

L-甲硫氨酸改性微晶纤维素对革兰氏阳性菌的抑制作用

吴思邈¹, 杨海凡^{1,2}, 梁冠男², 孙昕炀¹

(1.南京财经大学食品科学与工程学院, 江苏 南京 210023; 2.北京绿邦环保工程有限公司, 北京 100176)

摘要: 为有效预防、处理食品中的微生物污染, 本研究以微晶纤维素 (microcrystalline cellulose, MCC) 为原材料, 通过L-甲硫氨酸 (L-methionine, L-Met) 负载, 制备得到了具有抗菌效果的L-Met改性MCC (M-MCC)。通过微观形貌、元素组成分析等表征改性后M-MCC的形貌变化、元素变化以及稳定性, 证明了L-Met成功接枝。对M-MCC的体外抗氧化能力进行研究, 发现其对2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS) 阳离子自由基有良好的去除效果, 当M-MCC的质量浓度为20 mg/mL时, 对ABTS阳离子自由基的清除率达到97.47%。而后通过最小抑菌浓度以及细菌生长曲线对M-MCC抑制单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的效果进行研究。确定了M-MCC对*L. monocytogenes*和*S. aureus*等革兰氏阳性菌有着较好的抑制效果, 最小抑菌浓度和最小杀菌浓度分别为15 mg/mL和30 mg/mL。最后, 以*L. monocytogenes*和*S. aureus*为指示菌, 研究了M-MCC对指示菌细胞膜通透性、细胞膜完整性、细胞内容物以及DNA含量等多个方面的影响。相关结果表明, M-MCC处理对*L. monocytogenes*和*S. aureus*的生长有显著的抑制效果, 到达对数生长期的时间相较无处理组有所推迟。相应的胞外电导率、核酸和蛋白质的含量都有着明显的变化, 且与处理时间密切相关。本研究表明M-MCC在抗菌应用方面具有巨大潜力。

关键词: 纤维素; 氨基酸; 抑菌; 单核细胞增生李斯特菌; 金黄色葡萄球菌

Inhibitory Effect of L-Methionine-Modified Microcrystalline Cellulose on Gram-Positive Bacteria

WU Simiao¹, YANG Haifan^{1,2}, LIANG Guannan², SUN Xinyang¹

(1. College of Food Science and Engineering, Nanjing University of Finance and Economics, Nanjing 210023, China;

2. Beijing Green State Environmental Engineering Co., Ltd., Beijing 100176, China)

Abstract: In order to effectively prevent and treat microbial contamination in foods, L-methionine-modified microcrystalline cellulose (M-MCC) with antibacterial effect was prepared by loading L-methionine (L-Met) on microcrystalline cellulose (MCC). The morphology, element composition and stability of M-MCC were characterized, indicating the successful grafting of L-Met. M-MCC had a good scavenging effect on 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) cationic radicals, with a scavenging percentage of 97.47% at 20 mg/mL. M-MCC had a marked antibacterial activity against the Gram-positive bacteria *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*, with minimal inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of 15 and 30 mg/mL, respectively. Finally, the effect of M-MCC on the cell membrane permeability, cell membrane integrity, cellular contents and DNA content of the two bacteria was studied. The results showed that M-MCC treatment had a significant inhibitory effect on the growth of *L. monocytogenes* and *S. aureus*, and delayed the time taken to reach the logarithmic phase compared with the untreated group. Furthermore, it resulted in obvious changes in extracellular conductivity and the contents of nucleic acid and protein, which was closely related to the treatment time. This study shows that M-MCC has great application potential as an antibacterial agent.

Keywords: cellulose; amino acids; bacteriostasis; *Listeria monocytogenes*; *Staphylococcus aureus*

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240625-177

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2025) 03-0074-09

收稿日期: 2024-06-25

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (32001839; 32302118); 江苏省自然科学基金项目 (BK20200836; BK20210672)

第一作者简介: 吴思邈 (1990—) (ORCID: 0000-0001-9343-0568), 女, 副教授, 博士, 研究方向为食品安全及微生物控制。

E-mail: 9120191162@nufe.edu.cn

引文格式:

吴思邈, 杨海凡, 梁冠男, 等. *L*-甲硫氨酸改性微晶纤维素对革兰氏阳性菌的抑制作用[J]. 食品科学, 2025, 46(3): 74-82.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240625-177. <http://www.spkx.net.cn>

WU Simiao, YANG Haifan, LIANG Guannan, et al. Inhibitory effect of *L*-methionine-modified microcrystalline cellulose on Gram-positive bacteria[J]. Food Science, 2025, 46(3): 74-82. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240625-177. <http://www.spkx.net.cn>

革兰氏阳性菌是能被革兰氏染色为深蓝色或紫色的细菌,其细胞壁中含有大量的肽聚糖。由革兰氏阳性菌引起的感染可能导致许多严重的疾病,包括败血症、菌血症、肺炎和心内膜炎等^[1-2]。其中单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)^[3]和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)^[4]是食品中常见的革兰氏阳性菌。*L. monocytogenes*在环境中无处不在,在绝大多数食品中都能找到。肉类、蛋类、禽类、海产品、乳制品、蔬菜等都被证实是*L. monocytogenes*的感染源。*S. aureus*感染引起中毒的食品种类较多,如奶、肉、蛋、鱼及其制品。*L. monocytogenes*每年导致全球约23 000例严重感染,易感人群的死亡率超过30%^[5]。2018年,欧盟共有2 549例侵入性*L. monocytogenes*确诊病例,每10万居民中有0.47例,1 469例确诊病例中死亡率为15.6%,是所有食源性疾病中死亡率最高的^[6]。金黄色葡萄球菌是一种共生细菌,可在人类的皮肤、鼻子和肠黏膜上繁殖^[7]。无病征的工人可透过人手接触或呼吸道分泌物污染食物,因而成为葡萄球菌导致食物中毒的源头。这种肠道中毒是因进食受产生肠毒素的金黄色葡萄球菌污染的食物而导致。细菌血症、感染性心内膜炎、骨关节、皮肤和软组织感染以及器械相关感染是金黄色葡萄球菌引起的主要疾病^[8-9]。食源性疾病带来的负面影响不仅局限于某个人或某一处地方,其会深入到生活的各个方面,食品的微生物污染问题也逐渐成为所有人共同关注的焦点。因此,如何快速有效地杀灭食品中的致病微生物,确保食品安全,对消费者及社会各方都具有十分重要的意义。食品中微生物的抑制和去除方法也成为许多研究者不断研究的课题。

