

复合生物保鲜剂对金黄色葡萄球菌的抑菌作用研究

蓝蔚青^{1,2}, 谢晶^{*1,2}, 毛锋^{1,2}, 陈文燕^{1,2}

(上海海洋大学 食品学院,上海 201306; 2. 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心,上海 201306)

摘要: 研究了壳聚糖、溶菌酶与茶多酚配制而成的复合保鲜剂对金黄色葡萄球菌的抑菌作用。采用琼脂平板打孔法确定复合保鲜剂对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度(MIC)与最小杀菌浓度(MBC),结合抑菌率、抑菌活力、细菌生长曲线、膜完整性、AKP活性与细菌超微结构,综合评价复合保鲜剂对金黄色葡萄球菌的影响。结果得出,复合保鲜剂对金黄色葡萄球菌的MIC与MBC分别为0.8 mg/mL与1.6 mg/mL,随着作用时间的延长,复合保鲜剂对金黄色葡萄球菌的生长抑制明显,菌体的细胞壁与细胞膜完整性受到破坏,菌体细胞中的AKP量增多,影响菌体细胞的代谢循环,菌体内部的核酸与蛋白质外泄,抑制其正常生长。由细菌超微结构观察发现,菌体细胞经复合保鲜剂处理后,造成菌体扭曲变形,细胞壁破裂,细胞质外渗。表明复合保鲜剂可破坏菌体的细胞壁,影响胞膜稳定性与胞内环境,最终导致菌体死亡。

关键词: 复合保鲜剂;抑菌作用;壳聚糖;溶菌酶;茶多酚;金黄色葡萄球菌

中图分类号:Q 93-33 文献标志码:A 文章编号:1673-1689(2014)08-0814-07

Antibacterial Effect of Composite Natural Preservatives Against *Staphylococcus aureus*

LAN Weiqing^{1,2}, XIE Jing^{*1,2}, MAO Feng^{1,2}, CHEN Wenyan^{1,2}

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Engineering Research Center of Aquatic Product Processing and Preservation, Shanghai 201306, China)

Abstract: In this paper, antibacterial activity of composite natural preservatives with chitosan, lysozyme, and tea polyphenols against *Staphylococcus aureus* were investigated. Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of composite natural preservatives were determined by stiletto method. The damage of *Staphylococcus aureus* which treated with composite natural preservatives were studied by cell damage experiment, such as bacteriostatic rate, antibacterial kinetics, growth curve, integrity of cell membrane, alkaline

收稿日期: 2013-11-18

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目(2012BAD38B09);上海市科技兴农项目(沪农科攻字2013第3-4号);上海海洋大学科技发展专项基金项目。

作者简介: 蓝蔚青(1977—),男,福建闽侯人,工学博士,高级工程师,主要从事食品冷冻与冷藏方面的研究。E-Mail:wqlan@shou.edu.cn

*通信作者: 谢晶(1968—),女,浙江嵊州人,工学博士,教授,博士研究生导师,主要从事食品冷冻与冷藏方面的研究。

E-Mail:jxie@shou.edu.cn

phosphatase (AKP) activity and ultra microstructure of bacteria. It concluded that the MIC and MBC of composite natural preservatives were 0.8mg/mL and 1.6mg/mL. With the extension of time, composite natural preservatives could inhibit the growth of *Staphylococcus aureus*, increase the quantity of AKP, and destroy the metabolic circulation, make the nucleic acid and protein leaked in cells. When treated with composite natural preservatives, *Staphylococcus aureus* was distorted, the cell wall was ruptured, the cytoplasm was spilled out, the stability of cell membrane and intracellular environment was destroyed, which led to the death of *Staphylococcus aureus*.

Keywords: composite natural preservatives, antibacterial effect, chitosan, lysozyme, tea polyphenols, *Staphylococcus aureus*

