

## $\epsilon$ -聚赖氨酸对腐败希瓦氏菌的作用机制初探

蓝蔚青, 陈雪宁, 冯豪杰, 谢晶

### **Preliminary research on the antibacterial mechanism of $\epsilon$ -polylysine hydrochloride against *Shewanella putrefaciens***

LAN Weiqing, CHEN Xuening, FENG Haojie, XIE Jing

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20211003579>

#### 您可能感兴趣的其他文章

##### Articles you may be interested in

#### 酸性电解水通过抑制总菌及特定腐败菌保鲜南美白对虾的研究

Acidic electrolyzed water improving the quality of *Litopenaeus vannamei* by inhibiting the total bacteria and specific spoilage microorganisms

上海海洋大学学报. 2018, 27(4): 616 <https://doi.org/10.12024/jsou.20180502319>

#### 鲍鱼希瓦氏菌发酵条件的优化

Optimization of fermentation process of *Shewanella haliotis*

上海海洋大学学报. 2017, 26(2): 301 <https://doi.org/10.12024/jsou.20160501762>

#### 饲料喷涂光合细菌对凡纳滨对虾肠道微生物多样性的影响

Effect of different photosynthetic bacteria coating diets on intestinal microbial diversity of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*

上海海洋大学学报. 2019, 28(4): 577 <https://doi.org/10.12024/jsou.20180802380>

#### 乳酸链球菌素与乳酸对维氏气单胞菌的协同抑制和损伤作用

Synergistic inhibition and damage effects of nisin and lactic acid against pathogen *Aeromonas veronii*

上海海洋大学学报. 2020, 35(6): 830 <https://doi.org/10.16535/j.cnki.dlhyxb.2019-301>

#### 噬菌体在水产品安全控制中的应用研究进展

Research progress on the bacteriophage in safety control of aquatic products

上海海洋大学学报. 2021, 30(1): 197 <https://doi.org/10.12024/jsou.20200703110>

文章编号: 1674-5566(2022)06-1562-08

DOI:10.12024/jsou.20211003579

## $\epsilon$ -聚赖氨酸盐酸盐对腐败希瓦氏菌的作用机制初探

蓝蔚青<sup>1,2,3</sup>, 陈雪宁<sup>1</sup>, 冯豪杰<sup>1</sup>, 谢 晶<sup>1,2,3</sup>

(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. 食品科学与工程国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

**摘要:** 从细胞层面初步研究了  $\epsilon$ -聚赖氨酸盐酸盐 ( $\epsilon$ -polylysine hydrochloride,  $\epsilon$ -PLH) 对腐败希瓦氏菌 (*Shewanella putrefaciens*) 的作用机制。通过最小抑菌浓度 (MIC)、最小杀菌浓度 (MBC) 和微生物生长曲线来判定  $\epsilon$ -PLH 对腐败希瓦氏菌的抑菌效果。通过电导率、碘化丙啶 (PI) 摄入量、碱性磷酸酶 (AKPase)、乳酸脱氢酶 (LDHase) 和腺苷三磷酸酶 (ATPase) 活性分析, 结合扫描电镜 (SEM) 来判定菌体细胞结构的通透性和完整性, 以此来综合评价  $\epsilon$ -PLH 对腐败希瓦氏菌的作用效果。结果得出,  $\epsilon$ -PLH 对腐败希瓦氏菌的 MIC 与 MBC 分别为 1.0 mg/mL 与 2.0 mg/mL。菌体经  $\epsilon$ -PLH 处理后, 其正常生长受到抑制, 胞外 AKPase 与 LDHase 活性明显提高, 细胞膜中的 ATPase 活性下降, PI 摄入量和电导率与  $\epsilon$ -PLH 浓度呈显著正相关。由 SEM 得出, 腐败希瓦氏菌经  $\epsilon$ -PLH 处理后, 菌体出现凹陷、孔洞等现象, 外观已发生改变。得出腐败希瓦氏菌经  $\epsilon$ -PLH 处理后, 菌体细胞结构受损严重, 内容物渗漏, 菌体严重变形, 最终导致细胞凋亡。研究  $\epsilon$ -PLH 对腐败希瓦氏菌的作用机制, 可为  $\epsilon$ -PLH 在水产品保鲜中的应用提供理论参考。

**关键词:**  $\epsilon$ -聚赖氨酸盐酸盐; 腐败希瓦氏菌; 作用机制

**中图分类号:** Q 939.96 **文献标志码:** A

我国是水产品生产大国, 产量呈逐年递增的发展态势。水产品味道鲜美, 营养丰富, 深受消费者喜爱, 然而由于微生物的作用, 使其易发生腐败变质, 利用率相应降低。水产品流通保鲜多在冷藏条件下进行。现有研究发现, 腐败希瓦氏菌 (*Shewanella putrefaciens*) 是多种冷藏水产品中的优势腐败菌<sup>[1]</sup>, 其能在低温条件下将三甲胺-N-氧化物还原为三甲胺, 参与蛋白质和脂肪分解, 生成腐胺、尸胺等, 产生臭味, 加速水产品的腐败进程<sup>[2-3]</sup>。因此, 抑制腐败希瓦氏菌等优势菌的生长, 可降低水产品流通期间的腐损率。

$\epsilon$ -聚赖氨酸盐酸盐 ( $\epsilon$ -polylysine hydrochloride,  $\epsilon$ -PLH) 是从淀粉酶产色链霉菌 (*Streptomyces diastatochromogenes*) 受控发酵培养液经离子交换树脂吸附、解吸、提纯而来的一类物质。原国家卫生计生委于 2014 年发布公告, 将

