

乌梅提取液对李斯特菌的抑菌机理

耿飞, 王伟, 周涛*

(南京师范大学金陵女子学院食品科学与工程系, 江苏 南京 210097)

摘要: 运用流式细胞仪研究乌梅提取液对李斯特菌的抑菌机理。首先通过抑菌实验确定乌梅提取液对李斯特菌的最小抑菌浓度(MIC)为0.625mg/mL, 然后用1、2、4倍MIC的乌梅提取液对李斯特菌进行处理, 通过流式细胞仪对其前向散射光(FSC)变化、DNA含量变化、细胞膜电位变化、细胞周期变化和Annexin V-FITC/PI双标记法、细胞内Ca²⁺含量变化指标进行检测, 探索抑菌机理。结果表明, 乌梅提取液通过破坏李斯特菌的细胞膜系统和阻滞DNA的合成抑制其生长繁殖。

关键词: 流式细胞仪; 乌梅; 李斯特菌; 抑菌机理

Antibacterial Mechanisms of Fructus mume Extract against *Listeria innocua*

GENG Fei, WANG Wei, ZHOU Tao*

(Department of Food Science and Engineering, Ginling College, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: The antibacterial mechanisms of ethanol extract from *Fructus mume* (prepared by reflux extraction with 95% ethanol and subsequent rotary evaporation until a concentration of 1 g/mL, namely raw material weight/condensed extract volume ratio = 1:1) against *Listeria innocua* were assayed by flow cytometry. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the extract against *L. innocua* was 0.625 mg/mL. In the presence of the extract at different concentrations such as 1, 2 and 4 MICs, the changes of forward scatter (FSC) light, DNA content, membrane potential, cell cycle, Ca²⁺ and Annexin V-FITC/PI double staining of *L. innocua* were analyzed by flow cytometry. The results showed that the extract could inhibit *L. innocua* by destroying cell membrane system and blocking DNA synthesis.

Key words: flow cytometry; *Fructus mume*; *L. innocua*; antibacterial mechanism

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)15-0088-06

乌梅为蔷薇科植物梅(*Prunus mume* Sieb. et Zucc)成熟的果实青梅经干燥而成。乌梅药食兼用, 能开胃、生津、止渴。其果实中含有柠檬酸、苹果酸、琥珀酸、酒石酸及谷甾酸等, 具有一定的抑菌防腐作用^[1]。有关乌梅提取液的抑菌研究, 国内外均有报道, 吴传茂等^[2]研究表明乌梅水提液对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌均有很强的抑菌作用。Kwon等^[3]通过对乌梅、黄连、五味子的甲醇复合提取液研究表明, 其复合提取液对沙门氏菌有较强抑菌作用。

李斯特菌是一种在自然界和各类食品中经常发现的食源性致病菌。它具有高致病率的特点, 而且其对外界环境有很强的适应性, 如: 可在冷藏温度、低pH值、高盐浓度下生存^[4]。

流式细胞仪(flow cytometry, FCM)是一项集激光技

术、电子物理技术、光电测量技术、计算机技术以及细胞荧光化学技术、单克隆抗体技术为一体的新型高科技仪器, 它可对单细胞或其他生物颗粒膜表面以及内部的化学成分进行快速定量分析与分选^[5]。通过结合荧光技术, 流式细胞分析可以非常有效地分析细胞功能, 如: 代谢活性、膜电位和膜的完整性等。

目前, 乌梅提取液对李斯特菌的抑菌机理研究国内外文献尚未报道。本实验研究不同质量浓度的乌梅提取液对李斯特菌的抑制作用, 并利用流式细胞仪对经过不同质量浓度乌梅提取液处理的李斯特菌的前向散射光(FSC)变化、DNA含量变化、细胞膜电位变化、细胞内Ca²⁺含量变化、细胞周期变化和Annexin V-FITC/PI双染法指标检测, 探索乌梅提取液对李斯特菌的抑菌机理。

收稿日期: 2010-11-09

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目(CX(09)627)

