

肉桂醛与 ϵ -聚赖氨酸盐酸盐的抑菌活性及其协同抑菌机制初探

许超群^{1,2}, 陈飞平^{2*}, 梁旭茹¹, 岳淑丽^{1*}

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 农业农村部功能食品重点实验室, 广东省农产品加工重点实验室, 广东广州 510610)

摘要: 气味强烈是限制肉桂醛 (Cinnamaldehyde, CIN) 产业应用的瓶颈问题, 利用活性物质复配是一种有效的解决途径。基于此, 该研究探讨了 CIN 与天然抑菌剂 ϵ -聚赖氨酸盐酸盐 (ϵ -Polylysine Hydrochloride, ϵ -PLH) 对四种食物源致病菌和两种腐败菌的抑制活性及其协同效果。结果表明: CIN 和 ϵ -PLH 对病原菌具有优越的抑制活性, 其中 CIN 对真菌的抑制优于细菌[最小抑制浓度 (MIC) 为 0.05 mg/mL vs ~0.2 mg/mL], 而 ϵ -PLH 反之 (MIC 为 ~0.1 mg/mL vs 0.2 mg/mL); 两者联用对大肠杆菌、单增李斯特菌、蜡样芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌表现出协同或部分协同作用, 对尖孢镰刀菌和荔枝霜疫霉菌, 表现出相加作用。两者联用可使金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌生长停滞, 大肠杆菌和蜡样芽孢杆菌的对数生长期延迟, 并且菌体的相对电导率增加、细胞形态发生皱褶或聚集, 推断 CIN 和 ϵ -PLH 联用的抑菌机理可能是通过扰乱菌体的生长周期、改变细胞膜的通透性, 从而导致胞内物质泄漏菌体形态明显改变, 细胞生长受到抑制甚至死亡。研究结果为 CIN 等植物精油产业化提供理论支撑。

关键词: 肉桂醛; ϵ -聚赖氨酸盐酸盐; 协同效应; 抑菌机理

文章编号: 1673-9078(2023)07-24-31

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.7.0980

Preliminary Investigation of the Antimicrobial Activities and Synergies of Cinnamaldehyde and ϵ -Polylysine Hydrochloride

XU Chaoqun^{1,2}, CHEN Feiping^{2*}, LIANG Xuru¹, YUE Shuli^{1*}

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(2. Sericultural & Agri-Food Research Institute Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Functional Foods, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Key Laboratory of Agricultural Products Processing, Guangzhou 510610, China)

Abstract: The intense odor of cinnamaldehyde (CIN) renders its production challenging on an industrial scale. One way to solve this problem is to compound CIN with other active substances. To this end, the antimicrobial activity and synergies of CIN and ϵ -polylysine hydrochloride (ϵ -PLH) on four types of foodborne pathogens and two types of spoilage bacteria were studied, with results indicating that both have excellent activity against various pathogens. CIN inhibits fungi better than it does bacteria, with a minimum inhibition concentration (MIC) of 0.05 mg/mL for fungi versus ~0.2 mg/mL for bacteria, while ϵ -PLH shows the opposite (MIC of ~0.1 mg/mL for bacteria versus 0.2 mg/mL for fungi). Combined CIN and ϵ -PLH exhibit synergy or partial synergy against *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, and

引文格式:

许超群, 陈飞平, 梁旭茹, 等. 肉桂醛与 ϵ -聚赖氨酸盐酸盐的抑菌活性及其协同抑菌机制初探[J]. 现代食品科技, 2023, 39(7): 24-31.

XU Chaoqun, CHEN Feiping, LIANG Xuru, et al. Preliminary investigation of the antimicrobial activities and synergies of cinnamaldehyde and ϵ -polylysine hydrochloride [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(7): 24-31.

收稿日期: 2022-08-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (32202143); 科技创新战略专项资金 (高水平农科院建设) 项目资助 (R2017YJ-YB3010); 广东省现代农业产业技术体系创新团队建设专项资金项目 (2023KJ1117); 农业农村部功能食品重点实验室, 广东省农产品加工重点实验室开放课题资助 (202112)

作者简介: 许超群 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品保鲜, E-mail: xcq@stu.scau.edu.cn

通讯作者: 陈飞平 (1985-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 生物材料与农产品保鲜, E-mail: feiping52@126.com; 共同通讯作者: 岳淑丽 (1979-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品包装、功能性包装材料, E-mail: ysl@scau.edu.cn

Staphylococcus aureus, with additive effects against *Fusarium oxysporum* and *Phytophthora litchii*. Using CIN with ϵ -PLH can limit the proliferation of *S. aureus* and *L. monocytogenes* and delay the log growth phase of *E. coli* and *B. cereus*. In addition, the relative electrical conductivity of bacteria is increased, leading to wrinkled or clumped cell morphologies. Hence, CIN + ϵ -PLH may exert antimicrobial activity by disrupting the bacterial growth cycle and altering the cell membrane permeability, leading to the leakage of intracellular compounds and changes in the cell morphology that inhibit cell growth or cause cell death. These findings provide theoretical support for the industrial production of essential oils such as CIN.