近年来,随着消费者对食品安全问题关注程度的愈益深入,安全、健康、专一性强且来源广泛的生物保鲜剂逐渐被应用于各种食品保鲜当中。国内外专家学者也就生物保鲜剂的抑菌机理与作用机制开展了一些研究工作。王丽丹等^[1]发现将 2 g/L 壳聚糖与 10 g/L 溶菌酶复配后对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、绿脓杆菌和白色念珠菌的杀菌率优于单独使用壳聚糖或单独使用溶菌酶,尤其对白色念珠菌的杀菌力明显提高。蒋慧亮等^[2]研究了茶多酚等 5 种生物保鲜剂对假单胞菌和腐败希瓦氏菌的抑菌效果。廖爱琳等^[3]考察了不同壳聚糖浓度、pH 值、金属离子、醋酸浓度对壳聚糖抑制金黄色葡萄球菌活性的影响。廖晓珊等^[4]测定了壳聚糖和竹醋液的复配液对细菌、霉菌的最低抑菌浓度,并研究了不同浓度壳聚糖竹醋液的复配液对抑菌活性的影响。同时,也逐渐形成了部分研究理论,如生物保鲜剂能使细胞壁受损、影响细胞代谢过程、改变细胞通透性与核酸分子结构、抑制酶活性与核酸合成等。常用的生物保鲜剂中,壳聚糖(Chitosan)能形成分子交联结构,作用于细胞膜和细胞壁,吸附菌体,造成细胞壁通透性增加,影响到细胞膜的通透性,从而明显抑制细菌的正常生长^[5-6],茶多酚(Tea polyphenols)能降低细菌黏着性^[7-8],破坏细胞膜^[9];溶菌酶(Lysozyme)同茶多酚一样,具有广谱的抑菌性能,能水解细胞壁中的糖苷键,影响细胞壁结构,使细胞壁部分缺失,失去对细胞的保护作用,使细胞质解体出现空腔;同时还能渗入细胞内部,吸附细胞内带有阴离子的细胞质,发生絮凝,扰乱其正常的生理活动,从而杀灭细菌,对革兰氏阳性球菌有明显的抑制作用^[10-12]。

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)又名

嗜肉菌,隶属于葡萄球菌属,是一种重要的食源性致病菌,广泛存在于自然环境中,它产生的肠毒素是引起食物中毒的主要致病因子,其对水产品的污染情况已严重影响到食品安全卫生,目前世界各国已将其列入食品卫生法定检测项目^[13]。作者以金黄色葡萄球菌为研究对象,将不同比例的壳聚糖、茶多酚与溶菌酶复配而成的生物保鲜剂,采用琼脂平板打孔法确定复合保鲜剂对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度(MIC)与最小杀菌浓度(MBC),结合抑菌率、抑菌活力、细菌生长曲线、膜完整性、AKP 活性与细菌超微结构,综合评价复合保鲜剂对金黄色葡萄球菌的作用,初步阐明复合保鲜剂对金黄色葡萄球菌的抑菌效果和作用机理。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料 复合保鲜剂:以壳聚糖、茶多酚和溶菌酶按一定比例和方法复配制得,配比为壳聚糖 10.0 g/L、茶多酚 3.0 g/L、溶菌酶 0.3 g/L,其中壳聚糖用 1.0% 乙酸溶液溶解。

1.1.2 药品与试剂 金黄色葡萄球菌(菌株编号 AB91093):由上海市疾病预防控制中心提供;壳聚糖、溶菌酶:购于国药集团化学试剂有限公司;茶多酚:购于上海维编科贸有限公司;碱性磷酸酶(AKP)测试盒:购于南京建成生物工程研究所;胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA)与胰蛋白胨大豆肉汤(TSB):购于上海市疾病预防控制中心;乙酸、无水乙醇溶液、氯化钠等:均为国产分析纯。

1.1.3 仪器与设备 M334712 全自动微生物生长曲线分析仪:芬兰 Bioscreen 公司;Synergy2 自动酶标仪:美国 BioTek 公司;THZ-82A 气浴恒温振荡

器:江苏金坛市环宇科学仪器厂;DK-8D 型电热恒温水槽:由上海一恒科技有限公司;SMA4000 微量紫外分光光度计:北京美林恒通科技有限公司;Unico UV-2100 分光光度计:尤尼柯(上海)仪器有限公司;隔水式培养箱:上海一恒科学仪器有限公司;VORTEX-5 漩涡混合器:海门市其林贝尔仪器制造有限公司;DHG-9053A 型电热鼓风干燥箱:上海一恒科学仪器有限公司;E-1010 离子溅射装置:Hitachi 日本株式会社;S3400N 扫描电子显微镜:Hitachi 日本株式会社;VS-1300L-U 标准超净工作台、高速冷冻离心机、SS-325 高压灭菌锅、Minispan Plue 微型高速离心机等。

1.2 实验方法

1.2.1 菌悬液的制备 挑取培养基上的 4~5 个单菌落于已灭菌的 TSB 中,37 ℃水浴培养 17 h,以 7 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,菌体沉淀用已灭菌的 TSB 稀释至 10^6 CFU/mL 作为实验菌液,贮存备用^[14]。

