

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

绿原酸对鸡肉腐败菌的抑菌机理

苏萌萌^{1,2}, 孙芝兰², 刘芳², 吴海虹², 张新笑², 诸永志², 王道营², 徐为民^{2,3}, 罗章¹

(1. 西藏农牧学院食品科学学院, 西藏 林芝 860000; 2. 江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏 南京 210014; 3. 江苏省肉类生产与加工质量安全控制协同创新中心, 江苏 南京 210095)

摘要: 以鸡肉腐败菌荧光假单胞菌和腐生葡萄球菌作为指示菌, 研究绿原酸的抑菌机理, 为绿原酸的开发利用提供理论依据。结果发现, 绿原酸对 2 种指示菌的最小抑菌质量浓度、最小杀菌质量浓度为 5 mg/ml; 根据扫描电镜观察发现经过绿原酸处理后, 2 种指示菌表面有明显凹陷, 细胞受损严重; 通过对胞外 ATP、蛋白质质量浓度的检测发现经过绿原酸处理后 2 种指示菌 ATP、蛋白质发生明显泄漏; 膜电位以及激光扫描共聚焦显微镜的结果也表明绿原酸使 2 种指示菌细胞膜受损, 膜电位被破坏。由此看出, 绿原酸是通过作用于细胞膜, 使细胞膜受损严重, 从而导致膜电位被破坏, 胞内大分子物质泄漏从而达到抑菌作用。

关键词: 绿原酸; 荧光假单胞菌; 腐生葡萄球菌; 抑菌机理

中图分类号: Q939.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2018)06-1386-06

Antimicrobial mechanism of chlorogenic acid against chicken spoilage bacteria

SU Meng-meng^{1,2}, SUN Zhi-lan², LIU Fang², WU Hai-hong², ZHANG Xin-xiao², ZHU Yong-zhi², WANG Dao-ying², XU Wei-min^{2,3}, LUO Zhang¹

(1. College of Food Science, Agricultural and Animal Husbandry College of Tibet University, Linzhi 860000, China; 2. Institute of Agricultural Products Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 3. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Meat Production and Processing, Quality and Safety Control, Nanjing 210095, China)

Abstract: Using chicken spoilage bacteria (*Pseudomonas fluorescens* and *Staphylococcus saprophyticus*) as indicator bacteria, the antimicrobial mechanism of chlorogenic acid was studied to provide a theoretical basis for the development and utilization of chlorogenic acid. The results showed that the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of chlorogenic acid against two indicator bacteria were 5 mg/ml. According to the SEM, the surface of

收稿日期: 2018-03-02

基金项目: 江苏省重点研发计划项目 (BE2017392); 江苏省农业科技创新基金项目 [CX(17)3015]; 国家现代农业 (肉鸡) 产业技术体系建设专项 (CARS-41); 江苏省现代农业研究开发示范类项目 (BE2016320)

作者简介: 苏萌萌 (1995-), 女, 吉林公主岭人, 硕士研究生, 研究方向为植物提取物对肉品种主要腐败菌的抑菌机理。 (Tel) 17551041209; (E-mail) 275094940@qq.com

通讯作者: 徐为民, (Tel) 13851577250; (E-mail) weiminxu2002@aliyun.com; 罗章, (Tel) 13989041759; (E-mail) luzhang1759@sohu.com

the two indicator bacteria treated with chlorogenic acid showed obvious depression and the cells were severely damaged. Moreover, chlorogenic acid treatment caused the significant leakage of ATP and protein. The results of membrane potential and LSCM showed that chlorogenic acid treatment caused the membrane damage of the two indicators and the membrane potential was also destroyed. Thus, chlorogenic acid resulted in cell death by destroying the cell membrane, which lead to the destruction of membrane potential and leakage of intracellular macromolecules.