$\epsilon$ -聚赖氨酸 ( $\epsilon$ -polylysine,  $\epsilon$ -PL) 及其盐酸盐作为食品添加剂新品种<sup>[4]</sup>, 可作为防腐剂用于果蔬、食用菌、粮谷、肉类及制品、调味品与饮料中<sup>[5]</sup>。相关研究显示,  $\epsilon$ -PLH 对革兰氏阴性菌和阳性菌作用效果良好, 其能使菌体细胞变形, 细胞膜完整性丧失, 核酸、蛋白质等内容物流失, 具有安全、稳定和广谱抑菌性等特点<sup>[6]</sup>。史文艳等<sup>[7]</sup>研究发现,  $\epsilon$ -PLH 主要通过影响 ATP 酶活性、蛋白质合成与表达及能量代谢过程来影响蜡状芽孢杆菌菌体的生长代谢; 李秋莹等<sup>[8]</sup>研究得出  $\epsilon$ -PLH 的加入, 使壳聚糖和普鲁兰多糖复合涂膜对荧光假单胞菌菌体细胞膜完整性和通透性的破坏增强, 降低碱性磷酸酶活性。但目前  $\epsilon$ -PLH 对腐败希瓦氏菌作用机制还未探明。基于此, 以腐败希瓦氏菌为研究对象, 通过最小抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 和最小杀菌浓度

收稿日期: 2021-10-11 修回日期: 2021-11-14

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项 (2019YFD0901602); 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-47-G26); 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心能力提升项目 (19DZ2284000)

作者简介: 蓝蔚青 (1977—), 男, 博士, 高级工程师, 研究方向为食品保鲜技术。E-mail: wqlan@shou.edu.cn

通信作者: 谢 晶, E-mail: jxie@shou.edu.cn

(minimum bactericidal concentration, MBC)测定腐败希瓦氏菌对  $\epsilon$ -PLH 的敏感度,根据微生物生长曲线推测不同时期细菌的生长情况,结合电导率、碘化丙啶(propidium iodide, PI)摄入量、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKPase)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDHase)和腺苷三磷酸酶(adenosine triphosphatase, ATPase)活性来衡量菌体细胞结构破坏程度,并结合扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)观察  $\epsilon$ -PLH 对菌体形态的影响,初步分析  $\epsilon$ -PLH 对腐败希瓦氏菌的作用机制,以期为  $\epsilon$ -PLH 在水产品保鲜中的应用提供理论参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*)为本课题组前期从腐败暗纹东方鲀中分离、筛选并鉴定后将菌株保存于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  的超低温冰箱,存放于上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心。

### 1.2 主要药品试剂

$\epsilon$ -聚赖氨酸盐酸盐( $\epsilon$ -PLH)购于浙江新银象生物工程有限公司;AKPase 试剂盒、LDHase 试剂盒、超微量总 ATPase 试剂盒均购于南京建成生物工程研究所;胰蛋白胍大豆琼脂培养基(tryptic soy agar, TSA)、胰蛋白胍大豆肉汤(tryptic soy broth, TSB)、氯化钠、无水乙醇、戊二醛购于国药集团化学试剂有限公司,均为国产分析纯。

### 1.3 主要仪器设备

Synergy2 型自动酶标仪,美国 BioTek 公司;DHG-9053A 型电热鼓风干燥箱,上海一恒科学仪器有限公司;DNP-9002BS 型电热恒温培养箱,上海新苗医疗器械制造有限公司;LDZM-40KCS 型高压蒸汽灭菌器,上海神安医疗器械厂;VS-1300L-U 型超净工作台,苏净安泰集团;H-2050R 型高速冷冻离心机,湖南湘仪实验室仪器开放有限公司;Tescan Mira3 型扫描电子显微镜,日本捷克 Tescan 公司。

### 1.4 实验方法

#### 1.4.1 菌悬液制备

将贮藏于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  的菌种接种于 TSB 中,活化 2~3 代后,吸取少量菌液进行平板涂布,培养后重复平板划线。挑取活化好的菌种  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 8 h,菌悬液用无菌生理盐水稀释至  $106\sim 107\text{ CFU/}$

mL,保存备用。

#### 1.4.2 最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)

采用二倍梯度稀释法<sup>[9]</sup>测定  $\epsilon$ -PLH 对腐败希瓦氏菌的 MIC。通过使用 96 孔板进行  $\epsilon$ -PLH 溶液的二倍梯度稀释,获得最终浓度为 2.0、1.0、0.5、0.25 mg/mL 的溶液。各孔分别接种 100  $\mu\text{L}$  的菌悬液,混匀后于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  振荡培养 24 h,最后用酶标仪测定  $\text{OD}_{600}$ ,以肉眼观察,未变浑浊的最低浓度为  $\epsilon$ -PLH 对腐败希瓦氏菌的 MIC。将 MIC 和高于 MIC 浓度的菌悬液于 TSA 培养基中进行平板涂布, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 24 h 后,以无菌生长的  $\epsilon$ -PLH 最低浓度为 MBC。

#### 1.4.3 微生物生长曲线

将菌悬液按 1% 的接种量分别加入 1/2MIC、MIC 和 2MIC 的  $\epsilon$ -PLH 溶液中,以不添加  $\epsilon$ -PLH 的菌液作为对照组(CK), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  振荡培养 24 h,用全自动微生物生长曲线分析仪测定  $\text{OD}_{600}$ ,每隔 2 h 测定一次。

#### 1.4.4 电导率

参考 DIAO 等<sup>[10]</sup>研究方法,稍作修改。将菌悬液按 1% 的接种量分别加入 1/2MIC、MIC 和 2MIC 的  $\epsilon$ -PLH 溶液中,于摇床  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养。分别于离心 0、3、6、9、12 h 时取上清液稀释 20 倍测定其电导率。