1.2.2 最小抑菌浓度(MIC)与最小杀菌浓度(MBC)的测定 按配方配制一定初始质量浓度的复合保鲜剂,采用二倍稀释法,用灭菌的 TSB 培养液把保鲜剂终质量浓度稀释为 13.3、6.6、3.3、1.6、0.8、0.4、0.2 mg/mL。通过琼脂平板打孔法^[15],将实验菌液与灭菌后未凝固的 TSA 营养琼脂按 1:5 的比例均匀混合,倾注入直径 9 cm 的培养皿中,凝固后其厚度为 4~5 mm。用直径为 7.8 mm 的无菌打孔器均匀打孔,4 孔/板,孔间距大于 20 mm,呈正方形,孔径大小与深度保持均匀。将打好的孔在酒精灯火焰上略微加热,使局部培养基融化重新凝固与平皿底壁紧密结合,防止加入的药液从底部的缝隙流出而影响实验结果。用移液枪吸取 200 μ L 经过无菌微滤的不同稀释度的保鲜剂,以无菌水为对照。培养皿置于 37 ℃培养 24 h 后,测量抑菌圈直径大小(mm),用游标卡尺测量抑菌圈直径,计算平均值,进行对比研究^[16]。每一质量浓度作 4 次平行实验。按抑菌直径大小划分相对敏感度^[17],见表 1。

1.2.3 抑菌率的测定 向 96 微孔板中依次加入 100 μ L 已制备的菌液,并作编号,分别取 100 μ L 的 MIC 与 MBC 的复合保鲜剂加入孔中与菌液充分混合,置于 37 ℃微孔板振荡器中培养 12 h,酶标仪测定 600 nm 处的吸光度值,根据公式^[18]计算其抑菌率。

$$\text{抑菌率}/\% = \frac{\text{OD}_R - \text{OD}}{\text{OD}_R - \text{OD}_B}$$

式中: OD_R 为对照孔吸光值; OD 为样品孔吸光值; OD_B 为空白孔吸光值。

表 1 复合保鲜剂对金黄色葡萄球菌的抑菌效果对照

Table 1 Comparative inhibitory effect of composite natural preservatives on *Staphylococcus aureus*

抑菌直径/mm	敏感级别	相对敏感度
$d \geq 20.0$	极敏感	++++
$15.0 \leq d < 20.0$	高敏	+++
$10.0 \leq d < 15.0$	中敏	++
$7.8 < d < 10.0$	低敏	+
$d \leq 7.8$	无效	-

注:大于对照抑菌圈直径的最低保鲜剂浓度为复合保鲜剂的 MIC,抑菌圈最小的保鲜剂最大浓度为复合保鲜剂的 MBC。

1.2.4 抑菌活力的测定 将 MIC 与 MBC 的复合生物保鲜剂溶液分别加入到菌悬液中,相应温度下 150 r/min 摇床培养,用蒸馏水代替复合保鲜剂作对照,用自动酶标仪在波长 630 nm 处检测不同时间的吸光度(A),绘制曲线,得出活性峰出现的时间与数量。按 Seiichi Hara 等^[19]的方法计算抗菌活力。

$$U = \left(\frac{A_0 - A}{A_0} \right)^{1/2}$$

式中: A_0 为对照组的吸光度; A 为处理组的吸光度。

1.2.5 复合保鲜剂对金黄色葡萄球菌生长曲线的影响 取一定量测试菌液,加入 MIC 与 MBC 的复合保鲜剂,37 ℃、150 r/min 摇床培养,在 24 h 内,每隔 30 分钟由全自动微生物生长曲线分析仪自动取样一次,测定 620 nm 处的吸光度值,以培养时间为横坐标, OD_{620} 值为纵坐标,绘制金黄色葡萄球菌生长曲线,设立不添加保鲜剂的菌液为对照组。

1.2.6 复合生物保鲜剂对菌体细胞壁的影响 将 MIC 与 MBC 的复合生物保鲜剂溶液加入到两种菌悬液中,37 ℃、150 r/min 摇床培养,用蒸馏水代替保鲜剂溶液作为对照组,定时取样,3 500 r/min 离心 10 min,取上清液,用试剂盒方法测定碱性磷酸酶(AKP)的含量随时间延长的变化情况。

1.2.7 复合保鲜剂对金黄色葡萄球菌菌体紫外吸收物渗透的影响 菌体的细胞膜如果遭到破坏,细胞内容物将发生外泄,通过测定菌液在 260 nm 吸收物的吸光度值,便可分析细菌细胞膜的完整性^[19]。

