

辣木籽素对单增李斯特菌的抑制作用

温燕龙^{1,2}, 张楠¹, 李文云^{1,2}, 苏荣镇¹, 李曦明^{1,2}, 李凌飞^{1,2*}, 田洋^{1,2*}

(1. 云南农业大学食品科学技术学院, 云南昆明 650201) (2. 云南农业大学国家辣木加工技术研发专业中心, 食
药同源资源开发与利用教育部工程研究中心, 云南省药食同源功能食品工程研究中心, 云南昆明 650201)

摘要: 为了探究辣木籽素对单增李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 的抑制作用, 采用牛津杯法、二倍稀释法和生长曲线评价辣木籽素对 *L. monocytogenes* 的抑菌活性。通过核酸泄漏和蛋白质泄漏、胞外总糖、PI 染色探究辣木籽素对单增李斯特菌细胞膜通透性的影响; 运用结晶紫染色、细菌表面疏水性、菌体泳动性及扫描电镜评估辣木籽素对 *L. monocytogenes* 生物被膜的影响; 采用胞内 Ca^{2+} 含量和细胞凋亡率分析辣木籽素对单增李斯特菌凋亡的影响。结果表明, 辣木籽素对单增李斯特菌具有较强的抑菌活性, 其最小抑菌浓度 (MIC) 为 400 $\mu\text{mol/L}$; 经 1 MIC 辣木籽素处理后的单增李斯特菌生长明显受到抑制, 细胞膜损伤率达 50.20%, 通透性显著增加 ($P<0.05$); 核酸、蛋白质和糖类等大分子物质泄漏量分别是对照组的 2.59 倍、2.38 倍和 1.34 倍 ($P<0.05$); 与对照组相比, 生物被膜形成、细菌表面疏水性、泳动性和粘附性显著降低 58.10%、38.00% 和 68.19% ($P<0.05$); 胞内 Ca^{2+} 含量显著上升 3.83 倍 ($P<0.01$), 凋亡率达 54.40%。辣木籽素可能通过抑制生物膜、改变细胞膜通透性和促进细胞凋亡而起到抑菌作用。该研究为辣木籽素应用于食品防腐奠定了理论基础。

关键词: 辣木籽素; 单增李斯特菌; 壁膜损伤; 生物被膜; 凋亡; 抑菌机制

文章编号: 1673-9078(2023)04-62-70

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.4.0515

Inhibitory Effect of Moringin from *Moringa oleifera* Seeds on *Listeria monocytogenes*

WEN Yanlong^{1,2}, ZHANG Nan¹, LI Wenyun^{1,2}, SU Rongzhen¹, LI Ximing^{1,2}, LI Lingfei^{1,2*}, TIAN Yang^{1,2*}

(1.College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

(2.National Research and Development Professional Center for Moringa Processing Technology, Engineering Research Center of Development and Utilization of Food and Drug Homologous Resources, Ministry of Education, Yunnan Engineering Research Center of Drug and Food Homologous Functional Food, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: To investigate the inhibitory effect of moringin on *Listeria monocytogenes*, the antibacterial activity of moringin against *L. monocytogenes* was evaluated by the Oxford cup method, the double dilution method, and the growth curve. The effects of moringin on cell membrane permeability of *L. monocytogenes* were explored through determining nucleic acid leakage and protein leakage, total extracellular sugar, and PI staining. The effect of moringin on *L. monocytogenes* biofilm was evaluated by crystal violet staining, bacterial surface hydrophobicity, bacterial mobility, and scanning electron microscopy. The effect of moringin on apoptosis of *L. monocytogenes* was analyzed based on intracellular Ca^{2+} content and apoptosis rate. The results showed that moringin had a strong antibacterial activity against

引文格式:

温燕龙,张楠,李文云,等.辣木籽素对单增李斯特菌的抑制作用[J].现代食品科技,2023,39(4):62-70.

WEN Yanlong, ZHANG Nan, LI Wenyun, et al. Inhibitory effect of moringin from *Moringa oleifera* seeds on *Listeria monocytogenes* [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(4): 62-70.

收稿日期: 2022-04-25

基金项目: 国家木薯产业技术体系辣木产品加工岗位 (CARS-11-YNSJ); 重要药食兼用资源生物制造技术开发与应用 (202002AA100005); 云南省万人计划产业技术领军人才项目 (YNWR-CYJS-2020-010); 云南省重大科技专项计划 (202102AE090027-2)

作者简介: 温燕龙 (1997-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食源性致病菌, E-mail: 980967449@qq.com

通讯作者: 李凌飞 (1979-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品微生物, E-mail: lingfeili@163.com; 共同通讯作者: 田洋 (1982-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 功能食品, E-mail: tianyang1208@163.com

L. monocytogenes, and the minimum inhibitory concentration (MIC) was 400 $\mu\text{mol/L}$. The growth of *L. monocytogenes* was significantly inhibited after the treatment with 1 MIC moringin, with the cell membrane damage rate reaching 50.20% while the permeability significantly increasing ($P<0.05$). The leakages of macromolecular substances such as nucleic acids, proteins, and carbohydrates were 2.59, 2.38, and 1.34 times that of the control group, respectively ($P<0.05$). Compared with the control group, the biofilm formation, bacterial surface hydrophobicity, motility, and adhesion decreased significantly (by 58.10%, 38.00% and 68.19%, respectively) ($P<0.05$). The intracellular Ca^{2+} content increased significantly (by 3.83 times; $P<0.01$), and the apoptosis rate reached 54.40%. Moringin may play an antibacterial role through inhibiting biofilm, changing cell membrane permeability and promoting apoptosis. This study lays a theoretical foundation for the application of moringin in food preservation.