#### 1.4.5 碘化丙啶(PI)摄入量

参考蓝蔚青等<sup>[1]</sup>研究方法测定。在 1/2MIC、MIC 和 2MIC 的  $\epsilon$ -PLH 溶液中接种菌悬液后,加入 1.0 mg/mL 的 PI 染色液。避光孵化 15 min,离心后弃上清液,沉淀用 PBS 缓冲液洗涤 2 次,用荧光分光光度计测定,波长条件为激发光波长 490 nm,发射光波长 635 nm。

#### 1.4.6 LDHase、AKPase 与 ATPase 活性

通过 1.4.5 节获得上清液,按照 LDHase、AKPase 与超微量总 ATPase 试剂盒测定各组在不同处理时间的酶活性值。

#### 1.4.7 微观结构观察

参考蓝蔚青等<sup>[11]</sup>研究方法,将菌悬液按 1% 的接种量分别加入 1/2MIC、MIC 和 2MIC 的  $\epsilon$ -PLH 溶液中,于摇床  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 6 h 后,取 2 mL 菌液  $8\ 000\text{ r/min}$  离心 5 min,收集沉淀。沉淀用 2.5% 戊二醛溶液悬浮后固定 10 h,然后用 PBS 缓冲液洗涤 3 次后弃上清液,再用 30%、50%、

70%、90%和100%乙醇进行梯度脱水,冻干后固定喷金,在扫描电镜下观察菌体形态结构。

### 1.5 数据处理

每组样品设3个平行。文中全部数据通过平均值 $\pm$ 标准差来表示。利用SPSS 17.0对数据进行单因素方差分析,采用Duncan's法进行显著性分析和多重比较,差异显著水平 $P < 0.05$ ;用Origin 8.5软件作图。

## 2 结果与分析

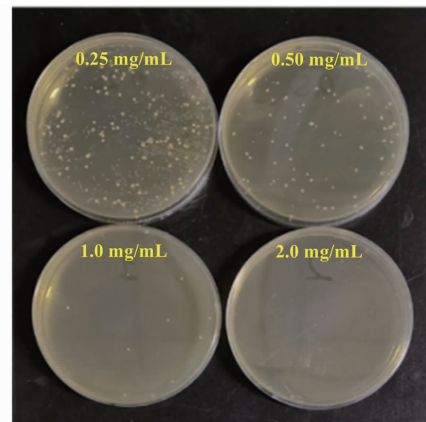
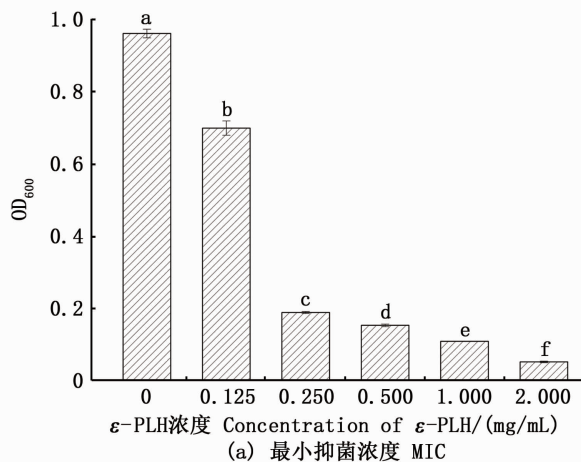
### 2.1 MIC和MBC

由图1可知,与对照组相比,当 $\epsilon$ -PLH为1.0 mg/mL时,其 $OD_{600}$ 约为0.11,说明该质量浓度对腐败希瓦氏菌的生长有明显的抑制作用。而当 $\epsilon$ -PLH浓度降至0.5 mg/mL甚至更低时,其 $OD$ 值显著升高,初步判断其MIC值为1.0 mg/mL。随后通过对平板涂布计数结果(图1b)观察得到,

质量浓度为1.0 mg/mL处理组培养皿有少量菌落;当浓度升至2.0 mg/mL时,无菌落生长,故 $\epsilon$ -PLH对腐败希瓦氏菌的MBC为2.0 mg/mL。因此,在一定浓度范围内, $\epsilon$ -PLH对腐败希瓦氏菌的抑制作用与浓度呈正相关关系。

### 2.2 微生物生长曲线

从图2可以看出,CK组菌体生长旺盛,2 h后进入对数生长期,直至16 h后进入稳定期。1/2MIC组菌体的生长趋势与CK组相似,其在整个生长阶段的 $OD_{600}$ 均低于CK组。而经MIC和2MIC的 $\epsilon$ -PLH处理后,腐败希瓦氏菌生长受到明显抑制,MIC组菌体对数生长期延迟至14 h,2MIC组在生长期内无细菌生长。表明 $\epsilon$ -PLH能显著抑制希瓦氏菌的生长,且 $\epsilon$ -PLH浓度越高,其作用效果越明显。研究结果与蓝蔚青等<sup>[12-13]</sup>研究复合保鲜剂对金黄色葡萄球菌抑菌作用相似。



(b) 最小杀菌浓度 MBC

同一小写字母表示组内无显著差异( $P > 0.05$ )。

The same lowercase letter means no significant difference within a group ( $P > 0.05$ ).