将 MIC 与 MBC 的复合保鲜液,取一定量加入菌悬液中,37 ℃、150 r/min 摇床中进行培养,采用无菌蒸馏水代替保鲜剂作对照组,每隔 1 小时取样,3 500 r/min 离心 1 min,使用紫外分光光度计测定上清液在 260 nm 处的吸光度。

1.2.8 复合生物保鲜剂对菌体细胞超微结构的影响 测试菌液中加入 MIC 与 MBC 浓度的复合生物保鲜剂溶液处理菌体,用扫描电镜观察经复合保鲜剂处理 10 h 后,对菌体形态结构的影响。取对数生长期的细菌,3 500 r/min 离心 10 min,弃上清液,无菌缓冲液洗涤 3 次,并稀释成菌落总数 10^6 CFU/mL 的菌悬液,加入复合保鲜剂,以蒸馏水处理的菌液作为对照组,37 ℃、170 r/min 培养。多次离心获得菌体,菌体沉淀用磷酸缓冲液洗涤 3 次后分别进行以下操作:甲醛-乙醇-乙酸试液固定 12 h,体积分数 30%、50%、70%、90%的乙醇梯度脱水、涂至金属箔片上、超临界二氧化碳干燥固定、喷金,于扫描电镜下观察细菌形态结构。

1.3 数据处理

实验数据均采用重复实验的平均值,数据用 Microsoft Excel 软件绘制曲线,数据间的差异通过统计软件 SPSS13.0 中的 Duncan 新复极差法进行方差分析与多重比较,结果以平均值 $\pm$ 标准偏差表示。

2 结果与分析

2.1 最小抑菌浓度(MIC)与最小杀菌浓度(MBC)

由表 2 可看出,质量浓度 ≥ 1.6 mg/mL 的复合保鲜剂与 1.0%的乙酸溶液对金黄色葡萄球菌均有较好的杀菌效果。随着复合保鲜剂质量浓度浓度的降低,其抑菌作用逐渐减弱,复合保鲜剂对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度(MIC)为 0.8 mg/mL,最小杀菌浓度(MBC)为 1.6 mg/mL。

2.2 抑菌率

由公式计算得出,MIC 与 MBC 浓度的复合保鲜剂对金黄色葡萄球菌的抑菌率分别为 17.19%与 58.60%。可见,相应浓度的复合生物保鲜剂对金黄色葡萄球菌具有较好的抑制作用。

2.3 抑菌活力

抑菌活力主要用于表征复合保鲜剂对菌体的抑制效果,通常是利用液体抑菌实验(即抑菌动力学),测定 MIC 与 MBC 浓度复合保鲜剂的抑菌活性与作用时间的关系。

表 2 复合保鲜剂对金黄色葡萄球菌的抑菌效果

Table 2 Inhibitory effect of composite natural preservatives against *Staphylococcus aureus*

质量浓度/(mg/mL)	抑菌圈直径/mm	相对敏感度
13.3	18.12 $\pm$ 0.19	+++
6.6	17.15 $\pm$ 0.13	+++
3.3	15.95 $\pm$ 0.31	+++
1.6	13.72 $\pm$ 0.30	++
0.8	7.80 $\pm$ 0.21	-
0.4	7.80 $\pm$ 0.19	-
0.2	7.80 $\pm$ 0.25	-
1.0%乙酸	16.38 $\pm$ 0.95	+++

由图 1 可知,MIC 处理组的金黄色葡萄球菌在作用 2 h 时出现一个活性峰,随着作用时间的延长,其抑菌活力逐渐减弱。经 MBC 处理后,作用的 3 h 抑菌活性略有降低,后总体呈显著上升趋势,且在 6 h 时出现了一个活性峰。可见,复合保鲜剂的质量浓度越高,其抑菌效果也相对越好。

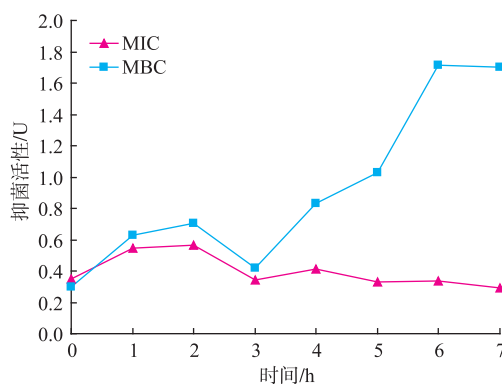


图 1 复合保鲜剂对金黄色葡萄球菌的抑菌动力学

Fig. 1 Antibacterial kinetics of composite natural preservatives against *Staphylococcus aureus*

