

丁香酚对腐败希瓦氏菌和荧光假单胞菌的抑制机理

周倩倩¹, 方士元², 梅俊³, 谢晶^{1,4,*}

(1.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;

3.上海冷链装备性能与节能评价专业技术服务平台, 上海 201306;

4.食品科学与工程国家级实验教学示范中心(上海海洋大学), 上海 201306)

摘要:为探讨丁香酚对海产品冷藏过程中优势腐败菌(腐败希瓦氏菌和荧光假单胞菌)的抑制作用及其机制, 本实验先测定丁香酚对腐败希瓦氏菌和荧光假单胞菌的最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC), 然后分别研究了0.5 MIC、1 MIC、2 MIC对腐败希瓦氏菌和荧光假单胞菌生长曲线的影响, 通过对比分析丁香酚处理前后细胞的破坏情况, 发现细胞外OD_{260 nm}和OD_{280 nm}、钾离子和碱性磷酸酶的水平均上升, 细胞内三磷酸腺苷酶活力下降; 从丁香酚处理后的扫描电子显微镜图像可看出, 完整光滑的菌体出现裂解、粘黏现象, 结合傅里叶变换红外光谱所呈现的代表脂质、蛋白质等分子成分官能团的改变, 可以得出丁香酚能够破坏细胞壁, 并使细胞膜通透性增大、细胞内容物流出, 最终导致细胞死亡。

关键词:丁香酚; 腐败希瓦氏菌; 荧光假单胞菌; 抑制作用; 细胞膜

Inhibitory Mechanism of Eugenol on *Shewanella putrefaciens* and *Pseudomonas fluorescens*

ZHOU Qianqian¹, FANG Shiyuan², MEI Jun³, XIE Jing^{1,4,*}

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Shanghai Engineering Research Center of Aquatic Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China;

3. Shanghai Professional Technology Service Platform on Cold Chain Equipment Performance and Energy Saving Evaluation, Shanghai 201306, China; 4. National Experimental Teaching Demonstration Center for Food Science and Engineering

(Shanghai Ocean University), Shanghai 201306, China)

Abstract: In order to investigate the inhibitory effect and underlying mechanism of eugenol on the dominant spoilage bacteria of *Shewanella putrefaciens* and *Pseudomonas fluorescens* during seafood cold storage, the minimal inhibitory concentrations (MICs) of eugenol against *S. putrefaciens* and *P. fluorescens* were determined, and then the inhibitory effects of eugenol at doses of 0.5 MIC, 1 MIC and 2 MIC on the growth of *S. putrefaciens* and *P. fluorescens* were studied. The damage caused by eugenol to the cell membrane was measured. The results showed that the optical density (OD) at 260 and 280 nm wavelengths of extracellular substances, the content of potassium ions (K⁺) and the activity of alkaline phosphatase (AKP) increased on average, and the activity of intracellular ATPase decreased. Scanning electron microscopic (SEM) images and Fourier transform infrared spectra showed that eugenol destroyed the cell wall, and increased the permeability of the cell membrane, leading to leakage of cell contents and finally cell death.

Keywords: eugenol; *Shewanella putrefaciens*; *Pseudomonas fluorescens*; inhibition; cell membrane

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190414-181

中图分类号: S983

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2020)09-0001-06

引文格式:

周倩倩, 方士元, 梅俊, 等. 丁香酚对腐败希瓦氏菌和荧光假单胞菌的抑制机理[J]. 食品科学, 2020, 41(9): 1-6.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190414-181. <http://www.spkx.net.cn>

ZHOU Qianqian, FANG Shiyuan, MEI Jun, et al. Inhibitory mechanism of eugenol on *Shewanella putrefaciens* and *Pseudomonas fluorescens*[J]. Food Science, 2020, 41(9): 1-6. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190414-181. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2019-04-14

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31972142; 31571914); 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-47);

上海市科委平台能力建设项目(19DZ2284000); 上海市科委公共服务平台建设项目(17DZ2293400)

第一作者简介: 周倩倩(1994—)(ORCID: 0000-0002-3279-0655), 女, 硕士研究生, 研究方向为海产品保鲜。

E-mail: zhouqianqian917@163.com

*通信作者简介: 谢晶(1968—)(ORCID: 0000-0002-3194-9273), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品工程。E-mail: jxie@shou.edu.cn

