

## 异硫氰酸烯丙酯对产气荚膜梭菌的抑菌作用及在熟猪肉糜中的应用

黎琳莹, 林以琳, 温耀升, 廖彩虎, 余以刚

### Inhibitory Effect of Allyl Isothiocyanate on *Clostridium perfringens* and Its Application of Cooked Pork

LI Linying, LIN Yilin, WEN Yaosheng, LIAO Caihu, and YU Yigang

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023020200>

## 您可能感兴趣的其他文章

### Articles you may be interested in

几种香辛料精油对产气荚膜梭菌的体外抑菌效果

Bacteriostatic effects of different spices essential oils on *Clostridium perfringens* in vitro

食品工业科技. 2017(23): 10-13 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.23.003>

异硫氰酸苄酯及其类似物抑菌活性的初步探究

Preliminary Study on Antibacterial Activity of Benzyl Isothiocyanate and Its Analogues

食品工业科技. 2019, 40(16): 84-89 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.16.014>

接骨草总黄酮提取工艺及其抑菌作用的研究

Study on the extraction and antibacterial effect of total flavonoids from *Sambucus chinensis* Lindl

食品工业科技. 2017(13): 36-41 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.13.007>

不同加工方法对白萝卜中异硫氰酸酯的影响

Effect of different processing methods on isothiocyanate of white radish

食品工业科技. 2017(19): 166-171 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.19.031>

高温及其联合亚硒酸钠调控西兰花芽苗生理及异硫氰酸酯代谢研究

Regulate Effect of High Temperature and Its  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  Combination on the Physiology and Metabolism of Isothiocyanates in Broccoli Sprouts

食品工业科技. 2019, 40(22): 67-72 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.22.012>

大气压冷等离子体处理对果蔬表面 *E.coli* O157:H7 生物膜的清除作用

Antibacterial Activity of Atmospheric Cold Plasma Treatment Against *E. coli* O157:H7 Biofilms on Fruits and Vegetables

食品工业科技. 2020, 41(21): 293-298 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019100076>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

黎琳莹, 林以琳, 温耀升, 等. 异硫氰酸烯丙酯对产气荚膜梭菌的抑菌作用及在熟猪肉糜中的应用 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(23): 127-133. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020200

LI Linying, LIN Yilin, WEN Yaosheng, et al. Inhibitory Effect of Allyl Isothiocyanate on *Clostridium perfringens* and Its Application of Cooked Pork[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(23): 127-133. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020200

· 生物工程 ·

# 异硫氰酸烯丙酯对产气荚膜梭菌的抑菌作用 及在熟猪肉糜中的应用

黎琳莹<sup>1</sup>, 林以琳<sup>1</sup>, 温耀升<sup>2</sup>, 廖彩虎<sup>2,\*</sup>, 余以刚<sup>1,\*</sup>

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640;

2. 韶关学院英东食品学院, 广东韶关 512005)

**摘要:** 本文旨在研究异硫氰酸烯丙酯 (Allyl isothiocyanate, AITC) 对产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*, *C. perfringens*) 的抑菌效果及作用机制。首先, 通过测定最小抑菌浓度 (Minimum inhibition concentration, MIC) 和绘制生长曲线评估 AITC 对 *C. perfringens* 的抑菌效果, 并采用扫描电镜观察细胞形态、碘化丙啶染色实验测定细胞膜完整性, 评估 AITC 对 *C. perfringens* 细胞膜的影响; 进一步通过 SDS-PAGE 图谱分析和 ATP 酶活力测定研究 AITC 对 *C. perfringens* 细胞代谢的影响; 最后, 研究了 AITC 对熟猪肉糜中 *C. perfringens* 的抑制效果。结果表明, AITC 可有效抑制 *C. perfringens* 的生长, 其 MIC 为 0.1  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ; AITC 引起 *C. perfringens* 细胞膜破裂、凹陷等形变, 导致细胞膜完整性丧失, 且膜损伤的程度随 AITC 浓度的升高而增强; AITC 显著 ( $P < 0.05$ ) 降低了 *C. perfringens* 的蛋白质含量和 ATP 酶活性, 进而影响细胞的正常代谢; 此外, 添加 0.1%~0.4% 的 AITC 能够显著 ( $P < 0.05$ ) 抑制熟猪肉糜中 *C. perfringens* 的生长。综上, AITC 可以通过破坏 *C. perfringens* 的细胞膜和干扰蛋白质代谢达到抑菌效果, 本研究为天然抑菌剂在肉类行业中的应用提供了一定的理论基础。

**关键词:** 产气荚膜梭菌, 异硫氰酸烯丙酯, 抑菌作用, 膜损伤, 蛋白质代谢

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)23-0127-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020200



本文网刊:

## Inhibitory Effect of Allyl Isothiocyanate on *Clostridium perfringens* and Its Application of Cooked Pork

LI Linying<sup>1</sup>, LIN Yilin<sup>1</sup>, WEN Yaosheng<sup>2</sup>, LIAO Caihu<sup>2,\*</sup>, YU Yigang<sup>1,\*</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China;