Key words: moringin; *L. monocytogenes*; wall membrane damage; biofilm; apoptosis; antibacterial mechanisms

单增李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*), 是一种兼性厌氧、无芽孢、革兰氏阳性食源性致病菌, 其被认为是全球四大食源性致病菌之一, 极易污染各类食品。单增李斯特菌对环境具有较强的耐受力, 能在低温、高盐等极端条件下长时间存活^[1,2]。如果误食被单增李斯特菌污染的食物, 可使人患李斯特菌病, 感染率高达 75%^[3], 致死率高达 20%~30%^[4]。此外, 单增李斯特菌还能黏附在食品或食品加工设备表面, 形成生物被膜。单增李斯特菌一旦形成生物被膜, 常规杀菌方法便难以将其彻底清除, 增加了食品再污染的风险, 从而引起食源性疾病^[5]。因此, 迫切需要寻求有效预防和控制单增李斯特菌污染的方法^[6]。

随着人们生活水平的不断提高, 食物腐败现象普遍存在。食品领域中常用化学防腐剂延长食品的货架期, 但过量使用往往对人体具有潜在危害^[7]。传统的高温杀菌技术虽然能保证安全, 但会影响食品的营养成分和结构^[8], 开发新型抗菌剂仍然是保障食品安全的重要途径之一。因此, 寻找天然、绿色和安全的防腐剂, 延长食品的货架期, 已成为当下研究的热点。

异硫氰酸酯 (R-N=C=S, Isothiocyanates, ITCs) 是十字花科植物所富含的一种硫苷的酶解产物, 具有多种生物活性^[9-11]。辣木籽素 (Moringin) 是从辣木种子中提取的一种异硫氰酸酯。研究表明, 辣木籽素具有抗菌^[12]、抗癌^[13]、降血压^[14]等生物活性, 在食品、农业和医疗等领域受到广泛关注, 但其对单增李斯特菌的抑菌活性及其机制鲜有报道。

本研究以辣木籽素为研究对象, 初步探究辣木籽素对单增李斯特菌的抑菌作用及其机制, 以期对辣木籽素的深加工以及新型高效植物源性抗菌剂的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

供试菌株: 单增李斯特菌 (*L. monocytogenes* NR-2019-034) 由课题组前期从牛乳中分离获得并经

生理生化鉴定和分子生物学鉴定。

培养基: 营养肉汤培养基和胰蛋白胍大豆琼脂培养基, 广东环凯微生物科技有限公司。

试验材料: 辣木籽素, 参照 Xie 等^[15]的方法从辣木籽中提取, 结构式如图 1 所示; 二甲基亚砜 DMSO, 北京索莱宝科技有限公司, 用于配置不同浓度的辣木籽素。

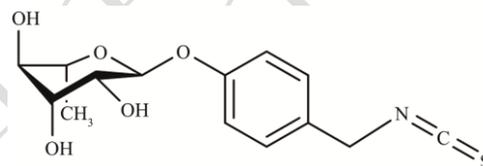


图 1 辣木籽素结构式

Fig.1 Structure of moringin

1.2 主要仪器设备

FluorChem E 多功能酶标仪, 美国 Molecular Devices; 恒温培养箱、恒温培养摇床, 上海恒一科学仪器有限公司; 高压灭菌锅, Kagoshima seisakusyo inc.; 离心机, 湖南湘立科学仪器有限公司; 安全操作柜, 上海龙跃仪器设备有限公司; 烘干箱, 山东潍坊医疗器械厂; 分析天平, 上海舜宇恒平科学仪器有限公司; FlexSEM1000 扫描电子显微镜, 日本日立高新公司; C6 流式细胞仪, 美国 BD Biosciences 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 辣木籽素对单增李斯特菌的抑菌活性评价

1.3.1.1 抑菌圈直径测定

参考 Wan 等^[16]的方法稍作修改, 采用牛津杯法测定辣木籽素对单增李斯特菌的抑菌圈直径。待培养基凝固后, 向胰蛋白胍大豆琼脂培养基中加入 100 μL 单增李斯特菌菌液, 并涂布均匀。然后向牛津杯中添加 200 μL 质量浓度分别为 200、400 和 800 $\mu\text{mol/L}$ 的辣木籽素溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后测量抑菌圈直径。

1.3.1.2 最小抑菌浓度 (Minimum Inhibition Concentration, MIC) 测定

调整菌液浓度为 10^6 CFU/mL, 采用二倍稀释法^[17]

测定辣木籽素对单增李斯特菌的 MIC。将辣木籽素溶液加入到单增李斯特菌菌悬液中充分混匀,使其终浓度分别为 50、100、200、400 和 800 $\mu\text{mol/L}$,然后以 200 μL /孔加入 96 孔板,空白对照组为等量无菌水代替辣木籽素。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光培养 24 h 后,OD₆₀₀ 处检测其吸光度值,拐点即为 MIC。

1.3.1.3 辣木籽素对单增李斯特菌生长曲线的影响

参考朱红霞等^[18]的方法稍作修改。将辣木籽素溶液加入到单增李斯特菌菌悬液(10⁶ CFU/mL)中混匀,使其终浓度分别为 1/2 MIC、1 MIC 和 2 MIC,以 200 μL /孔加入 96 孔板,空白对照组为等量无菌水加入菌悬液中。37 $^{\circ}\text{C}$ 避光培养 24 h 后,每间隔 1 h 使用酶标仪测定 600 nm 处的吸光度值,绘制单增李斯特菌的生长曲线。

1.3.2 辣木籽素对单增李斯特菌的抑菌机制

1.3.2.1 生物膜结晶紫染色

参考 Shi 等^[19]的方法检测单增李斯特菌生物膜的形成能力。将辣木籽素溶液加入到单增李斯特菌菌悬液中,充分混匀,使其终浓度分别为 1/2 MIC、1 MIC 和 2 MIC,以 200 μL /孔加入 96 孔板,空白对照组为等量无菌水。37 $^{\circ}\text{C}$ 避光培养 24 h 后,弃上清,用磷酸盐缓冲溶液(Phosphate Buffer Saline, PBS)漂洗 2 次,37 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 30 min。将 150 μL $m=0.1\%$ 结晶紫染液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 染色 15 min。弃染液, PBS 洗涤 2 次。37 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 30 min,用 200 μL $\varphi=95\%$ 乙醇 37 $^{\circ}\text{C}$ 脱色。最后在 OD₅₉₅ 处测定其吸光度值。