海产品具有丰富的营养价值,深受消费者的喜爱。但在贮藏和运输过程中,由于内源蛋白水解酶活性的增大和细菌的生长繁殖,会使产品品质下降,造成其经济价值和食用价值的下降^[1]。腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*)和荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)是低温肉和水产品中主要的革兰氏阴性优势腐败菌,革兰氏阴性菌的细胞壁结构复杂,包括外膜和肽聚糖^[2]。腐败希瓦氏菌和荧光假单胞菌可以在缺氧条件下快速繁殖,并将三甲胺-*N*-氧化物还原为三甲胺,水解蛋白质和脂肪,产生令人不愉快的鱼腥味,导致感官上的不可接受性。Lyu等^[2]发现肉桂油与 γ 射线结合对腐败希瓦氏菌有很强的抑菌效果。Zhang Nannan等^[3]研究发现银杏叶提取物会破坏腐败希瓦氏菌的细胞壁和细胞膜;Wright等^[4]发现法地榄仁果提取物可以抑制腐败希瓦氏菌的生长,防止鱼肉腐败。Yao Xiaolin等^[5]探究了川陈皮素和橘皮素可破坏荧光假单胞菌细胞膜的通透性,抑制蛋白质合成,延缓代谢;Tyagi等^[6]发现空气负离子与挥发油蒸气的联合作用对荧光假单胞菌的抑制作用更加明显。Ferreira等^[7]发现季铵化合物苄基十二烷基氯化铵可通过离子和疏水相互作用与荧光假单胞菌细胞膜结合,导致膜特性和功能发生变化。

为了保持食品的安全性并降低食品中容易导致高血压的盐含量,植物精油及其提取物在食品工业中的应用逐渐增多^[8]。丁香酚是丁香油的主要成分,对细菌和真菌有很强的抑制作用,是一种良好的天然抑菌剂,它可以破坏微生物细胞膜,使膜内蛋白质和脂质泄露。其兼具抗菌、消炎、抗氧化特性,因此在食品、医疗、化妆品和个人保健产品中的应用备受关注^[9]。钱卫东等^[10]研究了丁香酚对耐药性大肠杆菌的抑菌作用;Zhang Yi^[9]和Jafri^[11]等分别研究了丁香酚对牙根卟啉单胞菌、白色念珠菌和变形链球菌的单生物膜和混合生物膜的抑菌机理。虽然已有很多学者研究了丁香酚对致病菌的抑菌机理,但是目前对其作用于海产品腐败菌的抑菌效果和抑菌机理知之甚少。因此,本研究尝试用多种方法揭示丁香酚对腐败希瓦氏菌和荧光假单胞菌的抑菌机理,为海产品保鲜中天然安全的植物源保鲜剂开发提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

腐败希瓦氏菌WS13从4℃贮藏下的凡纳滨对虾中分离得到;荧光假单胞菌ATCC27853购于北京北纳创联生物技术有限公司;丁香酚(纯度大于98%)购于上海阿拉丁试剂有限公司;碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)、三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)酶试剂盒购于南京建成生物工程研究所。

1.2 仪器与设备

全自动微生物生长曲线分析仪 芬兰Bioscreen公司;MIRA3场发射扫描电子显微镜 泰思肯贸易(上海)有限公司;Nicolet iS5 FT-IR傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)仪 美国赛默飞世尔有限公司。

1.3 方法

1.3.1 最小抑菌浓度测定

采用二倍梯度稀释法^[12]配制不同质量浓度的丁香酚。在选择性液体培养基中培养腐败希瓦氏菌和荧光假单胞菌,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)稀释,使其菌体浓度约为 10^6 CFU/mL。在96孔板中,每孔加入10 μ L细菌悬液、100 μ L丁香酚、100 μ L培养基,使丁香酚的最终质量浓度分别为93.75、187.5、375、750、1 500 mg/L。对照组1加入100 μ L质量分数2.5%的二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)和10 μ L细菌悬液,对照组2加入100 μ L无菌水和10 μ L细菌悬液,在30℃下培养24 h,在培养时间内没有观察到细菌明显生长时丁香酚的浓度为最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC),实验重复3次。

1.3.2 生长曲线绘制

参考侯温甫等^[13]的方法并稍作修改。在选择性液体培养基中培养腐败希瓦氏菌和荧光假单胞菌,用PBS稀释,获得约 10^6 CFU/mL的菌液。将不同质量浓度的丁香酚(终质量浓度分别为0(对照)、0.5 MIC、1 MIC、2 MIC)加入悬液管中培养48 h,用全自动微生物生长曲线分析仪测定OD_{600 nm},每2 h测一次,并以时间为横坐标,光密度值为纵坐标绘制生长曲线。