2. Henry FOK School of Food Science and Technology, Shaoguan University, Shaoguan 512005, China)

**Abstract:** The study aimed to investigate the inhibitory activity and mechanism of action of allyl isothiocyanate (AITC) against *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*). Firstly, the inhibitory effect of AITC on *C. perfringens* was evaluated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and plotting the growth curve. Secondly, the effect of AITC on *C. perfringens* cell membranes was assessed by scanning electron microscopy to observe cell morphology and by measuring cell membrane integrity with a propidium iodide staining assay. In addition, the impact of AITC on the metabolism of *C. perfringens* was investigated using SDS-PAGE profile and an ATPase activity assay. Finally, the inhibitory effect of AITC on *C. perfringens* in cooked ground pork was examined. The experimental results showed that AITC could effectively inhibit the growth of *C. perfringens*, and the MIC of AITC was determined to be 0.1  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . AITC was able to induce cell

收稿日期: 2023-02-22

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (32272425); 广东省自然科学基金项目 (2020A1515011182); 广东省教育厅重点领域项目 (2022ZDZX4042); 广州市科技计划项目 (202206010177); 大学生创新创业计划项目 (202210576017)。

作者简介: 黎琳莹 (1997-), 女, 硕士, 研究方向: 食品质量与安全控制, E-mail: 850681735@qq.com。

\* 通信作者: 廖彩虎 (1984-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 农副产品深加工, E-mail: 154931443@qq.com。

余以刚 (1968-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品质量与安全控制, E-mail: yuyigang@scut.edu.cn。

membrane deformations, such as rupture and depression, resulting in the loss of *C. perfringens* cell membrane integrity, and the degree of membrane damage increased with AITC concentration. Meanwhile, AITC could reduce the protein content and ATPase activity of *C. perfringens*, which had an impact on normal cellular metabolism. Furthermore, the addition of 0.1%~0.4% AITC significantly inhibited the growth of *C. perfringens* in cooked ground pork ( $P<0.05$ ). In conclusion, AITC could achieve bacterial inhibition by disrupting the cell membrane of *C. perfringens* and interfering with protein metabolism, and this study offered a theoretical foundation for the use of natural bacterial inhibitors in the meat industry.

**Key words:** *Clostridium perfringens*; allyl isothiocyanate; antibacterial effect; membrane damage; protein metabolism

产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*, *C. perfringens*)是肉类食品中最常见的食源性致病菌之一,能形成芽孢和产生多种毒素,对人类和其它动物具有致病性<sup>[1-2]</sup>。目前,由 *C. perfringens* 引起的食物中毒仍是一个严峻的公共卫生问题,消费者食用了被 *C. perfringens* 污染的食品(一般大于 6 log CFU/g)后会引发腹部绞痛、腹泻等症状,严重时可能导致死亡<sup>[3]</sup>。因此,有效控制肉制品中的 *C. perfringens* 是食品工业领域中亟待解决的问题。

近年来,植物精油由于具有来源广泛、广谱抑菌活性、天然低毒等优势而被逐渐开发应用于食品防腐<sup>[4-5]</sup>。已有研究表明,从罗勒、迷迭香、百里香和茴香中提取的精油对 *C. perfringens* 均具有抑菌效应<sup>[6]</sup>,但植物精油对 *C. perfringens* 的抑菌机制尚未深入研究。异硫氰酸烯丙酯(Allyl isothiocyanate, AITC)是芥末精油的主要活性成分,广泛存在于十字花科植物,对金黄色葡萄球菌<sup>[7]</sup>、大肠杆菌<sup>[7-8]</sup>、单增李斯特菌<sup>[9-10]</sup>和沙门氏菌<sup>[8,11]</sup>等多种病原微生物均具有很强的抑菌效应。Alanazi 等<sup>[12]</sup>研究了四种植物精油成分(肉桂醛、丁香酚、香芹酚和 AITC)对 *C. perfringens* 芽孢的萌发、二次生长以及营养细胞的生长抑制作用,结果表明:在实验室培养基体系中,四种精油成分均能抑制 *C. perfringens* 芽孢的二次生长和营养细胞的生长,其中香芹酚和 AITC 的抑制效果最佳;但将精油应用于熟制鸡肉基质时,只有 AITC(添加量为 0.5%~2.0%)能抑制 *C. perfringens* 的生长,而香芹酚即使添加量达到 5% 也无法抑制 *C. perfringens* 的生长。由此可见,AITC 在抑制肉制品中的 *C. perfringens* 方面具有广阔的应用前景,然而其对 *C. perfringens* 的抑菌机制尚不清楚。因此,本研究尝试从细胞膜损伤和蛋白质代谢两个方面来探究 AITC 对 *C. perfringens* 的抑菌作用方式,为有效利用 AITC 作为食品工业的天然抑菌剂提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

*C. perfringens* CICC24751 由华南理工大学食品科学与工程学院食品安全与检测实验室保藏;生鲜猪肉 购于广州市盒马鲜生超市;AITC( $\geq 99\%$ ) 山东西亚化学有限公司;液体硫乙醇酸盐(Fluid thioglycollate, FTG)培养基、胰酪-亚硫酸盐-环丝氨酸(Tryptose sulfite cycloserine, TSC)琼脂基础培养基 北京陆桥技术股份有限公司;吐温 80(食品级)

郑州欧尼嘉商贸有限公司;戊二醛固定液(2.5%) 上海麦克林生化科技有限公司;碘化丙啶(Propidium iodide, PI)染液 上海阿拉丁生化科技股份有限公司;超微量总 ATP 酶试剂盒、总蛋白定量试剂盒 南京建成生物工程研究所。