为提高食品包装的抑菌能力,通常在包装中添加抑菌材料^[10-13]。常用的抑菌材料可分为无机抑菌材料和有机抑菌材料。一些无机化合物具有一定的抗菌活性,如银(Ag)、铜(Cu)、锌(Zn)等以及相应金属氧化物^[14-16]。此外,纳米颗粒和纳米技术也多用于无机抗菌材料。无机抗菌材料最重要的特点是在热等的条件下具有很好的稳定性^[17]。同时,无机抑菌材料也存在抗霉菌活性弱的缺点,因此在工业应用时通常会加大使用剂量。有机抗菌剂对某些生物分子具有特异性。这一特性使其在医疗、保健、食品包装薄膜等领域的应用更加广泛^[18-20]。有机抗菌剂又分为天然抗菌剂和合成抗菌剂两

大类。天然抗菌剂主要包括精油类、溶菌酶类、壳聚糖类、细菌素类和酚类。合成抑菌剂包括季铵盐和其他活性物质负载聚合物复合材料。目前,抗菌剂的发展方向除了探索开发天然抗菌剂外,更多的是将天然抗菌剂负载在聚合物材料上,从而在保留抑菌剂活性的条件下达到增强其机械性能的效果。近年来,由于纤维素独特的结构和性质,例如无毒环保、生物相容性好、可再生性强等特点,又具备比表面积大、纳米结构精细、力学强度良好和热膨胀系数较低等特点,纤维素可作为一种理想的新型食品载体材料,被广泛应用于包括食品、造纸、生物材料和制药行业的许多领域^[21-22]。

纤维素来源广泛,年产量约为500亿t。纤维素是由 β -D-吡喃葡萄糖通过 β -1,4-糖苷键连接而成的线性高分子化合物,具有良好的亲水性和化学修饰性,是自然界中最丰富的生物大分子材料,是最适合合成绿色产品的原料之一^[23-25]。近年来,纤维素基抗菌剂的研究逐渐成为抗菌研究的热门。纤维素可以作为性能优良的载体,运用不同的改性方法能够使纤维素在具备较好抗菌效果的同时满足差异化的需求。氨基酸是生物大分子蛋白质的基本组成单位,是一类同时含有碱性氨基和酸性羧基的两性化合物,目前一共有22种氨基酸。按照人体能否自行合成,可将氨基酸分为必需氨基酸和非必需氨基酸。氨基酸的结构基本类似,性质的不同主要体现在R基的不同。甘氨酸的R基为—H,不具备立体异构体,除甘氨酸外的所有氨基酸都具备立体异构体,即存在D-型和L-型两种构型。氨基酸被广泛应用于食品和医药产业。氨基酸具有丰富的官能团,且大部分氨基酸具有良好的水溶性,是纤维素改性的一个良好选择对象^[26-27]。

一些研究如含有五倍子草提取物的高吸水性交联羧甲基纤维素-聚乙二醇水凝胶^[28](最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)为0.24 mg/mL)和由聚己内酯及醋酸纤维素制成、添加精油的同轴湿纺纤维^[29](对*S. aureus*的MIC为2.06 mg/mL)虽然具备较低的MIC,但一般都用于医学领域作为体外伤口敷料,难以运用在食品中。此外,这些材料的制备还存在着提取困难、合成复杂等问题。相较于其他材料,纤维素和氨基酸均为绿色无害的天然化合物,可以广泛应用于食品中,且合成原料便于获取、成本较低,通过高碘酸钠氧化接枝的合成途径和条件也较为简单。

本研究以食品中常见的*L. monocytogenes*和*S. aureus*两种革兰氏阳性菌为研究对象,以微晶纤维素(microcrystalline cellulose, MCC)为载体,*L*-甲硫氨酸(*L*-methionine, *L*-Met)为改性材料,设计开发一种纤维素基抑菌材料*L*-Met改性MCC(M-MCC)。通过*L. monocytogenes*和*S. aureus*生长曲线等指标评价M-MCC的抑菌效果,通过测定M-MCC处理后细胞膜通透性等指标以评价M-MCC对*L. monocytogenes*和*S. aureus*细胞膜的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

*L. monocytogenes*购自美国农业部食品安全检验局;*S. aureus*购自美国模式培养物集存库。

MCC 上海沪试实验室器材股份有限公司;高碘酸钠、2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS)、*L*-Met、过硫酸钾、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)(均为分析纯)上海麦克林生化科技有限公司;甲醇(色谱纯)、二甲基亚砩(分析纯)、乙二醇(分析纯)广东光华科技股份有限公司;硼氢化钠(分析纯)江苏强盛功能化学股份有限公司;无水乙醇(分析纯)无锡市亚盛化工有限公司;盐酸(分析纯)南京化学试剂股份有限公司。

1.2 仪器与设备

JJ2000B电子天平 常熟双杰测试仪器厂;524G恒温磁力搅拌器 上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司;DHG-9240A电热鼓风干燥箱 上海一恒科学仪器有限公司;SCIENTZ-10N冷冻干燥机 宁波新芝冻干设备股份有限公司;FE28 pH计、电导率仪 瑞士Mettler Toledo公司;恒温培养箱 宁波江南仪器设备有限公司;BKQ-B75L高压蒸汽灭菌锅 山东博科生物产业有限公司;M2E全波长酶标仪 美国BioTek公司;紫外分光光度计 上海精密科学仪器有限公司;LL 600300傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)仪 美国PerkinElmer公司;Sigma 300扫描电子显微镜(scanning electron microscopy, SEM)、LSM900激光共聚焦显微镜 德国Zeiss公司。

1.3 方法

1.3.1 M-MCC的合成总流程

M-MCC的制备总流程如图1所示。

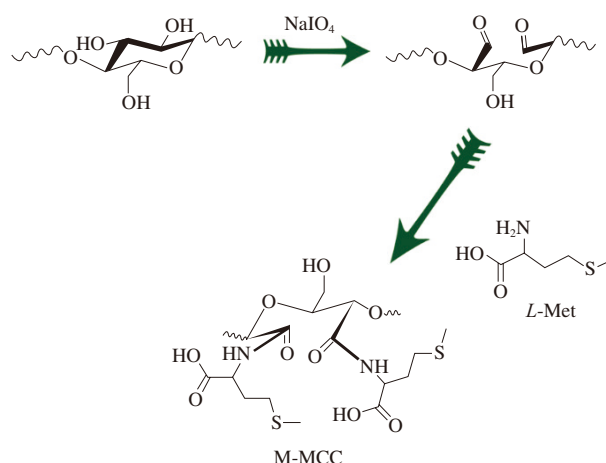


图1 NaIO₄氧化法制备M-MCC总流程

Fig. 1 Reaction route for M-MCC preparation by NaIO₄ oxidation method

1.3.2 MCC的氧化活化

原始的MCC样品性质较为稳定,难以直接进行接枝。需采用高碘酸钠氧化法对MCC进行开环氧化,生成双醛基纤维素(dialdehyde cellulose, DAC),再进行下一步的接枝。