Key words: cinnamaldehyde; ϵ -polylysine hydrochloride; synergy; antimicrobial mechanism

由微生物引起的食物中毒和食品腐败变质始终是食品工业和消费者所面临的重要问题,目前抑制食品中病原微生物生长的主要手段是使用化学防腐剂,然而,由于化学防腐剂存在着环境污染和潜在的健康风险等问题,消费者对含有化学防腐剂的食品安全性的担忧日益增加^[1]。来源于植物、动物及微生物的生物保鲜剂因具有天然、绿色、安全等优势,逐渐成为近年来食品科学领域的研究热点。肉桂醛(Cinnamaldehyde, CIN)是芳香植物生产的肉桂精油的主要成分,具有高效的抑菌活性,能影响微生物细胞膜上脂肪酸的分布、酶活性及膜的流动性,从而增强其渗透作用,破坏细胞膜,引起胞内物质外渗,抑制ATP酶及细胞分裂,最终导致菌体死亡^[2,3]。CIN对大肠杆菌^[4]、金黄色葡萄球菌^[5]、沙门氏菌、单增李斯特菌^[6]等细菌和黄曲霉、黑曲霉、青霉、灰葡萄孢霉、镰刀菌、炭疽菌等真菌^[7]均有很好的抑制作用。然而,CIN的刺激性气味会给食品带来负面影响,通过与其他抑菌剂复配使用,可降低CIN的有效抑菌浓度且效果更好,能减少CIN带来的感官负面影响^[8]。

ϵ -聚赖氨酸盐酸盐(ϵ -Polylysine Hydrochloride, ϵ -PLH)是淀粉酶产色链霉菌发酵过程中的代谢产物,由于其带阳离子静电,可吸附到微生物的细胞膜表面,与细胞膜结合后在膜上形成孔洞,导致细胞内容物渗漏,破坏微生物正常的生理代谢^[9,10]。 ϵ -PLH作为一种抑菌能力强、抑菌范围广、水溶性好、热稳定性强的生物防腐剂,在食品杀菌领域具有良好的应用前景^[11]。

CIN和 ϵ -PLH均为国家食品添加剂标准中允许使用的食品防腐剂^[12]。目前关于CIN和 ϵ -PLH的生物活性^[13]、抑菌机理^[14,15]及应用^[16,17]等方面都取得了较大的进展,单一使用CIN和 ϵ -PLH均可取得较好的抑菌效果,而针对CIN和 ϵ -PLH复配抑菌的研究尚鲜见报道。从前人研究可知,CIN和 ϵ -PLH的抑菌机制不同,两者复配使用理论上具有协同增效作用。因此,本研究以常见的致病细菌与果蔬采后病害真菌为对象,通过二倍连续稀释法测定CIN和 ϵ -PLH的最小抑菌浓度,采用棋盘稀释法确定CIN和 ϵ -PLH的联合抑菌效果,最后通过致病菌生长曲线、细胞膜完整性、形态

等的变化探究复配抑菌剂的抑菌机理,为CIN和 ϵ -PLH在食品保鲜领域的应用提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

肉桂醛,上海麦克林生化科技有限公司; ϵ -聚赖氨酸盐酸盐,浙江新银象生物工程有限公司;营养肉汤培养基、营养琼脂培养基、马铃薯葡萄糖培养基、马铃薯葡萄糖琼脂培养基,广东环凯微生物科技有限公司;二甲基亚砜,天津市大茂化学试剂厂;葡萄糖,天津市福晨化学试剂厂;其他试剂均为国产分析纯。

大肠杆菌BNCC133264 (*Escherichia coli*),金黄色葡萄球菌BNCC186335 (*Staphylococcus aureus*),蜡样芽孢杆菌ATCC14579 (*Bacillus cereus*),单增李斯特菌ATCC19115 (*Listeria monocytogenes*),尖孢镰刀菌BNCC143070 (*Fusarium oxysporum*),河南省工业微生物菌种工程技术研究中心;荔枝霜疫霉菌(*Peronophythora litchi*),实验室分离培养。

1.2 仪器与设备

Millipore Elix 纯水仪,德国Merck Millipore公司;Synergy LX型多功能酶标仪,美国伯腾仪器有限公司;UV-1800型紫外可见分光光度计,日本岛津公司;生化培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;5810R型台式高速冷冻离心机,德国Eppendorf公司;DY-200B全温型恒温培养摇床,天津市泰斯特仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 抑菌剂的配制

取100 mg的CIN加入1 mL二甲基亚砜配制为100 mg/mL的储备液,将 ϵ -PLH溶于水配制为100 mg/mL的储备液,用0.22 μ m的微孔过滤器过滤。

1.3.2 最小抑菌浓度及最小杀菌浓度测定

采用微量肉汤二倍稀释法^[18]考察各抑菌物质的最小抑菌浓度(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)。将活化好的菌液稀释成 10^6 CFU/mL,在96孔

板中加入 100 μL 菌液 100 μL 抑菌剂,使每孔菌体浓度为 5×10^5 CFU/mL; 阴性对照为每孔加 100 μL 培养基+100 μL 抑菌剂,空白对照为每孔加 100 μL 菌液+100 μL 培养基。将 96 孔板置于恒温培养箱中培养,细菌在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 20 h,霉菌在 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h,用酶标仪测定各培养液在 600 nm 处的吸光值,最小抑菌浓度为培养前后 $\Delta\text{OD}_{600} \leq 0.1$ 的抑菌剂的最低浓度,结合肉眼观察即可判定为最低抑菌浓度 MIC。在 MIC 的基础上,取 MIC 及后三个浓度的培养液 100 μL 涂布于琼脂平板培养基上培养(细菌:20 h,真菌:48 h),无菌落生长的浓度即为最小杀菌浓度(Minimum Bactericidal Concentration, MBC)。