II 级 A2 型生物安全柜 赛默飞世尔(上海)仪器有限公司;LRH-250A-II 生化培养箱 韶关泰宏医疗器械有限公司;Cytation5 型多功能酶标仪 美国 Bio Tek 公司;Phenom Pro 扫描电子显微镜(Scanning electron microscopy, SEM) 荷兰 Phenom 公司;Leica DMI8 倒置荧光显微镜 德国 Leica 公司;GelDoc XR+凝胶成像分析仪 美国 Bio-rad 公司;Scientz-IID 型超声波细胞粉碎机 宁波新芝生物科技有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 *C. perfringens* 悬液的制备 将保存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 瓷珠管中的瓷珠转移至含有 10 mL FTG 培养基的试管中,于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  厌氧培养过夜;将所得培养物用接种环沾取少量穿刺于含有 10 mL TSC 培养基中,于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  厌氧培养过夜后保存在  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。在每次实验前,用接种环挑取穿刺管中少量黑色菌落至含有 10 mL FTG 培养基的试管中,于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  厌氧培养至稳定期( $\sim 1 \times 10^8$  CFU/mL),用无菌 FTG 培养基或 PBS 溶液进行适当稀释,得到所需菌体浓度并用于后续实验。

1.2.2 AITC 对 *C. perfringens* 最小抑菌浓度(Minimum inhibition concentration, MIC)的测定 采用二倍稀释法测定 AITC 对 *C. perfringens* 的 MIC<sup>[13]</sup>。将 AITC 溶于 10%(m/v)的吐温-水溶液中,配制成 40  $\mu\text{L/mL}$  母液;在各无菌试管中加入 1 mL FTG 培养基,加入 1 mL 稀释的 AITC 溶液,充分混匀后吸取 1 mL 混合液移至下一试管,以此类推,得到 AITC 浓度分别为 0.4000、0.2000、0.1000、0.0500、0.0250、0.0125  $\mu\text{L/mL}$  的系列培养体系(编号为 1~6)。对照组不含 AITC,以等量的吐温-80 溶液代替(编号为 7)。随后向各试管中加入 1 mL 菌悬液( $\sim 1 \times 10^7$  CFU/mL),将上述试管混合均匀后,置于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养箱中厌氧培养 24 h。使用酶标仪测定各组试管中菌液的 OD<sub>600nm</sub> 值,无明显细菌生长的最低 AITC 浓度即为 MIC。

1.2.3 AITC 对 *C. perfringens* 生长曲线的影响 参考 Wu 等<sup>[14]</sup>的方法稍作修改以评估 AITC 对 *C. perfringens* 生长曲线的影响。将 AITC 溶液与菌悬液在



试管中混合均匀(菌体终浓度 $\sim 5 \times 10^6$  CFU/mL, AITC 的终浓度为 1 MIC 和 2 MIC), 空白对照含相同浓度的无水乙醇。将上述试管置于 37 °C 培养箱中厌氧孵育 24 h, 每 2 h 取样测定 OD<sub>600 nm</sub> 值以监测细菌生长情况。

**1.2.4 AITC 对 *C. perfringens* 细胞形态的影响** 参考 Luo 等<sup>[15]</sup> 的方法探究 AITC 对 *C. perfringens* 细胞形态的影响。将过夜培养的菌悬液离心(8000 r/min, 4 °C, 5 min, 后续离心条件一致), 弃去上清, 用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(Phosphate buffer solution, PBS, pH7.4)洗涤两次并重悬于试管中, 加入 AITC 溶液使其终浓度分别为 1 MIC、2 MIC 和 4 MIC。对照组试管中不添加 AITC。将上述试管置于 37 °C 培养箱中厌氧孵育 8 h 后, 将样品离心, 用 PBS 洗涤两次并重悬于 2.5%(v/v)戊二醛溶液中, 置于 4 °C 下过夜固定。对固定过的样品进行洗涤, 随后用不同体积分数(30%、50%、70%、90%、100%)的乙醇水溶液进一步梯度脱水, 每次 15 min, 最后重悬于无水乙醇中。取 2  $\mu$ L 菌悬液滴于盖玻片, 待其自然风干后进行喷金处理, 在 SEM 下观察细菌形态。

**1.2.5 AITC 对 *C. perfringens* 细胞膜完整性的影响**

按照 1.2.4 所述的方法制备菌悬液并加入 AITC 溶液, 得到 AITC 终浓度分别为 1 MIC、2 MIC 和 4 MIC 的样品, 在 37 °C 条件下厌氧处理 8 h 后, 用生理盐水清洗两次, 加入 10  $\mu$ g/mL 的 PI 染液, 室温下避光染色 30 min 后用生理盐水清洗、重悬。随后, 在荧光显微镜下观察细菌染色情况, 并使用酶标仪测定样品的荧光光谱, 设置激发波长为 495 nm, 发射光谱的扫描范围为 550~700 nm, 步幅为 5 nm。