图1  $\epsilon$ -PLH对腐败希瓦氏菌的最小抑菌浓度与最小杀菌浓度的影响

Fig. 1 Effect of  $\epsilon$ -PLH on MIC and MBC of *Shewanella putrefaciens*

### 2.3 电导率

当抑菌剂对菌体细胞造成破坏时,内容物泄漏导致培养液的导电性增强,因此通过测定电导率可反映菌体细胞膜通透性的变化<sup>[14]</sup>。由图3可知,各组电导率在前期呈明显的上升趋势,但各组菌体在前3 h时的电导率差异不明显,可能由于菌体细胞的结构特性在初期对 $\epsilon$ -PLH表现出一定耐受性。3 h后,MIC组和2MIC组电导率持续升高,MIC组和2MIC组的电导率在6 h时比

对照组增加了3.45%与5.58%,而CK组和1/2MIC组的电导率维持在相对平稳状态。可能由于菌体经 $\epsilon$ -PLH处理后,菌体细胞膜的通透性发生变化,导致 $K^+$ 和 $Ca^{2+}$ 等电解质泄漏,电导率随之升高。ZHANG等<sup>[15]</sup>研究得出菌液的电导率随保鲜剂浓度的增加而上升,结果与本研究一致。何静如等<sup>[16]</sup>也得到类似结论。可见 $\epsilon$ -PLH浓度越高,菌体细胞膜通透性越大,胞内的无机盐离子大量流失,破坏胞内稳态,实现其抑菌作用。

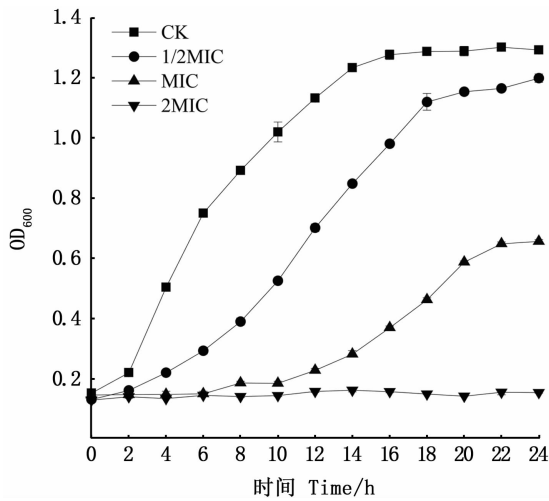
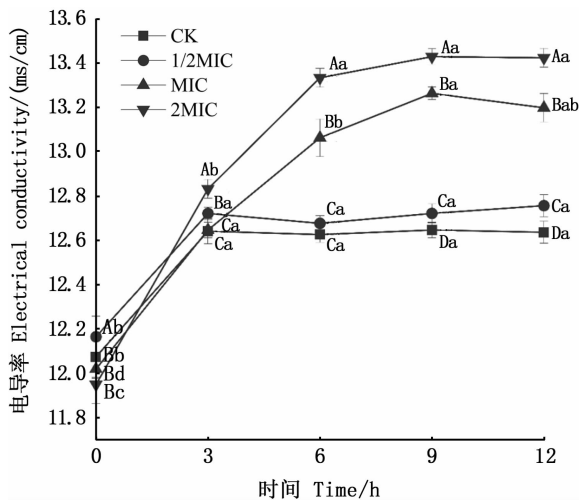


图2 ε-PLH对腐败希瓦氏菌生长曲线变化影响  
Fig. 2 Effect of ε-PLH on the growth curve of *Shewanella putrefaciens*



不同小写字母代表组间差异显著 ( $P < 0.05$ ), 不同大写字母代表组内差异显著 ( $P < 0.05$ ).  
Different lowercase letters represent significant differences between groups ( $P < 0.05$ ), and different uppercase letters represent significant differences within groups ( $P < 0.05$ ).  
图3 ε-PLH对腐败希瓦氏菌电导率值变化影响  
Fig. 3 Effect of ε-PLH on the electrical conductivity of *Shewanella putrefaciens*

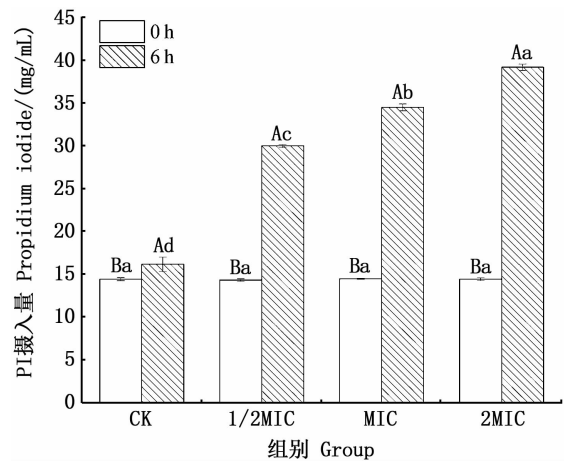
### 2.4 PI 摄入量

PI 是大分子的荧光染料,当细胞膜结构被破坏,通透性发生改变,核酸泄漏至胞外,与PI结合会发出荧光<sup>[17]</sup>,故可用于判断菌体细胞膜的完整性。

从图4可以看出,PI摄入量与ε-PLH浓度呈正相关。处理组的PI摄入量明显高于CK组。

在6h后,1/2MIC组、MIC组和2MIC组的摄入量是CK组的1.85倍、2.13倍和2.42倍,表明ε-PLH能在一定程度上破坏菌体细胞膜的完整性,ε-PLH的抗菌活性随其浓度升高而增大。可能由于ε-PLH处理浓度增加,严重损坏菌体结构,使PI荧光染料更易进入细胞。朱金帅等<sup>[18]</sup>研究发现,腐败希瓦氏菌经没食子酸处理后,其凋亡程度增加,可能由于菌体细胞膜被破坏,通透性增加,使细菌凋亡。