1.3.3 联合抑菌指数的测定

采用二维棋盘法^[19]测定两种抑菌剂对几种病原微生物的分级抑菌浓度(Fractional Inhibition Concentration, FIC),CIN 和 ϵ -PLH 配置为 2~1/32 MIC; 在 96 孔板的 A2~H2 孔中分别加入 2 MIC 的 ϵ -PLH, A3~H3 孔中分别加入 1 MIC 的 ϵ -PLH,依次进行;在 H1~H8 孔中分别加入 2 MIC 的 CIN, G1~G8 孔中分别加入 1 MIC 的 CIN,依次进行;在 A1 孔中加入 100 μL 培养基,为空白对照;加入菌悬液,使每孔最终菌浓度约为 5×10^5 CFU/mL;同时做一组阴性对照。培养条件及判定 MIC 条件同 1.3.2,根据以下公式计算分级抑菌浓度指数(Fractional Inhibition Concentration Indices, FICI)。

FIC 指数 ≤ 0.5 时为协同作用, $0.5 < \text{FICI} \leq 0.75$ 为部分协同, $0.75 < \text{FIC}$ 指数 ≤ 1 为相加作用, $1 < \text{FIC}$ 指数 ≤ 2 为无关, FIC 指数 > 2 时为拮抗作用^[20]。

$$\text{FICI} = \frac{\text{MIC}_{A\text{联用}}}{\text{MIC}_A} + \frac{\text{MIC}_{B\text{联用}}}{\text{MIC}_B} \quad (1)$$

式中:

FICI——分级抑菌浓度指数;

$\text{MIC}_{A\text{联用}}$ ——A 和 B 联用时 A 对应的最小抑菌浓度;

$\text{MIC}_{B\text{联用}}$ ——A 和 B 联用时 B 对应的最小抑菌浓度;

MIC_A ——A 单独使用时的最小抑菌浓度;

MIC_B ——B 单独使用时的最小抑菌浓度。

1.3.4 抑菌动力学的测定

分别将 200 μL 不同菌悬液 (10^7 CFU/mL) 和 200 μL 不同抑菌剂组混合,使最终抑菌剂浓度分别为大肠杆菌: 1/4 MIC (0.056 25 mg/mL) CIN、1/8 MIC (0.012 5 mg/mL) ϵ -PLH+1/4 MIC (0.056 25 mg/mL) CIN、1/4 MIC (0.012 5 mg/mL) ϵ -PLH; 金黄色葡萄球菌: 1/4 MIC (0.037 5 mg/mL) CIN、1/2 MIC (0.006 25 mg/mL) ϵ -PLH+1/4 MIC (0.037 5 mg/mL) CIN、1/2 MIC (0.006 25 mg/mL) ϵ -PLH; 单增李斯特

菌及蜡芽芽孢杆菌: 1/4 MIC (0.05 mg/mL) CIN、1/8 MIC (0.012 5 mg/mL) ϵ -PLH 1/4 MIC (0.05 mg/mL) CIN、1/8 MIC (0.012 5 mg/mL) ϵ -PLH。将生长曲线测定仪调节至 37 $^{\circ}\text{C}$,测定时间间隔为 1 h,中速摇板,测定前 30 s 停止,使用 600 nm 的波长分别测定致病菌在 24 h 内的生长曲线。每组设置 5 个平行,同时设定空白对照组。

1.3.5 细胞膜完整性的测定

参考 Diao 等^[21]的方法,将受试菌接入到培养基中培养 12 h 后,离心 (4 000 r/min, 5 min),收集菌体,用 $m=5\%$ 葡萄糖溶液洗涤至菌液的相对电导率与 $m=5\%$ 葡萄糖溶液的相对电导率相当,此菌液为等渗菌液。向 $m=5\%$ 葡萄糖溶液中分别加入不同浓度的抑菌剂,使最终抑菌剂浓度与 1.3.4 相同,混匀后离心 (4 000 r/min, 5 min),取上清液测其相对电导率记为 L_1 。取等渗菌液分别加入不同浓度抑菌剂,37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 6 h,每 1 h 取出菌悬浮液 5 mL,离心 (4 000 r/min, 5 min) 后取上清液测定相对电导率,记为 L_2 。将等渗菌液在沸水浴中煮沸 5 min,冷却后离心,取上清液测定相对电导率记为 L_0 。相对电导率根据如下公式计算:

$$E = \frac{100 \times (L_2 - L_1)}{L_0} \quad (2)$$

式中:

E ——相对电导率, %;

L_0 ——等渗菌液在沸水浴中煮沸后上清液的电导率, mS/cm;

L_1 ——向 $m=5\%$ 葡萄糖溶液中加入不同浓度的抑菌剂,上清液的电导率, mS/cm;

L_2 ——等渗菌液加入不同浓度抑菌剂,上清液的电导率, mS/cm。

1.3.6 扫描电镜

取 50 mL 处于对数期的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌菌悬液 (1×10^7 CFU/mL) 中分别加入 50 mL 抑菌剂,使其终浓度为 1/8 MIC ϵ -PLH+1/4 MIC CIN、1/2 MIC ϵ -PLH+1/4 MIC CIN,同时设定空白对照组,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 h。3 000 r/min 离心 5 min,将收集到的菌体用 0.1 mol/L pH 值 7.2 磷酸盐缓冲液清洗 3 次,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下用体积分数 2.5% 戊二醛溶液固定过夜。样品分别用体积分数为 30%、50%、70%、90%、100% 的乙醇梯度脱水,临界点干燥仪干燥,并固定喷金后在扫描电镜下观察细胞的形态结构,观察时样品放大 50 000 倍。