MCC氧化成DAC的步骤如下:准确称取24.063 g高碘酸钠(NaIO₄),用去离子水溶解,转移到250 mL容量瓶中,超声30 min使其完全溶解。称取10 g MCC样品粉末,置于烧杯中并加入所配的0.37 mol/L NaIO₄溶液250 mL,用0.1 mol/L的盐酸调节pH值到4左右。用锡纸将烧杯完全包裹以营造黑暗条件,以40 ℃、600 r/min搅拌180 min,随即加入6 mL乙二醇结束反应,调节pH值到8左右再继续搅拌30 min,静置30 min。将所得到的悬浮液倒入3 500 Da的透析袋中透析48 h,期间每8 h将析出溶液更换为去离子水。经冷冻干燥后得到氧化的MCC,即DAC。

1.3.3 *L*-Met的功能化接枝

称取10 g上述所得DAC,根据DAC与所用*L*-Met物质的量比为1:1称取*L*-Met,并将二者混合在250 mL去离子水中,在40 ℃、400 r/min的条件下搅拌混匀5 min后加入5 mL二甲基亚砩,并继续搅拌反应6 h。然后加入5 g硼氢化钠(NaBH₄),静置至无气泡产生后,加入6 mL无水乙醇终止反应。使用去离子水洗涤所得产物2~3次后,将所得产物转移至透析袋用去离子水透析48 h,期间每8 h更换去离子水,以除去产物中掺杂的过量离子。最后冷冻干燥得到最终产物M-MCC。

1.3.4 M-MCC表征分析

1.3.4.1 微观形貌及结构

采用SEM对改性后的M-MCC表面微观结构进行观察,样品通过喷金提高电导率后进行测试,在不同放大倍数下进行拍照。

1.3.4.2 表面官能团和元素分析

通过FTIR对M-MCC进行表征,扫描范围为4 000~400 cm⁻¹,以确定材料的成功合成。通过能量色散X射线谱(energy dispersive spectrometer, EDS)以及X射线光电子能谱(X-ray photoelectron spectroscopy, XPS)测试M-MCC中各元素的分布和存在情况。

1.3.4.3 X射线衍射(X-ray diffraction, XRD)和热重分析

通过XRD表征了M-MCC的晶体结构,射线为CuK α ,加速电压为40 kV,加速电流为15 mA,扫描速率2°/min,扫描范围2 θ 为5°~90°。

通过热重分析仪(thermogravimetric analysis, TGA)表征M-MCC的热稳定性和受热分解过程。

1.3.5 抑菌性能测定

1.3.5.1 M-MCC的体外抗氧化活性测定

将M-MCC加入去离子水中配制成不同质量浓度梯度的悬浮液,质量浓度梯度设置为0.1、0.5、1、5、10、20 mg/mL。

使用7 mmol/L的ABTS阳离子自由基溶液与过硫酸钾溶液在25 °C黑暗条件下反应12 h,以生成稳定的氧化ABTS阳离子自由基。用0.2 mol/L磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)稀释ABTS阳离子自由基溶液至用紫外分光光度计检测在734 nm波长处的吸光度为0.65~0.75,保存溶液备用。稀释后的ABTS阳离子自由基溶液取200 μ L与20 μ L不同浓度梯度的样品溶液混匀,并在黑暗条件下静置反应10 min后在734 nm波长处测定溶液的吸光度。同时以抗坏血酸作为反应的阳性对照。ABTS阳离子自由基清除率按下式计算:

$$\text{ABTS阳离子自由基清除率/\%} = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}) \times 100$$

式中: A_0 为空白实验组的吸光度(以超纯水代替样品); A_1 为样品吸光度; A_2 为标准组吸光度(以PBS替代稀释后的ABTS阳离子自由基溶液)。

1.3.5.2 M-MCC的MIC和最小杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC)的确定

MIC是指无法以肉眼观察到细菌生长的抑菌剂最低抑制浓度。MIC和MBC的测定:将得到的M-MCC以1、5、10、15、20 mg/mL的质量浓度梯度溶解于10 mL的无菌液体培养基中。液体培养基为3 g/100 mL的胰蛋白大豆肉汤。向其中加入100 μ L浓度为10⁶ CFU/mL的菌悬液,置于37 °C恒温培养箱中培养24 h。观察菌体生长情况和培养液浑浊情况,24 h后培养液依然澄清的M-MCC最小浓度即为M-MCC的MIC。取100 μ L培养液均匀涂布在固体培养基表面,置于37 °C恒温培养箱培养24 h,观察菌落生长情况。没有菌落生长的最小M-MCC浓度即为M-MCC的MBC。

1.3.5.3 M-MCC处理下细菌生长曲线测定

分别以1 MIC和2 MIC的M-MCC为处理组,空白组不加入抗菌剂,向其中分别加入200 μ L浓度为10⁶ CFU/mL的菌悬液,置于恒温培养箱中37 °C,每2 h在600 nm波长处用酶标仪测定OD_{600 nm},并记录数据,绘制细菌生长曲线。

1.3.5.4 M-MCC对细胞膜通透性的影响测定

将培养24 h的*L. monocytogenes*和*S. aureus*在8 000 r/min离心15 min,收集细胞沉淀,用无菌生理盐水洗涤两次,重悬至OD_{600 nm}=0.6~0.8,作为初始菌溶液备用。以2 mL *L. monocytogenes*菌悬液+2 mL无菌葡萄糖水为空白对照组,以2 mL菌悬液+2 mL无菌葡萄糖水+2 MIC的M-MCC为1 MIC组,以2 mL菌悬液+2 mL无菌葡萄糖水+4 MIC的M-MCC为2 MIC组。于37 °C恒温培养6 h。在8 000 r/min将不同培养时间的混合液分别离心15 min,保留上清液,过0.22 μ m的滤膜,并用电导率仪测定过滤后上清液的电导率。

1.3.5.5 M-MCC对细胞内容物的影响测定

通过测定细菌细胞核酸及蛋白质的泄漏情况确定M-MCC对细菌细胞内容物的影响,其中利用紫外分光光度计在260 nm波长处测定核酸吸收峰,在280 nm波长处测定蛋白质吸收峰。

将培养24 h的*L. monocytogenes*和*S. aureus*在8 000 r/min离心15 min,并收集细胞沉淀,用无菌PBS洗涤两次,重悬至OD_{600 nm}=0.6~0.8,作为初始菌溶液备用。以4 mL菌悬液为空白对照组,以4 mL菌悬液+MIC的M-MCC为1 MIC组,以4 mL菌悬液+2 MIC的M-MCC为2 MIC组。于37 °C恒温培养0、30、60、90、120、150、180 min。在8 000 r/min将不同培养时间的混合液分别离心15 min,保留上清液,过0.22 μ m滤膜,使用紫外分光光度计分别测定260 nm和280 nm波长处的吸光度。