1.3.3 AKP活力的测定

AKP活力测定采用AKP试剂盒。在液体培养基中加入 10^8 CFU/mL细菌悬液和终质量浓度分别为0(对照)、0.5 MIC、1 MIC、2 MIC丁香酚溶液,然后在摇床中以150 r/min和30℃的条件培养3 h。最后分别于0 h和3 h各取1 mL培养液8 000 r/min离心10 min,然后用AKP试剂盒测定上清液中AKP的活力。对照组以DMSO代替丁香酚,实验重复3次。

1.3.4 蛋白质和核酸的测定

参考Xiang Qisen等^[14]方法,并稍作修改。在选择性液体培养基中培养腐败希瓦氏菌和荧光假单胞菌,用PBS稀释,获得约 10^6 CFU/mL的菌液,将终质量浓度为0(对照)、0.5 MIC、1 MIC、2 MIC丁香酚溶液分别加入至1 mL 10^6 CFU/mL菌悬液中,在摇床中以150 r/min、30℃条件培养3 h后,取其上清液的10倍稀释液测得OD_{280 nm}和OD_{260 nm}。重复实验3次,每次设置3个平行。

1.3.5 K⁺含量的测定

通过1.3.3节中的方法获得上清液,用K⁺试剂盒分别检测0 h和3 h上清液中K⁺的含量,实验重复3次。

1.3.6 ATP酶活力的测定

采用ATP酶试剂盒检测ATP酶活力。通过1.3.3节中的方法获得上清液及沉淀,离心后除去上清液,用液氮破碎细菌。分别于0 h和3 h测定ATP酶活力,实验重复3次。

1.3.7 FTIR分析分子结构

采用FTIR法^[15]对细菌分子结构的变化进行分析,在细菌培养液中加入终质量浓度为1 MIC的丁香酚,对照组加入等体积的DMSO。在摇床中以30 ℃、150 r/min培养6 h,然后取培养悬液以8 000 r/min离心10 min,去上清液,用PBS清洗细胞两次,冷冻干燥后,用FTIR仪对干燥的细菌细胞进行分析。

1.3.8 扫描电子显微镜观察

采用扫描电子显微镜观察丁香酚对细菌的损伤情况。沉淀细胞由1.3.7节中的方法获得,接着用体积分数2.5%戊二醛溶液固定细胞4 h,然后在PBS中漂洗两次,每次10 min,再置于30%~100%的乙醇中脱水,真空冷冻干燥后喷金,扫描电镜观察细菌的细胞形态。

1.4 数据统计与分析

采用SPSS 19.0软件(单因素方差分析)和Origin 8.5软件对数据分别进行显著性分析和图表的制作。

2 结果与分析

2.1 丁香酚的MIC

不同质量浓度丁香酚对腐败希瓦氏菌和荧光假单胞菌的抑菌作用见表1。丁香酚对腐败希瓦氏菌和荧光假单胞菌的MIC均为750 mg/L, DMSO无抑菌作用^[16]。

表1 丁香酚对腐败希瓦氏菌和荧光假单胞菌的MIC
Table 1 MICs of eugenol against *Shewanella putrefaciens* and *Pseudomonas fluorescens*

| 菌株 | 丁香酚质量浓度/(mg/L) | | | | |
|--------|----------------|-----|-----|-------|-------|
| | 1 500 | 750 | 375 | 187.5 | 93.75 |
| 腐败希瓦氏菌 | — | — | + | + | + |
| 荧光假单胞菌 | — | — | + | + | + |

注: +.能观察到细菌明显的生长; -.细菌无明显生长。

2.2 丁香酚对腐败希瓦氏菌和荧光假单胞菌生长曲线的影响

从图1A可以看出,对照组的细菌生长活性较高,在开始的20 h内迅速增加,之后几乎不再生长。随着丁香酚质量浓度的增加,丁香酚的抑制作用越明显。0.5 MIC丁香酚处理的腐败希瓦氏菌在培养的前16 h受到抑制,随后进入对数生长期,后期OD_{600 nm}下降可能是培养基的消耗所致。1 MIC和2 MIC处理组无细菌生长。

如图1B所示,丁香酚对荧光假单胞菌的抑制作用主要表现为延迟其对数生长期,0.5 MIC时的丁香酚对荧光假单胞菌的抑制作用在前14 h受到抑制,随后迅速增加,24 h后高于对照组。可能是丁香酚延迟了荧光假单胞菌的对数生长期^[17-18]。1 MIC和2 MIC处理组无细菌生长。这一结果与之前测定MIC的结果相似。