2.4 细菌生长曲线

由图 2 可以看出,时间-抑制研究显示两种质量浓度的复合保鲜剂对金黄色葡萄球菌均有明显的抑制作用。对照组的金黄色葡萄球菌生长正常,培养 8 h 时达到对数期,细菌数量迅速增加。MIC 的复合保鲜剂处理后的菌体生长速度与对照组相比,生长速度明显变缓。经 MBC 的复合保鲜剂处理后,金黄色葡萄球菌的生长则始终处于低水平状态,抑制效果较显著。

2.5 对菌体细胞壁的影响

碱性磷酸酶(AKP)广泛存在于动植物及微生物

体内, 是一种对底物专一性较低的磷酸单酯水解酶, 不仅参与钙磷代谢维持生物体内适宜的钙磷比例, 而且还与蛋白质的分泌合成相关, 在生物体内的物质代谢中具有重要作用^[20]。由于其主要存在于细胞壁与细胞膜间, 正常情况下在胞外不能检测到其活性。但当细胞壁或细胞膜遭到破坏后, 导致细胞透性增加, 其将泄漏到胞外。因此, 通过检测细胞外酶量的变化便可以反映菌体细胞壁的透性变化^[21-22]。从图 3 可以看出, 经复合保鲜剂作用 4 h 后, 菌液中胞外渗出的 AKP 量开始增多, 其 AKP 值高于对照组。其中, 经 MBC 的复合保鲜剂处理后, 其菌体细胞中渗出的 AKP 量更明显增加。可知, 对照组细胞内容物 AKP 量变化平缓, 经复合保鲜剂处理后, AKP 量显著升高, 说明复合生物保鲜剂对细胞的代谢循环产生影响, 菌体的正常生长受到抑制。同时, 还造成菌体电解质的外泄增多, 使细胞内环境和细胞膜稳定性破坏。

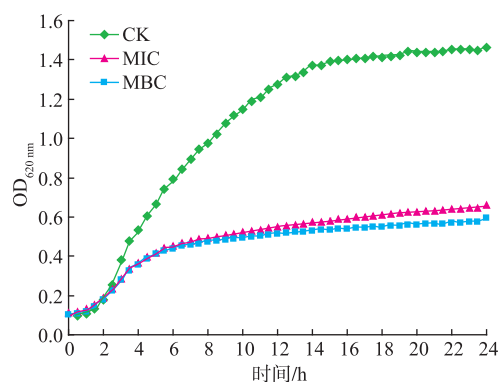


图 2 复合保鲜剂对金黄色葡萄球菌生长曲线的影响

Fig. 2 Effect of composite natural preservatives on the growth curves of *Staphylococcus aureus*

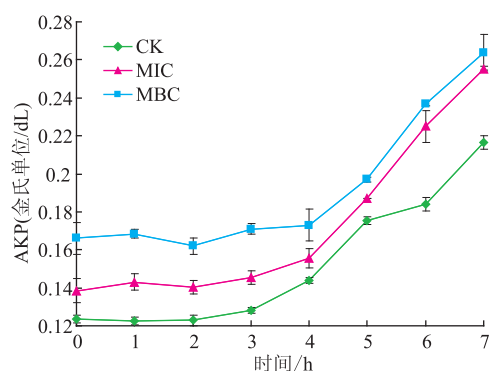


图 3 复合保鲜剂对金黄色葡萄球菌菌体细胞壁的影响

Fig. 3 Effects of composite natural preservatives on cell wall of *Staphylococcus aureus*

2.6 对菌体细胞膜完整性的影响

细胞膜是一种结构组成, 当菌悬液暴露在抗菌剂中时, 它可能会被破坏甚至功能缺失。如果细胞膜被破坏, K^+ 、 PO_4^{3-} 等小离子会首先泄漏出来, 随后是大分子如 DNA、RNA 与其它物质, 这种在 260 nm 处具有强吸收值的细胞内容物可以用来表征细胞膜的破坏情况^[23]。由图 4 可见, MIC 与 MBC 的复合保鲜剂对金黄色葡萄球菌均表现出明显的抑菌活性。实验组在 260 nm 波长的吸光值明显大于对照组, 随着复合保鲜剂作用时间的延长, 其吸光值呈上升趋势, 复合生物保鲜剂的 MBC 作用效果明显高于 MIC, 充分说明了细胞内容物的泄漏速率与复合保鲜剂浓度呈正相关, 复合保鲜剂会造成菌体内部核酸和蛋白质外泄, 这与早期研究结果相一致^[24]。