1.3.2.2 细菌疏水性测定

参考杜宏等^[20]的方法稍作修改,使用十六烷测定细菌表面疏水性。离心菌体沉淀,用 0.1 mol/L KNO₃ 洗涤两次重悬,将辣木籽素溶液加入单增李斯特菌菌悬液中,充分混匀,使其终浓度分别为 1/2 MIC、1 MIC 和 2 MIC,空白对照组为等量无菌水。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h, OD₄₀₅ 处测定吸光度值(记为 A₀)。然后向菌悬液中加入 200 μL 十六烷,充分混匀后静置 15 min,吸取水相, OD₄₀₅ 处测定吸光度值(记为 A₁)。疏水性计算公式为:

$$R = \left(1 - \frac{A_1}{A_0}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中:

R——吸附率, %;

A₀——加入十六烷前 OD₄₀₅ 处测定的吸光度值;

A₁——加入十六烷后 OD₄₀₅ 处测定的吸光度值。

1.3.2.3 细菌泳动性测定

参考蒋长军等^[21]的方法略作修改,采用含药平板法测定辣木籽素对单增李斯特菌的泳动性。配置含

$m=0.30\%$ 琼脂粉的营养琼脂培养基, 121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 30 min,待培养基冷却至 55 $^{\circ}\text{C}$ 左右,将辣木籽素溶液加入到培养基中摇匀并倒平板,使其终浓度分别为 1/2 MIC、1 MIC 和 2 MIC,等量无菌水作为空白对照组。待培养基凝固后,分别点种 2 μL (10⁶ CFU/mL) 菌悬液至平板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后测量泳动圈的直径。

1.3.2.4 菌体生物膜粘附性测定

参考杜宏等^[20]的方法略作修改,测定生物膜粘附性。将不同浓度的辣木籽素溶液与菌液混合后加入含有细胞爬片的细胞培养板中。37 $^{\circ}\text{C}$ 避光培养 24 h 后,弃菌液, PBS 漂洗 2 次。 $m=2.5\%$ 的戊二醛固定 12 h。PBS 漂洗 2 次,乙醇梯度脱水后,将爬片真空干燥,喷金,扫描电镜观察。

1.3.3 辣木籽素对单增李斯特菌细胞膜通透性的影响

1.3.3.1 核酸和蛋白质泄漏测定

调整菌液浓度至 10⁶ CFU/mL,参考张译同等^[22]的方法,使用 PBS 离心洗涤并重悬菌体,将辣木籽素溶液加入到菌悬液中,使其终浓度为 1 MIC,充分混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光培养,每 1 h 取培养液离心收集上清,分别测量 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀,评估胞内核酸和蛋白质的泄漏情况。

1.3.3.2 胞外总糖含量的测定

采用蒽酮法^[23]测定单增李斯特菌胞外总糖的含量,采用 PBS 洗涤并重悬对数期的单增李斯特菌细胞,将辣木籽素溶液加入至培养液使终浓度为 1 MIC,相同体积的无菌水为对照,混匀后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,每间隔 1 h 离心取上清,检测 OD₆₂₀,并计算胞外总糖含量。

1.3.3.3 碘化丙啶(Propidium Iodid, PI)染色

离心收集对数期的菌体,参考阚玉红等^[24]的方法稍作修改,评估辣木籽素对单增李斯特菌细胞膜通透性的损伤效应。向 PBS 洗涤并重悬的菌悬液中加入辣木籽素溶液,使其终浓度为 1 MIC,等量的无菌水作为对照,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4 h,加入 PI(10 $\mu\text{g/mL}$)溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光静置孵育 15 min,采用流式细胞仪检测 PI 染色率。

1.3.4 辣木籽素对单增李斯特菌凋亡的影响

1.3.4.1 胞内 Ca²⁺的测定

参考韦田等^[25]的方法稍作修改,采用 Fluo3-AM 荧光探针法评价胞内 Ca²⁺的含量。调整菌液浓度至 10⁶ CFU/mL,将辣木籽素溶液加入到菌悬液中,充分混匀,使其终浓度分别为 1/2 MIC、1 MIC 和 2 MIC,空白对照组为等量无菌水。加入稀释好的 Fluo3-AM 工作液(5 $\mu\text{mol/L}$),37 $^{\circ}\text{C}$ 避光培养 20 min。PBS 洗涤并重悬菌体,于激发波长 488 nm、发射波长 525 nm

处检测胞内荧光强度。

1.3.4.2 凋亡率测定

单增李斯特菌凋亡率的测定参考 Churklam 等^[26]的方法稍作修改。调整菌液浓度至 10^6 CFU/mL, 将辣木籽素溶液加入到菌悬液中充分混匀, 使其终浓度分别为 1/2 MIC、1 MIC 和 2 MIC, 空白对照组为等量无菌水。37 °C 培养 24 h, PBS 洗涤 2 次, 随后加入 5 μ L AnnexinV-FITC 和 5 μ L PI, 于 4 °C 避光孵育 15 min, 孵育结束后使用流式细胞仪检测凋亡率。

1.3.5 数据处理与统计分析

使用 GraphPad Prism 5.0 软件进行数据分析和作图, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验 (两尾法), $P < 0.05$ 为显著性检验标准。

2 结果与讨论

2.1 辣木籽素对单增李斯特菌的抑菌活性评价

2.1.1 辣木籽素对单增李斯特菌的抑菌圈直径

表 1 辣木籽素对单增李斯特菌的抑菌圈直径

Table 1 Diameters of the inhibition zone of *L. monocytogenes*

by moringin	
辣木籽素浓度/ μ mol/L	抑菌圈直径/mm
100	8.70 \pm 0.07
200	10.30 \pm 0.07
400	11.00 \pm 0.10
800	11.30 \pm 0.07

辣木籽素对单增李斯特菌抑菌圈直径的结果如表 1 所示。由表 1 可知, 辣木籽素对单增李斯特菌具有抑制作用, 当浓度为 100、200、400 和 800 μ mol/L 时, 分别产生了 8.70、10.30、11.00 和 11.30 mm 的抑菌圈, 且抑菌圈大小随辣木籽素浓度的增加而增大。Jiang 等^[27]研究发现, 紫花扣豆凝集素对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌具有抑制作用, 且抑菌圈直径随紫花扣豆凝集素浓度的增加而增大, 这与本研究的结果类似。