**1.2.6 AITC 对 *C. perfringens* 蛋白质代谢的影响**

根据 Cui 等<sup>[16]</sup> 报道方法并进行适当修改, 以评估 AITC 对 *C. perfringens* 蛋白质代谢的影响。将过夜培养的菌悬液离心弃去上清, 用 PBS 洗涤后重悬于含有 AITC 的 PBS 体系中, 得到 AITC 终浓度分别为 1/2 MIC、1 MIC、2 MIC 和 4 MIC 的混合体系。对照组样品中不添加 AITC。37 °C 厌氧孵育 6 h 后, 用 PBS 清洗菌体并重悬, 取 40  $\mu$ L 菌液与 10  $\mu$ L 5 $\times$ 蛋白上样缓冲溶液混合均匀, 沸水浴加热 5 min, 冷却至室温后离心, 收集上清液。取 10  $\mu$ L 上清液加至预先制备好的凝胶(12% 的分离胶和 5% 的浓缩胶)孔中进行 SDS-PAGE 分析, 电泳完成后对凝胶染色、脱色, 最后使用凝胶成像仪对分离的蛋白条带进行拍照。

**1.2.7 AITC 对 *C. perfringens* ATP 酶活性的影响**

参考 Guo 等<sup>[17]</sup> 的方法稍加修改, 取过夜培养物离心弃去上清, 用生理盐水洗涤、重悬, 加入 AITC 溶液使混合体系中 AITC 的终浓度分别为 1 MIC、2 MIC 和 4 MIC, 置于 37 °C 厌氧孵育 6 h。随后, 用生理盐水洗涤菌体两次并重悬, 在冰水浴中进行超声处理(功率 25%, 每个循环超声 4 s, 间隔 5 s, 重复 20 个

循环), 随后按照 ATP 酶试剂盒的说明书进行定磷, 通过计算得出不同处理组中 *C. perfringens* 的 ATP 酶活性。

**1.2.8 AITC 对熟猪肉糜中 *C. perfringens* 的抑制效果** 参考 Zhu 等<sup>[13]</sup> 的方法探究 AITC 对熟猪肉糜中 *C. perfringens* 的抑制效果。将绞碎的猪肉糜进行高压灭菌以除去本体菌, 分装成 10 g/袋, 分别接种 *C. perfringens* 并加入 AITC 溶液, 得到初始菌量约为  $1 \times 10^4$  CFU/g, AITC 终浓度分别为 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%(v/m)的熟肉样品。对照组不含 AITC, 以等量的吐温-水溶液代替。将所有样品充分混匀之后进行真空包装, 置于 37 °C 条件下培养 18 h。将肉糜与无菌生理盐水充分混匀, 随后进行梯度稀释。取 1 mL 合适梯度的样品与 10 mL 无菌 TSC 琼脂混合均匀, 待其凝固后, 再在平板表面倾注一层 TSC 琼脂以覆盖下层琼脂, 平板凝固后将培养皿的盖子敞开, 在超净工作台中吹干 1 h。将制备好的平板置于 37 °C 培养箱中厌氧培养 18~24 h, 可见 *C. perfringens* 在 TSC 琼脂平板上呈典型的黑色菌落, 对平板进行菌落计数和结果计算<sup>[18]</sup>。

### 1.3 数据处理

本研究实验均重复三次取平均值。使用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析, 确定均值之间的显著性差异( $P < 0.05$ ), 采用 Origin 2017 软件绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 AITC 对 *C. perfringens* 的 MIC 及其对生长曲线的影响

AITC 对 *C. perfringens* 的 MIC 测定结果如表 1 和图 1A 所示。从图 1A 可知, 对照组及含有 0.0500、0.0250、0.0125  $\mu$ L/mL 的 AITC 的 FTG 试管呈现浑浊状态, 并有气泡产生, 表明有 *C. perfringens* 生长; 而含有 0.4000、0.2000、0.1000  $\mu$ L/mL 的试管仍保持澄清, 表明无 *C. perfringens* 生长。同时测定各试管对应的 OD<sub>600 nm</sub> 值(表 1), 结果发现, 用 0.1000  $\mu$ L/mL AITC 处理时, 菌液的 OD<sub>600 nm</sub> 值与更低浓度的 AITC 处理组相比开始发生显著变化, 表明 AITC 对 *C. perfringens* 的 MIC 为 0.1000  $\mu$ L/mL。该结果

表 1 不同浓度 AITC 处理 *C. perfringens* 24 h 后的 OD<sub>600 nm</sub> 值

Table 1 OD<sub>600 nm</sub> values of *C. perfringens* after 24 h treatment with different concentrations of AITC

试管编号	AITC浓度( $\mu$ L/mL)	OD <sub>600 nm</sub>
1	0.4000	0.037 $\pm$ 0.001 <sup>c</sup>
2	0.2000	0.043 $\pm$ 0.005 <sup>c</sup>
3	0.1000	0.041 $\pm$ 0.005 <sup>c</sup>
4	0.0500	0.267 $\pm$ 0.010 <sup>b</sup>
5	0.0250	0.253 $\pm$ 0.018 <sup>b</sup>
6	0.0125	0.269 $\pm$ 0.015 <sup>b</sup>
7	0.0000	0.337 $\pm$ 0.020 <sup>a</sup>