Key words: chlorogenic acid; *Pseudomonas fluorescens*; *Staphylococcus saprophyticus*; antimicrobial mechanism

由微生物引起的食品腐败变质一直严重威胁着食品安全^[1]。鸡肉作为优质的蛋白质来源^[2],由于其具有适宜微生物生长的 pH、水分活度、营养成分等条件,所以在生产运输和销售等过程中很容易受到腐败菌的污染。鸡肉中的腐败菌种类繁多,主要包括沙门氏菌、假单胞菌、腐生葡萄球菌、变形杆菌等^[3-5],严重影响着鸡肉的品质,所以控制微生物污染是保证肉品品质的重点^[6]。

绿原酸作为植物体有氧呼吸的天然产物^[7],具有生物活性^[8-9]。在不对食物造成任何有害作用的情况下,对多种腐败菌均有一定的抑菌效果^[10-12],这使得绿原酸作为生物防腐剂越来越受人们关注,然而绿原酸的抑菌机理尚不完全明了,亦无较系统的关于绿原酸抑菌机理的报道。据此,本研究就从杜仲中提取出来的绿原酸对鸡肉中主要的腐败菌(荧光假单胞菌和腐生葡萄球菌)的抑菌机理进行深入探讨,为绿原酸的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

菌种:荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、腐生葡萄球菌(*Staphylococcus saprophyticus*)分离自市场上的冰鲜鸡肉。

培养基:营养肉汤培养基(NB)由北京奥博星生物技术有限公司生产,营养琼脂培养基(NA)由北京陆桥技术有限责任公司生产。

试剂:绿原酸由陕西慧科植物开发有限公司生产,ATP 分析试剂盒、Bradford 蛋白浓度测定试剂盒、cFDA 染料、PI 染料由碧云天公司生产,diSC3(5)、valinomycin、nigericin 由 Sigma 公司生产,戊二醛由成都市科龙化工试剂厂生产。

1.2 仪器与设备

Ultra View VOX 激光共聚焦显微镜购自珀金埃尔默公司,扫描电镜 EVOMA10/LS10 购自德国 Zeiss Oberkochen 公司,水浴锅购自国华电器有限公司,台式高速冷冻离心机购自德国 Herolab 公司,Anke TGL-16B 离心机购自上海安亭科学仪器厂,LDZX-50KBS 型灭菌锅购自上海申安医疗器械厂,JY5002 型电子天平购自上海良平仪器仪表有限公司,SPX-250B-Z 型生化培养箱购自上海博讯实业有

限公司医疗设备厂,SW-CJ-1FD 型无菌操作台购自苏州净化设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 菌株的活化与培养 将指示菌接种于 NB 培养基中,37 ℃ 200 r/min 摇床培养至对数期后重新转接到新的 NB 培养基中,重复此操作 2 到 3 次后,将菌种与灭过菌的体积浓度 30% 甘油以 1:1 的比例均匀混合,保存于-40 ℃ 的冰箱中。使用前,将冻存菌种解冻后,体积浓度 2% 接种于 NB 培养基中,37 ℃ 200 r/min 摇床培养 12 h 备用。

1.3.2 最小抑菌质量浓度(MIC)和最小杀菌质量浓度(MBC)的测定 配制菌悬液:将体积浓度 2% 指示菌接种于 NB 培养基中,培养到对数期后收集菌株,重悬到生理盐水中,按 10 倍稀释后将菌悬液稀释到 10⁶ CFU/ml。吸收 0.5 ml 加入到 4.5 ml NB 培养基中,用枪头吹匀待用。

MIC、MBC 的测定:从配好的含 10 mg/ml 绿原酸的 NB 培养液中吸 200 μl 至 96 孔板中,采用二倍稀释法将绿原酸稀释到系列质量浓度(0.1562 5~10.000 0 mg/ml)。在 96 孔板上每孔加 100 μl 不同质量浓度的绿原酸溶液和 100 μl 配制好的菌悬液,最终菌液为 5~10⁵ CFU/ml^[13]。以 NB 培养液加菌悬液作为对照,每个试验重复 3 次,37 ℃ 培养 24 h 后测 OD₆₀₀,以抑制菌株生长的最低绿原酸质量浓度为 MIC。在 MIC 的基础上,处理 2 h 时,从每孔中取 10 μl 混合菌液加到 NA 培养基上,37 ℃ 培养 24 h 后观察菌落生长情况。以杀灭 99.9% 细菌(未见菌落生长)的最低绿原酸质量浓度为 MBC^[14]。

