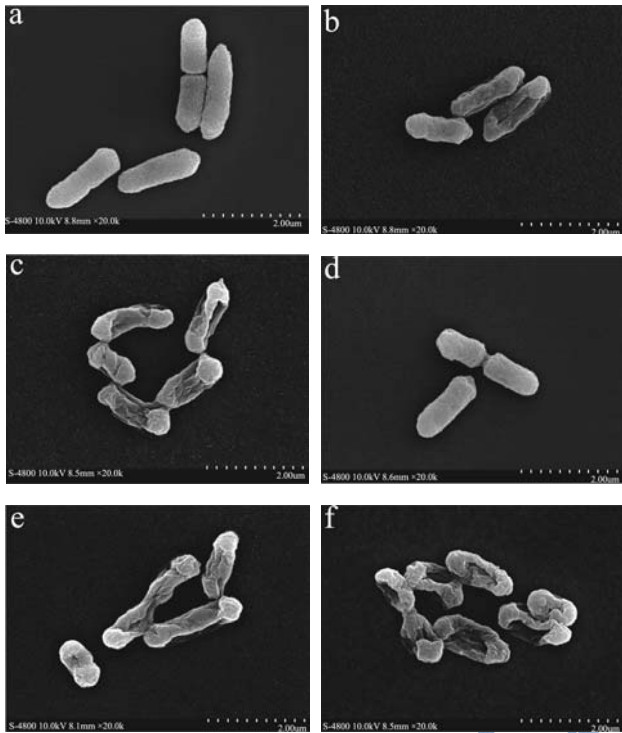


图 4 扫描电镜观测反式肉桂醛对阪崎 Fig. 罗诺肠杆菌 ATCC 29544 形态改变的影响

Fig.4 Effects of trans-cinnamaldehyde on the morphology changes of *C. sakazakii* ATCC 29544 by scanning electron micrographs

注:放大倍数:20000×;图 a 和 d 表示未经反式肉桂醛处理;图 b 和 e 表示经浓度为 MIC 反式肉桂醛处理 2 h 和 4 h;图 c 和 f 表示经浓度为 2 MIC 反式肉桂醛处理 2 h 和 4 h。

2.6 反式肉桂醛对复原婴幼儿配方乳中阪崎 Fig.罗诺肠杆菌的抑制作用

4 °C 下,反式肉桂醛对阪崎 Fig.罗诺肠杆菌的抑制效果见图 5a。复原婴幼儿配方乳样品中阪崎 Fig.罗诺肠杆菌的起始浓度为 6.7 log CFU/mL。结果显示未经肉桂醛处理的和经浓度为 0.1% 的反式肉桂醛处理的样品中,阪崎 Fig.罗诺肠杆菌在 240 min 内细菌总数与起始值无显著差异 ($p>0.05$)。经浓度为 0.2% 和 0.4% 的反式肉桂醛处理的复原配方乳样品中阪崎 Fig.罗诺肠杆菌细菌总数较起始值分别下降了约 1.9 log CFU/mL 和 3.9 log CFU/mL。