1.3.7 数据处理

每个样品重复 3 次实验,使用 Origin 2022 软件作图,对试验数据进行分析及作图,数值以平均值 \pm SD 表示。当获得的 $P < 0.05$ 时表示有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 CIN 与 ϵ -PLH 对致病菌的 MIC 和 MBC

CIN 和 ϵ -PLH 对四种食源性致病菌的抑菌效果如表 1 所示, 两种抑菌剂均显示出很强的抗菌活性且均对金黄色葡萄球菌的抑菌效果最好, 其 MIC/MBC 值分别为 0.15/0.2 (mg/mL) 和 0.012 5/0.05 (mg/mL), 这可能是由于革兰氏阳性菌(金黄色葡萄球菌)的单层膜结构比革兰氏阴性菌的高脂多糖双层膜结构更易被侵入^[22]。 ϵ -PLH 对大肠杆菌、单增李斯特菌、蜡样芽孢杆菌的 MIC 均为 0.1 mg/mL, 但 MBC 有所差异。CIN 对单增李斯特菌和蜡样芽孢杆菌具有相同的抗菌活性, 它们的 MIC 均为 0.2 mg/mL, MBC 均为 0.4 mg/mL, 对大肠杆菌的 MIC 为 0.225 mg/mL, MBC 为 0.25 mg/mL, 这与宁亚维^[23]、Ye 等^[24]的研究结果相似。许多研究表明, 革兰氏阴性菌对精油的抵抗力高于革兰氏阳性菌^[25], 本研究的结果显示差异不大, 这可能是由于不同菌种本身的差异所致, 此外, 许多因素会影响 MIC 值, 例如天然抗菌剂的溶解率、温度、接种量和测试方法等^[26]。

表 1 CIN 和 ϵ -PLH 对常见食物源致病菌及腐败菌的抑制活性

Table 1 Inhibitory activities of CIN and ϵ -PLH against common food-derived pathogenic and spoilage bacteria

菌种	ϵ -PLH/(mg/mL)	CIN/(mg/mL)
大肠杆菌	MIC	0.1
	MBC	0.2
金黄色葡萄球菌	MIC	0.012 5
	MBC	0.05
单增李斯特菌	MIC	0.1
	MBC	0.2
蜡样芽孢杆菌	MIC	0.1
	MBC	0.1
尖孢镰刀菌	MIC	0.1
	MBC	0.2
荔枝霜疫霉菌	MIC	0.2
	MBC	2

ϵ -PLH 和 CIN 对于尖孢镰刀菌和荔枝霜疫霉菌均具有良好的抑制效果, CIN 对真菌的抑制效果要优于细菌, 仅 0.05 mg/mL 的浓度即可完全抑制尖孢镰刀菌孢子的生长, 0.1 mg/mL 的浓度可达到致死效果, 而对于荔枝霜疫霉菌, CIN 的 MIC 和 MBC 浓度均为 0.05 mg/mL。 ϵ -PLH 对尖孢镰刀菌和荔枝霜疫霉菌的 MIC 分别为 0.1 mg/mL 和 0.2 mg/mL, 抑菌效果显著弱于 CIN。

2.2 CIN 与 ϵ -PLH 的联合抑菌能力

表 2 结果表明, CIN 和 ϵ -PLH 对 4 种被测细菌具有协同或部分协同抑制作用。CIN 和 ϵ -PLH 对大肠杆菌、单增李斯特菌、蜡样芽孢杆菌的 FICI 均为 0.375, 表明两者具有协同作用, 对金黄色葡萄球菌的 FICI 为 0.75, 表明联合作用为部分协同关系; ϵ -PLH 不仅降低了 CIN 的 MIC, 而且 ϵ -PLH 本身的 MIC 也有不同程度的降低(表 1、2)。然而, 对于真菌, 两种抑菌剂并未出现协同增效, 仅表现为相加作用, 可能两种抑菌剂的协同增效机理仅对于细菌有效。多项研究表明, CIN 及 ϵ -PLH 与其他抑菌剂联用可以表现出增效作用, 如 CIN 与百里香酚联用时联用可以显著地破坏沙门氏菌细胞膜的完整性^[27], CIN 与纳米银联用对多种细菌具有协同抑菌作用^[28], ϵ -PLH 与 Nisin 联用破坏了蜡状芽孢杆菌的生长代谢^[8]。表 2 CIN 和 ϵ -PLH 对常见食物源致病菌及腐败菌的协同抑制活性

表 2 CIN 和 ϵ -PLH 对常见食物源致病菌及腐败菌的协同抑制活性

Table 2 Synergistic inhibitory activities of CIN and ϵ -PLH against common food-derived pathogenic and spoilage bacteria

菌种	ϵ -PLH/(mg/mL)	CIN/(mg/mL)
大肠杆菌	MIC _{联用}	0.012 5
	FICI	0.375
金黄色葡萄球菌	MIC _{联用}	0.006 25
	FICI	0.75
单增李斯特菌	MIC _{联用}	0.012 5
	FICI	0.375
蜡样芽孢杆菌	MIC _{联用}	0.012 5
	FICI	0.375
尖孢镰刀菌	MIC _{联用}	0.05
	FICI	1
荔枝霜疫霉菌	MIC _{联用}	0.1
	FICI	1