1.3.3 扫描电镜 将已活化的指示菌按体积浓度 2% 接种于 NB 培养基中培养到对数期后,将 1×MIC 质量浓度的绿原酸加入菌液中作为处理组,同体积 PBS 缓冲液加菌液为对照组。37 ℃ 200 r/min 摇床培养 3 h 后 6 000 r/min 离心 10 min,用 PBS 缓冲液洗涤 2 次。将菌液固定于体积浓度 2.5% 的戊二醛缓冲液中,4 ℃ 24 h,2 500 r/min 4 ℃ 离心 10 min,去上清液,加蒸馏水放置 10 min 再次离心,重复操作 3 次,以 50%、70%、80%、90% 的乙醇按顺序依次洗涤,每次洗涤后放置 10 min,离心,加入 100% 的乙醇后放置 30 min,将菌泥固定于镜片上,在通风橱中风干,喷金后在扫描电镜下观察、拍照^[15-16]。

1.3.4 胞外 ATP 的检测 将已活化的指示菌按体积浓度 2% 接种于 NB 培养基中培养到对数期后,离心、用 PBS 缓冲液洗涤 3 次后,重悬到 PBS 缓冲液中。加入 $1 \times MIC$ 质量浓度的绿原酸培养 0.5 h、1.0 h、1.5 h、2.0 h、2.5 h 后离心,取上清液待用。以未加入绿原酸处理的悬浮液作为对照。采用荧光标记法,具体操作步骤参照碧云天 ATP 试剂盒说明书。试验重复操作 3 次。

1.3.5 胞外蛋白质的检测 将已活化的指示菌按体积浓度 2% 接种于 NB 培养基中培养到对数期后,离心、重悬到 PBS 缓冲液中。加入 $1 \times MIC$ 质量浓度的绿原酸培养 0.5 h、1.0 h、1.5 h、2.0 h、2.5 h 后离心,取上清液待用。采用 Bradford 法,利用考马斯亮蓝 G-250 与蛋白质结合的特点使溶液被染为蓝色^[17],测定 595 nm 处的吸光值,根据蛋白质标准曲线和样品的体积计算蛋白质浓度。以指示菌加 PBS 缓冲液作为对照组,试验重复 3 次。具体操作步骤参照碧云天 Bradford 蛋白质质量浓度测定试剂盒说明书。

1.3.6 膜电位的检测 采用荧光探针 diSC3(5) 测定指示菌细胞膜电位^[18]。将已活化的指示菌按体积浓度 2% 接种培养到对数期后,离心、重悬到 PBS 缓冲液中。将 0.5 mmol/L 的 diSC3(5) 加入到菌悬液中,放置 15 min,向菌悬液中加入 100 mmol/L KCl 用以平衡胞内外 K^+ 浓度。用移液枪各吸取 1 ml 上述菌悬液,加入 1 μ mol/L valinomycin、nigericin 和 $1 \times MIC$ 质量浓度的绿原酸,取 1 ml 菌悬液作为空白对照。酶标仪测其荧光强度 ($ex = 622$ nm, $em = 670$ nm),每 2 min 测定 1 次,测定 10 min。试验重复操作 3 次。

1.3.7 激光扫描共聚焦显微镜检测 将已活化的指示菌按体积浓度 2% 接种于 NB 培养基中培养到对数期后加入 $1 \times MIC$ 质量浓度的绿原酸,37 $^{\circ}$ C 200 r/min 摇床培养 1 h,以同体积 PBS 缓冲液加菌液为对照组。8 000 r/min 离心 3 min,去上清液后加入 PBS 缓冲液洗涤 1 次,离心。将菌体重悬在 1 ml PBS 缓冲液中,加入 50 μ l 荧光探针 cFDA,37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min,加入 15 μ l 荧光染料 PI,37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min,8 000 r/min 离心 3 min 后将菌泥重悬在 1 ml PBS 缓冲液,重复操作 3 次,用移液枪吸取 2 μ l 混合菌液于载玻片上,盖上盖玻片后在激光扫描共聚焦显微镜下观察、拍照。