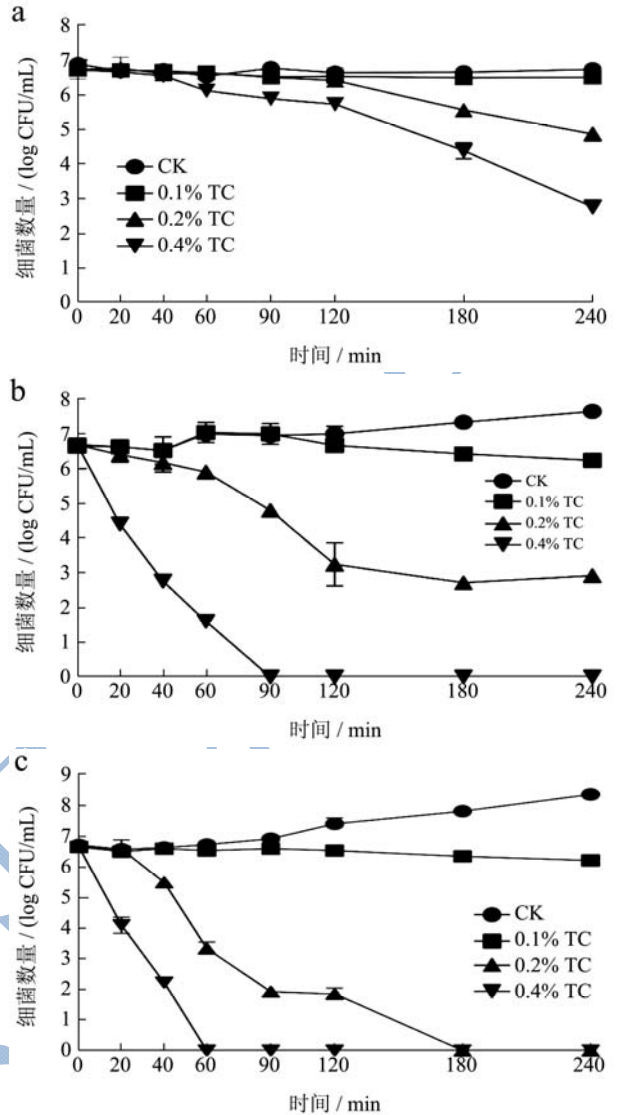


图 5 反式肉桂醛对复原婴幼儿配方乳中阪崎 Fig. 罗诺肠杆菌的抑制作用

Fig.5 The inhibitory effect of trans-cinnamaldehyde on *C. sakazakii* in reconstituted infant formula

注:误差线表示标准差(n=6);图 a 表示 4 °C;图 b 表示 25 °C;图 c 表示 37 °C。

25 °C 时(图 5b),未经反式肉桂醛处理的配方乳样品中的阪崎 Fig.罗诺肠杆菌在孵育 240 min 后,细菌总数较起始值上升 0.9 log CFU/mL,而经浓度为 0.1% 的反式肉桂醛处理的样品中,在 240 min 内细菌总数与起始值无显著性差异 ($p>0.05$)。经浓度为 0.2% 的反式肉桂醛处理的样品在作用 120 min 内细菌总数下降 3.4 log CFU/mL,但 120 min 到 240 min 内,细菌总数无显著变化。经浓度为 0.4% 的反式肉桂醛处理的样品在 90 min 内,样品中阪崎 Fig.罗诺肠杆菌细菌总数降至检出限以下。

图 5c 为 37 °C 下反式肉桂醛对复原婴幼儿配方乳中阪崎 Fig.罗诺肠杆菌的抑制效果。结果显示,未经

反式肉桂醛处理的样品中,阪崎 Fig.罗诺肠杆菌在培养 240 min 后,细菌总数较起始值上升约 1.5 log CFU/mL。经浓度为 0.1%的反式肉桂醛处理的样品,其在 240 min 内细菌总数与起始值无显著性差异 ($p>0.05$)。浓度为 0.2%的反式肉桂醛在该温度下 90 min 内使样品中阪崎 Fig.罗诺肠杆菌细菌总数下降约 3.3 log CFU/mL, 180 min 后样品中细菌总数降至检出限以下。经浓度为 0.4%的反式肉桂醛处理的样品在作用 30 min 后,细菌总数下降约 4.4 log CFU/mL, 60 min 后细菌总数降至检出限以下。