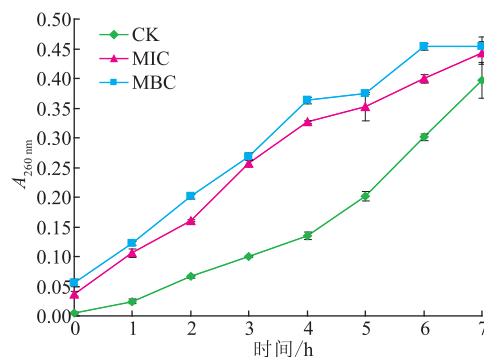


图 4 复合保鲜剂对金黄色葡萄球菌膜完整性的影响

Fig. 4 Effects of composite natural preservatives on adventitia permeability of *Staphylococcus aureus*

2.7 细菌超微结构

由图 5 可知, 对照组的金黄色葡萄球菌菌体形态饱满, 菌体完整未变形, 表面无缺损; 经复合生物保鲜剂处理 10 h 后, 菌体表面被保鲜剂吸附凝集, MIC 复合保鲜剂处理后, 部分菌体出现扭曲变形, 一些部位开始凹陷, 内容物渗出至胞外。经 MBC 复合保鲜剂处理后, 菌体在扭曲变形的同时, 还发生干瘪破裂现象, 细胞壁发生溶解, 细胞质从菌体细胞体内大量渗出, 此现象同叶磊^[25]与杨东芝^[26]等研究结果相似。叶磊等研究认为壳聚糖的有效基团- NH_3^+ 可以与细菌细胞膜上的类脂-蛋白质复合物反应, 使蛋白质变性, 改变细胞膜的通透性或细菌细胞壁形成一个负电荷环境, 壳聚糖能使细胞壁的完整性受损或使其趋于溶解, 直至细胞死亡。此外, 杨东芝等的研究也发现, 壳聚糖溶于酸后成为一种阳离子生物絮凝剂, 能使菌体细胞沉淀, 在细菌菌

体表层形成一层高分子膜,影响细菌对营养物质的吸收,阻止代谢物的排出,导致细菌新陈代谢紊乱,从而达到杀菌抑菌的作用。

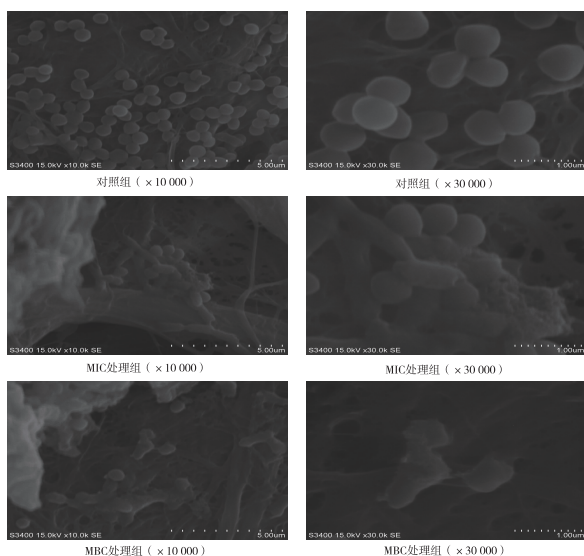


图5 对照组和复合保鲜剂处理10 h的金黄色葡萄球菌扫描电镜图

Fig. 5 Scanning electron microscopy of *Staphylococcus aureus* at 10 h with composite natural preservatives

参考文献:

- [1] 王丽丹,钱秀珍,徐云龙.壳聚糖与溶菌酶复配体系的杀菌性能研究[J].华东理工大学学报:自然科学版,2013,39(6):284-288,295.
WANG Lidan,QIAN Xiuzhen,XU Yunlong. Bactericidal properties of chitosan and lysozyme composite system [J]. **Journal of East China University of Science and Technology:Natural Science Edition**,2013,39(6):284-288,295.(in Chinese)
- [2] 蒋慧亮,李学英,杨宪时,等.生物保鲜剂对鱼类腐败菌抑菌效果比较及抑菌机理研究[J].食品科学,2012,33(23):31-35.
JIANG Huiliang,LI Xueying,YANG Xianshi,et al. Comparative antibacterial effects and mechanisms of biological preservatives against fish spoilage organisms[J]. **Food Science**,2012,33(23):31-35.(in Chinese)
- [3] 廖爱琳,吴晓萍,易蜀婷,等.壳聚糖对金黄色葡萄球菌抑菌活性的研究[J].中国食物与营养,2011,17(4):40-43.
MIAO Ailin,WU Xiaoping,YI Suting,et al. Study on antimicrobial activity of chitosan against *Staphylococcus aureus* [J]. **Food and Nutrition in China**,2011,17(4):40-43.(in Chinese)
- [4] 廖晓珊,钟晓红,孟娟,等.壳聚糖竹醋液复合膜抗菌活性及其应用[J].食品与生物技术学报,2010,29(3):395-400.
MIAO Xiaoshan,ZHONG Xiaohong,MENG Juan,et al. Antimicrobial properties and application of composite film from chitosan and bamboo vinegar[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2010,29(3):395-400.(in Chinese)
- [5] 滕丽菊,张子勇,唐书泽,等.壳聚糖抗菌活性的研究[J].中国调味品,2008,10:48-51.
TENG Liju,ZHANG Ziyong,TANG Shuze,et al. Antibacterial study of chitosan [J]. **China Condiment**,2008,10:48-51.(in Chinese)
- [6] 荆迎军,郝友进,渠晖,等.壳聚糖的抑菌活性分析及其抑菌机理的研究[J].中国抗生素杂志,2006,31(6):361-365,375.
JING Yingjun,HAO Youjin,QU Hui,et al. Preliminary studies on antibacterial mechanism and analysis of antibacterial activity of chitosan[J]. **Chinese Journal of Antibiotics**,2006,31(6):361-365,375. (in Chinese)
- [7] 徐芃,刘东成.茶多酚抗氧化和抑菌机制的研究[J].中国医药导报,2008,23(5):21-22.
XU Fan,LIU Dongcheng. Antiseptic mechanism of tea polyphenol[J]. **China Medical Herald**,2008,23(5):21-22.(in Chinese)
- [8] 唐裕芳,张妙玲,冯波,等.茶多酚抑菌活性研究[J].浙江林学院学报,2005,22(5):553-557.

3 结语

1) 该复合生物保鲜剂对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度(MIC)与最小杀菌浓度(MBC)分别为0.8 mg/mL与1.6 mg/mL,其对金黄色葡萄球菌对数生长期的抑制明显,能使其进入对数生长期的速度减缓。

2) 随着处理时间的延长,培养液的紫外吸收物质增多,复合保鲜剂能造成金黄色葡萄球菌菌体内部的核酸和蛋白质等物质外泄,细胞内容物泄漏速率与复合保鲜剂浓度正相关。

3) 复合保鲜剂使菌体细胞中渗出的 AKP 量增多,造成细胞壁通透性增加,破坏细胞结构的完整性。同时,也能影响细胞内环境与细胞膜的稳定性,导致菌体内部的电解质外泄,从而达到抑菌目的。