注: 不同小写字母表示具有显著性差异( $P < 0.05$ )。

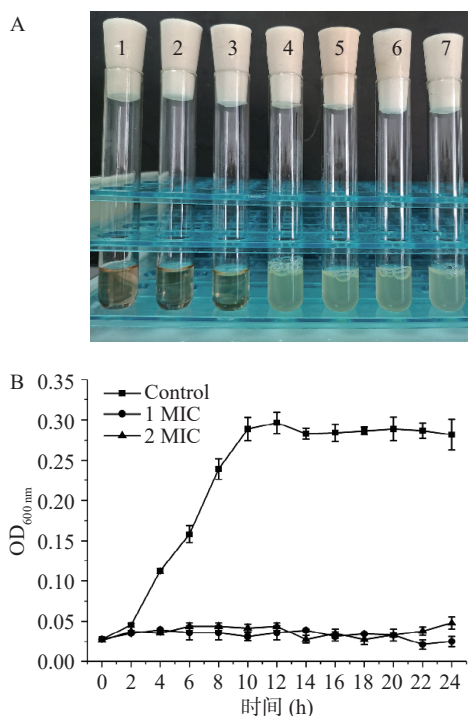


图1 AITC对*C. perfringens*的MIC(A)及其对生长曲线(B)的影响

Fig.1 MIC of AITC against *C. perfringens* (A) and the effect of AITC on the growth curve of *C. perfringens* (B)

注: 图中1~6所含AITC浓度分别为0.4000、0.2000、0.1000、0.0500、0.0250、0.0125  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , 7为对照组。

与邓群等<sup>[19]</sup>报道AITC对*C. perfringens*的MIC(800  $\mu\text{L}/\text{L}$ )存在一定差异,可能是由于菌株、抑菌剂和培养条件等因素不同。为进一步研究AITC对*C. perfringens*的抑菌效果,测定了不同浓度AITC对*C. perfringens*生长曲线的影响。如图1B所示,空白对照组中的*C. perfringens*在2~10 h期间呈指数型增长,在12 h时OD<sub>600 nm</sub>值达到最大值,随后进入细菌生长的稳定期。然而,1 MIC和2 MIC处理组中*C. perfringens*的OD<sub>600 nm</sub>值基本不变,表明AITC能够有效抑制菌体的增殖。

## 2.2 AITC对*C. perfringens*细胞微观形貌的影响

AITC处理前后的*C. perfringens*的细胞形态如图2所示。空白对照组的菌体呈完整、饱满的杆状结构,表面光滑圆润(图2A)。当用1 MIC的AITC处理时,部分菌体的细胞膜出现褶皱和凹陷,甚至破裂(图2B);在2 MIC处理组中,菌体的形态受损更为严重,其表面不再光滑,部分菌体被溶解(图2C);随着AITC的浓度增至4 MIC,菌体的周围出现大量粘连物质,表明细胞膜完全受损,细胞内容物泄出(图2D)。Turgis等<sup>[11]</sup>也观察到类似的现象,经芥末精油处理的大肠杆菌O157:H7和伤寒沙门氏菌的细胞膜均受损,形态也发生改变;Wang等<sup>[20]</sup>通过SEM发现异硫氰酸苜蓿酯可以破坏蜡样芽孢杆菌和阪崎克罗诺肠杆菌的细胞膜。目前普遍认为,造成膜损伤的主要原因是植物精油的疏水性使其更易于与细胞膜相互作用,从而破坏细胞膜原有的结构<sup>[21-23]</sup>。因此,

AITC处理后细胞微观形态的变化,可能是与*C. perfringens*细胞膜损伤有关,且损伤程度与AITC浓度具有高度的依赖性。

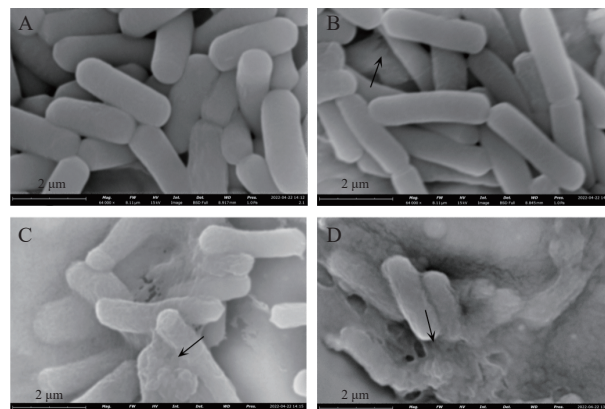


图2 AITC对*C. perfringens*细胞微观形貌的影响

Fig.2 Effect of AITC on cell morphology of *C. perfringens*  
注: A: 未经AITC处理的*C. perfringens*, B~D: 分别为经1 MIC, 2 MIC和4 MIC AITC处理的*C. perfringens*。

## 2.3 AITC对*C. perfringens*细胞膜完整性的影响

当细胞膜被破坏时,PI分子可以进入细胞并与核酸结合,在特定激发波长下能够发出红色荧光<sup>[24]</sup>,故通过荧光显微镜观察和荧光光谱扫描研究AITC对*C. perfringens*细胞膜完整性的影响。图3A显示对照组的*C. perfringens*几乎没有出现红色荧光,表明细胞膜完整性良好;经过AITC处理后,观察到明显的红色荧光,且呈红光的细菌数量随着AITC浓度的升高而增加(图3B~图3D)。通过测定各组荧光强度值,发现对照组和AITC处理组(1 MIC、2 MIC和4 MIC)在620 nm处的荧光强度分别为9952、10794、14046和16309(图3E),与荧光显微镜观察到的结果相一致。以上结果表明,AITC能够以剂量依赖性的方式破坏*C. perfringens*细胞膜完整性,该实验现象与Borges等<sup>[25]</sup>的研究结果相似,这主要归因于异硫氰酸酯类化合物与细胞膜的相互作用,使得细胞膜通透性增强和完整性破坏,最终导致菌体死亡。