2.3 CIN 与 ϵ -PLH 对细菌生长曲线抑制作用

从图 1 可以看出, 对照组组菌体生长旺盛, 大肠杆菌、单增李斯特菌及蜡样芽孢杆菌在 0 h 后即进入了对数期, 直至 3 h 后逐渐趋于稳定, 金黄色葡萄球菌在 1 h 后进入对数期, 4 h 后进入稳定期。经 1/4 MIC 浓度的 CIN 处理的大肠杆菌、单增李斯特菌及蜡样芽孢杆菌均在 1 h 后进入对数生长期, 4 h 后进入稳定期, 且在 13 h 前吸光值始终低于对照组, 但最终的菌密度大于对照组。1/4 MIC 浓度的 CIN 处理的金黄色葡萄球菌和过 1/8 MIC 浓度的 ϵ -PLH 处理后的大肠杆菌、单增李斯特菌及蜡样芽孢杆菌增长趋势与对照组相

似, 但最终菌体密度与对照组相比有明显的下降。1/2 MIC 浓度的 ϵ -PLH 处理后的金黄色葡萄球菌对数生长期推迟到 2 h 后, 且最终 OD 值小于对照组, 与 1/4 MIC 浓度的 CIN 处理组的菌密度相接近。而联合处理组的四种细菌生长受到明显抑制, 金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌停止了生长, 部分细菌甚至可能发生了裂解死亡。大肠杆菌的对数生长期推迟到 3 h

以后, 蜡样芽孢杆菌对数生长期推迟到 1 h 以后, 生长受到抑制, 且最终 OD 值显著低于对照组, 说明 CIN 与 ϵ -PLH 联合使用在低浓度条件下即可显著抑制各供试菌体对数生长期的分裂和繁殖。这与王雪燕等^[29]的研究结果一致, 该研究报道了草鱼鱼鳞抗菌肽与肉桂精油的联合抑菌作用, 结果表明复配抑菌剂可导致菌体生长速率减缓、衰亡期加快。

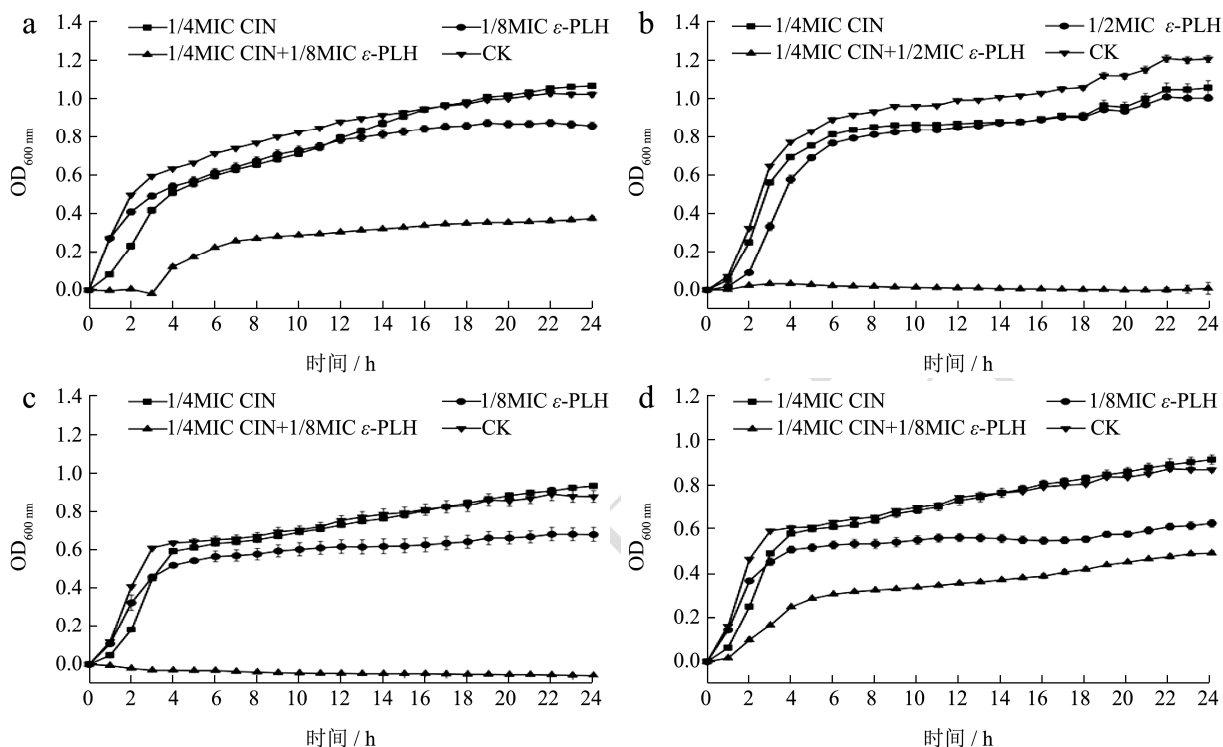


图 1 ϵ -PLH 与 CIN 联合及单一组分处理对常见致病细菌生长曲线的影响

Fig.1 Effect of ϵ -PLH and CIN combined and single treated on the growth curve of common pathogenic bacteria