2 结果与分析

2.1 最小抑菌质量浓度和最小杀菌质量浓度

试验结果如表 1,绿原酸对于荧光假单胞菌、腐生葡萄球菌具有抑菌、杀菌作用。 MIC 和 MBC 均为 5 mg/ml。

表 1 绿原酸对荧光假单胞菌、腐生葡萄球菌的 MIC 、 MBC

Table 1 The minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of *Pseudomonas fluorescens* and *Staphylococcus saprophyticus* treated by chlorogenic acid

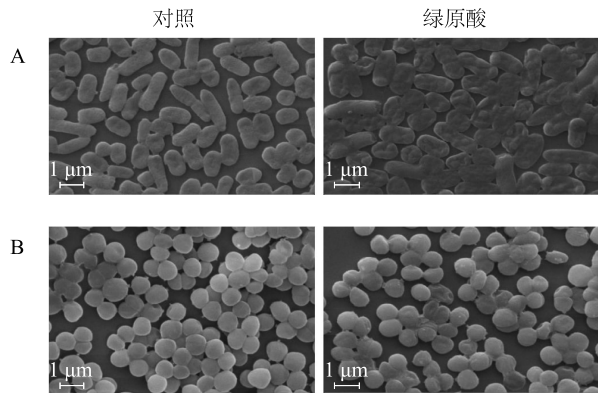
菌种	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
荧光假单胞菌	5.0	5.0
腐生葡萄球菌	5.0	5.0

2.2 绿原酸对菌种形态的影响

利用扫描电镜对微生物进行观察可以更直观地掌握微生物的形态^[16]。如图 1 所示,未加入绿原酸的对照组中,荧光假单胞菌在电镜下呈饱满、圆润杆状,菌体完整,表面细滑有光泽,充满活力。经过绿原酸处理 3 h 后,荧光假单胞菌表面粗糙,大多数菌体扁平,色泽也变得暗淡,菌体变形严重,出现明显孔洞;未加入绿原酸的对照组中,腐生葡萄球菌在电镜下呈饱满的球状,菌体完整,色泽明亮,体态圆润。经过绿原酸处理 3 h 后,部分菌体色泽变暗,菌体表面有絮绒状结构出现,大多数菌体有凹陷和孔洞出现。说明绿原酸能够破坏荧光假单胞菌和腐生葡萄球菌的表面结构,使细胞受损严重。并且绿原酸对荧光假单胞菌的作用效果更强。

2.3 绿原酸对菌种细胞膜的影响

2.3.1 绿原酸处理对 ATP 流失的影响 胞外 ATP 来源于细胞的释放,其含量的测定直接可以说明细胞膜的受损情况^[19]。ATP 含量如图 2 所示,在未加入绿原酸的对照组中,荧光假单胞菌和腐生葡萄球菌的胞外 ATP 含量随着时间的增加均保持在 50 nmol/ml 以内,而在加入 5 mg/ml 绿原酸的处理组中,荧光假单胞菌的胞外 ATP 含量在处理 1 h 后明显呈上升趋势,在 2.5 h 内增加到 263 nmol/ml;腐生葡萄球菌的胞外 ATP 含量在处理 1 h 后呈明显上升趋势,在 2.5 h 内增加到 230 nmol/ml。结果说明绿原酸导致了荧光假单胞菌和腐生葡萄球菌细胞膜的受损,从而使胞内 ATP 流失。随着绿原酸处理的



A: 荧光假单胞菌; B: 腐生葡萄球菌。

图1 绿原酸处理后的荧光假单胞菌、腐生葡萄球菌扫描电镜结果

Fig.1 SEM images of *P. fluorescens* and *S. saprophyticus* treated by chlorogenic acid

时间越长,细胞膜的受损情况越严重;相对于荧光假单胞菌,腐生葡萄球菌的耐抗性可能更强。

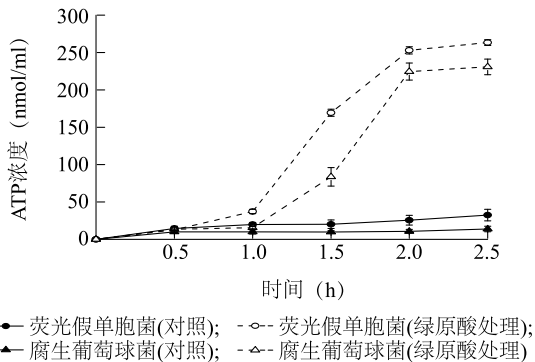


图2 绿原酸处理后荧光假单胞菌、腐生葡萄球菌的胞外ATP浓度

Fig.2 Extracellular ATP concentration of *P. fluorescens* and *S. saprophyticus* treated by chlorogenic acid