## 2.4 AITC对*C. perfringens*蛋白质代谢的影响

蛋白质是维持活细胞结构及其生存的基本物质,参与细菌代谢、物质合成等重要生化过程。采用SDS-PAGE分析AITC处理后*C. perfringens*蛋白条带的变化,结果如图4所示。1/2 MIC处理组的蛋白条带与对照组相比颜色变浅,而在1 MIC、2 MIC和4 MIC处理组中部分条带几乎消失,表明AITC能够影响*C. perfringens*的蛋白质代谢过程。Wang等<sup>[26]</sup>使用生姜精油处理大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的SDS-PAGE图谱中也观察到类似的实验现象,其推测可能是精油处理增强了细胞膜的通透性,从而导致蛋白质泄漏。结合上述SEM和PI染色实验结果,推测AITC对蛋白质的影响可能是两种作用机制: a. AITC对细胞膜造成破坏可能促进蛋白外渗,进



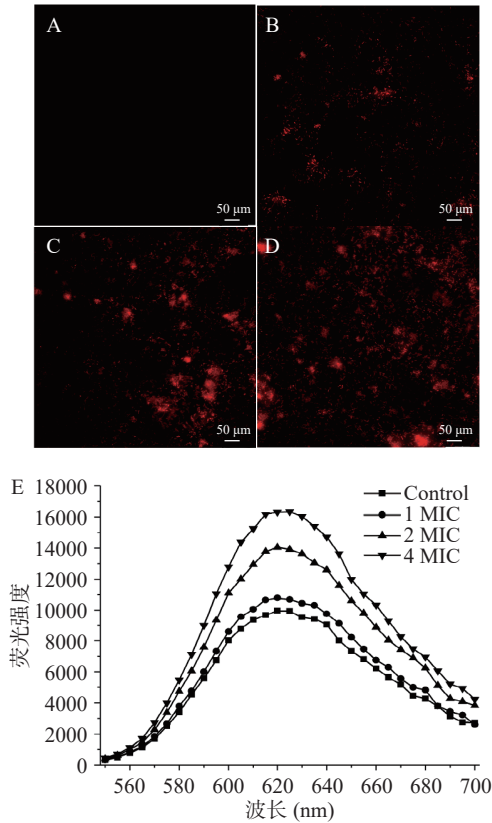


图 3 AITC 对 *C. perfringens* 细胞膜完整性的影响

Fig.3 Effect of AITC treatment on the cell membrane integrity of *C. perfringens*

注: 图中 A~D: *C. perfringens* 的荧光显微镜图, 其中 A 为未经 AITC 处理的 *C. perfringens*, B~D 分别为经 1 MIC, 2 MIC 和 4 MIC AITC 处理的 *C. perfringens*; E: *C. perfringens* 经 PI 染色后的荧光光谱图。

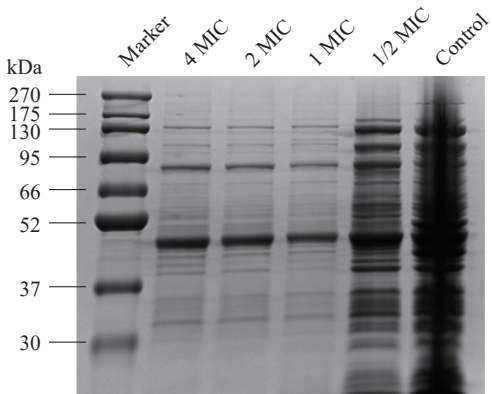


图 4 AITC 对 *C. perfringens* 蛋白质代谢的影响

Fig.4 Effect of AITC on protein metabolism of *C. perfringens*

而降低细胞内的蛋白质含量; b.细菌本身蛋白质合成受到抑制或降解<sup>[27]</sup>。这些变化均对细胞的正常代谢活动造成影响。

### 2.5 AITC 对 *C. perfringens* ATP 酶活性的影响

ATP 酶是一种能够催化 ATP 水解产生能量的蛋白酶, 在细胞能量代谢中发挥着重要作用<sup>[28]</sup>, 当生物体受到外界环境胁迫时, 其活性可能随之发生改变。本研究测定了不同处理组中 *C. perfringens* 的 ATP 酶活力变化, 结果表明, 1 MIC(1.57±0.01 U/mg

prot) 和 2 MIC(1.48±0.02 U/mg prot) 处理组中 *C. perfringens* 的 ATP 酶活力与对照组(1.96±0.04 U/mg prot)相比显著下降( $P<0.05$ ), 而在 4 MIC 处理组中 ATP 酶活性(1.38±0.10 U/mg prot)进一步降低(图 5)。ATP 酶活性的降低会影响细胞的呼吸代谢, 进而阻碍细胞生长, 甚至导致死亡。根据 SDS-PAGE 的结果分析, 可以推测 AITC 通过抑制 *C. perfringens* 细胞内蛋白质的合成, 使得胞内酶合成受阻<sup>[29]</sup>。Wen 等<sup>[30]</sup> 研究发现从辣木种子中提取的异硫氰酸酯显著降低了单增李斯特菌的 ATP 酶活性, 并导致胞内 ATP 含量降低, 可能是由于异硫氰酸酯通过影响细胞的糖代谢干扰能量代谢, 进而影响细胞分解代谢产物的自身修复的过程, 从而抑制细菌生长。因此, 推测 AITC 可能通过降低 *C. perfringens* 的 ATP 酶活力对菌体能量代谢造成干扰, 进而发挥抑菌效果。