注: a 大肠杆菌, b 金黄色葡萄球菌, c 单增李斯特菌, d 蜡样芽孢杆菌。图 2 同。

2.4 CIN 与 ϵ -PLH 对细胞膜完整性的影响

细胞膜是细菌的保护屏障, 可允许 K^+ 、 Na^+ 、 H^+ 等小分子物质通过, 这些小分子在维持细胞的能量状态以及溶质运输、新陈代谢的调节、控制膨胀压力和流动性等方面起到至关重要的作用^[21]。因此, 即使是膜结构和膜完整性的相对较小的变化也会对细胞代谢产生不利影响, 从而导致细胞死亡。抑菌剂作用于细胞膜, 使细胞膜遭到破坏, 电解质大量泄漏, 造成菌体的代谢紊乱, 最终导致菌体的死亡。因此, 可通过菌体相对电导率的变化来表征菌体细胞膜完整性。图 2 展示了 CIN 与 ϵ -PLH 对细菌膜通透性的影响, 抑菌剂处理后的四种细菌均显示出比对照组更高的电导率值, 并在 0~2 h 呈现出快速上升的趋势, 此后逐渐趋于平缓。CIN、 ϵ -PLH 单独使用时, 对几种致病细菌细胞膜的影响十分有限, 而联合处理组的大肠杆菌、

金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌、蜡样芽孢杆菌菌液的电导率在 6 h 后分别增大到 39.86%、30.28%、41.60%、26.73%。在 2 h 时, 联合处理组菌体的相对电导率分别是 CIN 处理组的 267.67%、303.53%、267.67%、345.45% 以及 ϵ -PLH 处理组的 210.65%、271.58%、210.65%、271.43%, 说明二者联合可以使菌体细胞膜的通透性增加, 加速菌体细胞质渗漏到了细胞外。四种细菌的这一趋势相似, 大肠杆菌和单增李斯特菌表现出比金黄色葡萄球菌和蜡样芽孢杆菌更高的电导率。Shen 等^[30]研究发现菌液的电导率值随着 CIN 浓度的增加而增加, 大肠杆菌电导率值在 0 到 2 h 显著增加, 金黄色葡萄球菌的电导率在 0 到 1 h 时显著增加。张赟彬等^[31]用 CIN 处理大肠杆菌和金黄色葡萄球菌后, 菌液的相对电导率先迅速增大, 之后增长趋于平缓。这些研究报道与本实验中 CIN、 ϵ -PLH 的抑菌效果相似。

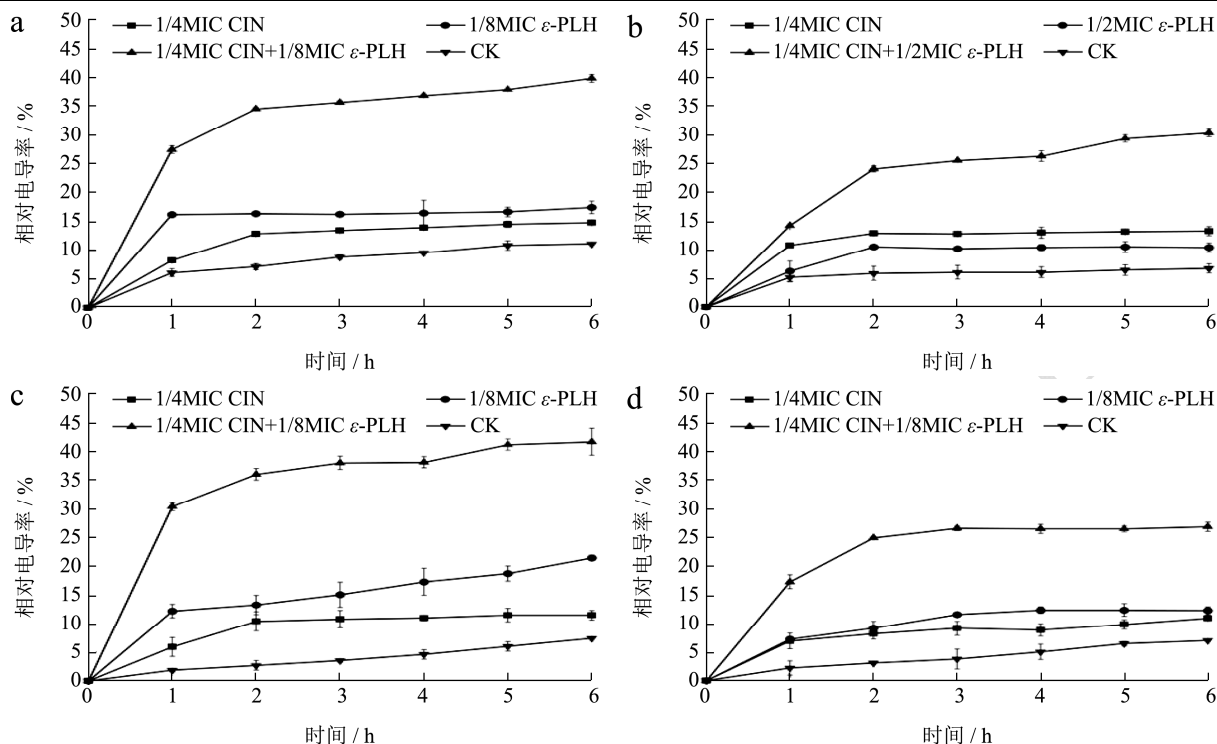


图2 ϵ -PLH 与 CIN 联合及单一组分处理对常见致病细菌相对电导率的影响

Fig.2 Effect of ϵ -PLH and CIN combined and single treated on relative conductivity of common pathogenic bacteria