作者简介: 耿飞(1982—), 男, 硕士研究生, 研究方向为天然防腐剂。E-mail: gplane1983@126.com

* 通信作者: 周涛(1964—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为天然防腐剂。E-mail: zhoutao@sina.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

威尔斯李斯特菌(*Listeria innocua*)由南京师范大学食品科学与工程系提供。

AnnexinV-FITC/PI 检测试剂盒由美国 Biouniquer 公司提供。

1.2 仪器与设备

FACS Calibur 流式细胞仪 美国 BD 公司; ELX808 酶标仪 美国 Bio-Tek 公司。

1.3 乌梅提取液制备^[6]

乌梅购于南京市广州路大药房, 将乌梅干燥后粉碎至 40~60 目, 用 95% 乙醇进行冷凝回流浸提, 浸提液经抽滤后用旋转蒸发仪浓缩, 制成原液(1mL 提取液中含有 1g 原材料的提取物, 即 1g/mL)备用。

1.4 菌悬液制备

从牛肉膏蛋白胨琼脂培养基斜面上取威尔斯李斯特菌菌种, 接种于液体培养基中, 在 37℃ 条件下培养 16h 后, 2000r/min 离心 10min, 弃上清液, 菌体沉淀用已灭菌培养液稀释至菌落总数 10⁶CFU/mL 作为测试菌液, 备用。

1.5 最小抑菌浓度(MIC)测定

乌梅提取液的 MIC 测定采用 2 倍稀释法^[7]。乌梅提取液原液用 5% 的吐温-80 稀释, 使其质量浓度达到 10mg/mL, 再用等梯度稀释法使其质量浓度分别为 5、2.5、1.25、0.625、0.313mg/mL。取不同质量浓度的提取液 1mL, 菌悬液 1mL, 于不同试管混合, 另一管取 5% 的吐温-80 与菌悬液 1mL 混合, 作为对照组, 分别于 37℃ 培养 24h, 观察菌落生长情况, 以不长菌的乌梅提取液的最低质量浓度为乌梅提取液对李斯特菌的 MIC。

1.6 抑菌活力测定

将 1 倍 MIC 的乌梅提取液加入到李斯特菌菌悬液中, 在 37℃ 条件下 150r/min 摇床培养, 用牛肉膏蛋白胨液体培养基代替乌梅提取液作对照组, 培养不同时间后用自动酶标仪在波长 630nm 处检测吸光度(A), 按 Hultmark 等^[8]的方法计算抑菌活力(U)。以时间为横坐标, 抑菌活力为纵坐标绘制曲线, 得出活性峰出现的时间与数量。

$$\text{抑菌活力 } U = \frac{A_0 - A}{A_0}$$

式中: A_0 为对照组吸光度。

1.7 乌梅提取液对李斯特菌的抑菌机理

1.7.1 样品前处理

取对数生长期的细菌, 2000r/min 离心 10min, 弃上清液, 无菌缓冲液洗涤 3 次, 并稀释成菌落总数

10⁶CFU/mL 的菌悬液, 加入 1、2、4 倍 MIC 的乌梅提取液, 以无菌液体培养基代替乌梅提取液作为对照组, 37℃、180r/min 培养 2h, 取样作为待测样品。

1.7.2 AnnexinV-FITC/PI 双标记法

取上述待测样品 1mL, 于 2000r/min 离心 5min, 弃上清液, 用磷酸缓冲液(PBS, pH7.0)冲洗 3 次, 并用 PBS 将菌悬液浓度稀释为 10⁶CFU/mL, 设空白对照组和乌梅提取液处理组, 取 100μL 细胞悬液加入异硫氰酸荧光素(FITC)标记的 Annexin V - FITC 5μL 和 20μg/mL 碘化丙啶(PI)5μL, 室温静止 30min, 再加入 1mL PBS, 在 1h 内用流式细胞仪检测其荧光强度。

1.7.3 DNA 含量和前向散射光(FSC)变化

取上述待测样品 1mL, 于 2000r/min 离心 5min, 弃上清液, 用 PBS 冲洗 3 次, 加入预冷的 70% 乙醇 1mL, 放入冰箱固定 30min, 再次离心弃乙醇, 用 PBS 冲洗, 再离心、弃上清液, 加入 PI 溶液 1mL(包含 Rnase 和 TritonX-100), 4℃、避光孵育 30min 后, 上机检测。