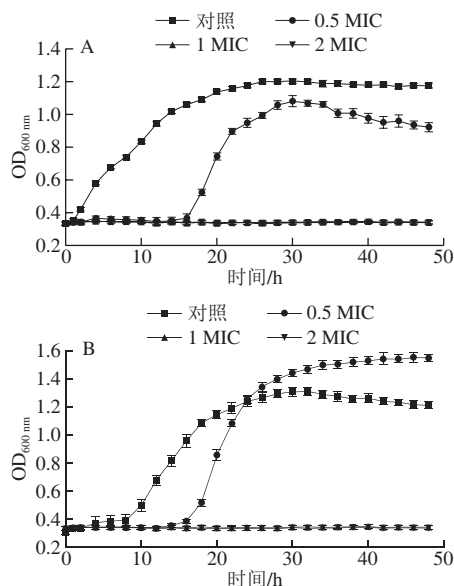
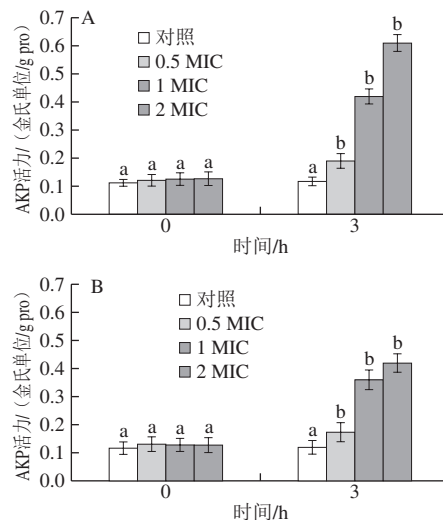


图1 丁香酚对腐败希瓦氏菌(A)和荧光假单胞菌(B)生长曲线的影响
Fig. 1 Effect of eugenol on the growth of *Shewanella putrefaciens* (A) and *Pseudomonas fluorescens* (B)

2.3 丁香酚对腐败希瓦氏菌和荧光假单胞菌AKP活力的影响



小写字母不同表示0、3 h组间存在显著性差异($P < 0.05$)。图3、4同。

图2 丁香酚对腐败希瓦氏菌(A)和荧光假单胞菌(B) AKP活力的影响

Fig. 2 Effect of eugenol on the activity of AKP in *Shewanella putrefaciens* (A) and *Pseudomonas fluorescens* (B)

AKP是一种位于细胞壁和细胞膜之间的磷酸单酯酶,菌悬液中AKP活力可以反映细菌细胞壁的完整性^[19]。如图2所示,两种细菌在不加丁香酚的情况下,两菌株酶活力稳定在0.13左右,经1 MIC丁香酚处理3 h后,腐败希瓦氏菌和荧光假单胞菌实验组的OD值分别从0.125和0.128增加到0.42和0.36。且OD值随着丁香酚质量浓度增加而增加。这些结果表明丁香酚显著增加了细胞

壁的通透性,使得AKP流出,这意味着细菌细胞壁的完整性已经被破坏。细胞壁具有固定细胞形状,使细胞具有一定机械强度以避免渗透压等其他外力对细胞损害的作用,失去细胞壁的保护,细菌极易死亡^[20-21]。

2.4 丁香酚对腐败希瓦氏菌和荧光假单胞菌蛋白质和核酸的影响

表2 丁香酚对腐败希瓦氏菌和荧光假单胞菌蛋白质和核酸的影响
Table 2 Effect of eugenol on protein and nucleic acid in *Shewanella putrefaciens* and *Pseudomonas fluorescens*

| 菌株 | 光密度值 | 对照 | 0.5 MIC | 1 MIC | 2 MIC |
|--------|----------------------|-------|---------|-------|-------|
| 腐败希瓦氏菌 | OD _{280 nm} | 0.151 | 0.170 | 0.210 | 0.217 |
| | OD _{260 nm} | 0.104 | 0.190 | 0.251 | 0.447 |
| 荧光假单胞菌 | OD _{280 nm} | 0.103 | 0.116 | 0.147 | 0.186 |
| | OD _{260 nm} | 0.112 | 0.214 | 0.294 | 0.429 |

从表2可以看出,丁香酚处理后的腐败希瓦氏菌和荧光假单胞菌的蛋白质和核酸释放量明显增加,OD_{260 nm}的增加比OD_{280 nm}更为明显,且与丁香酚的质量浓度成正比,这与陈梦玲等^[22]研究牛至精油使腐生葡萄球菌紫外吸收物质泄漏的结论相似。可能是因为与丁香酚接触后细胞膜通透性增加,导致核酸和蛋白质从细胞内释放到细胞外,使其吸光度增大^[23]。加入1 MIC丁香酚的实验组与对照组比较有显著性差异。这与Zhang Yi等^[9]所研究的丁香酚杀菌作用的结果相似。