2.1.2 MIC 测定

采用二倍稀释法测定辣木籽素对单增李斯特菌的 MIC, 结果如图 2 所示。当浓度为 400 μ mol/L 时, 出现了拐点, 即辣木籽素对单增李斯特菌的 MIC 为 400 μ mol/L。植物提取物作为天然抑菌剂以在保证质量的前提下延长食品保存期, 在国内外已有大量报道^[28]。蓝蔚青等^[29]研究发现, 棘托竹荪提取液对单增李斯特菌具有抑制作用, 其 MIC 值为 15 mg/mL。刘思玉等^[30]研究发现, 经工艺优化的辣木籽提取物, 对乳中蜡样芽孢杆菌具有明显的抑制作用, 其 MIC 值为

1.25 mg/mL。本研究结果表明, 从辣木籽中提取的辣木籽素对单增李斯特菌具有较好的抑制作用, 其 MIC 值为 400 μ mol/L (0.12 mg/mL), 其抑菌效果优于上述研究。此外, 辣木籽素对单增李斯特菌的抑菌效果与抗生素相比还有一定差距^[31]。如何优化和提高辣木籽素的抑菌效果, 还有待进一步研究。

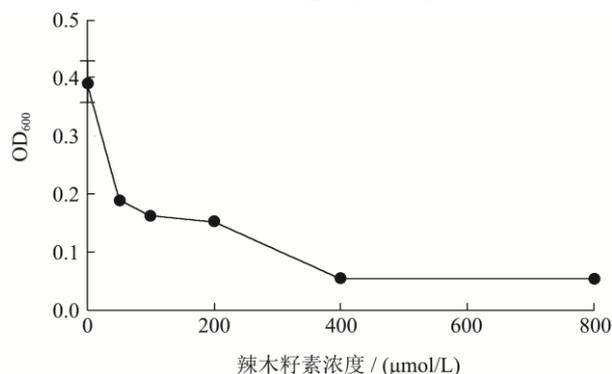


图 2 辣木籽素对单增李斯特菌的抑菌效果

Fig.2 Antibacterial effect of moringin on *L. monocytogenes*

2.1.3 辣木籽素对单增李斯特菌生长曲线的影响

辣木籽素对单增李斯特菌生长的影响如图 3 所示。与对照组相比, 1/2 MIC、1 MIC 和 2 MIC 辣木籽素均能抑制单增李斯特菌的生长, 随着浓度的增大, 抑制作用逐渐增强。这与李琪孟等^[32]的研究结果类似。

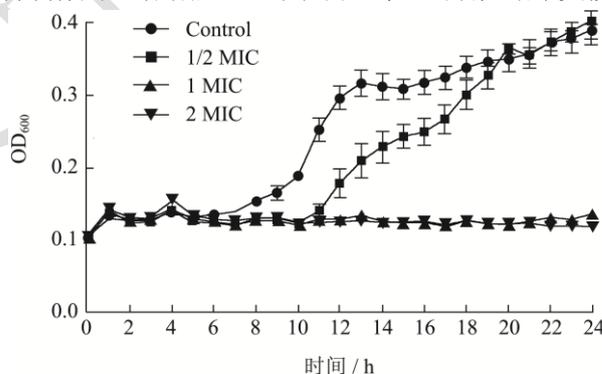


图 3 辣木籽素对单增李斯特菌生长曲线的影响

Fig.3 Effect of moringin on the growth curve of *L. monocytogenes*

2.2 辣木籽素对单增李斯特菌的抑菌机制研究

2.2.1 辣木籽素对抑制单增李斯特菌生物膜的影响

2.2.1.1 辣木籽素抑制单增李斯特菌被膜的形成

辣木籽素对单增李斯特菌生物膜形成的影响如图 4 所示。与对照组相比, 经 1/2 MIC、1 MIC 和 2 MIC 辣木籽素处理后单增李斯特菌的生物膜形成显著降低 34.29%、58.10% 和 99.62% ($P < 0.001$), 表明辣木籽素能显著抑制单增李斯特菌生物膜的形成。生物膜能黏附在生物及非生物材质表面, 是细菌生长过程中形

成的自我保护状态^[33]。徐巧玲等^[34]研究发现,不同浓度的DNase I虽然不能抑制金黄色葡萄球菌的生长,但能显著抑制细菌生物膜的形成,并呈剂量依赖性。付娇娇等^[35]研究发现,不同温度(4、15、25和37℃)条件下培养,会影响单增李斯特菌野生型菌株(WaX12)及sigB缺失突变型菌株(WaX12-ΔsigB)生物被膜形成能力。与徐巧玲等^[34]的结果不同,本研究发现辣木籽素能显著抑制单增李斯特菌生物被膜的形成,且呈剂量依赖性。此外,本研究只探究了37℃下辣木籽素对单增李斯特菌生物膜的影响,其它培养条件下还有待进一步研究。

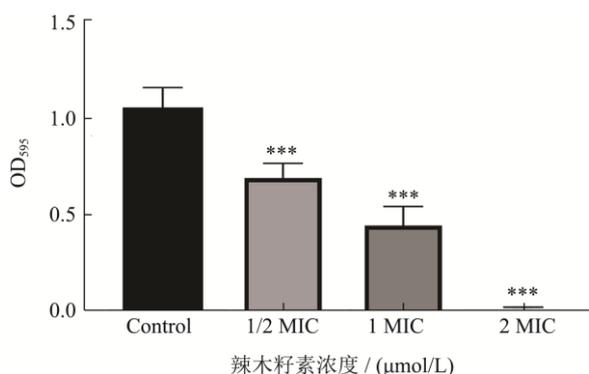


图4 辣木籽素对单增李斯特菌生物膜形成的影响

Fig.4 The effect of moringin on *L. monocytogenes* biofilm

注: ***表示 $P < 0.001$; 图5、6同。

2.2.1.2 辣木籽素干扰单增李斯特菌的疏水作用

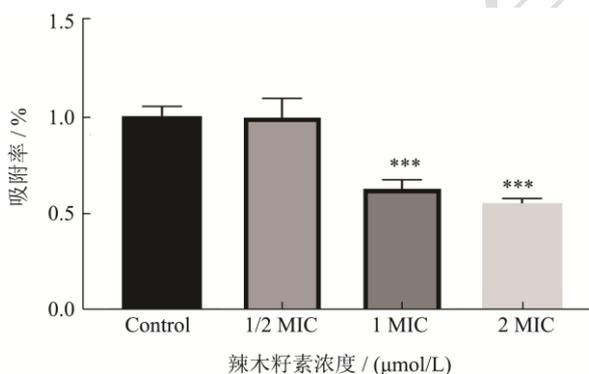


图5 辣木籽素对单增李斯特菌细胞表面疏水性的影响

Fig.5 Effects of moringin on the cell surface hydrophobicity of *L. monocytogenes*