1.7.4 细胞周期检测

参照 1.7.3 节操作步骤进行。

1.7.5 细胞内钙离子含量变化

取上述待测样品 1mL, 于 2000r/min 离心 5min, 弃上清液, 用去离子水配制的 PBS 冲洗 3 次, 加入 10μL 荧光探针 Fluo-3, 避光孵育 30min 后, PBS 洗涤 2 次, 上机检测。

1.7.6 细胞膜电位变化

取上述待测样品 1mL, 用 2000r/min 离心 5min, 弃上清液, 用去离子水配制的 PBS 冲洗 3 次, 加入 5μL 荧光探针罗丹明 123, 避光孵育 30min 后, PBS 洗涤 2 次, 上机检测。

1.8 实验数据统计分析

本实验使用流式细胞仪自带软件对其结果进行分析。

2 结果与分析

2.1 MIC 的测定结果

表 1 乌梅提取液对李斯特菌的最小抑菌浓度

Table 1 MIC determination of *Fructus mume* extracts against *L. innocua*

乌梅提取液质量浓度/(mg/mL)	0.156	0.313	0.625	1.25	2.5	5	10
菌落生长情况	+	+	-	-	-	-	-

注: +. 有菌落生长; -. 无菌落生长。

由表 1 可见, 当乌梅提取液质量浓度为 0.313mg/mL 时, 有菌落长出, 但质量浓度为 0.625mg/mL 时, 无菌落长出, 因此, MIC 为 0.625mg/mL。

2.2 乌梅提取液对李斯特菌的抑菌动力学

利用液体抑菌实验,测定乌梅提取液的抑菌活力与作用时间的关系,即乌梅提取液的抑菌动力学。由图1可见,在乌梅提取液与李斯特菌作用的12h内,于2h左右达到活性高峰,此高峰一直持续到9h,表明乌梅提取液对李斯特菌有很强的抑制性。

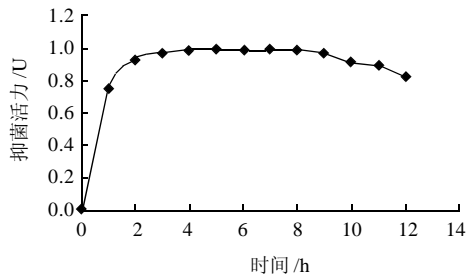
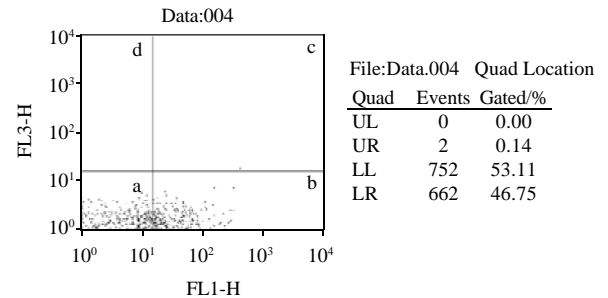
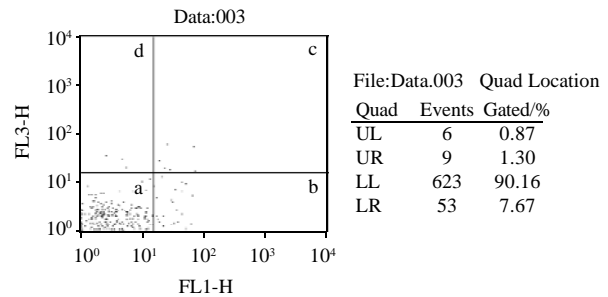
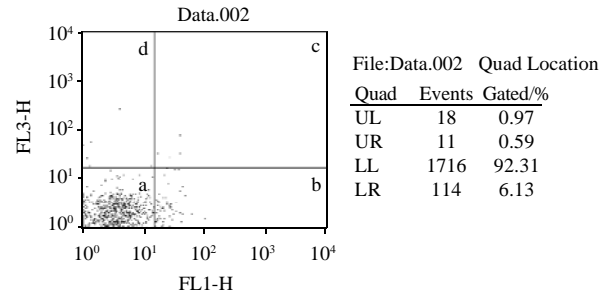
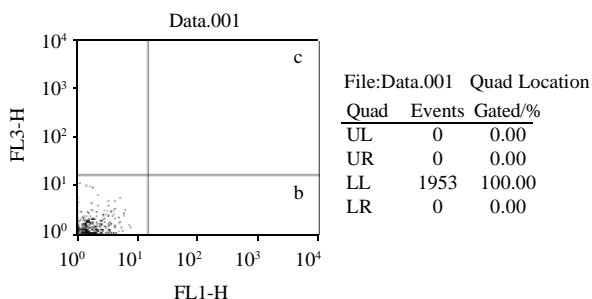