1.3.5.6 M-MCC对细胞DNA含量的影响测定

将培养24 h的*L. monocytogenes*和*S. aureus*在8 000 r/min离心15 min,并收集细胞沉淀,用无菌PBS洗涤两次,重悬至OD_{600 nm}=0.6~0.8,作为初始菌溶液备用。以2 mL菌悬液为空白对照组,以2 mL菌悬液+MIC的M-MCC为1 MIC组,以2 mL菌悬液+2 MIC的M-MCC为2 MIC组。于37 °C恒温培养4 h。向各组中加入20 μ L 1 mg/mL的DAPI,充分混匀并在遮光条件下反应10 min。取20 μ L溶液滴加至载玻片上,加盖玻片,通过激光共聚焦显微镜(64 \times)进行观察,激光共聚焦显微镜的激发波长设置为405 nm,发射波长设置为461 nm。

1.4 数据处理

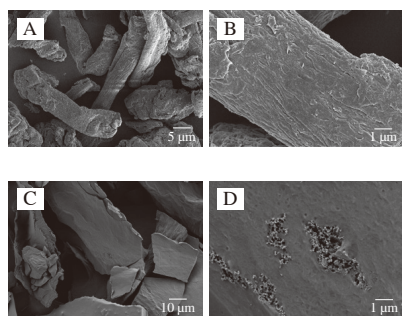
实验数据及图由Excel 2021软件和Origin 2021 Pro软件处理。

2 结果与分析

2.1 表征分析结果

2.1.1 微观形貌及结构分析

为了了解*L*-Met修饰对MCC形貌结构的影响, 观察MCC和M-MCC的微观形貌和结构变化, 采用SEM对MCC和M-MCC成像, 结果如图2所示。与具有多孔结构、呈现短棒状的MCC相比, *L*-Met修饰的M-MCC表现出更粗糙的表面, 呈片状分布, 且表面覆盖有颗粒状纤维。这种表面结构改变可能有助于增加M-MCC对细菌的接触面积, 进而提高抗菌活性, 这有待进一步的确定。



A、B. MCC在5 μm 和1 μm 水平下的微观形貌;
C、D. M-MCC在10 μm 和1 μm 水平下的微观形貌。

图2 MCC与M-MCC的微观形貌

Fig. 2 Microstructures of MCC and M-MCC

2.1.2 表面官能团及元素分析

使用FTIR对改性前的MCC和改性后的M-MCC表面官能团进行表征, 结果如图3所示。在3 337、1 634、1 430、1 320、1 166 cm^{-1} 和1 031 cm^{-1} 处MCC和M-MCC具有相同的峰, 分别对应—OH拉伸振动峰、—OH弯曲振动吸收峰、—H—C—H—面内弯曲振动峰、—O—C—H—面内弯曲振动峰、—C—O—C—不对称拉伸振动峰和—C—O—拉伸振动峰, 这证明改性后MCC骨架结构不变, 说明*L*-Met的接枝并没有破坏纤维素的基本骨架结构^[30]。—C—S—C—的红外吸收峰出现在1 024 cm^{-1} 处, 1 630~1 680 cm^{-1} 碳氧伸缩振动和1 460~1 550 cm^{-1} 氮氢弯曲振动证明了酰胺键的存在^[31], 间接证明了*L*-Met成功接枝到MCC表面。

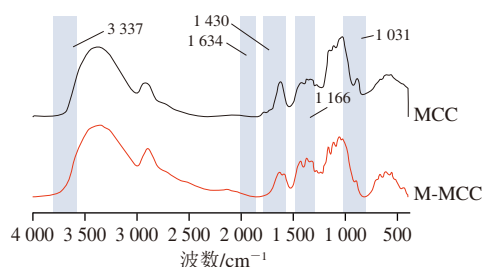
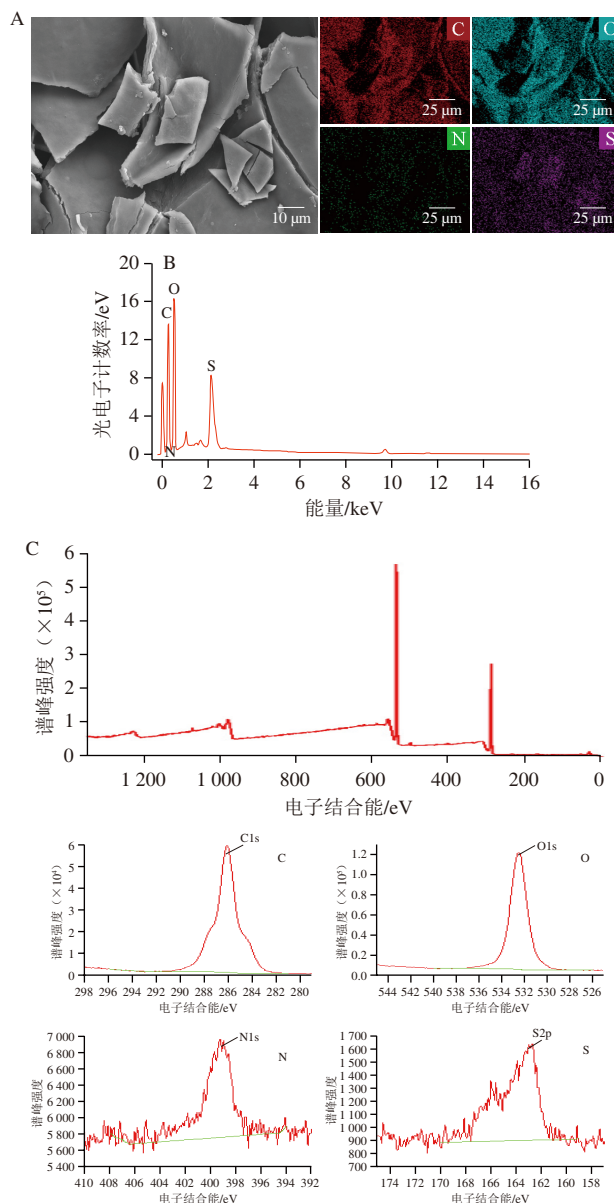


图3 MCC和M-MCC的FTIR

Fig. 3 FTIR of MCC and M-MCC

为了进一步了解M-MCC的元素分布情况, 采用SEM-EDS和XPS分别对C、O、N、S进行元素分析。M-MCC中的元素分布情况如图4A所示, 包含C、O、N、S的EDS总谱图如图4B所示, 可以看出, 在M-MCC上可以检测到N、S元素, 而这两种元素MCC本身不具备, 由于*L*-Met接枝负载在MCC上而出现, 这证明*L*-Met成功接枝到了MCC上。在能谱总谱图中能够观察到N、S的特征峰, 也证明了这一结论。