4) 复合生物保鲜剂还可造成金黄色葡萄球菌菌体凝集并沉降,处理10 h后发现大部分细菌菌体弯曲变形,细胞壁塌陷破裂,内容物渗出至胞外,细胞相继死亡。

- TANG Yufang, ZHANG Miaoling, FENG Bo, et al. Anti-microbial activities of tea polyphenol [J]. **Journal of Zhejiang Forestry College**, 2005, 22(5): 553–557. (in Chinese)
- [9] 杨冬芝, 刘晓飞, 李治. 壳聚糖抗菌活性的影响因素[J]. **应用化学**, 2000, 17(6): 598–602.
YANG Dongzhi, LIU Xiaofei, LI Zhi. On the factors influencing the antibacterial activity of chitosan [J]. **Chinese Journal of Applied Chemistry**, 2000, 17(6): 598–602. (in Chinese)
- [10] 王景梓, 王岗, 徐贵发, 等. 茶多酚的药理研究[J]. **食品与药品**, 2006, 8: 23–26.
WANG Jingzi, WANG Gang, XU Guifa, et al. The study of pharmacology of tea polyphenol [J]. **Food and Drug**, 2006, 8: 23–26. (in Chinese)
- [11] 卢亚萍, 潘宏涛. Aegis 溶菌酶的抑菌作用及抑菌机理初步研究[J]. **新饲料**, 2007, 12: 15–17.
LU Yaping, PAN Hongtao. Preliminary study on the inhibition effect of Aegis lysozyme and its mechanism [J]. **New Feed**, 2007, 12: 15–17. (in Chinese)
- [12] 杨向科, 邹艳丽, 孙溢, 等. 海洋微生物溶菌酶的抑菌作用及抑菌机理初步研究[J]. **海洋水产研究**, 2005, 26(5): 62–67.
YANG Xianke, ZOU Yanli, SUN Mi, et al. Study on antimicrobial action and bacteriostatic mechanism of the marine microbial lysozyme[J]. **Marine Fisheries Research**, 2005, 26(5): 62–67. (in Chinese)
- [13] BB Lewis, SB Chestner. Formaldehyde in dentistry: a review of mutagenic and carcinogenic potential [J]. **Journal of the American Dental Association**, 1981, 103: 429–434.
- [14] Le Loir Y, Baron F, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning [J]. **Genetics and Molecular Research**, 2003, 2(1): 63–76.
- [15] 周煜华. 黄鳝鱼的松鼠葡萄球菌的分离与鉴定[J]. **广西畜牧兽医**, 2000, 16(1): 15–17.
ZHOU Yuhua, Separation and identification of *Staphylococcus sciuri* in Yellow eels[J]. **Guangxi Journal of Animal Husbandry & Veterinary Medicine**, 2000, 16(1): 15–17. (in Chinese)
- [16] 丁月云, 李茜, 王恬. 21 种中药对奶牛乳房炎 3 种病原菌的体外抑菌试验[J]. **畜牧与兽医**, 2004, 36(12): 5–7.
DING Yueyun, LI Qian, WANG Tian. Antibiosis effect of 21 kinds of Chinese medicinal herbs on the major pathogenic bacteria causing mastitis[J]. **Animal Husbandry & Veterinary Medicine**, 2004, 36(12): 5–7. (in Chinese)
- [17] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物学实验教程[M]. 北京: 北京大学出版社, 2000: 207–208.
- [18] 刘冬梅, 李理, 杨晓泉. 用牛津杯法测定益生菌的抑菌活力[J]. **食品研究与开发**, 2006, 27(3): 110–111.
LIU Dongmei, LI Li, YANG Xiaoquan. Determination of the antimicrobial activity of probiotic by oxford plate assay system[J]. **Food Research and Development**, 2006, 27(3): 110–111. (in Chinese)
- [19] 骆健美, 王敏, 刘峰, 等. 一种快速检测抑菌物质活性的微孔板生物检测方法[P]. 中国专利: 200810153179.9, 2009–04–21.
- [20] Seiichi Hara, Minoru Yamakawa. A novel type of antibacterial peptide isolated from the silkworm *Bombyx mori* [J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1995, 270: 29923–29927.
- [21] 黄秀琴, 王卫星. 补体对大肠杆菌的致死过程[J]. **华东师大学报: 自然科学版**, 1996(2): 103.
HUANG Xiuqin, WANG Weixing. The lethal event in the complement bactericidal reaction [J]. **Journal of East China Normal University: Natural Science**, 1996(2): 103. (in Chinese)
- [22] Chris Zhisheng Chen, Stuart L. Cooper. Interactions between dendrimer biocides and bacterial membranes [J]. **Biomaterials**, 2002, 23: 3359–3368.
- [23] 孙延忠, 曾洪梅, 石萍, 等. 武夷菌素对番茄灰霉菌的作用方式[J]. **植物病理学报**, 2003, 33(5): 434–438.
SUN Yanzhong, ZENG Hongmei, SHI Ping, et al. Action mode of *wuyiencin* against *Botrytis cinerea* [J]. **Chinese Journal of Plant Pathology**, 2003, 33(5): 434–438. (in Chinese)
- [24] Hee Jae Lee, Gyung Ja Choi, Kwang Yun Cho. Correlation of lipid peroxidation in *Botrytis cinerea* caused by dicarboximide fungicides with their fungicidal activity[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 1998, 46: 737–740.
- [25] 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 Lihong, TAO Yan, XIE Jing. Antimicrobial Mechanisms of tea polyphenol against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*[J]. **Microbiology**, 2010, 37(11): 1628–1633. (in Chinese)
- [26] 叶磊, 何立千, 高天洲, 等. 壳聚糖的抑菌作用及其稳定性研究[J]. **北京联合大学学报: 自然科学版**, 2004, 18(1): 79–82.
YE Lei, HE Liqian, GAO Tianzhou, et al. Studies on the antibiotic activity and its stability of chitosan [J]. **Journal of Beijing Union University: Natural Sciences**, 2004, 18(1): 79–82. (in Chinese)