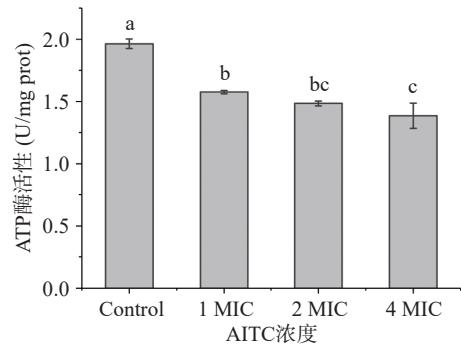


图 5 AITC 对 *C. perfringens* 的 ATP 酶活力的影响

Fig.5 Effect of AITC on ATPase activity of *C. perfringens*  
注: 不同小写字母表示具有显著性差异( $P<0.05$ ); 图 6 同。

### 2.6 AITC 对熟猪肉糜中 *C. perfringens* 的抑制效果

由于肉类体系中成分复杂, 抑菌剂添加量通常需要在实验室培养基体系更高才有可能展现出良好的显示出抑菌效果<sup>[21]</sup>。图 6 为不同添加量 AITC 的熟猪肉糜中 *C. perfringens* 的增长情况。可以看到, 对照组(不含 AITC)中 *C. perfringens* 数量生长繁殖至 8.63±0.18 log CFU/g, 而添加了 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%AITC 的熟肉样品中的 *C. perfringens* 数量显著减少( $P<0.05$ ), 分别为 8.03±0.23、7.18±0.24、6.10±0.04、5.28±0.03 log CFU/g。本实验结果与其

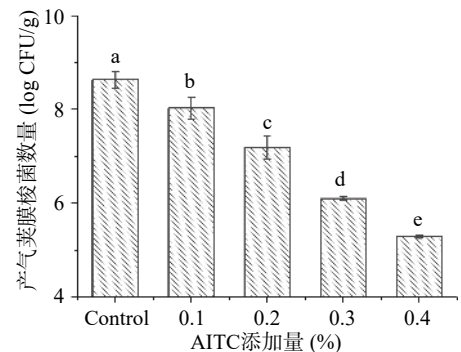


图 6 AITC 对熟猪肉糜中 *C. perfringens* 的抑制效果

Fig.6 Effect of AITC on the inhibition of *C. perfringens* in cooked ground pork

它植物精油对鸡胸肉中 *C. perfringens* [13,31] 的抑制效果相似,表明 AITC 对熟猪肉糜中的 *C. perfringens* 具有良好的抑制效果。

### 3 结论

本文中生长曲线的实验结果表明 AITC 对 *C. perfringens* 的生长繁殖具有良好的抑制作用。随后利用 SEM、荧光显微镜、SDS-PAGE 等手段初步探讨其对 *C. perfringens* 的抑菌作用方式,结果表明,AITC 主要作用于 *C. perfringens* 的细胞膜结构,使菌体发生形变,导致细胞膜完整性丧失、通透性增强,进而引起蛋白质泄漏,同时能够显著降低 ATP 酶活性,影响细胞的正常代谢活动,最终抑制菌体生长甚至导致其死亡。在熟猪肉糜体系中,添加低剂量的 AITC 就能够有效抑制 *C. perfringens* 的生长。总之,本研究为利用 AITC 抑制肉类食品中的 *C. perfringens* 提供了一种可行性方案,后续应针对性研究精油类抑菌剂对肉制品品质的影响。