辣木籽素对单增李斯特菌疏水性的影响如图5所示。与对照组相比,1/2 MIC、1 MIC和2 MIC辣木籽素处理后,单增李斯特菌的疏水性均受到抑制,吸附率分别降低10.00%、38.00%和45.00%。当浓度为1 MIC和2 MIC时,抑制作用达到极显著($P < 0.001$)。随着浓度的增加,抑制作用逐渐增强。菌体表面疏水性对细菌粘附性和生物被膜的形成具有重要影响^[36]。张晨等^[37]研究发现,细胞表面疏水作用能促进菌体的黏附和聚集,促进生物被膜的形成。本研究表明辣木

籽素能干扰单增李斯特菌的表面疏水作用。

2.2.1.3 辣木籽素抑制单增李斯特菌的泳动性

辣木籽素对单增李斯特菌泳动性的影响如图6所示。与对照组相比,1/2 MIC、1 MIC和2 MIC辣木籽素处理后,单增李斯特菌泳动性均受到显著抑制($P < 0.001$),菌落直径分别降低20.13%、68.69%和83.39%。随着辣木籽素浓度的升高,迁移扩散直径逐渐减小,抑制作用逐渐增强。Harshey等^[38]研究发现菌体泳动性能促进被膜生物被膜的形成。此外,于淑池等^[39]研究发现,苦丁茶多酚对荧光假单胞菌的泳动性具有抑制作用,这与本研究的结果一致。

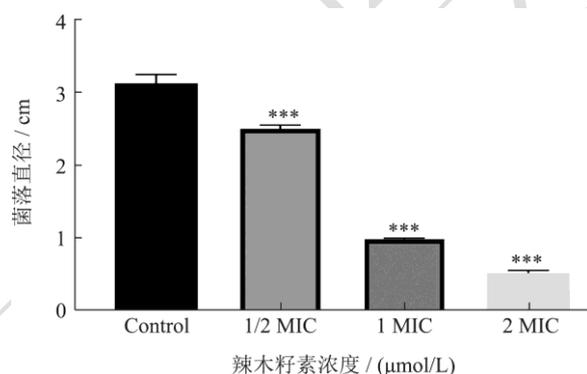


图6 辣木籽素对单增李斯特菌运动性的影响

Fig.6 Effects of moringin on the motility of *L. monocytogenes*

2.2.1.4 辣木籽素降低单增李斯特菌生物膜粘附性

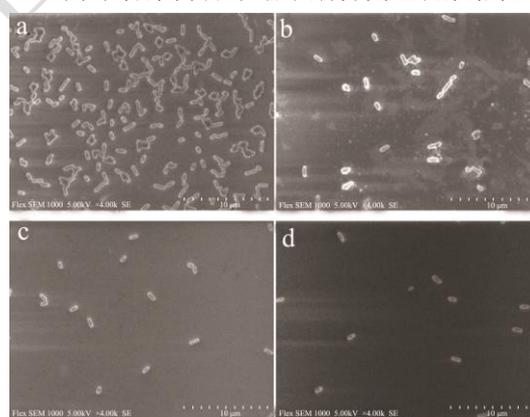


图7 辣木籽素对单增李斯特菌生物膜粘附性的影响

Fig.7 Effect of moringin on biofilm adhesion of *L. monocytogenes*

注: a为空白对照组; b为1/2 MIC处理组; c为1 MIC处理组; d为2 MIC处理组。

辣木籽素对单增李斯特菌生物膜粘附性的影响如图7所示。与对照组相比,1/2 MIC、1 MIC和2 MIC辣木籽素处理后,单增李斯特菌数目明显减少,生物膜的附着力也有所下降。随着浓度的增大,生物膜粘附性和单增李斯特菌数目逐渐降低。顾春涛等^[40]研究发现,亚抑菌浓度肉桂醛显著抑制隆德假单胞菌生物被膜的形成,并降低其生物被膜的粘附性,这与本研

究的结果一致。

2.2.2 辣木籽素对单增李斯特菌细胞膜通透性的影响

2.2.2.1 核酸和蛋白质泄漏

辣木籽素对单增李斯特菌核酸和蛋白质泄漏的影响如图 8 所示。在辣木籽素处理后 6 h 内，随着处理时间的延长，处理组 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 处的吸光度值显著高于对照组 ($P < 0.05$)，泄漏量分别为对照组的 2.59 倍和 2.38 倍，表明辣木籽素处理后单增李斯特菌的细胞膜通透性增大，导致大分子核酸和蛋白质泄漏到胞外。细胞膜为细胞正常生命活动提供了相对稳定的内环境，当细菌细胞膜通透性遭到破坏时，胞内物质则会泄漏到胞外^[41]。洪小利等^[42]研究发现，肉桂精油能破坏单增李斯特菌菌体细胞壁和细胞膜结构，导致核酸和蛋白质泄漏到胞外，且随着浓度的升高，泄漏量逐渐增大。与该研究结果相似，本研究也发现辣木籽素改变了单增李斯特菌的细胞膜通透性，致使大分子核酸、蛋白质泄漏到胞外。大分子物质泄漏到胞外的抑菌机制也被 Kang 等^[43]和 Bajpai 等^[44]报道。