图1 乌梅提取液对李斯特菌的抑菌动力学

Fig.1 Antibacterial dynamics of *Fructus mume* extracts against *L. innocua*

2.3 AnnexinV-FITC/PI 双标记法

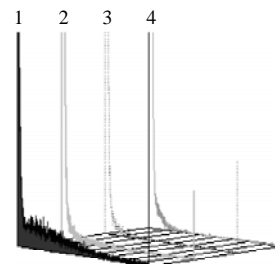
磷脂酰丝氨酸(PS)在正常细胞中只存在于细胞膜的内侧,在受到特定伤害时,质膜内侧的PS重新分布,由细胞膜内侧翻转到细胞膜外侧,暴露于细胞外表面,PS外翻可以通过AnnexinV来检测^[11]。用FITC标记的AnnexinV与PI进行双染色,就可以在流式细胞仪上灵敏地检测到活细胞、受伤细胞和死细胞。图2显示4类不同的细胞,即FITC- /PI-的活细胞(a, LL)、FITC+/PI-的受伤细胞(b, LR)、FITC+/PI+的死细胞(c, UR)、FITC- /PI+的坏死细胞和碎片(d, UL)。实验用不同质量浓度的乌梅提取液处理李斯特菌发现,当1倍MIC时,细胞受伤率为6.13%,当2倍MIC时,细胞受伤率为7.6%,但当4倍MIC时,受伤率为46.7%,而且活细胞所占比例也随着质量浓度的增加而降低,这说明抑菌效果与提取液质量浓度成正比。Paparella等^[10]利用羧基双乙酸钠和碘化丙啶采取双标记法评价百里香、肉桂和牛至对李斯特菌的抑菌效果。结果表明,随着香精油浓度的增大,完整活细胞所占的比例在逐渐减少,即抑菌效果与香精油的浓度成正相关性,这与本实验所得结果是一致的。



Date 001、002、003、004.分别为对照组和1、2、4倍MIC处理组。

图2 乌梅提取液对李斯特菌的AnnexinV-FITC/PI双标记的影响
Fig.2 Effect of *Fructus mume* extract on annexin V-FITC/PI double staining of *L. innocua*

2.4 DNA含量变化



File:Data.007		File:Data.009		File:Data.010		File:Data.011	
Events	Mean	Events	Mean	Events	Mean	Events	Mean
30000	154.59	30000	25.47	30000	24.74	30000	24.26

Numerator Histogram		*Numerator Histogram*		*Numerator Histogram*	
File:Data.009		File:Data.010		File:Data.011	
Denominator Histogram		*Denominator Histogram*		*Denominator Histogram*	
File:Data.007		File:Data.007		File:Data.007	
Events	Mean	Events	Mean	Events	Mean
30000	25.47	30000	24.74	30000	24.26