#### 参考文献

- [ 1 ] BRYNESTAD S, GRANUM P E. *Clostridium perfringens* and foodborne infections[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, 74(3): 195–202.
- [ 2 ] KIU R, HALL L J. An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens* [J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2018, 7: 1–15.
- [ 3 ] GARCIA S, HEREDIA N. *Clostridium perfringens*: A dynamic foodborne pathogen[J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2011, 4(4): 624–630.
- [ 4 ] JAYASENA D D, JO C. Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2013, 34(2): 96–108.
- [ 5 ] LI Y X, ERHUNMWUNSEE F, LIU M, et al. Antimicrobial mechanisms of spice essential oils and application in food industry [J]. *Food Chemistry*, 2022, 382: 132312.
- [ 6 ] RADAELLI M, DA SILVA B P, WEIDLICH L, et al. Antimicrobial activities of six essential oils commonly used as condiments in Brazil against *Clostridium perfringens* [J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2016, 47(2): 424–430.
- [ 7 ] CLEMENTE I, AZNAR M, SILVA F, et al. Antimicrobial properties and mode of action of mustard and cinnamon essential oils and their combination against foodborne bacteria[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2016, 36: 26–33.
- [ 8 ] LIN C M, PRESTON J F, WEI C I. Antibacterial mechanism of allyl isothiocyanate [J]. *Journal of Food Protection*, 2000, 63(6): 727–734.
- [ 9 ] AHN E S, KIM Y S, SHIN D H. Observation of bactericidal effect of allyl isothiocyanate on *Listeria monocytogenes* [J]. *Food Science and Biotechnology*, 2001, 10: 31–35.
- [ 10 ] OLAIMAT A N, HOLLEY R A. Effects of changes in pH and temperature on the inhibition of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* by allyl isothiocyanate [J]. *Food Control*, 2013, 34(2): 414–419.
- [ 11 ] TURGIS M, HAN J, CAILLET S, et al. Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella typhi* [J]. *Food Control*, 2009, 20(12): 1073–1079.
- [ 12 ] ALANAZI S, ALNOMAN M, BANAWAS S, et al. The inhibitory effects of essential oil constituents against germination, outgrowth and vegetative growth of spores of *Clostridium perfringens* type A in laboratory medium and chicken meat [J]. *Food Microbiology*, 2018, 73: 311–318.
- [ 13 ] ZHU Y D, MA Y Y, ZHANG J Y, et al. The inhibitory effects of spice essential oils and rapidly prediction on the growth of *Clostridium perfringens* in cooked chicken breast [J]. *Food Control*, 2020, 113: 106978.
- [ 14 ] WU Y, BAI J, ZHONG K, et al. A dual antibacterial mechanism involved in membrane disruption and DNA binding of 2R, 3R-dihydromyricetin from pine needles of *Cedrus deodara* against *Staphylococcus aureus* [J]. *Food Chemistry*, 2017, 218: 463–470.
- [ 15 ] LUO K, ZHAO P, HE Y, et al. Antibacterial effect of oregano essential oil against *Vibrio vulnificus* and its mechanism [J]. *Foods*, 2022, 11(3): 403.
- [ 16 ] CUI H, ZHANG C, LI C, et al. Antimicrobial mechanism of clove oil on *Listeria monocytogenes* [J]. *Food Control*, 2018, 94: 140–146.
- [ 17 ] GUO F, CHEN Q, LIANG Q, et al. Antimicrobial activity and proposed action mechanism of linalool against *Pseudomonas fluorescens* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 562094.
- [ 18 ] HUANG L, LI C. Growth of *Clostridium perfringens* in cooked chicken during cooling: One-step dynamic inverse analysis, sensitivity analysis, and Markov Chain Monte Carlo simulation [J]. *Food Microbiology*, 2020, 85: 103285.
- [ 19 ] 邓群, 许晓曦, 卓志国, 等. 异硫氰酸苜蓿酯对产气荚膜梭菌抑菌作用的研究 [J]. *食品工业科技*, 2011, 32: 125–128. [ DENG Q, XU X X, ZHUO Z G, et al. Study on antimicrobial action of benzyl isothiocyanate against *Clostridium perfringens* [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2011, 32: 125–128. ]
- [ 20 ] WANG S, LIU S, HAO G, et al. Antimicrobial activity and mechanism of isothiocyanate from *Moringa oleifera* seeds against *Bacillus cereus* and *Cronobacter sakazakii* and its application in goat milk [J]. *Food Control*, 2022, 139: 127268.
- [ 21 ] BURT S. *Essential oils*: Their antibacterial properties and potential applications in foods-A review [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 94(3): 223–253.
- [ 22 ] CALO J R, CRANDALL P G, O'BRYAN C A, et al. Essential oils as antimicrobials in food systems-A review [J]. *Food Control*, 2015, 54: 111–119.
- [ 23 ] FALLEH H, BEN JEMAA M, SAADA M, et al. *Essential oils*: A promising eco-friendly food preservative [J]. *Food Chemistry*, 2020, 330: 127268.
- [ 24 ] LU Y, YAN H, LI X, et al. Physicochemical properties and mode of action of a novel bacteriocin BM1122 with broad antibacterial spectrum produced by *Lactobacillus crustorum* MN047 [J]. *Journal of Food Science*, 2020, 85(5): 1523–1535.
- [ 25 ] BORGES A, ABREU A C, FERREIRA C, et al. Antibacterial activity and mode of action of selected glucosinolate hydrolysis products against bacterial pathogens [J]. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 2015, 52(8): 4737–4748.
- [ 26 ] WANG X, SHEN Y, THAKUR K, et al. Antibacterial activity and mechanism of ginger essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [J]. *Molecules*, 2020, 25(17): 3955.
- [ 27 ] DUAN X, CHEN S, DUAN S, et al. Antibiotic activities of the natural antimicrobial substance produced by *Lactobacillus paracasei* FX-6 against *Pseudomonas putida* [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2020, 123: 109096.

- [ 28 ] WANG N, QIAN Z, LUO M, et al. Identification of salt stress responding genes using transcriptome analysis in green alga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(11): 3359.
- [ 29 ] 耿一鸣, 李婷婷, 励建荣, 等. 松油烯-4-醇对荧光假单胞菌抑菌能力及作用机理[J]. *食品科学*, 2022, 43: 30-36. [ GENG Y M, LI T T, LI J R, et al. Antibacterial activity and mechanism of terpinene-4-ol against *Pseudomonas fluorescens*[J]. *Food Science*, 2022, 43: 30-36. ]
- [ 30 ] WEN Y, LI W, SU R, et al. Multi-target antibacterial mechanism of moringin from *Moringa oleifera* seeds against *Listeria monocytogenes*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 925291.
- [ 31 ] 李苗云, 张佳焯, 朱瑶迪, 等. 精油对熟制鸡胸肉中产气荚膜梭菌抑制效果预测模型研究[J]. *农业工程学报*, 2019, 35: 315-320. [ LI M Y, ZHANG J Y, ZHU Y D, et al. Prediction model for inhibitory effect of essential oils on *Clostridium perfringens* in cooked chicken breast[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2019, 35: 315-320. ]