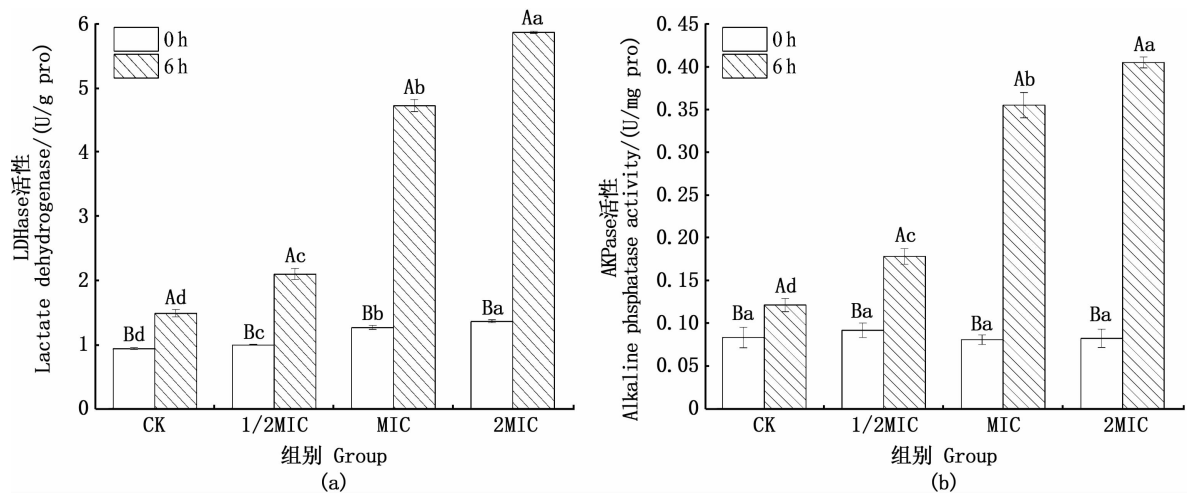
另外,可发现PI摄入量与电导率变化趋势相一致。随着ε-PLH浓度的增大,其均表现出对菌体细胞膜破坏程度增加,导致细胞膜通透性增大,核酸或蛋白质等胞内物质流出,使外来物质更易进入细胞内环境。



不同小写字母代表组间差异显著 ( $P < 0.05$ ), 不同大写字母代表组内差异显著 ( $P < 0.05$ ).  
Different lowercase letters represent significant differences between groups ( $P < 0.05$ ), and different uppercase letters represent significant differences within groups ( $P < 0.05$ ).  
图4 ε-PLH对腐败希瓦氏菌PI摄入量变化影响  
Fig. 4 Effect of ε-PLH on the PI intake of *Shewanella putrefaciens*

### 2.5 LDHase 与 AKPase 活性

LDHase 是一种将乳糖催化为丙酮酸的氧化还原酶,在生物糖酵解途径中起着重要作用<sup>[1]</sup>,若细胞膜破损,其就会从细胞质中泄露至胞外。一般情况下,存在于细胞壁与细胞膜之间的碱性磷酸酶会因细胞结构遭到破坏而流出<sup>[19]</sup>。因此,可通过检测酶活力来判断菌体结构的破坏程度。ε-PLH对菌体LDHase与AKPase活性变化影响如图5所示。



不同小写字母代表组间差异显著 ( $P < 0.05$ ), 不同大写字母代表组内差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Different lowercase letters represent significant differences between groups ( $P < 0.05$ ), and different uppercase letters represent significant differences within groups ( $P < 0.05$ ).

图5  $\epsilon$ -PLH对腐败希瓦氏菌LDHase与AKPase活性变化影响

Fig. 5 Effect of  $\epsilon$ -PLH on the LDHase and AKPase activity of *Shewanella putrefaciens*

从图5a可以看出,腐败希瓦氏菌经 $\epsilon$ -PLH处理6h后,MIC组和2MIC组中的LDHase活性分别从0h的(1.26 ± 0.03, 与(1.36 ± 0.02) U/g pro升至(4.72 ± 0.09)与(5.86 ± 0.02) U/g pro,明显高于CK组和1/2MIC组,表明菌体经 $\epsilon$ -PLH处理后,受到一定程度损伤,使其内容物流出,达到抑菌效果。这与陈梦玲等<sup>[20]</sup>研究发现腐生葡萄球菌经过牛至精油处理6h后,胞外LDHase活性明显升高的结果趋势一致。

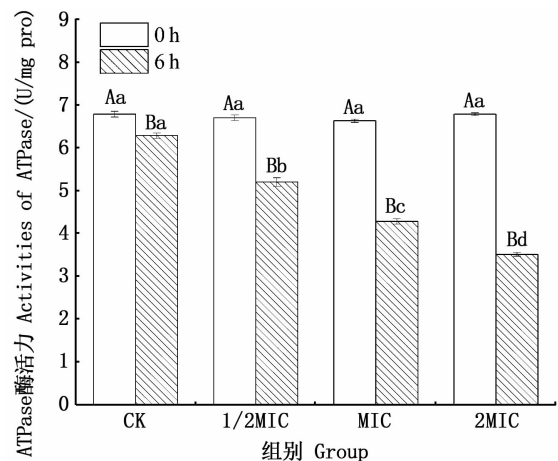
AKPase是一种磷酸单酯酶,菌体生长异常时,可在胞外被检出,存在于细胞壁和细胞膜之间,因此AKPase活性可反映细菌细胞壁完整性<sup>[21]</sup>。如图5b所示,CK组的AKPase活性值为(0.084 ± 0.012) U/mg pro,表明菌体细胞壁未遭受破坏。经过MIC和2MIC的 $\epsilon$ -PLH处理6h后,其值分别达到(0.36 ± 0.01)和(0.41 ± 0.01) U/mg pro,且其值随着 $\epsilon$ -PLH浓度增加而增大,表明菌体的细胞壁破坏明显,通透性增加,从而影响菌体的正常生长代谢。