2.3.2 绿原酸对胞外蛋白的影响 如图3所示,在未加入绿原酸的对照组中,2.5 h 荧光假单胞菌和腐生葡萄球菌的胞外蛋白质量浓度分别为 12.35 $\mu\text{g/ml}$ 和 13.87 $\mu\text{g/ml}$ 。而在加入 5 mg/ml绿原酸的处理组中,2.5 h 荧光假单胞菌和腐生葡萄球菌的胞外蛋白质量浓度上升为 321.25 $\mu\text{g/ml}$ 和 330.79 $\mu\text{g/ml}$ 。由此可见,加入 5 mg/ml绿原酸的处理组胞外蛋白质量浓度远远高于未加入绿原酸处理的对照组,说明绿原酸对荧光假单胞菌和腐生葡萄球菌的细胞膜有明显影响,通过改变细胞膜通透性导致细

胞内蛋白质渗透到胞外,绿原酸处理的时间越长蛋白质渗透越明显。

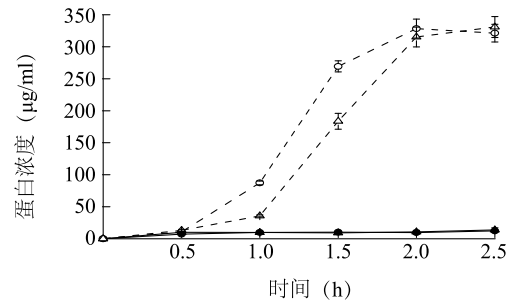
—●— 荧光假单胞菌(对照); -○- 荧光假单胞菌(绿原酸处理);
—▲— 腐生葡萄球菌(对照); -△- 腐生葡萄球菌(绿原酸处理)

图3 绿原酸处理后荧光假单胞菌、腐生葡萄球菌的胞外蛋白质质量浓度

Fig.3 Extracellular protein concentration of *P. fluorescens* and *S. saprophyticus* treated by chlorogenic acid

2.3.3 绿原酸对膜电位($\Delta\phi$)的影响 利用荧光探针 diSC3(5)测定指示菌的膜电位,当指示菌细胞膜破损时,diSC3(5)会渗透到胞外使测定的荧光量增强,膜电位发生变化。利用尼日利亚菌素(nigericin)能够保持细胞最大电位,缬氨霉素(valinomycin)能够完全破坏细胞电位的原理,将二者设置为阴性和阳性对照^[20]。如图4、图5所示,A为荧光假单胞菌未加入绿原酸的对照组在测定的10 min内荧光值增加到2 784,而加入绿原酸的处理组在测定的10 min内荧光值增加到12 335;B为腐生葡萄球菌未加入绿原酸的对照组在测定的10 min内荧光值增加到2 720,而加入绿原酸的处理组在测定的10 min内荧光值增加到14 208。2种指示菌在加入绿原酸处理2 min后,荧光值迅速增加,这说明绿原酸造成荧光假单胞菌和腐生葡萄球菌细胞膜损伤,膜电位被严重破坏。

2.3.4 激光扫描共聚焦显微镜观察 通过 cFDA 染料、PI 染料对细胞荧光染色,二者渗入细胞的能力不同,在激光扫描共聚焦显微镜下,cFDA 能够较容易穿过细胞膜,将健康细胞染色呈现绿色荧光;PI 不能穿过完整的细胞膜,但能使致死细胞染色呈现红色荧光,而亚致死细胞在显微镜下将红色、绿色荧光叠加呈现黄色荧光^[21]。如图6所示,A为荧光假单胞菌,B为腐生葡萄球菌。未加入绿原酸的对照组在显微镜下可以明显看到绝大多数的菌体呈绿色荧光,几乎没有菌体表面呈红色,这说明未加入绿原