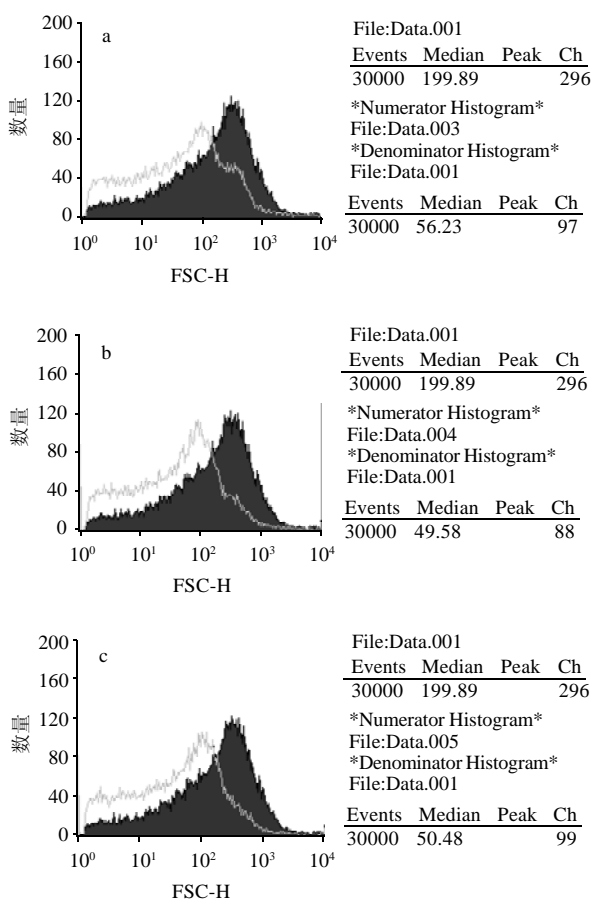
曲线1、2、3、4.分别为对照组和1、2、4倍MIC处理组;
Date 007、009、010、011.分别为对照组和1、2、4倍MIC处理组。

图3 乌梅提取液对李斯特菌DNA含量的影响

Fig.3 Effect of *Fructus mume* extract on DNA content of *L. innocua*

当细胞受到特定伤害时,细胞膜的通透性增大,并且核酸内切酶被激活,导致DNA链断裂和降解,降解产生的DNA片段从细胞中逸出,因此,受伤细胞比活细胞含有更少的DNA。用PI染色时,受伤细胞由于DNA含量减少而结合较少的染料,其荧光强度降低^[11]。如图3所示,对照组平均荧光强度为154.9,而1、2、4倍MIC处理组的平均荧光强度分别为25.47、24.74、24.56,与对照组存在极显著差异($P < 0.01$)。但随着处理组的质量浓度增大,其荧光强度并没有显著差异($P > 0.05$)。

2.5 细胞体积大小变化



黑色曲线为对照组,灰色曲线为处理组;

a、b、c、分别为1、2、4倍MIC组。

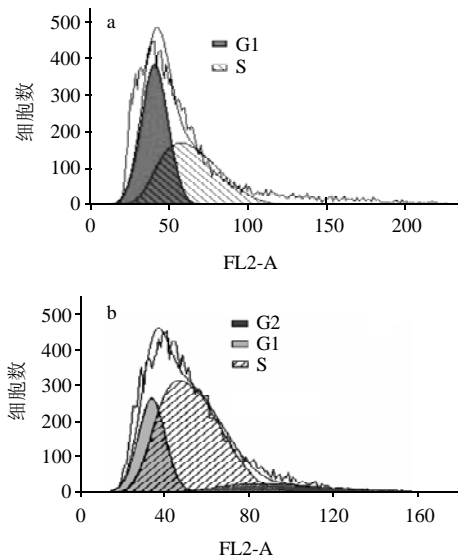
图4 乌梅提取液对李斯特菌细胞体积的影响

Fig.4 Effect of *Fructus mume* extract on cell volume of *L. innocua*

前向散射光(FSC)是细胞物理参数或固有参数,与细胞体积大小有关,更确切地说,它与细胞直径的平方值密切相关^[12]。如图4所示,与空白对照组相比,1、2、4倍MIC处理组的峰值都由高道数向低道数移动,这说明处理组与对照组相比,细胞体积缩小;从数值上分析,对照组荧光强度平均值为199.89,而处理组分别为56.23、49.58和50.48,说明两组之间存在极