相关研究发现,多阳离子抗菌物质可与带负电荷的脂多糖或磷酸结合,破坏细胞壁的完整性,导致细胞壁屏障功能丧失或阻断营养物质流通,同时细菌消耗营养物质,最终使菌体死亡。本研究结果与ZHANG等<sup>[22]</sup>所研究的球藻CGMCC6882产生的多糖对大肠杆菌细胞壁的作用机制相似。

## 2.6 ATPase活性

ATPase是广泛分布在细胞膜上的酶,其主要是通过利用ATPase水解产生能量,对 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 等进行由低至高浓度的运输,维持生物体正常生长代谢<sup>[23]</sup>。

由图6可知,CK组的ATPase活性保持稳定,而经1/2MIC、MIC和2MIC $\epsilon$ -PLH处理6h后,腐



不同小写字母代表组间差异显著 ( $P < 0.05$ ), 不同大写字母代表组内差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Different lowercase letters represent significant differences between groups ( $P < 0.05$ ), and different uppercase letters represent significant differences within groups ( $P < 0.05$ ).

图6  $\epsilon$ -PLH对腐败希瓦氏菌ATPase活性变化影响

Fig. 6 Effect of  $\epsilon$ -PLH on the ATPase activity of *Shewanella putrefaciens*

败希瓦氏菌的 ATPase 活性分别下降 22.39%、35.44% 和 48.24%,且下降程度与处理浓度呈正相关。通常情况下,ATPase 的低水平会直接影响细胞的能量代谢和功能,导致菌体死亡<sup>[24]</sup>。可能由于  $\epsilon$ -PLH 通过菌体细胞膜进入胞内,抑制 ATPase 活性,导致菌体代谢紊乱,最终导致其死亡。这与周倩倩等<sup>[25]</sup>利用丁香酚探究腐败希瓦氏菌的结果相似。GUO 等<sup>[26]</sup>利用代谢组学发现芳樟醇处理腐败希瓦氏菌后,菌体细胞膜损伤严重,ATPase 活性显著降低,阻碍了碳水化合物的代谢。这也与李兆亭等<sup>[27]</sup>的研究结果相似,其分析 ATPase 的活性降低破坏了胞内蛋白的代谢,从而改变细胞膜的通透性。

由此可知, $\epsilon$ -PLH 影响了 ATPase 的活性,且其变化与电导率和 PI 摄入量呈负相关,表明  $\epsilon$ -

PLH 通过破坏细胞结构,影响菌体内环境的生理代谢,最终抑制细菌生长,甚至导致菌体死亡。

## 2.7 SEM

由图 7 可知,CK 组的腐败希瓦氏菌呈短杆状,菌体细胞形态完整,表面平滑。经 MIC 的  $\epsilon$ -PLH 处理后,菌体出现凹陷、孔洞等现象,外观已发生改变。而经 2MIC  $\epsilon$ -PLH 处理后,菌体细胞壁与细胞膜受损严重,内容物渗漏,菌体严重变形。可能由于  $\epsilon$ -PLH 在细胞表面静电吸附,导致细胞膜和细胞壁剥离,内容物流出,使细胞受到生理损伤,且菌体受损程度与作用浓度呈正相关。这与徐宇辰<sup>[28]</sup>研究阿魏酸甲酯对腐败希瓦氏菌的抑菌作用结果相似。这也与 ZHANG 等<sup>[29]</sup>银杏叶提取物处理希瓦氏菌的结果趋势一致。

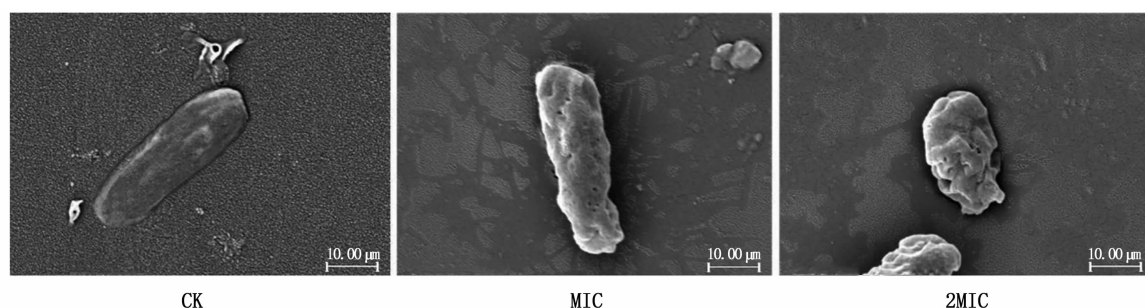


图 7  $\epsilon$ -PLH 对腐败希瓦氏菌微观结构变化影响(  $\times 18\ 000$  )

Fig.7 Effect of  $\epsilon$ -PLH on the microstructure of *Shewanella putrefaciens* (  $\times 18\ 000$  )

## 3 结论

由研究结果得出,通过  $\epsilon$ -PLH 处理后的腐败希瓦氏菌,其菌体细胞膜通透性发生变化,胞内电解质泄漏。酶活性分析与 SEM 观察结果表明, $\epsilon$ -PLH 可破坏腐败希瓦氏菌细胞壁和细胞膜的完整性,对细胞内环境产生一定影响,使细胞代谢紊乱,最终抑制腐败希瓦氏菌的生长代谢,导致菌体死亡。因此, $\epsilon$ -PLH 在食品领域具有广泛的应用前景,研究结果可为  $\epsilon$ -PLH 在水产品保鲜中的应用提供理论参考。

## 参考文献:

- [1] 蓝蔚青,张溪,赵宏强,等.超高压处理条件对腐败希瓦氏菌的影响[J].中国食品学报,2020,20(6):122-128.  
LAN W Q, ZHANG X, ZHAO H Q, et al. Effect of High

Hydrostatic Pressure (HHP) treatment conditions on *Shewanella putrefaciens* [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(6): 122-128.