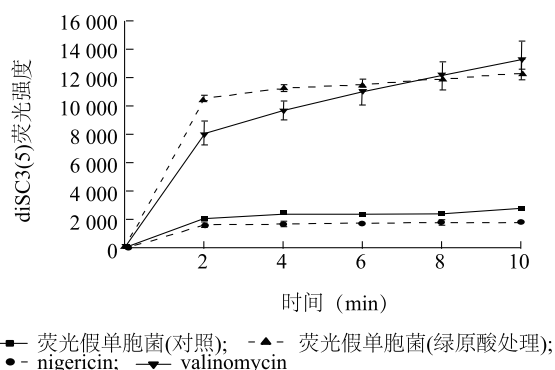


图4 绿原酸处理后荧光假单胞菌的膜电位

Fig.4 The membrane potential of *P. fluorescens* treated by chlorogenic acid

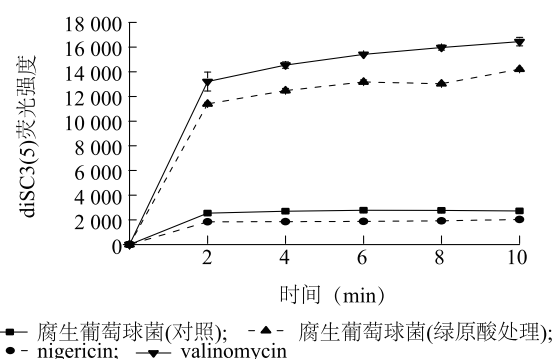


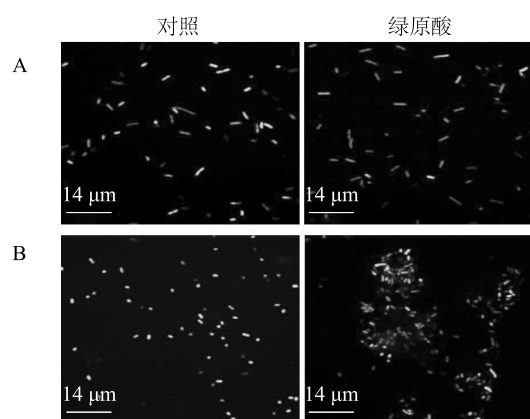
图5 绿原酸处理后腐生葡萄球菌的膜电位

Fig.5 The membrane potential of *S. saprophyticus* treated by chlorogenic acid

酸的对照组菌体健康,生长状况良好;加入绿原酸的处理组在显微镜下,可以看到荧光假单胞菌大多数菌体都被染成红色荧光,部分菌体呈现绿色和黄色荧光,腐生葡萄球菌也呈现出大量红色荧光。这说明经绿原酸处理后的2种指示菌细胞膜均有不同程度的受损,而绿原酸对荧光假单胞菌细胞膜的作用比腐生葡萄球菌更强一些。

3 结论

本研究通过测定绿原酸对荧光假单胞菌和腐生葡萄球菌的最小抑菌质量浓度、最小杀菌质量浓度,利用扫描电镜观察细胞形态,对胞外ATP、蛋白质质量浓度的测定观察胞内大分子物质的泄漏情况,以及根据激光扫描共聚焦显微镜下观察的结果和膜电位的测定进一步验证膜损伤情况,深入探究绿原酸对鸡肉腐败菌(荧光假单胞菌和腐生葡萄球菌)的抑菌机理。得到以下结论:1)绿原酸对荧光假单胞



A: 荧光假单胞菌; B: 腐生葡萄球菌。

图6 绿原酸处理后荧光假单胞菌、腐生葡萄球菌在共聚焦显微镜下的状态

Fig.6 CLSM images of *P. fluorescens* and *S. saprophyticus* treated by chlorogenic acid

菌和腐生葡萄球菌这2种指示菌具有抑菌、杀菌效果。2)绿原酸对2种指示菌的最小抑菌质量浓度、最小杀菌质量浓度为5 mg/ml。3)绿原酸是通过作用于2种指示菌的细胞膜,使细胞膜发生损伤从而导致胞内蛋白质、ATP等大分子物质泄漏,膜电位被破坏,最终达到抑菌、杀菌效果。