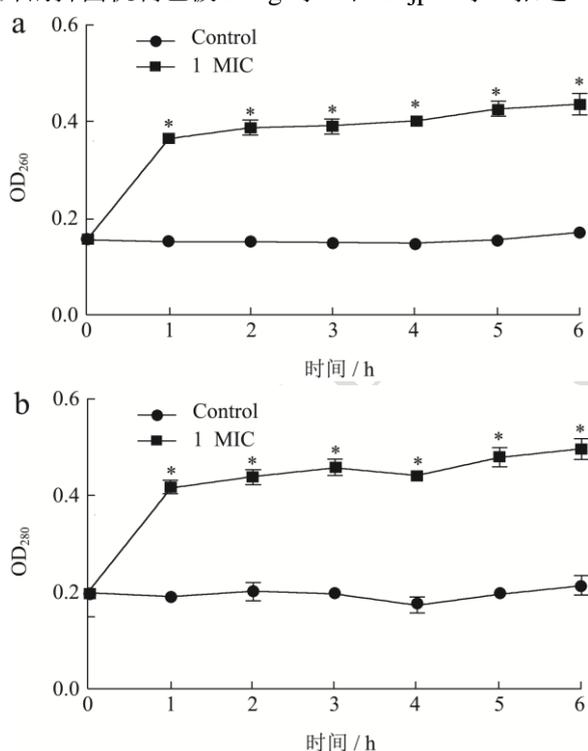


图 8 辣木籽素对单增李斯特菌核酸和蛋白质泄漏的影响

Fig.8 Effect of moringin on nucleic acid and protein leakage in *L. monocytogenes*

注：a 为辣木籽素处理单增李斯特菌后的核酸泄漏情况；b 为蛋白质泄漏情况；*表示 $P < 0.05$ ，图 9 同。

2.2.2.2 胞外总糖泄漏

辣木籽素对单增李斯特菌胞外总糖含量的影响如图 9 所示。在辣木籽素处理后 6 h 内，对照组与 1 MIC

处理组上清液中胞外总糖含量显著低于处理组 ($P < 0.05$)，含量为对照组的 1.34 倍，表明辣木籽素处理会使菌体细胞膜原有的通透性发生改变，导致胞内的糖类大分子物质泄漏到胞外，菌体内必要的营养物质减少，最终导致菌体死亡。糖类是微生物重要的能源和碳源。当细胞膜结构遭到破坏时，胞内糖类物质发生泄漏，因此，可以通过测定胞外总糖含量，确定细胞膜的破损程度^[45]。

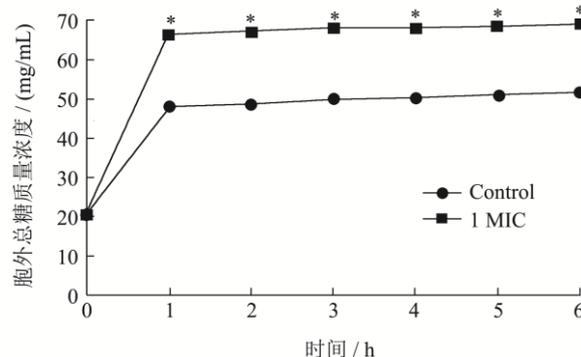


图 9 辣木籽素对单增李斯特菌胞外总糖含量的影响

Fig.9 Effect of moringin on extracellular total sugars content of *L. monocytogenes*

2.2.2.3 辣木籽素破坏单增李斯特菌细胞膜完整性

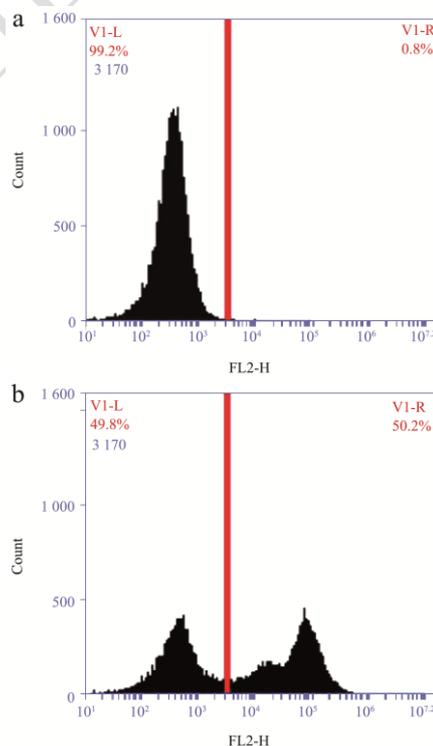


图 10 辣木籽素对单增李斯特菌细胞膜完整性的影响

Fig.10 Effect of moringin on the cell membrane integrity of *L. monocytogenes*

注：a 为对照组；b 为 1 MIC 处理组。

辣木籽素对单增李斯特菌细胞膜完整性的影响如图 10 所示。用 1 MIC 的辣木籽素处理后，细胞完整

率由 99.20% 降低至 49.80%，处理组细胞膜损伤率为 50.20%，表明单增李斯特菌的细胞膜受损。这与核酸泄漏、蛋白质泄漏和胞外总糖的结果一致。PI 是一种核酸染料，不能穿过完整的细胞膜，只有当细胞膜受到损伤后，才能进入细胞内部与核酸结合呈现红色荧光^[46]。因此，使用 PI 染色可探究辣木籽素对单增李斯特菌细胞膜的完整性。陈雨晴等^[47]研究发现，与对照组相比，1 MIC 石菖醇提取物对金黄色葡萄球菌细胞的膜损伤率增加了 24.62%。黄云坡等^[48]研究发现，苯乳酸能破坏单增李斯特菌的细胞膜完整性，随着作用时间的延长，破坏程度越明显。本研究结果表明，1 MIC 辣木籽素作用于单增李斯特菌后，细胞膜的完整性遭到破坏，损伤率高达 50.20%。因此，单增李斯特菌细胞膜可能是辣木籽素抑菌作用的靶点之一。

2.2.3 辣木籽素对单增李斯特菌凋亡的影响

2.2.3.1 辣木籽素增加胞内 Ca²⁺水平

辣木籽素对单增李斯特菌胞内 Ca²⁺荧光强度的影响如图 11 所示。与对照组相比，1/2 MIC、1 MIC 和 2 MIC 处理组均显著增加了单增李斯特菌胞内 Ca²⁺的荧光强度 ($P < 0.01$)，分别为对照组的 1.1 倍、3.83 倍和 4.77 倍，表明辣木籽素处理单增李斯特菌后，造成 Ca²⁺失衡进而损伤菌体的代谢功能，最终导致单增李斯特菌凋亡。细胞凋亡是一种遗传调控形式性的程序性死亡，在细胞凋亡中，Ca²⁺是多种死亡信号转导的第二信使，参与多种生理代谢过程^[49]。正常状态下，原核细菌维持着较低水平的 Ca²⁺含量，当受到刺激后，Ca²⁺稳态被破坏，菌体内的 Ca²⁺水平增加，最终导致细菌凋亡^[50]。