3 讨论

3.1 阪崎 Fig.罗诺肠杆菌与新生儿坏死性小肠结肠炎、菌血症、脑膜炎以及免疫力低下成年人的多种疾病有着密切关系^[18], 2002 年食品微生物标准委员会 (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, ICMSF) 将其描述为“对特定人群造成严重危害, 危及生命或引起长期慢性实质性后遗症的细菌”^[19]。因此预防和控制该种食源性致病菌具有重要的现实意义。传统治疗阪崎 Fig.罗诺肠杆菌感染的方法是使用抗生素, 其中, 氨基青霉素-庆大霉素结合治疗已经被称为金标准^[20], 然而, 大量实验证明长期使用广谱抗生素是导致抗多种抗生素微生物数量增加的主要原因。近年来, 植物源天然活性物质的出现吸引了众多学者的眼球, 且植物源活性物质以其消费者接受度高及来源范围广被认为是合成防腐剂及抗菌药物的最佳替代品^[21]。已有研究表明反式肉桂醛具有良好的抗菌功效以及多种生物活性^[10,11,22]。

3.2 本实验团队前期研究^[23,24]表明, 阿魏酸和硫辛酸对阪崎 Fig.罗诺肠杆菌具有一定的抑制功效, 其对阪崎 Fig.罗诺肠杆菌的 MIC 均为 2.5~5 mg/mL。Back 等^[25]利用肉汤稀释法测定了在 TSB 肉汤中苹果酸和柠檬酸对阪崎 Fig.罗诺肠杆菌的 MIC 分别为 125~500 mM (约 16.8~67 mg/mL) 和 63~250 mM (约 12.1~48.0 mg/mL)。而本试验得出, 反式肉桂醛对阪崎 Fig.罗诺肠杆菌 4 株标准菌株和 5 株实验室分离菌株的 MIC 仅为 0.4~1.0 mg/mL, 且反式肉桂醛目前已被美国 FDA 评价为公认安全的食品成分。由此说明, 反式肉桂醛相比于其他天然抗菌物质对阪崎 Fig.罗诺肠杆菌有着良好的抑制作用且更安全更易被人们接受。琼脂稀释法和肉汤稀释法是常见的两种测定 MIC 的方法。琼脂稀释法是根据肉眼观察菌体不生长的浓度作为菌株的 MIC, 而肉汤稀释法是通过仪器测定肉汤浊度来判定 MIC^[26]。由于判定方法、培养介质和菌体接种量的不同, 琼脂稀释法和肉汤稀释法检测所得的 MIC 常会出现不同的结

果, 但目前的国内外研究中尚未明确规定测定方法。Qiu 等^[27]利用肉汤稀释法测定出百里酚对金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 的 MIC 为 128 $\mu\text{g/mL}$ 。但是在生长曲线分析中发现金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 仍可在含 128 $\mu\text{g/mL}$ 的肉汤中生长。本试验中, 我们采用琼脂稀释法测定了反式肉桂醛对阪崎 Fig.罗诺肠杆菌的 MIC, 并在生长曲线分析中对所测得的 MIC 进行了验证, 结果表明浓度为 MIC 的反式肉桂醛在肉汤中也能够完全抑制阪崎 Fig.罗诺肠杆菌的生长。由此表明, 在本研究中得到的反式肉桂醛对阪崎 Fig.罗诺肠杆菌的最小抑菌浓度较为准确。