A. EDS能谱图; B. EDS能谱总谱图; C. XPS能谱图。

图4 M-MCC的表面官能团分析

Fig. 4 Surface functional group analysis of M-MCC

如图4C所示, M-MCC由于分子中N、S元素含量较少, 全谱分析中并未能直接看到N元素(N1s)和S元素(S2p)的结合峰。M-MCC的C1s结合能为286.11 eV,

O1s结合能为532.5 eV。进一步对N1s和S2p的特征谱峰进行精细扫描分析,由峰形可以判断出N、S元素的存在,但其较小的峰面积和峰强度也证实了N、S元素在M-MCC中含量较低^[32]。M-MCC的原子百分比如表1所示。由XPS所得到的N、S元素在M-MCC上的原子百分比仅为0.94%和0.55%,而C、O元素原子百分比则高达57.61%和40.91%。

表1 M-MCC的元素分析

Table 1 Elemental analysis of M-MCC

元素	C	O	N	S	总计
原子百分比/%	57.61	40.90	0.94	0.55	100

2.1.3 XRD和TGA

如图5A所示,15.6°、22.6°和34.8°处的衍射峰分别为纤维素的(1~10)(110)、(200)和(004)晶面^[33]。没有观察到纤维素晶体形态的明显变化。改性后的M-MCC在22.6°处的特征峰略有增强,这可能是因为L-Met的负载使得MCC中非晶态区域有效降解,结晶强度增加,有利于M-MCC的稳定性。

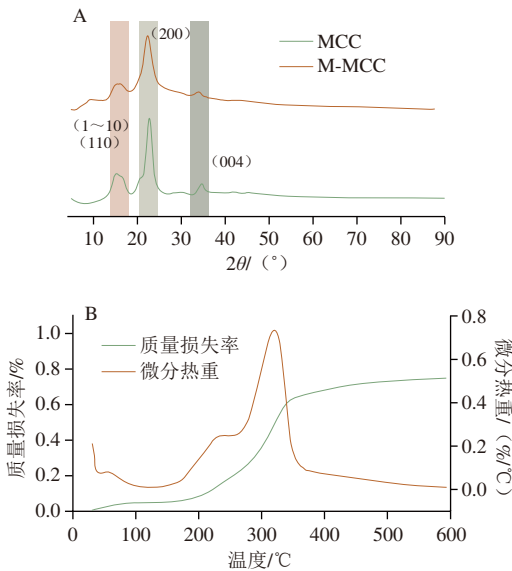


图5 MCC和M-MCC的XRD谱图(A)以及M-MCC的热重曲线和微分热重曲线(B)

Fig. 5 XRD patterns of MCC and M-MCC (A) and thermogravimetric curves and differential thermogravimetric curves of M-MCC (B)

如图5B所示, M-MCC在开始加热后开始缓慢产生质量损失, M-MCC在温度达到112.05 °C左右时质量损失达到4.728%,而后质量随温度上升损失十分缓慢。温度到达153.08 °C, M-MCC开始快速分解,产生较大的质量损失,且质量损失速率在320.46 °C时达到最大值,在356.84 °C时, M-MCC结束快速分解状态,恢复慢速降解。在温度上升到526.34 °C时, M-MCC热解基本结束,质量不再有大的损失,此时M-MCC在升温过程中损失的质量达到73.87%。M-MCC在热解刚开始的质量损失都是

由于水分的蒸发和小分子化合物的降解而造成。随着温度的进一步升高, M-MCC出现大规模的质量损失现象,而后在较高的温度结束快速热解状态。

2.2 M-MCC的体外抗氧化活性分析

如图6所示,在M-MCC质量浓度为0.1、0.5、1、5、10、20 mg/mL时, M-MCC对ABTS阳离子自由基的清除率分别为(30.67±3.35)%、(43.51±10.53)%、(52.38±6.99)%、(82.03±6.45)%、(93.55±3.63)%、(97.48±2.30)%。当M-MCC质量浓度较低时(0~1 mg/mL), M-MCC对ABTS阳离子自由基的清除能力较弱,清除率小于52.38%, M-MCC抗氧化能力较差;当M-MCC质量浓度逐渐上升时(1~5 mg/mL), M-MCC对ABTS阳离子自由基的清除能力急剧上升,清除率由52.38%上升到82.03%;当M-MCC质量浓度由5 mg/mL提高到10 mg/mL时, M-MCC对ABTS阳离子自由基的清除率高于90%;当M-MCC的质量浓度提高到20 mg/mL时, M-MCC对ABTS阳离子自由基的清除率达到97.47%,已接近抗坏血酸的抗氧化效果。

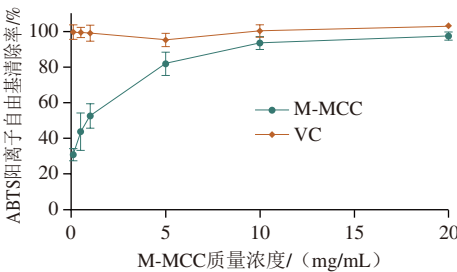
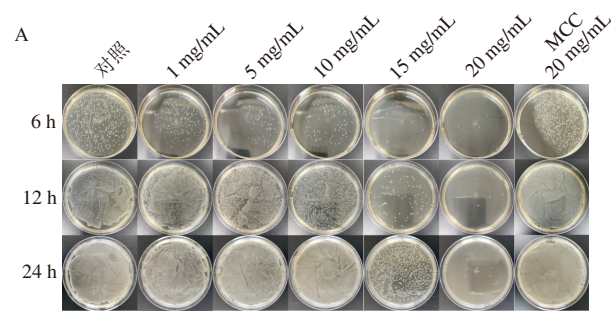


图6 M-MCC对ABTS阳离子自由基的清除效果

Fig. 6 Scavenging effect of M-MCC on ABTS cationic radicals

2.3 M-MCC的MIC和MBC

通过不同浓度的M-MCC抗菌实验发现, M-MCC质量浓度在15 mg/mL时,培养液在培养24 h后仍然澄清,所测得的M-MCC的MIC和MBC分别为15 mg/mL和30 mg/mL。从12 h和24 h的平板菌落可以看出, 15 mg/mL以上的M-MCC对*L. monocytogenes*和*S. aureus*都具有较好的抑制效果(图7)。这可能是由于*L. monocytogenes*和*S. aureus*都是革兰氏阳性菌,细胞壁与细胞膜结合不紧密,细胞壁结构较为简单。