显著差异($P < 0.01$),且处理组随着质量浓度由1倍MIC增加到2倍MIC时,细胞体积继续变小,但4倍MIC和2倍MIC条件下,其细胞体积没有显著变化。

2.6 细胞周期变化



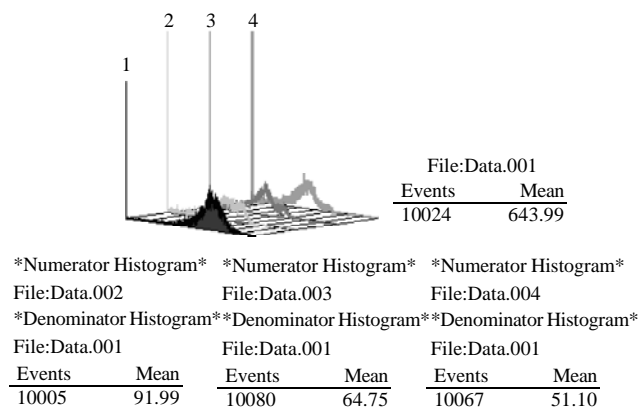
a.对照组; b.1倍MIC处理组。

图5 乌梅提取液对李斯特菌细胞周期的影响

Fig.5 Effect of *Fructus mume* extract on cell cycle of *L. innocua*

在原核细胞生长周期中,DNA复制前的准备时期(I)相当于真核细胞的G1期;DNA复制期(R)相当于真核细胞的S期;原核细胞一旦DNA复制结束,便立即进入细胞分裂(D)期,没有为细胞分裂做准备的G2期^[13]。如图5所示,用1倍MIC处理2h后,位于I期细胞数减少,而进入R期的细胞数明显增加,对照组进入R期的细胞数只占总细胞数的48.51%,而处理组占73.15%,增加了约25%(图中阴影面积大小显示了处于R期细菌所占的百分含量)。

2.7 细胞内钙离子含量变化



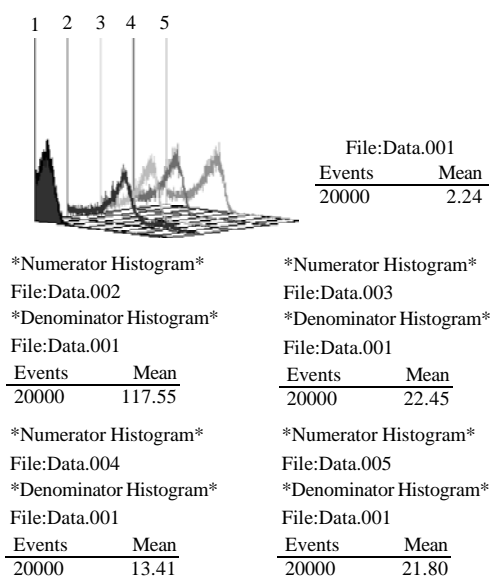
曲线1.对照组;曲线2、3、4.分别为1、2、4倍MIC处理组。

图6 乌梅提取液对李斯特菌细胞内Ca²⁺含量影响

Fig.6 Effect of *Fructus mume* extract on intracellular calcium concentration of *L. innocua*

Fluo3 是一敏感性钙指示剂, 与游离的 Ca^{2+} 特异性结合, 并在一定波长激发后产生荧光, 其荧光强度与 Ca^{2+} 浓度成正比, 因而荧光强度值可反应 Ca^{2+} 浓度的变化情况^[14]。如图 6 所示, 对照组的平均荧光强度为 643.99, 而处理组的平均荧光强度分别为 91.99、64.75 和 51.10, 对照组和处理组之间存在极显著差异($P < 0.01$), 在处理组中, 其平均荧光强度与提取液质量浓度成正相关性。