- [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.
- [3] YANG S P, XIE J, CHENG Y, et al. Response of *Shewanella putrefaciens* to low temperature regulated by membrane fluidity and fatty acid metabolism [J]. LWT, 2020, 117: 108638.
- [4] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB2760-2014 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.  
National Health Commission of the People's Republic of China. GB2760-2014 Standards of using food additives[S]. Beijing: Standards Press of China, 2015.
- [5] 樊敏,唐紫薇,李立. $\epsilon$ -聚赖氨酸盐酸盐/壳聚糖复合涂膜对櫻桃的保鲜效果[J].包装工程,2020,41(9):29-



35.  
FAN M, TANG Z W, LI L. Effects of  $\epsilon$ -polylysine hydrochloride/chitosan composite film on cherry preservation [J]. *Packaging Engineering*, 2020, 41(9): 29-35.
- [6] 李丽, 严碧云, 谭念, 等.  $\epsilon$ -聚赖氨酸盐酸盐在菱角豆腐保鲜中的应用研究[J]. *食品工业*, 2016, 37(11): 5-7.  
LI L, YAN B Y, TAN N, et al. Study on application of poly-L-lysine hydrochloride in preservation of water chestnut tofu[J]. *The Food Industry*, 2016, 37(11): 5-7.
- [7] 史文艳, 孙震.  $\epsilon$ -聚赖氨酸盐酸盐与 Nisin 对蜡状芽孢杆菌的协同作用及机理[J]. *食品与机械*, 2019, 35(3): 15-19, 103.  
SHI W Y, SUN Z. Synergistic effect and mechanism of  $\epsilon$ -polylysine hydrochloride and Nisin on *Bacillus cereus* [J]. *Food & Machinery*, 2019, 35(3): 15-19, 103.
- [8] 李秋莹, 张东栋, 王司雯, 等. 溶菌酶与  $\epsilon$ -聚赖氨酸盐酸盐复合涂膜的制备及性能分析[J]. *食品科学*, 2019, 40(19): 249-255.  
LI Q Y, ZHANG D D, WANG S W, et al. Preparation and properties of lysozyme and  $\epsilon$ -polylysine hydrochloride composite coating[J]. *Food Science*, 2019, 40(19): 249-255.
- [9] 陈晓青, 李可可, 余甜, 等.  $\epsilon$ -聚赖氨酸对金黄色葡萄球菌生长及生物膜形成的影响[J]. *中国抗生素杂志*, 2018, 43(1): 91-95.  
CHEN X Q, LI K K, YU T, et al. Effects of  $\epsilon$ -PL on growth and biofilm formation of *Staphylococcus aureus* [J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2018, 43(1): 91-95.
- [10] DIAO M M, QI D P, XU M M, et al. Antibacterial activity and mechanism of monolauryl-galactosylglycerol against *Bacillus cereus*[J]. *Food Control*, 2018, 85: 339-344.
- [11] 蓝蔚青, 刘嘉莉, 翁忠铭, 等. 10 种植物精油对腐生葡萄球菌抑制效果比较及肉桂精油抑菌机制分析[J]. *食品科学*, 2020, 41(19): 38-44.  
LAN W Q, LIU J L, WENG Z M, et al. Effects of ten plant essential oils and antimicrobial mechanism of cinnamon essential oil against *Staphylococcus saprophyticus* [J]. *Food Science*, 2020, 41(19): 38-44.
- [12] 蓝蔚青, 谢晶, 毛锋, 等. 复合生物保鲜剂对金黄色葡萄球菌的抑菌作用研究[J]. *食品与生物技术学报*, 2014, 33(8): 814-820.  
LAN W Q, XIE J, MAO F, et al. Antibacterial effect of composite natural preservatives against *Staphylococcus aureus* [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2014, 33(8): 814-820.
- [13] 蓝蔚青, 冯豪杰, 刘大勇, 等. 微生物源生物保鲜剂对水产品腐败菌作用机制研究进展[J]. *包装工程*, 2020, 41(5): 31-38.  
LAN W Q, FENG H J, LIU D Y, et al. Research progress on mechanism of microbial source bio-preservatives on spoilage bacteria of aquatic products [J]. *Packaging Engineering*, 2020, 41(5): 31-38.
- [14] 李婷, 杨舒然, 陈敏, 等. 姜厚朴水提物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌机理研究[J]. *现代食品科技*, 2016, 32(2): 84-92.  
LI T, YANG S R, CHEN M, et al. Antibacterial mechanism of ginger mix-fried magnolia bark extract against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [J]. *Modern Food Science & Technology*, 2016, 32(2): 84-92.
- [15] ZHANG Y B, LIU X Y, WANG Y F, et al. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [J]. *Food Control*, 2016, 59: 282-289.
- [16] 何静如, 刘雪, 陈文学, 等. (-)- $\beta$ -蒎烯对沙门氏菌的抑菌机制[J]. *食品科学*, 2019, 40(1): 44-49.  
HE J R, LIU X, CHEN W X, et al. Antibacterial activity and mechanism of (-)- $\beta$ -pinene against *Salmonella* [J]. *Food Science*, 2019, 40(1): 44-49.
- [17] 陆海霞, 黄小鸣, 朱军莉. 超高压对单增李斯特菌细胞膜的损伤和致死机理[J]. *微生物学报*, 2014, 54(7): 746-753.  
LU H X, HUANG X M, ZHU J L. Effect of ultra high pressure on cell membrane destruction and death of *Listeria monocytogenes* [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(7): 746-753.
- [18] 朱金帅, 李秋莹, 于昕睿, 等. 酚酸对水产品腐败希瓦氏菌的抑菌作用[J]. *食品与机械*, 2020, 36(6): 133-137.  
ZHU J S, LI Q Y, YU X R, et al. Antibacterial effect of phenolic acid on *Shewanella putrefaciens* from aquatic product [J]. *Food & Machinery*, 2020, 36(6): 133-137.
- [19] WANG Y, ZHANG Y, SHI Y Q, et al. Antibacterial effects of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) bark essential oil on *Porphyromonas gingivalis* [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2018, 116: 26-32.
- [20] 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.  
CHEN M L, LAN W Q, LI H X, et al. Action mechanism of oregano essential oil against *Staphylococcus saprophyticus* [J]. *Food Science*, 2020, 41(7): 46-51.
- [21] WANG F, WEI F Y, SONG C X, 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.
- [22] ZHANG L, MA L, PAN Y P, et al. Effect of molecular weight on the antibacterial activity of polysaccharides produced by *Chaetomium globosum* CGMCC 6882 [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 188: 863-869.
- [23] LIN L, GU Y L, LI C Z, et al. Antibacterial mechanism of  $\epsilon$ -Poly-lysine against *Listeria monocytogenes* and its application on cheese [J]. *Food Control*, 2018, 91: 76-84.
- [24] CUI H Y, BAI M, SUN Y H, et al. Antibacterial activity and mechanism of Chuzhou chrysanthemum essential oil [J]. *Journal of Functional Foods*, 2018, 48: 159-166.