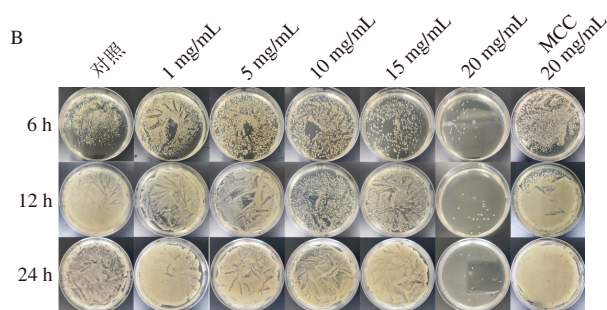


图7 M-MCC对*L. monocytogenes* (A)和*S. aureus* (B)的抗菌效果
Fig. 7 Antibacterial effect of M-MCC on *L. monocytogenes* (A) and *S. aureus* (B)

2.4 M-MCC细菌生长曲线测定

在M-MCC存在下的细菌生长曲线即为M-MCC对细菌的抑菌动力学曲线,可以用来表示细菌的生长代谢情况和规律。*L. monocytogenes*的生长曲线如图8A所示,未做任何处理的对照组呈现为典型的“S”型曲线,从8 h开始上升,到12 h左右到达整个生长曲线的对数期中期,表明*L. monocytogenes*的生长状态正常。在MIC的处理下,可以看出M-MCC对*L. monocytogenes*的生长具有一定的抑制作用,培养至16 h后曲线才出现上升趋势。而在2 MIC的作用下,*L. monocytogenes*几乎没有生长,24 h的 $OD_{600\text{ nm}}$ 仅为0.25左右,M-MCC对*L. monocytogenes*的抑制作用效果极其显著。这表明M-MCC能够在一定程度上推迟*L. monocytogenes*的对数生长期,且作用效果与其剂量有关。M-MCC对*S. aureus*的抑制效果较差,*S. aureus*对照组在开始培养的4~10 h即进行了快速的繁殖,并于10 h左右达到繁殖的巅峰,而1 MIC条件下的M-MCC将这一过程推迟了近6 h,同时也降低了*S. aureus*生长到最高处的 $OD_{600\text{ nm}}$ 。此外,2 MIC条件下的M-MCC处理仍然对*S. aureus*的生长有较好的抑制作用,2 MIC处理的*S. aureus*生长曲线仅在18 h后有小幅度的上涨。

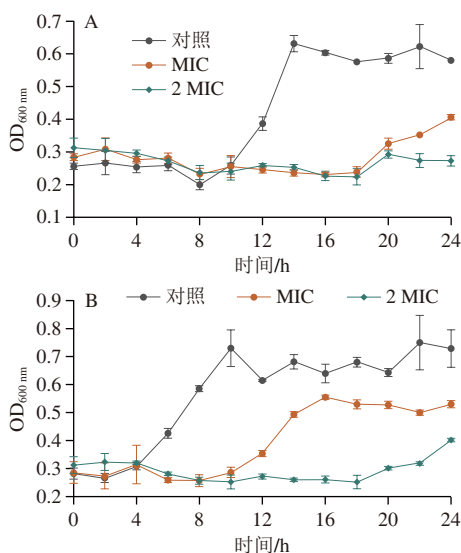
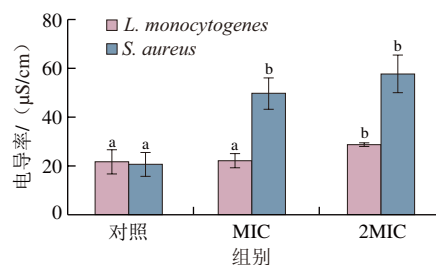


图8 *L. monocytogenes* (A)和*S. aureus* (B)的生长曲线
Fig. 8 Growth curves of *L. monocytogenes* (A) and *S. aureus* (B)

2.5 M-MCC对细胞膜通透性的影响

如图9所示,与未处理的*L. monocytogenes*组相比,在1 MIC处理下,胞外电导率呈现上升的趋势,这种情况在2 MIC处理下表现得更加明显。这是因为活的细菌细胞拥有完整的细胞膜,能够选择性的控制膜内外的物质跨膜运输,所以胞外电导率较为稳定。而M-MCC处理过的*L. monocytogenes*、*S. aureus*胞外电导率上升,这说明M-MCC可能改变了细胞膜的通透性,或是破坏了细菌细胞膜,从而导致细菌胞内离子和聚合物转移到悬液中,造成电导率的变化。



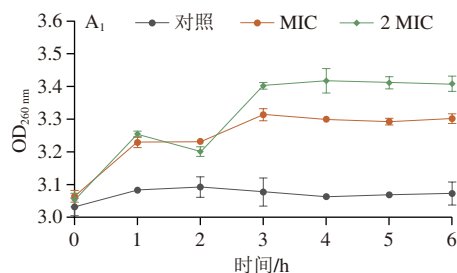
同一菌株不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图9 M-MCC处理对*L. monocytogenes*和*S. aureus*胞外电导率的影响

Fig. 9 Effect of M-MCC treatment on the extracellular conductivity of *L. monocytogenes* and *S. aureus*

2.6 M-MCC对细胞内容物的影响

核酸和蛋白质是生物细胞的重要组成部分,一般情况下,核酸和蛋白质等大分子不会跨活细胞的细胞膜运输,因此,核酸和蛋白的泄漏情况可以一定程度上反映出细菌细胞膜的完整性。如图10所示,经过1 MIC和2 MIC处理后*L. monocytogenes*和*S. aureus*的 $OD_{260\text{ nm}}$ 和 $OD_{280\text{ nm}}$ 均有一定程度的上升,这说明部分*L. monocytogenes*和*S. aureus*细胞的核酸和蛋白质泄漏到上清液中,即M-MCC对细菌细胞膜的完整性产生了影响,使菌体细胞死亡,导致核酸和蛋白质泄漏。各处理组均在反应3 h左右核酸和蛋白的吸光度达到峰值,之后核酸和蛋白吸光度无明显变化,即细菌的胞内核酸和蛋白不再泄漏。所用M-MCC的浓度越高,上清液中核酸和蛋白质检出量越多,即对细菌细胞的破坏越严重。