3.3 本研究表明, 反式肉桂醛可显著地降低阪崎 Fig.罗诺肠杆菌细胞膜的完整性。类似的研究表明, 相比与对照组, 最小抑菌浓度的月桂精油使大肠杆菌细胞膜完整性下降 34%^[28]。试验通过细菌活性试剂盒检测反式肉桂醛对阪崎 Fig.罗诺肠杆菌细胞膜完整性的影响。结果表明, 与对照组相比, MIC 和 2MIC 浓度的反式肉桂醛使阪崎 Fig.罗诺肠杆菌细胞膜完整性降低 40 和 56%, 结合激光共聚焦显微镜观察结果, 共同说明反式肉桂醛对阪崎 Fig.罗诺肠杆菌的细胞膜完整性具有较显著的破坏能力。同时, 利用场发射扫描电镜观测到反式肉桂醛使阪崎 Fig.罗诺肠杆菌失去原始形态。同样地, 一些天然物质被证明能够改变病原菌的细胞形态: Di 等人^[29]的研究指出丁香酚能够使大肠杆菌 O157:H7 的细胞膜发生破裂, 从而致使细胞内容物流出。Bajpai^[30]等人研究表明, 拓树果实精油可使大肠杆菌和蜡样芽胞杆菌细胞膜发生皱缩甚至细胞溶解。在本试验中, 反式肉桂醛可使阪崎 Fig.罗诺肠杆菌细胞膜皱缩, 菌体表面凹陷, 但并没有造成细胞表面出现孔洞以及细胞破碎。然而有研究表明反式肉桂醛通过使金黄色葡萄球菌细胞膜破裂实现抑菌作用^[29]。丁香精油也有类似研究结果^[31]: 丁香精油可损坏大肠杆菌的细胞膜, 使细胞膜表面出现孔洞, 而对于枯草芽孢杆菌, 菌体仅出现变形。因此, 同一种天然物质对不同病原菌的作用方式可能不同。

3.4 在复原婴幼儿配方乳模型中, 浓度为 0.4%的反式肉桂醛在 25 $^{\circ}\text{C}$ 和 37 $^{\circ}\text{C}$ 时分别在 90 min 和 60 min 内将复原婴幼儿配方乳中阪崎 Fig.罗诺肠杆菌总数降低至检出限以下。浓度为 0.2%的反式肉桂醛在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 180 min 将细菌总数降至检出限以下。综合 3 个温度分析 (图 5), 在未添加反式肉桂醛时, 4 $^{\circ}\text{C}$ 相比其他两个温度对阪崎 Fig.罗诺肠杆菌的生长有明显的抑制作用。而在添加反式肉桂醛时, 其在 4 $^{\circ}\text{C}$ 的作用效果却弱于其他两个温度 (25 $^{\circ}\text{C}$ 和 37 $^{\circ}\text{C}$)。类似地, Obaidat^[32]等人研究表明, 香草醛对阪崎 Fig.罗诺

肠杆菌以及沙门氏菌在 23 °C 的抑制作用高于其在 4 °C 的作用。Gill 和 Holley^[33]指出细胞膜是反式肉桂醛的主要作用位点,一些因素的改变比如脂肪酸不同类型的比例、不饱和脂肪酸的流动性以及菌体暴露在寒冷条件下都可能会干扰到反式肉桂醛与细胞膜的作用,影响抑菌作用^[34]。反式肉桂醛在 25 °C 和 37 °C 的作用效果强于 4 °C 的作用效果,可归因于:在较高温度下,菌体代谢率较高,反式肉桂醛和菌体细胞膜结合效率较高。且反式肉桂醛在 25 °C 和 37 °C 的溶解度高于其在 4 °C 的溶解度。

4 结论

4.1 反式肉桂醛对阪崎 Fig. 罗诺肠杆菌的最小抑菌为 0.4~1.0 mg/mL, 并可有效延长阪崎 Fig. 罗诺肠杆菌的生长延滞期、降低菌体最大吸光度。结果表明:反式肉桂醛对阪崎 Fig. 罗诺肠杆菌有着良好的抑制作用。

4.2 利用 LIVE/DEAD 细菌活性检测试剂盒和激光共聚焦显微镜共同探究发现反式肉桂醛使阪崎 Fig. 罗诺肠杆菌细胞膜完整性显著降低。利用场发射扫描电镜观测发现反式肉桂醛使细胞膜皱缩菌体干瘪、皱缩。结果表明:反式肉桂醛是通过降低细胞膜完整性以及改变细胞形态来实现其抑菌作用。