2.8 细胞膜电位变化



曲线 1. 未加探针染料罗丹明 123 对照组; 曲线 2、3、4、5. 分别为未加提取液对照组和 1、2、4 倍 MIC 处理组。

图 7 乌梅提取液对李斯特菌细胞膜电位的影响

Fig.7 Effect of *Fructus mume* extract on membrane potential of *L. innocua*

一个具有完整细胞结构及代谢旺盛的细菌, 其细胞膜内外存在 100~200mV 的膜电压差, 通常膜内的电压比膜外的低。如果膜电位降低说明细胞发生了去极化现象, 反之, 如果膜电位升高说明细胞发生了超极化现象^[15]。结果如图 7 所示, Data.001 为未加探针染料罗丹明 123 的对照组, 平均荧光强度为 2.24, 其目的是消除细胞内自发荧光及其他外界因素的影响。Data.002、003、004、005 为加探针染料组, 未加乌梅提取液的对照组、1、2、4 倍 MIC 处理组数据, 平均荧光强度分别为 117.55、22.45、13.41、21.8。处理组与未加乌梅提取液的对照组相比, 荧光强度存在极显著差异($P < 0.01$), 出现严重去极化现象。这一结果与经过药物处理的大肠杆菌膜电位的变化相同, 经过药物处理后其膜电位都是降低的, 大肠杆菌细胞发生了去极化现象^[16]。在处理组中, 当处理组的质量浓度从 1 倍 MIC 升至 2 倍 MIC 时, 荧光强度降低 9.04, 存在显著差异($P < 0.05$), 但当质量浓度再升至 4 倍 MIC 时, 荧光强度却上升至 21.8。

3 结论与讨论

本实验利用流式细胞仪研究乌梅提取液对李斯特菌的抑菌机理, 结果表明, 乌梅提取液通过对李斯特菌的细胞膜系统和遗传物质作用, 抑制李斯特菌的生长繁殖。

3.1 乌梅提取液对李斯特菌细胞膜系统的作用

细胞膜又称质膜, 它不仅是细胞结构的边界, 使细胞具有一个稳定的内环境, 同时在细胞与环境之间进行物质、能量的交换, 在信息传递过程中也起着决定性作用, 许多防腐剂都是通过破坏微生物的细胞质膜发挥作用, 如抗菌肽对原核生物细胞的作用具有专一性, 其靶位点为细胞膜表面的阴性磷脂, 如磷酸酰甘油、磷脂酸和磷脂酰丝氨酸。通过 AnnexinV-FITC/PI 双标记法实验得知, 乌梅提取液对李斯特菌抑制破坏其细胞膜的对称性, 使其质膜内侧的 PS 重新分布, 由胞膜内侧翻转到胞膜外侧, 暴露于细胞外表面, 因此, 乌梅提取液对李斯特菌的靶位点为其质膜内侧的 PS。这与抗菌肽对原核生物的抑菌机理相似^[17]。

宫霞等^[18]通过透射电镜研究家蝇幼虫抗菌肽对金黄色葡萄球菌的抑菌机理, 经 $5 \mu\text{mol/L}$ 抗菌肽处理 60min 后金黄色葡萄球菌的细胞严重损伤, 细胞壁、细胞膜大面积破损, 原生质扩散后流出, 细胞体积缩小。本实验处理组的细胞体积远小于对照组, 这可能是由于乌梅提取液作用于李斯特菌细胞膜, 使其质膜破裂, 细胞质中的内容物逸出, 而导致细胞体积缩小, 这与宫霞等^[18]通过电镜研究所得结果相似。

与对照组相比, 处理组的 Ca^{2+} 离子浓度快速下降, 再次证明乌梅提取液作用于李斯特菌的细胞膜, 使其通透性增加, Ca^{2+} 离子外泄。细胞膜电位是细胞膜完整性的重要参数, 它是由于某些离子如 K^+ 、 Na^+ 等在细胞膜两侧的不均衡分布, 以及这些离子在膜两侧分布发生改变而形成的, 因此凡影响到细胞膜内外离子浓度或其分布以及细胞膜状态的因素都可引起细胞膜电位的改变, 从而导致去极化或超极化现象。处理组细胞膜电位低于对照组细胞膜电位, 发生去极化现象。其具体机理可能是由于乌梅提取液对李斯特菌细胞膜内侧的 PS 的作用, 扰乱了膜脂分子的排列, 改变了细胞膜的通透性, 影响细胞膜的结构和功能, 在细胞膜上形成了许多孔道, 致使细胞内离子如 Ca^{2+} 、 K^+ 等从孔道向胞外渗漏, 从而导致了细胞膜的去极化现象。