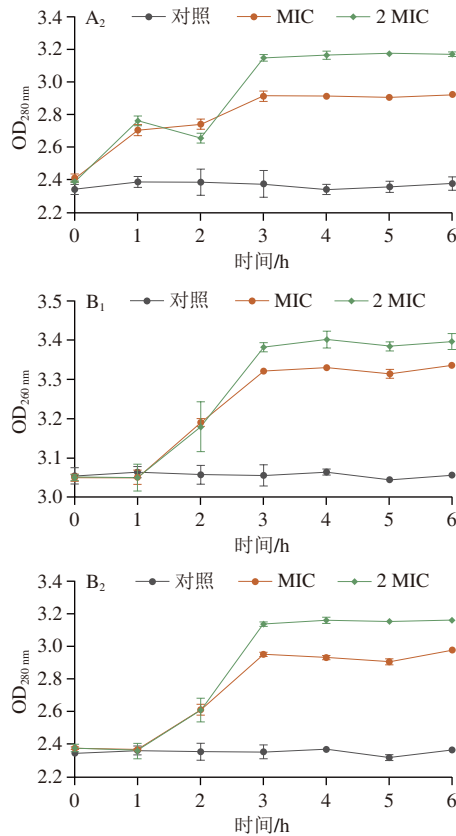


图 10 M-MCC处理对*L. monocytogenes* (A) 和*S. aureus* (B) 细胞内容物泄漏情况的影响

Fig. 10 Effect of M-MCC treatment on leakage of cellular contents of *L. monocytogenes* (A) and *S. aureus* (B)

2.7 M-MCC对细胞DNA含量的影响

DAPI是一种能够和DNA具有极强结合能力的荧光染料,能够透过完整的细胞膜,因此一般用于活细胞的染色。利用DAPI的过膜能力,使之与*L. monocytogenes*活细胞的DNA相结合,观察M-MCC对*L. monocytogenes*细胞DNA的影响。如图11所示,对照组无处理的*L. monocytogenes*细胞荧光强度较强,而经过1 MIC和2 MIC处理的细胞荧光强度明显降低。这说明经过M-MCC处理的细胞DNA发生了泄漏,细胞内DNA含量降低,这也与核酸泄漏情况相符合。

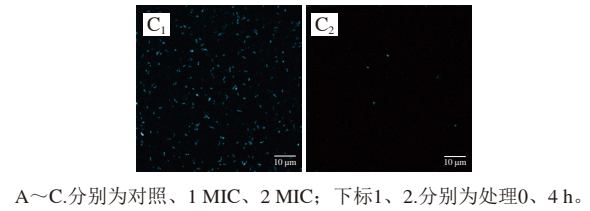
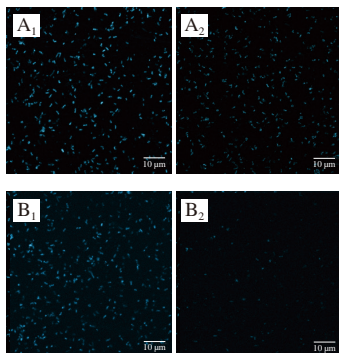


图 11 M-MCC处理后的*L. monocytogenes*激光共聚焦图像
Fig. 11 Confocal laser microscopic images of *L. monocytogenes* treated by M-MCC

3 结论

本研究成功制备了具有抑菌效果的M-MCC抑菌剂,用以应对食品中*L. monocytogenes*和*S. aureus*的污染。通过SEM、EDS、FTIR、XPS、XRD和TGA表征改性后M-MCC的形貌变化、元素变化以及稳定性,结果表明*L. Met*成功接枝。对M-MCC的体外抗氧化能力进行研究,发现其对ABTS阳离子自由基有着良好的去除效果。而后通过MIC以及细菌生长曲线进行了M-MCC对*L. monocytogenes*和*S. aureus*抑菌效果的研究。确定了M-MCC对*L. monocytogenes*和*S. aureus*的MIC为15 mg/mL。细菌生长曲线表明M-MCC能推迟指示菌的对数生长期。这可能与革兰氏阳性菌独特的细胞壁结构有关。通过研究细胞膜通透性、细胞膜完整性、细胞内容物以及DNA含量等多个方面,分析了M-MCC对*L. monocytogenes*和*S. aureus*细胞膜的作用。相关结果表明, M-MCC处理对*L. monocytogenes*的生长有显著的抑制效果,相应的胞外电导率、核酸和蛋白质的含量都发生明显的变化,且与处理时间的长短密切相关。综上, M-MCC可能是直接作用于*L. monocytogenes*的细胞膜表面,较低浓度的M-MCC可增加细菌细胞膜的通透性,破坏细菌胞内外电解质平衡,从而抑制细菌的生长;较高浓度的M-MCC则剧烈作用于细菌细胞膜表面,破坏细菌的细胞膜结构,使细胞死亡并释放出原本胞内的核酸和蛋白质等大分子,从而起到抑菌的作用。表明M-MCC抗菌剂在抗菌应用方面潜力巨大。

参考文献:

- [1] POWELL D A, JACOB C J, CHAPMAN B J. Enhancing food safety culture to reduce rates of foodborne illness[J]. Food Control, 2011, 22(6): 817-822. DOI:10.1016/j.foodcont.2010.12.009.
- [2] FU L, DENG S Q, LUO Y M, et al. An ultrasensitive colorimetric biosensor for the detection of Gram-positive bacteria by integrating paper-based enrichment and carbon dot-based selective recognition[J]. Talanta, 2023, 265: 124920. DOI:10.1016/j.talanta.2023.124920.
- [3] TUYTSCHAEVER T, RAES K, SAMPERS I. *Listeria monocytogenes* in food businesses: from persistence strategies to intervention/prevention strategies: a review[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2023, 22(5): 3910-3950. DOI:10.1111/1541-4337.13219.