- [25] 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.  
ZHOU Q Q, FANG S Y, MEI J, et al. Inhibitory mechanism of eugenol on *Shewanella putrefaciens* and *Pseudomonas fluorescens*[J]. Food Science, 2020, 41(9): 1-6.
- [26] GUO F Y, LIANG Q, ZHANG M, et al. Antibacterial activity and mechanism of Linalool against *Shewanella putrefaciens* [J]. Molecules, 2021, 26(1): 245.
- [27] 李兆亭, 陈文学, 韩迎洁, 等. 胡椒单萜类化合物对单增李斯特菌抑菌机理的研究[J]. 食品工业科技, 2018, 39(23): 154-158.  
LI Z T, CHEN W X, HAN Y J, et al. Study on the antimicrobial mechanism of *Listeria monocytogenes* from pepper monoterpenoids[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(23): 154-158.
- [28] 徐宇辰. 阿魏酸甲酯对腐败希瓦氏菌的抑菌机制及其同轴静电纺丝膜的制备与保鲜应用[D]. 锦州: 渤海大学, 2021.  
XU Y C. Antibacterial mechanism of methyl ferulate against *Shewanella putrefaciens* and its application in coaxial electrospinning membrane [D]. Jinzhou: Bohai University, 2021.
- [29] ZHANG N N, LAN W Q, WANG Q, 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.

## Preliminary research on the antibacterial mechanism of $\epsilon$ -polylysine hydrochloride against *Shewanella putrefaciens*

LAN Weiqing<sup>1,2,3</sup>, CHEN Xuening<sup>1</sup>, FENG Haojie<sup>1</sup>, XIE Jing<sup>1,2,3</sup>

(1. College of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Aquatic Products Processing and Storage Engineering Technology Research Center, Shanghai 201306, China; 3. National Experimental Teaching Demonstration Center for Food Science and Engineering, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** The antibacterial mechanism of  $\epsilon$ -polylysine hydrochloride ( $\epsilon$ -PLH) against *Shewanella putrefaciens* was investigated at the cellular level. The inhibitory effects of  $\epsilon$ -PLH against *S. putrefaciens* were determined by minimal inhibitory concentration (MIC), minimal bactericidal concentration (MBC) and microbial growth curve. The permeability and integrity of cell structure were determined by electrical conductivity, propidium iodide (PI) intake, alkaline phosphatase (AKPase), lactate dehydrogenase (LDHase) and adenosine triphosphatase (ATPase) activity, and scanning electron microscope (SEM) was used to evaluate the effect of  $\epsilon$ -PLH on the cell structure of *S. putrefaciens*. The results showed that the MIC and MBC of  $\epsilon$ -PLH against *S. putrefaciens* were 1.0 mg/mL and 2.0 mg/mL respectively. The growth of bacteria was inhibited, the extracellular AKPase and LDHase activities were increased significantly, while the ATPase activity in the cell membrane was decreased. The results of PI intake and electrical conductivity were greatly positively correlated with the concentration of  $\epsilon$ -PLH. The results of SEM showed that after  $\epsilon$ -PLH treatment, the bacteria presented depression, holes and other phenomena, and the appearance had changed. In conclusion, after  $\epsilon$ -PLH treatment, the bacterial cell structure was seriously damaged, the contents leaked, and the bacterial cell shape greatly changed, and led to cell apoptosis finally. The research on the mechanism of  $\epsilon$ -PLH against *S. putrefaciens* can provide the theoretical reference for the application of  $\epsilon$ -PLH in aquatic products preservation.

**Key words:**  $\epsilon$ -polylysine hydrochloride; *Shewanella putrefaciens*; antibacterial mechanism