参考文献:

- [1] MEAD P S, SLUTSKER L, DIETZ V, et al. Food-related illness and death in the United States[J]. Emerg Infect Dis, 1999, 5(5):607-625.
- [2] 梁慧,于立梅,陈秀兰,等.鸡胸肉冷藏过程中腐败菌分析及品质变化研究[J].食品与发酵工业,2016,42(10):184-188.
- [3] HAINES R. The bacterial flora developing on stored lean meat, especially with regard to slimy meat[J]. Journal of Hygiene, 1933, 33(2):175-182.
- [4] LIGOWSKA M, COHN M T, STABLER R A, et al. Effect of chicken meat environment on gene expression of *Campylobacter jejuni* and its relevance to survival in food[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 145(S1):111-115.
- [5] DOULGERAKI A I, NYCHAS G J E. Monitoring the succession of the biota grown on a selective medium for pseudomonads during storage of minced beef with molecular-based methods[J]. Food Microbiology, 2013, 34(1):62-69.
- [6] LATHA C, SHERIKARA T, WASKAR V S, et al. Sanitizing effect of salts on experimentally inoculated organisms on pork carcasses[J]. Meat Science, 2009, 83:796-799.
- [7] 王辉,田呈瑞,马守磊,等.绿原酸的研究进展[J].食品工业

- 科技,2009(5):341-345.
- [8] 王文龙,文超越,郭秋平,等.绿原酸的生物活性及其作用机制[J].动物营养学报,2017,29(7):2220-2227.
- [9] 孙阳,黄和,胡焱.绿原酸提取纯化方法的研究进展[J].化学试剂,2017,39(3):257-262.
- [10] CHAO M M, KULLY M, JEHANGIR K K, et al. Synthesis of chlorogenic acid derivatives with promising antifungal activity[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2007, 21(15):6830-6833.
- [11] 伊文君.杜仲叶提取物中绿原酸的纯化及其体外抑菌效果的研究[D].大庆:黑龙江八一农垦大学,2014.
- [12] 周志娥,罗秋水,熊建华,等.绿原酸、异绿原酸A对大肠杆菌的抑菌机制[J].食品科技,2014,39(4):228-231.
- [13] 李楠,王松,祖元刚,等.山梨酸与山梨酸钾抑菌、抗炎效果比较[J].黑龙江医药,2012,25(1):25-27.
- [14] 关飞,尤永君,安俊峰.三种酸化剂最小杀菌浓度(MBC)的测定[J].中国动物保健,2015,17(4):71-73.
- [15] 谢家仪,董光军,刘振英.扫描电镜的微生物样品制备方法[J].电子显微学报,2005(4):440.
- [16] BENLI M, YIGIT N, GEVEN F, et al. Antimicrobial activity of endemic *Crataegus tanacetifolia*, (Lam.) Pers and observation of the inhibition effect on bacterial cells[J]. Cell Biochemistry & Function, 2008, 26(26):844-851.
- [17] 张志涛,刘金生,许强,等.Bradford法测定牛奶中蛋白质含量[J].食品与机械,2011,27(5):128-130.
- [18] HUANG E, YOUSEF A E. The lipopeptide antibiotic paenibacterin binds to the bacterial outer membrane and exerts bactericidal activity through cytoplasmic membrane damage[J]. Appl Environ Microbiol, 2014, 80(9):2700-2704.
- [19] FARIDA B, BRIGITTE G M, MICHEL H, et al. Kinetic of production and mode of action of the *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* anti-listerial bacteriocin, an Algerian isolate[J]. Food Science & Technology, 2009, 41(10):1784-1792.
- [20] 刘国荣,郜亚昆,王欣,等.双歧杆菌细菌素 Bifidocin A 对金黄色葡萄球菌的抑菌作用及其机制[J].食品科学,2017,38(17):1-7.
- [21] LIAO H, ZHANG F, LIAO X, et al. Analysis of *Escherichia coli* cell damage induced by HPCD using microscopies and fluorescent staining[J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 144(1):169-176.

(责任编辑:陈海霞)