2.5 丁香酚对腐败希瓦氏菌和荧光假单胞菌K⁺泄漏量的影响

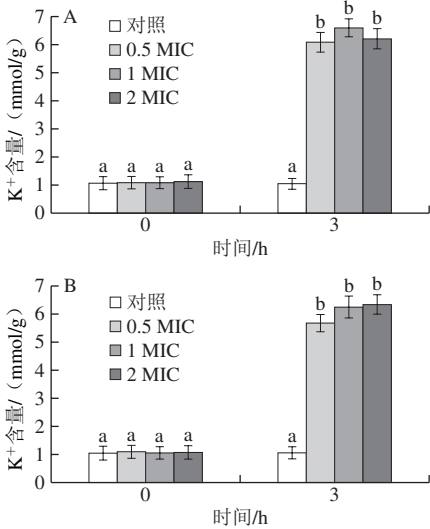


图3 丁香酚对腐败希瓦氏菌(A)和荧光假单胞菌(B) K⁺渗漏的影响
Fig. 3 Effect of eugenol on potassium ion leakage from *Shewanella putrefaciens* (A) and *Pseudomonas fluorescens* (B)

由图3可以看出,丁香酚引起两种细菌K⁺泄漏量显著增加($P<0.05$)。经0.5 MIC丁香酚处理后,腐败希瓦氏菌和荧光假单胞菌培养液的上清液中K⁺含量分别由1.08、1.09 mmol/g增加到6.08、5.57 mmol/g,且随着丁

香酚质量浓度的增加,K⁺含量越多,说明丁香酚越能增大细胞膜的通透性,使细胞膜损伤,导致细菌中K⁺的泄漏,这与Liu Guorui等^[24]对双歧杆菌导致李斯特菌细胞泄漏的研究结果相似。

2.6 丁香酚对腐败希瓦氏菌和荧光假单胞菌ATP酶活力的影响

ATP酶是糖酵解过程中促进细胞代谢和生产ATP的胞内酶^[25]。如图4所示,在两种细菌中加入1 MIC丁香酚后,腐败希瓦氏菌和荧光假单胞菌的ATP酶活力分别下降了70.8%和73.2% ($P<0.05$),且下降的程度与丁香酚的质量浓度呈正相关,丁香酚能显著抑制ATP酶的活性。ATP酶的低水平也间接导致细胞因缺乏能量而死亡^[26]。

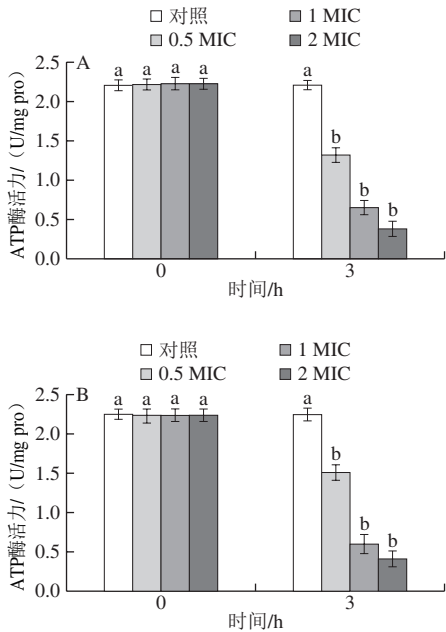


图4 丁香酚对腐败希瓦氏菌(A)和荧光假单胞菌(B) ATP酶活力的影响

Fig. 4 Effect of eugenol on the activity of ATPase in *Shewanella putrefaciens* (A) and *Pseudomonas fluorescens* (B)

2.7 FTIR分析结果

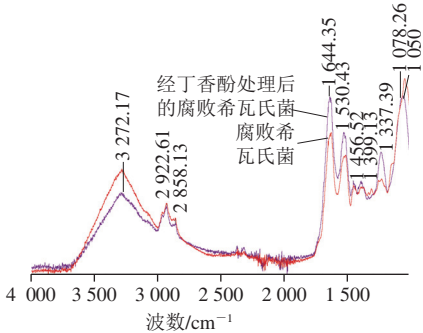


图5 加入丁香酚4 h后的腐败希瓦氏菌的FTIR图
Fig. 5 Infrared spectra of *Shewanella putrefaciens* after exposure to eugenol for 4 h