3.2 乌梅提取液对李斯特菌遗传物质的作用

与对照组相比, 处理组的细胞周期中 R 期细胞数增加, I 期细胞数目减少, 这说明乌梅提取液对李斯特菌的作用发生在 R 期, 而不是发生在蛋白质、糖类等合成的 I 期, 致使更多的细胞滞留 R 期。R 期又称为 DNA

合成期,这说明,乌梅提取液对DNA的合成起到抑制作用,处理组的DNA含量明显低于对照组,从而很好的证明此观点,即乌梅提取液通过对遗传物质的作用来抑制李斯特菌的生长。

综上所述,可以证实,乌梅提取液对李斯特菌的抑菌机理有两种途径:一是作用于细胞膜系统,使其细胞膜上形成孔洞或膜裂解,从而使其膜电位降低, Ca^{2+} 、 K^{+} 等细胞内容物外泄导致细胞死亡;另一种途径是通过作用于遗传物质,即抑制DNA的合成,使细胞阻滞在R期,从而抑制细胞分裂,起到抑菌作用。

参考文献:

- [1] 卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典一部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.
- [2] 吴传茂, 吴周和, 陈士英. 乌梅提取液的抑菌作用研究[J]. 食品工业, 2000(3): 11-13.
- [3] KWON H A, KWON Y J, KWON D Y, et al. Evaluation of antibacterial effects of a combination of *Coptidis Rhizoma*, *Mume Fructus*, and *Schizandrae Fructus* against *Salmonella*[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 127: 180-183.
- [4] GANDHI M, CHIKINDAS M. *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 113: 1-15.
- [5] 吴后男. 流式细胞术原理与应用教程[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2008: 2.
- [6] 钱昆, 周涛. 复配香辛料醇提液对鲜切茼蒿笋保鲜的研究[J]. 食品工业科技, 2007(4): 204-206.
- [7] CHANDRASEKARAN M, VENKATESALU V. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2004, 91: 105-108.
- [8] HARA S, YAMAKAWA M, MORICIN D. A novel type of antibacterial peptide isolated from the silkworm, *Bombyx mori*[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270: 29923-50.
- [9] VERMES I, HAANEN C, STEFFENS-NAKKEN H. A novel assay for apoptosis. flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V[J]. *Journal of Immunological Methods*, 1995, 184: 139-151.
- [10] PAPARELLA A, TACCOGNA L, AGUZZI I, et al. Flow cytometric assessment of the antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes*[J]. *Food Control*, 2008, 19: 1174-1182.
- [11] 王书奎, 周振英. 实用流式细胞术彩色图谱[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2004: 4.
- [12] 杜立颖, 冯仁青. 流式细胞术[M]. 北京: 北京大学出版社, 2008: 7.
- [13] 王关林, 唐金花, 蒋丹, 等. 苦参对鸡大肠杆菌的抑菌作用及其机理研究[J]. 中国农业科学, 2006, 39(5): 1018-1024.
- [14] SCHEOERS E, GLORIEUX G, DHONDT A, et al. Flow cytometric calcium flux assay: evaluation of cytoplasmic calcium kinetics in whole blood leukocytes[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2009, 348: 74-82.
- [15] 乔支红, 程永强, 鲁战会, 等. 乳酸对三种食源性致病菌的抑菌及杀菌作用[J]. 食品科技, 2008(10): 187-191.
- [16] NOVO D, PERLMUTTER N G, HUNT R H, et al. Accurate flow cytometric membrane potential measurement in bacteria using diethyl carbocyanine and a ratiometric technique[J]. *Cytometry*, 1999, 35: 55-63.
- [17] 黄现青, 高晓平, 赵改名, 等. 抗菌肽抑菌机制研究进展[J]. 生物学杂志, 2010, 27(2): 62-66.
- [18] 宫霞, 胡树凯, 乐国伟. 家蝇幼虫抗菌肽 MDL22 的电泳制备及其抗菌作用机理[J]. 昆虫学报, 2007, 50(12): 1212-1218.