2.5 CIN 与 ϵ -PLH 联用对细菌形态结构的影响

为了进一步阐明肉桂醛与 ϵ -聚赖氨酸盐酸盐的协同抑菌机理,选择革兰氏阴性菌大肠杆菌和革兰氏阳性球菌金黄色葡萄球菌,观察 ϵ -PLH 与 CIN 协同作用对菌体的形态变化的影响,结果如图 3 所示。未经联用抑菌剂处理的细菌菌体表面较为平整光滑,细胞膜和细胞壁结构相对完整,而经联用抑菌剂处理后的菌体出现不同程度的损伤。处理后的大肠杆菌表面变得粗糙,出现皱缩、凹陷,部分细胞膜出现孔洞或破裂,形态遭到严重破坏,胞内物质泄漏。金黄色葡萄球菌大部分严重皱缩、塌陷,发生粘连且内容物泄出细胞膜破损严重,其边界模糊不清,大量聚集成团。这些结果表明 ϵ -PLH 与 CIN 联用能够破坏两种菌体细胞的细胞膜,导致菌体的死亡和瓦解。Tan 等^[32]研究发现 750 $\mu\text{g/mL}$ 的 ϵ -聚赖氨酸可以使金黄色葡萄球菌细胞出现压痕、塌陷、溶解,对金黄色葡萄球菌细胞壁及细胞膜造成明显破坏。与本研究 6.25 $\mu\text{g/mL}$ ϵ -PLH+0.037 5 mg/mL CIN 处理后的金黄色葡萄球菌电镜结果相似。王梓源等^[33]认为 ϵ -聚赖氨酸的抑菌活性与其浓度呈正相关,对大肠杆菌的抑菌作用可能是通过毡毯模型中所描述的机制实现的,即 ϵ -聚赖氨酸通过静电作用与磷脂分子中的阴离子头部结合,如同一张地毯覆盖在细胞膜的外表面,当抗菌肽浓度到达

临界值时,被覆盖区域的细胞膜因稳定性降低而形成孔洞,细胞膜逐渐分解,与抗菌肽共同形成微胶团,细胞的完整性被破坏。因此推测联用抑菌剂处理后的菌体表面出现孔洞可能是 ϵ -PLH 通过毡毯模型中描述的作用模式形成的。Shen 等^[30]研究发现 0.31 mg/mL 的 CIN 处理后的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌细胞表面粗糙、带有颗粒,分裂异常,其抑菌机制是 CIN 渗透到细菌中,发生物理损伤或化学反应引起细胞壁和膜的裂解,并影响到遗传物质。