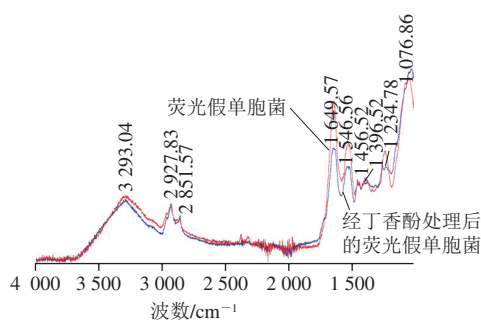


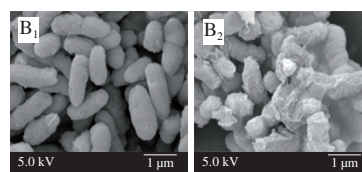
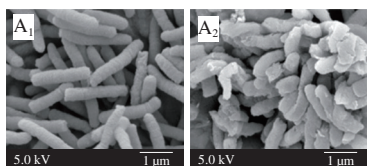
图6 加入丁香酚4h后的荧光假单胞菌的FTIR图

Fig. 6 Infrared spectra of *Pseudomonas fluorescens* after exposure to eugenol for 4 h

FTIR可以间接表征腐败希瓦氏菌和荧光假单胞菌暴露于丁香酚的死亡诱导机制,反映丁香酚加入前后两种菌的分子组成变化。 $3\ 300\text{ cm}^{-1}$ 与 $2\ 800\text{ cm}^{-1}$ 之间的吸收峰代表脂质的官能团, $1\ 237\text{ cm}^{-1}$ 左右的吸收峰代表与磷脂双层相关的磷酸二酯; $1\ 657$ 、 $1\ 546$ 、 $1\ 455\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 399\text{ cm}^{-1}$ 的吸收峰代表蛋白的官能团; $1\ 650\text{ cm}^{-1}$ 的吸收峰代表 α -螺旋结构中的酰胺I, $1\ 546\text{ cm}^{-1}$ 的吸收峰代表蛋白质酰胺的N—H键, $1\ 455\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 399\text{ cm}^{-1}$ 的吸收峰代表小区结构蛋白; $1\ 078\text{ cm}^{-1}$ 的吸收峰代表核酸的官能团;在 $1\ 235\text{ cm}^{-1}$ 的吸收峰代表磷酸二酯键的不对称拉伸,与磷脂双层有关^[27]。

由图5、6可知,经1 MIC丁香酚处理后的腐败希瓦氏菌和荧光假单胞菌大分子发生了明显变化,与对照组相比,经丁香酚处理的腐败希瓦氏菌在 $3\ 272\text{ cm}^{-1}$ (脂质)和 $1\ 237\text{ cm}^{-1}$ (磷酸二酯)处的吸收峰强度分别明显减弱和增强,这表明丁香酚可以破坏细胞膜的磷脂双分子层。对照组 $1\ 078\text{ cm}^{-1}$ 处吸收峰与处理后 $1\ 050\text{ cm}^{-1}$ 处吸收峰位置偏移,可以看出丁香酚使核酸部分流出并破坏了其结构。在 $1\ 644$ 、 $1\ 530$ 、 $1\ 456\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 399\text{ cm}^{-1}$ 处吸收峰强度明显增加,表明丁香酚改变了膜蛋白的二级结构。经过丁香酚处理后的荧光假单胞菌与腐败希瓦氏菌不同之处在于 $2\ 390\sim 2\ 851\text{ cm}^{-1}$ 的峰强度几乎不变,但峰面积减少,这也表明丁香酚破坏了细胞膜的磷脂双分子层;在 $1\ 649$ 、 $1\ 546$ 、 $1\ 456\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 396\text{ cm}^{-1}$ 处吸收峰强度明显减弱,表明丁香酚改变了膜蛋白的二级结构。因此,丁香酚通过破坏细胞膜来抑制细菌的生长繁殖,这与Liu Ming等^[28]研究海带中分离的解聚褐藻糖胶对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌影响的结论相似。

2.8 扫描电子显微镜观察结果



A.腐败希瓦氏菌; B.荧光假单胞菌。下标

1.正常细胞; 下标2.经丁香酚处理后的细胞。

图7 经丁香酚处理后的腐败希瓦氏菌和荧光假单胞菌扫描电子显微镜图像

Fig. 7 SEM images of *Shewanella putrefaciens* and *Pseudomonas fluorescens* treated with eugenol