- [4] ZHAN W J, XU L L, LIU Z Y, et al. Tandem guest-host-receptor recognitions precisely guide ciprofloxacin to eliminate intracellular *Staphylococcus aureus*[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2023, 62(32): e202306427. DOI:10.1002/anie.202306427.
- [5] RODRÍGUEZ-MELCÓN C, ALONSO-HERNANDO A, RIESCO-PELÁEZ F, et al. Biovolume and spatial distribution of foodborne Gram-negative and Gram-positive pathogenic bacteria in mono- and dual-species biofilms[J]. *Food Microbiology*, 2021, 94: 103616. DOI:10.1016/j.fm.2020.103616.
- [6] AUTHORITY E F S, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017[J]. *EFSA Journal*, 2019, 17(2): e05598. DOI:10.2903/j.efsa.2019.5598.
- [7] BALASUBRAMANIAN D, HARPER L, SHOPSIN B, et al. *Staphylococcus aureus* pathogenesis in diverse host environments[J]. *Pathogens and Disease*, 2017, 75(1): ftx005. DOI:10.1093/femspd/ftx005.
- [8] BENCARDINO D, AMAGLIANI G, BRANDI G. Carriage of *Staphylococcus aureus* among food handlers: an ongoing challenge in public health[J]. *Food Control*, 2021, 130: 108362. DOI:10.1016/j.foodcont.2021.108362.
- [9] TONG S Y C, DAVIS J S, EICHENBERGER E, et al. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2015, 28(3): 603-661. DOI:10.1128/CMR.00134-14.
- [10] SWETHA T A, BORA A, MOHANRASU K, et al. A comprehensive review on polylactic acid (PLA)-synthesis, processing and application in food packaging[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 234: 123715. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2023.123715.
- [11] HE Y, YE H C, YOU T T, et al. Sustainable and multifunctional cellulose-lignin films with excellent antibacterial and UV-shielding for active food packaging[J]. *Food Hydrocolloids*, 2023, 137: 108355. DOI:10.1016/j.foodhyd.2022.108355.
- [12] MANZOOR A, YOUSUF B, PANDITH J A, et al. Plant-derived active substances incorporated as antioxidant, antibacterial or antifungal components in coatings/films for food packaging applications[J]. *Food Bioscience*, 2023, 53: 102717. DOI:10.1016/j.fbio.2023.102717.
- [13] PACKIALAKSHMI J S, KANG J G, JAYAKUMAR A, et al. Insights into the antibacterial and antiviral mechanisms of metal oxide nanoparticles used in food packaging[J]. *Food Packaging and Shelf Life*, 2023, 40: 101213. DOI:10.1016/j.fpsl.2023.101213.
- [14] YANG R, LIU B Z, YU F Y, et al. Superhydrophobic cellulose paper with sustained antibacterial activity prepared by *in situ* growth of carvacrol-loaded zinc-based metal organic framework nanorods for food packaging application[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 234: 123712. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2023.123712.
- [15] ZHANG W L, ROY S, RHIM J W. Copper-based nanoparticles for biopolymer-based functional films in food packaging applications[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2023, 22(3): 1933-1952. DOI:10.1111/1541-4337.13136.
- [16] RAGAB H M, DIAB N S, OBEIDAT S T, et al. Improving the optical, thermal, mechanical, electrical properties and antibacterial activity of PVA-chitosan by biosynthesized Ag nanoparticles: eco-friendly nanocomposites for food packaging applications[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 264: 130668. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2024.130668.
- [17] TONG X, HAN Y, ZHU L, et al. ZnP-coated Zn-1Cu-0.1Ti membrane with high strength-ductility, antibacterial ability, cytocompatibility, and osteogenesis for biodegradable guided bone regeneration applications[J]. *Advanced Functional Materials*, 2023, 33(31): 2214657. DOI:10.1002/adfm.202214657.
- [18] BENKHAIRA N, ZOUINE N, FADIL M, et al. Application of mixture design for the optimum antibacterial action of chemically-analyzed essential oils and investigation of the antiadhesion ability of their optimal mixtures on 3D printing material[J]. *Bioprinting*, 2023, 34: e00299. DOI:10.1016/j.bprint.2023.e00299.
- [19] BAI J W, LI J Q, CHEN Z Y, et al. Antibacterial activity and mechanism of clove essential oil against foodborne pathogens[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2023, 173: 114249. DOI:10.1016/j.lwt.2022.114249.
- [20] MEENU M, PADHAN B, PATEL M, et al. Antibacterial activity of essential oils from different parts of plants against *Salmonella* and *Listeria* spp.[J]. *Food Chemistry*, 2023, 404: 134723. DOI:10.1016/j.foodchem.2022.134723.
- [21] CHEN C, SUN W J, WANG J W, et al. Tunable biocomposite films fabricated using cellulose nanocrystals and additives for food packaging[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2023, 321: 121315. DOI:10.1016/j.carbpol.2023.121315.
- [22] BANGAR S P, ESUA O J, NICKHIL C, et al. Microcrystalline cellulose for active food packaging applications: a review[J]. *Food Packaging and Shelf Life*, 2023, 36: 101048. DOI:10.1016/j.fpsl.2023.101048.
- [23] AZIZ T, HAQ F, FARID A, et al. Challenges associated with cellulose composite material: facet engineering and prospective[J]. *Environmental Research*, 2023, 223: 115429. DOI:10.1016/j.envres.2023.115429.
- [24] CHENG W K, ZHU Y, JIANG G Y, et al. Sustainable cellulose and its derivatives for promising biomedical applications[J]. *Progress in Materials Science*, 2023, 138: 101152. DOI:10.1016/j.pmatsci.2023.101152.
- [25] ETALE A, ONYIANTA A J, TURNER S R, et al. Cellulose: a review of water interactions, applications in composites, and water treatment[J]. *Chemical Reviews*, 2023, 123(5): 2016-2048. DOI:10.1021/acs.chemrev.2c00477.
- [26] ZHANG S, CHEN H, SHI Z C, et al. Preparation of amino cellulose nanofiber via ϵ -poly-L-lysine grafting with enhanced mechanical, antimicrobial and food preservation performance[J]. *Industrial Crops and Products*, 2023, 194: 116288. DOI:10.1016/j.indcrop.2023.116288.
- [27] WU Y, SI H K, YU X D, et al. Enhancing the solubility and antimicrobial activity of cellulose through esterification modification using amino acid hydrochlorides[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 226: 793-802. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2022.12.068.
- [28] WANNABOWORN S, LETHONGKAM S, BILHMAN S, et al. Superabsorbent crosslinked carboxymethyl cellulose-PEG hydrogel containing a nutgall extract as a broad antimicrobial agent for wound dressing applications[J]. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2024, 99: 106001. DOI:10.1016/j.jddst.2024.106001.
- [29] MIRANDA C S, MARINHO E, SEABRA C L, et al. Antimicrobial, antioxidant and cytocompatible coaxial wet-spun fibers made of polycaprolactone and cellulose acetate loaded with essential oils for wound care[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 277: 134565. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2024.134565.
- [30] JIANG H Y, WU S M, ZHOU J Z. Preparation and modification of nanocellulose and its application to heavy metal adsorption: a review[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 236: 123916. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2023.123916.
- [31] HASHEM A H, HASANIN M, KAMEL S, et al. A new approach for antimicrobial and antiviral activities of biocompatible nanocomposite based on cellulose, amino acid and graphene oxide[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2022, 209: 112172. DOI:10.1016/j.colsurfb.2021.112172.
- [32] GABRIELLI V, MISSALE E, CATTELAN M, et al. Supramolecular modulation of the mechanical properties of amino acid-functionalized cellulose nanocrystal films[J]. *Materials Today Chemistry*, 2022, 24: 100886. DOI:10.1016/j.mtchem.2022.100886.
- [33] SALEM K S, KASERA N K, RAHMAN M A, et al. Comparison and assessment of methods for cellulose crystallinity determination[J]. *Chemical Society Reviews*, 2023, 52(18): 6417-6446. DOI:10.1039/d2cs00569g.