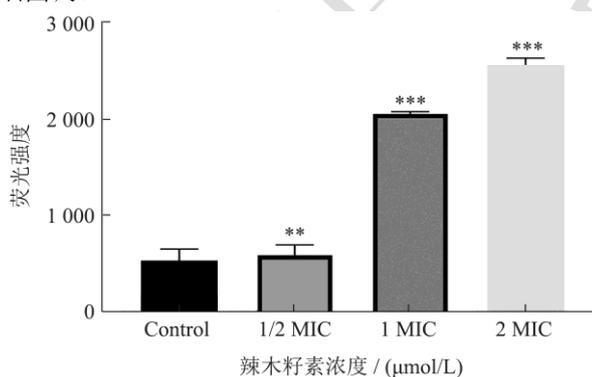


图 11 辣木籽素对单增李斯特菌胞内 Ca²⁺的影响

Fig.11 Effect of moringin on intracellular Ca²⁺ of *L. monocytogenes*

注: **表示 $P < 0.01$; ***表示 $P < 0.001$ 。

2.2.3.2 辣木籽素诱导单增李斯特菌凋亡

辣木籽素对单增李斯特菌凋亡率的影响如图 12 所示。不同浓度的辣木籽素 (1/2 MIC、1 MIC、2 MIC) 处理单增李斯特菌后，凋亡率分别为 32.30%、54.40%、

59.60%，表明辣木籽素具有促进单增李斯特菌细胞凋亡的作用，且随辣木籽素浓度的升高，凋亡率逐渐增大。罗泽萍等^[51]研究发现，桉桐提取物能够诱导金黄色葡萄球菌凋亡，随着桉桐提取物浓度的升高，凋亡率逐渐增大，这与本研究结果类似。

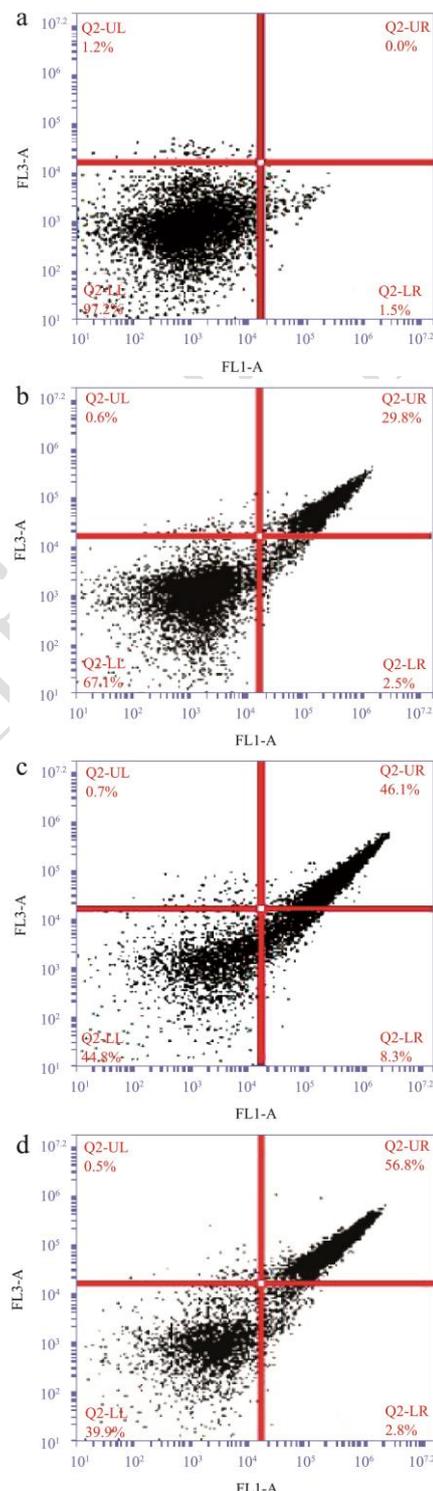


图 12 辣木籽素对单增李斯特菌凋亡率的影响

Fig.12 Effect of moringin on apoptosis rate of *L. monocytogenes*

注: a 为对照组, b 为 1/2 MIC 处理组; c 为 1 MIC 处理组; d 为 2 MIC 处理组。

3 结论

本研究探讨了辣木籽素对单增李斯特菌的抑制作用。结果表明,辣木籽素对单增李斯特菌具有较强的抑菌活性,其最小抑菌浓度为 400 $\mu\text{mol/L}$;经辣木籽素处理后的单增李斯特菌生长明显受到抑制,细胞膜通透性显著增加,使胞内大分子核酸、蛋白质和糖类物质泄漏到胞外,细胞膜损伤率达 50.20%;辣木素处理单增李斯特菌后,抑制单增李斯特菌生物膜的形成,降低生物被膜粘附性,干扰细菌疏水作用和菌体泳动性;辣木籽素显著增加胞内 Ca^{2+} 含量,导致菌体 Ca^{2+} 失衡,损伤菌体的代谢功能,最终导致单增李斯特菌凋亡。辣木籽素可能是通过改变单增李斯特菌细胞膜通透性,抑制生物膜形成、诱导和促进细胞凋亡进程来发挥其抑菌作用。本研究为辣木籽素作为天然抑菌剂的开发奠定一定的理论基础。