由图7可以看出,未加入丁香酚的腐败希瓦氏菌呈现出完整的杆状,并且彼此间无粘黏,经过1 MIC丁香酚处理4 h后,许多腐败希瓦氏菌开始聚集成堆,可能是细胞膜破损,细胞内容物泄露使它们粘连在一起,杆状出现断裂,细胞发生了明显的变形。经丁香酚处理前后的荧光假单胞菌之间的对比也同样明显,正常的荧光假单胞菌分散均匀,呈完整短杆状,而经丁香酚处理后的荧光假单胞菌细胞也遭到了明显的破坏,细胞和细胞之间发生粘黏现象。因此,从扫描电子显微镜图像中可以明显看出丁香酚对腐败希瓦氏菌和荧光假单胞菌细胞膜的破坏,失去了细胞膜的保护,细胞因不能正常生长而死亡^[29]。

3 结论

数据显示丁香酚对腐败希瓦氏菌和荧光假单胞菌的MIC均为750 mg/L。1 MIC丁香酚能明显抑制腐败希瓦氏菌和荧光假单胞菌生长,丁香酚破坏了细胞膜使其细胞内的核酸、蛋白质泄漏到细胞外, K^+ 含量、AKP活力升高和胞内ATP酶活力下降,可以看出细胞壁遭到破坏、细胞膜的通透性增加、细胞内容物发生泄露,导致细胞无法正常进行生命活动而死亡。从丁香酚处理前后的扫描电子显微镜图像可看出完整光滑的菌体出现裂解、粘黏现象,结合傅里叶变换红外光谱呈现的代表脂质、蛋白质等分子成分官能团的改变,进一步说明了丁香酚对腐败希瓦氏菌和荧光假单胞菌的抑制机理。本实验为海产品保鲜中天然安全的植物源保鲜剂的开发提供了理论依据。

参考文献:

- [1] DEHGHANI S, HOSSEINI S V, REGENSTEIN J M. Edible films and coatings in seafood preservation: a review [J]. Food Chemistry, 2018, 240: 505-513. DOI:10.1016/j.foodchem.2017.07.034.
- [2] LYU F, HONG Y L, CAI J H, et al. Antimicrobial effect and mechanism of cinnamon oil and gamma radiation on *Shewanella putrefaciens*[J]. Journal of Food Science and Technology, 2018, 55(9): 3353-3361. DOI:10.1007/s13197-018-3297-5.
- [3] ZHANG Nannan, LAN Weiqing, WANG Qian, et al. Antibacterial mechanism of Ginkgo biloba leaf extract when applied to *Shewanella*