4.3 通过构建复原婴幼儿配方乳模型,检测反式肉桂醛在 3 个温度对阪崎 Fig. 罗诺肠杆菌的抑制作用。浓度为 0.4% 的反式肉桂醛可在 90 min(25 °C)和 60 min(37 °C)使复原婴幼儿配方乳中阪崎 Fig. 罗诺肠杆菌数量降低至检出限以下。浓度为 0.2% 的反式肉桂醛也有明显的抑制作用。结果表明:反式肉桂醛在复原婴幼儿配方乳常用冷藏温度(4 °C)、室温放置温度(25 °C)及人体体温(37 °C)对阪崎 Fig. 罗诺肠杆菌具有较好的抑制效果。

4.4 反式肉桂醛已被美国 FDA 评价为公认安全的食品成分,然而,现行的食品安全国家标准食品添加剂使用标准(GB 2760-2014)对反式肉桂醛在配方乳中添加的限量未有明确规定。并且,反式肉桂醛对阪崎 Fig. 罗诺肠杆菌其他抑菌作用机制尚不明确。因此,探究反式肉桂醛对阪崎 Fig. 罗诺肠杆菌的其他抑菌机制,明确其作为食品添加剂加入配方乳中的限量以及对于婴幼儿肠道微生物的影响在其实际应用前需进一步研究。

参考文献

[1] Healy B, Cooney S, O'Brien S, et al. *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*): an opportunistic foodborne pathogen [J]. *Foodborne Pathogens & Disease*, 2010, 7(7):

339-350

- [2] Harouna S, Carrami Ana J J, Navarro F, et al. Antibacterial activity of bovine milk lactoferrin on the emerging foodborne pathogen *Cronobacter sakazakii*: effect of media and heat treatment [J]. *Food Control*, 2015, 47: 520-525
- [3] Iversen C, Forsythe S. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* from powdered infant milk and related products [J]. *Food Microbiology*, 2004, 21(6): 771-777
- [4] Carletti C, Cattaneo A. Home preparation of powdered infant formula: is it safe? [J]. *Acta Paediatrica*, 2008, 97(8): 1131-1132
- [5] Ha J W, Kang D H. Synergistic bactericidal effect of simultaneous near-infrared radiant heating and UV radiation against *Cronobacter sakazakii* in powdered infant formula [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2014, 80(6): 1858-1863
- [6] Cushnie T P T, Lamb A J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids [J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2011, 38(2): 99-107
- [7] Ahmad A, Viljoen A M, Chenia H Y. The impact of plant volatiles on bacterial quorum sensing [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2014, 60(1): 8-19
- [8] Lis-Balchin M, Deans S G, Eaglesham E. Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils [J]. *Flavour & Fragrance Journal*, 1998, 13(2): 98-104
- [9] Moreira M R, Ponce A G, Valle C E D, et al. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen [J]. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 2005, 38(5): 565-570
- [10] Zhang L Q, Zhang Z G, Fu Yan, et al. Trans-cinnamaldehyde improves memory impairment by blocking microglial activation through the destabilization of iNOS mRNA in mice challenged with lipopolysaccharide [J]. *Neuropharmacology*, 2016, 110: 503-518
- [11] Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review [J]. *International Journal Food Microbiology*, 2004, 94(3): 223-253
- [12] Sanla-Ead N, Jangchud A, Chonhenchob V, et al. Antimicrobial activity of cinnamaldehyde and eugenol and their activity after incorporation into cellulose-based packaging films [J]. *Packaging Technology & Science*, 2012, 25(1): 7-17
- [13] Baskaran S A, Amalaradjou M A R, Hoagland T, et al.

- Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice and apple cider by trans-cinnamaldehyde [J]. International Journal Food Microbiology, 2010, 141(1): 126-129
- [14] Fraňkov A, Marounek M, Mozrov V, et al. Antibacterial activities of plant-derived compounds and essential oils toward *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus* [J]. Foodborne Pathogens & Disease, 2014, 11(10): 795-797
- [15] Qiu J Z, Feng H H, Xiang H, et al. Influence of subinhibitory concentrations of licochalcone A on the secretion of enterotoxins A and B by *Staphylococcus aureus* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2010, 307(2): 135-141
- [16] Sanchez E, Garcia S, Heredia N. Extracts of edible and medicinal plants damage membranes of *Vibrio cholerae* [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2010, 76(20): 6888-6894
- [17] Li G H, Wang X, Xu Y F, et al. Antimicrobial effect and mode of action of chlorogenic acid on *Staphylococcus aureus* [J]. European Food Research and Technology, 2014, 238(4): 589-596
- [18] Hunter C J, Bean J F. *Cronobacter*: an emerging opportunistic pathogen associated with neonatal meningitis, sepsis and necrotizing enterocolitis [J]. Journal of Perinatology Official Journal of the California Perinatal Association, 2013, 33(8): 581-585
- [19] Iversen C. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula [J]. Trends in Food Science & Technology, 2003, 14(11): 443-454
- [20] Willis J, Robinson J E. *Enterobacter sakazakii* meningitis in neonates [J]. Pediatric Infectious Disease Journal, 1988, 7(3): 196-199
- [21] Tajkarimi M M, Ibrahim S A, Cliver D O. Antimicrobial herb and spice compounds in food [J]. Food Control, 2010, 21(9): 1199-1218
- [22] Devlieghere F, Vermeulen A, Debevere J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables [J]. Food Microbiology, 2005, 21(6): 703-714
- [23] Shi C, Sun Y, Zhang X R, et al. Antimicrobial effect of lipoic acid against *Cronobacter sakazakii* [J]. Food Control, 2016, 59: 352-358
- [24] Shi C, Zhang X R, Sun Y, et al. Antimicrobial activity of ferulic acid against *Cronobacter sakazakii* and possible mechanism of action [J]. Foodborne Pathogens & Disease, 2016, 13(4): 196-204
- [25] Back S Y, Jin H H, Lee S Y. Inhibitory effect of organic acids against *Enterobacter sakazakii* in laboratory media and liquid foods [J]. Food Control, 2009, 20(10): 867-872
- [26] Wiegand I, Hilpert K, Hancock R E. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances [J]. Nature Protocols, 2008, 3(2): 163-175
- [27] Qiu J Z, Wang D C, Xiang H, et al. Subinhibitory concentrations of thymol reduce enterotoxins A and B and α -Hemolysin production in *Staphylococcus aureus* isolates [J]. Plos One, 2010, 5(3): e9736
- [28] Cherrat L, Dumas E, Bakkali M, et al. Effect of essential oils on cell viability, membrane integrity and membrane fluidity of *Listeria innocua* and *Escherichia coli* [J]. Journal of Essential Oil-bearing Plants, 2016, 19(1): 155-166
- [29] Di P R, Betts G, Hoskins N, et al. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2007, 55(12): 4863-4870
- [30] Bajpai V K, Sharma A, Baek K H. Antibacterial mode of action of *Cudrania tricuspidata* fruit essential oil, affecting membrane permeability and surface characteristics of food-borne pathogens [J]. Food Control, 2013, 32(2): 582-590
- [31] Rhayour K, Bouchikhi T, Tantaoui-laraki A, et al. The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* [J]. Journal of Essential Oil Research, 2003, 15(5): 356-362
- [32] Obaidat M M, Alu'datt M H, Salman A E B, et al. Inactivation of nondesiccated and desiccated *Cronobacter Sakazakii* and *Salmonella* spp. at low and high inocula levels in reconstituted infant milk formula by vanillin [J]. Food Control, 2015, 50: 850-857
- [33] Gill A O, Holley R A. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics [J]. International Journal Food Microbiology, 2006, 108(1): 1-9
- [34] Russell N J. The regulation of membrane fluidity in bacteria by acyl chain length changes [M]. Springer US, 1984