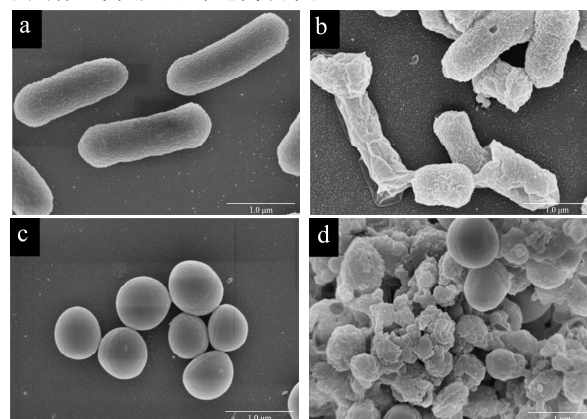


图3 抑菌剂处理后的细菌微观形态

Fig.3 Microscopic morphology of bacteria after bacterial inhibitor treatment

注: a、b 为大肠杆菌、c、d 为金黄色葡萄球菌; a、c 为对照组, b、d 为联用处理组。

3 结论

本文研究了 CIN 和 ϵ -PLH 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌、蜡样芽孢杆菌等食物源致病菌以及尖孢镰刀菌和荔枝霜疫霉菌等食物源腐败菌的抑制活性及其协同抑制活性, 结果发现 CIN 和 ϵ -PLH 对四种细菌和两种真菌的均具有优越的抑制活性, CIN 对真菌的抑制活性优于细菌, 而 ϵ -PLH 对细菌的抑制活性优于真菌; 两者联合使用对大肠杆菌、单增李斯特菌、蜡样芽孢杆菌的 FICI 均为 0.375, 表现出协同抑菌效应, 对金黄色葡萄球菌的 FICI 为 0.75, 表现为部分协同关系; 对两种真菌的 FICI 均为 1, 表现为相加作用。最后通过生长周期、细胞膜完整性及细胞形态分析, 推测 CIN 和 ϵ -PLH 的协同抑菌机理是通过影响菌体的生长周期, 抑制对数生长期的分裂和繁殖; 通过改变细胞膜的通透性, 破坏细胞形态结构, 引起细胞受损, 使得细胞内的物质发生泄漏, 能量代谢失衡, 从而导致细胞生长受到抑制或是裂解死亡, 但其具体的协同抑菌机制尚有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Ma Q, Xu Y, Xiao H, et al. Rethinking of botanical volatile organic compounds applied in food preservation: Challenges in acquisition, application, microbial inhibition and stimulation [J]. Trends in Food Science & Technology, 2022, 125: 166-184.
- [2] 陈帅,高彦祥.肉桂醛的抑菌机理及其在食品行业中的应用研究进展[J].中国食品添加剂,2019,30(5):134-144.
- [3] Vasconcelos N G, Croda J, Simionatto S. Antibacterial mechanisms of cinnamon and its constituents: A review [J]. Microbial Pathogenesis, 2018, 120: 198-203.
- [4] Ji Yeon Chun, Yeon Ji Jo, Piyawan Bjrappa, et al. Antimicrobial effect of α - or β -cyclodextrin complexes with trans-cinnamaldehyde against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* [J]. Drying Technology: An International Journal, 2015, 33(3): 377-383.
- [5] Sharma G, Raturi K, Dang S, et al. Inhibitory effect of cinnamaldehyde alone and in combination with thymol, eugenol and thymoquinone against *Staphylococcus epidermidis* [J]. Journal of Herbal Medicine, 2017, 9: 68-73.
- [6] Paudel S K, Bhargava K, Kotturi H. Antimicrobial activity of cinnamon oil nanoemulsion against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. on melons [J]. LWT, 2019, 111: 682-687.
- [7] He J, Wu D, Zhang Q, et al. Efficacy and mechanism of cinnamon essential oil on inhibition of *colletotrichum acutatum* isolated from 'hongyang' kiwifruit [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1288.
- [8] Kim S A, Rhee M S. Highly enhanced bactericidal effects of medium chain fatty acids (caprylic, capric, and lauric acid) combined with edible plant essential oils (carvacrol, eugenol, β -resorcylic acid, trans -cinnamaldehyde, thymol, and vanillin) against *Escherichia coli* O157:H7 [J]. Food Control, 2016, 60: 447-454.
- [9] 李晓玥,刘潭,杨博. ϵ -聚-L-赖氨酸及其抑菌机理研究进展[J].作物研究,2019,33(6):608-614.
- [10] Luo Y, Song Y. Mechanism of antimicrobial peptides: antimicrobial, anti-inflammatory and antibiofilm activities [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(21): 11401.
- [11] Li Y, Cui L, Du F, et al. Impacts of ϵ -polylysine hydrochloride with thymol on biogenic amines formation and biochemical changes of squid (*Illex argentinus*) [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2021, 45(6): 15505.
- [12] GB 2760-2014,食品安全国家标准食品添加剂使用标准[S].
- [13] 宋宗辉,张艺雯,王玲洁,等.肉桂醛的药理活性及其研究进展[J].解放军药学报,2018,34(6):550-554.
- [14] 史文艳,孙震. ϵ -聚赖氨酸盐酸盐与 Nisin 对蜡状芽孢杆菌的协同作用及机理[J].食品与机械,2019,35(3):15-19.
- [15] Doyle A A, Stephens J C. A review of cinnamaldehyde and its derivatives as antibacterial agents [J]. Fitoterapia, 2019, 139: 104405.
- [16] Yuan X, Zhang J, Zhang R, et al. Ultrasound-assisted preparation, characterization, and antibacterial activity of montmorillonite modified by ϵ -polylysine hydrochloride [J]. Materials, 2019, 12(24): 4148.
- [17] Jia Z, Li C, Fang T, et al. Predictive modeling of the effect of epsilon-polylysine hydrochloride on growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in fish balls [J]. J Food Sci, 2019, 84(1): 127-132.
- [18] Chen F, Kong N, Wang L, et al. Nanocomplexation between thymol and soy protein isolate and its improvements on stability and antibacterial properties of thymol [J]. Food Chemistry, 2021, 334: 127594.
- [19] Jiang Y, Yang L, Xin W, et al. Combined antibacterial and antibiofilm activity of phenyllactic acid and bacteriocin XJS01 against *Shigella flexneri* [J]. Food Bioscience, 2022, 45: 101512.
- [20] 宁亚维,付浴男,何建卓,等.苯乳酸和醋酸联用对单核细胞

- 增生李斯特菌的协同抑菌机理[J].食品科学,2020,41(23):70-76.
- [21] Diao W, Hu Q, Zhang H, 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.
- [22] Zhang Y, Liu X, Wang Y, et al. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [J]. Food Control, 2016, 59: 282-289.
- [23] 宁亚维,李文蕾,苏丹,等.抗菌肽 brevilaterin 与食品防腐剂联用对食源性致病菌的抑制[J].食品与发酵工业,2019,45(23):1-7.
- [24] Ye H, Shen S, Xu J, et al. Synergistic interactions of cinnamaldehyde in combination with carvacrol against food-borne bacteria [J]. Food Control, 2013, 34(2): 619-623.
- [25] 郭娟,张进,王佳敏,等.天然抗菌剂在食品包装中的研究进展[J].食品科学,2021,42(9):336-346.
- [26] 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 and Science, 2012, 25(1): 7-17.
- [27] 胡心怡,胡郁汉,潘振辉,等.百里香酚和肉桂醛联用对沙门氏菌的协同抑菌效应及其应用[J].现代食品科技,2021,37(12):112-119.
- [28] Ghosh I N, Patil S D, Sharma T K, et al. Synergistic action of cinnamaldehyde with silver nanoparticles against spore-forming bacteria: a case for judicious use of silver nanoparticles for antibacterial applications [J]. Int J Nanomedicine, 2013, 8: 4721-4731.
- [29] 王雪燕,陈瑛,张嘉敏,等.草鱼鱼鳞抗菌肽与肉桂精油联合抑菌作用及机理[J].食品科学,2020,41(23):100-106.
- [30] Shen S, Zhang T, Yuan Y, et al. Effects of cinnamaldehyde on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* membrane [J]. Food Control, 2015, 47: 196-202.
- [31] 张赟彬,刘笑宇,姜萍萍,等.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[J].现代食品科技,2015, 31(5):31-35.
- [32] Tan Z, Shi Y, Xing B, et al. The antimicrobial effects and mechanism of ϵ -poly-lysine against *Staphylococcus aureus* [J]. Bioresources and Bioprocessing, 2019, 6(1): 11.
- [33] 王梓源,李欣颖,吕俊阁,等. ϵ -聚赖氨酸对大肠杆菌的抑菌机制[J].食品与发酵工业,2020,46(21):34-41.