- putrefaciens* and *Saprophytic staphylococcus*[J]. Aquaculture and Fisheries, 2018, 3(4): 163-169. DOI:10.1016/j.aaf.2018.05.005.
- [4] WRIGHT M H, SHALOM J, MATTHEWS B, et al. Terminalia ferdinandiana exell: extracts inhibit *Shewanella* spp. growth and prevent fish spoilage[J]. Food Microbiology, 2019, 78: 114-122. DOI:10.1016/j.fm.2018.10.006.
- [5] YAO Xiaolin, ZHU Xinrong, PAN Siyi, et al. Antimicrobial activity of nobiletin and tangeretin against *Pseudomonas*[J]. Food Chemistry, 2012, 132(4): 1883-1890. DOI:10.1016/j.foodchem.2011.12.021.
- [6] TYAGI A K, MALIK A. Antimicrobial action of essential oil vapours and negative air ions against *Pseudomonas fluorescens*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 143(3): 205-210. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.023.
- [7] FERREIRA C, PEREIRA A M, PEREIRA M C, et al. Physiological changes induced by the quaternary ammonium compound benzyldimethyldodecylammonium chloride on *Pseudomonas fluorescens*[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2011, 66(5): 1036-1043. DOI:10.1093/jac/dkr028.
- [8] MARCHESI A, ORHAN I E, DAGLIA M, et al. Antibacterial and antifungal activities of thymol: a brief review of the literature[J]. Food Chemistry, 2016, 210: 402-414. DOI:10.1016/j.foodchem.2016.04.111.
- [9] ZHANG Yi, WANG Yue, ZHU Xiaojing, et al. Antibacterial and antibiofilm activities of eugenol from essential oil of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry (clove) leaf against periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*[J]. Microbial Pathogenesis, 2017, 113: 396-402. DOI:10.1016/j.micpath.2017.10.054.
- [10] 钱卫东, 刘婵婵, 王婷, 等. 丁香酚对多重耐药大肠杆菌的抑菌活性及其作用机制研究[J]. 现代食品科技, 2019, 35(1): 31-36; 14. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.1.005.
- [11] JAFRI H, KHAN M S A, AHMAD I. *In vitro* efficacy of eugenol in inhibiting single and mixed-biofilms of drug-resistant strains of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* [J]. Phytomedicine, 2019, 54: 206-213. DOI:10.1016/j.phymed.2018.10.005.
- [12] 周云冬, 章漪玲, 宗红, 等. 牡丹花蕾提取物对铜绿假单胞菌的抑菌活性及其机理[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(13): 92-97. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.020315.
- [13] 侯温甫, 欧阳何一, 吴忌, 等. 曲酸对冷鲜鸭肉中优势腐败菌的抑制作用及其抑菌机理[J]. 食品科学, 2019, 40(1): 278-285. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180613-226.
- [14] XIANG Qisen, KANG Chaodi, NIU Liyuan, et al. Antibacterial activity and a membrane damage mechanism of plasma-activated water against *Pseudomonas deceptionensis* CM2[J]. Lwt-Food Science and Technology, 2018, 96: 395-401. DOI:10.1016/j.lwt.2018.05.059.
- [15] DEVI K P, NISHA S A, SAKTHIVEL R, et al. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2010, 130(1): 107-115. DOI:10.1016/j.jep.2010.04.025.
- [16] KUMAR P P N V, SHAMEEM U, KOLLU P, et al. Green synthesis of copper oxide nanoparticles using aloe vera leaf extract and its antibacterial activity against fish bacterial pathogens[J]. BioNanoScience, 2015, 5(3): 135-139. DOI:10.1007/s12668-015-0171-z.
- [17] 皮杜娟. 鱼精蛋白对草鱼片保鲜效果及其抑菌机理的初探[D]. 武汉: 华中农业大学, 2017: 41-42.
- [18] WALSH S E, MAILLARD J Y, RUSSELL A D, et al. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria[J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 94(2): 240-247. DOI:10.1046/j.1365-2672.2003.01825.x.
- [19] WANG F, WEI F, SONG C, et al. *Dodartia orientalis* L. essential oil exerts antibacterial activity by mechanisms of disrupting cell structure and resisting biofilm[J]. Industrial Crops and Products, 2017, 109: 358-366. DOI:10.1016/j.indcrop.2017.08.058.
- [20] DIAO M, QI D, XU M, et al. Antibacterial activity and mechanism of monolauryl-galactosylglycerol against *Bacillus cereus*[J]. Food Control, 2018, 85: 339-344. DOI:10.1016/j.foodcont.2017.10.019.
- [21] HE N, WANG P Q, WANG P Y, et al. Antibacterial mechanism of chelerythrine isolated from root of *Toddalia asiatica* (Linn) Lam[J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2018, 18(1): 4-9. DOI:10.1186/s12906-018-2317-3.
- [22] 陈梦玲, 蓝蔚青, 李函笑, 等. 牛至精油对腐生葡萄球菌抑制作用机制[J]. 食品科学, 2020, 41(7): 46-51. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190311-131.
- [23] 苏萌萌, 孙芝兰, 刘芳, 等. 绿原酸对鸡肉腐败菌的抑菌机理[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(6): 1386-1391. DOI:10.3969/j.issn.1000-4440.2018.06.026.
- [24] LIU Guorui, REN Guimei, ZHAO Lei, et al. Antibacterial activity and mechanism of bifidocin A against *Listeria monocytogenes*[J]. Food Control, 2017, 73: 854-861. DOI:10.1016/j.foodcont.2016.09.036.
- [25] LIN L, GU Y, LI C, et al. Antibacterial mechanism of ϵ -poly-lysine against *Listeria monocytogenes* and its application on cheese[J]. Food Control, 2018, 91: 76-84. DOI:10.1016/j.foodcont.2018.03.025.
- [26] CUI H, BAI M, SUN Y, et al. Antibacterial activity and mechanism of Chuzhou chrysanthemum essential oil[J]. Journal of Functional Foods, 2018, 48: 159-166. DOI:10.1016/j.jff.2018.07.021.
- [27] SALMAN A, SHUFAN E, SHARAH U, et al. Distinction between mixed genus bacteria using infrared spectroscopy and multivariate analysis[J]. Vibrational Spectroscopy, 2019, 100: 6-13. DOI:10.1016/j.vibspec.2018.10.009.
- [28] LIU Ming, LIU Yixiang, CAO Minjie, et al. Antibacterial activity and mechanisms of depolymerized fucoidans isolated from *Laminaria japonica*[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 172: 294-305. DOI:10.1016/j.carbpol.2017.05.060.
- [29] PAN Y, ZHENG L B, MAO Y, et al. The antibacterial activity and mechanism analysis of piscidin 5 like from *Larimichthys crocea*[J]. Developmental and Comparative Immunology, 2019, 92: 43-49. DOI:10.1016/j.dci.2018.10.008.