参考文献

- [1] Bucur F, Grigore G, Crauwels P, et al. *Listeria monocytogenes* resistance of to stress conditions encountered in food and food processing environments [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2700.
- [2] Li W, Bai L, Fu P, et al. The epidemiology of *Listeria monocytogenes* in China [J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2018, 15(8): 459-466.
- [3] Denny J, Mclauchlin J. Human *Listeria monocytogenes* infections in Europe - an opportunity for improved European surveillance [J]. *Eurosurveillance*, 2008, 13(13): 9-10.
- [4] Calderon-gonzalez R, frande-cabanes E, Teran-navarro H, et al. GNP-GAPDH nanovaccines prevent neonatal *Listeriosis* by blocking microglial apoptosis and bacterial dissemination [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(33): 53916-53934.
- [5] Maggio F, Rossi C, Chaves-lópez C, et al. Interactions between *L. monocytogenes* and *P. fluorescens* in dual-species biofilms under simulated dairy processing conditions [J]. *Foods*, 2021, 10(1): 176.
- [6] Iwu C D, Okoh A I. Preharvest transmission routes of fresh produce associated bacterial pathogens with outbreak potentials: a review [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2019, 16(22): 4407.
- [7] Botthoulath V, Upaichit A, Thumarat U. Identification and in vitro assessment of potential probiotic characteristics and antibacterial effects of *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* SKI₁₉, a bacteriocinogenic strain isolated from Thai fermented pork sausage [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2018, 55(7): 2774-2785.
- [8] 张梅,李晓君,成悦,等.植物源防腐剂的制备及抑菌机理研究[J].*食品研究与开发*,2022,43(1):139-145.
- [9] Hanschen F S, Rohn S, Mewis I, et al. Influence of the chemical structure on the thermal degradation of the glucosinolates in broccoli sprouts [J]. *Food Chemistry*, 2012, 130(1): 1-8.
- [10] Nakamura Y, Iwahashi T, Tanaka A, et al. 4-(Methylthio)-3-butenyl isothiocyanate, a principal antimutagen in daikon (*Raphanus sativus*; Japanese white radish) [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49(12): 5755-5760.
- [11] Rajan T S, De Nicola G R, Iori R, et al. Anticancer activity of glucomoringin isothiocyanate in human malignant astrocytoma cells [J]. *Fitoterapia*, 2016, 110: 1-7.
- [12] Padla E P, Solis L T, Levida R M, et al. Antimicrobial isothiocyanates from the seeds of *Moringa oleifera* Lam [J]. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 2012, 67(11-12): 557-564.
- [13] Giacoppo S, Iori R, Rollin P, et al. *Moringa* isothiocyanate complexed with α -cyclodextrin: a new perspective in neuroblastoma treatment [J]. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 17(1): 362.
- [14] Faizi S, Siddiqui B S, Saleem R, et al. Isolation and structure elucidation of new nitrile and mustard oil glycosides from *Moringa oleifera* and their effect on blood pressure [J]. *Journal of Natural Products*, 1994, 57(9): 1256-1261.
- [15] Xie J, Qian Y, Yang Y, et al. Isothiocyanate from *Moringa oleifera* isothiocyanate from seeds inhibits the growth and migration of renal cancer cells by regulating the PTP1B-dependent Src/Ras/Raf/Erksignaling pathway [J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 9: 790618.
- [16] Liang W, Li H, Zhou H, et al. Effects of taraxacum and astragalus extracts combined with probiotic *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus* on *Escherichia coli* - infected broiler chickens [J]. *Poultry Science*, 2021, 100(4): 101007.
- [17] Martinez-elizalde K, Rodriguez-monroy M A, Flores C M, et al. Comparison of biological properties of two medicinal extracts of the tehuacan-cuicatlan valley [J]. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 2018: 1-9.
- [18] 朱红霞,冯睿蕊,胡林峰.曼陀罗提取物抑菌活性初步研究[J].*河南科技学院学报(自然科学版)*,2022,43(2):30-32.
- [19] Shi T, Hou X, Guo S, et al. Nanohole-booster electron transport between nanomaterials and bacteria as a concept for nano-bio interactions [J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 1-15.
- [20] 杜宏,吕欣然,崔晓玲,等.融合魏斯氏菌对单增李斯特菌生物膜形成的影响[J].*食品研究与开发*,2021,42(13):180-187.
- [21] 蒋长军,管翠翠,胡小敏,等.黄芩苷对嗜水气单胞菌生物膜

- 形成的影响及体内外的抑菌作用[J].微生物学报,2021,61(7):2112-2120.
- [22] 张译同,郭锰,董丽妍,等.香雪兰精油对金黄色葡萄球菌的抑菌机制[J].香料香精化妆品,2021,5:14-19.
- [23] 邓丽,孙冉,姚蒋庞,等.贝莱斯芽孢杆菌粗提物对金黄色葡萄球菌的抑菌机制[J].食品与发酵科技,2021,57(3):1-9.
- [24] 阚玉红,谢笔钧,孙智达.胭脂红番石榴叶黄酮提取物的抑菌活性及其机理[J].中国调味品,2021,46(12):159-166.
- [25] 韦田,梅林,王志耕,等.亚硝酸盐对植物乳杆菌 FQR 细胞表面性质及形态的影响[J].食品与发酵工业,2017,43(3):42-47.
- [26] Churklam W, Chaturongakul S, Ngamwongsatit B, et al. The mechanisms of action of carvacrol and its synergism with nisin against *Listeria monocytogenes* on sliced bologna sausage [J]. Food Control, 2020, 108: 106864.
- [27] Jiang B, Wang X, Wang L, et al. Two-step isolation, purification, and characterization of lectin from zihua snap bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds [J]. Polymers (Basel), 2019, 11(5): 785.
- [28] 李冬娜,马晓军.天然植物抑菌成分提取及在食品保鲜中的应用进展[J].包装工程,2018,39(13):71-77.
- [29] 蓝蔚青,曹奕,陈燕,等.棘托竹荪提取液对单增李斯特菌的抑菌机理初步研究[J].食品工业科技,2015,36(14):152-155.
- [30] 刘思玉,葛武鹏,赵丽丽,等.辣木籽提取物提取工艺优化及其对乳中蜡样芽孢杆菌的抑制作用[J].食品工业科技,2021,42(15):110-118.
- [31] Michelet C, Avril J L, Cartier F, et al. Inhibition of intracellular growth of *Listeria monocytogenes* by antibiotics [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1994, 38(3): 438-446.
- [32] 李琪孟,罗志刚,李小林.马铃薯胰蛋白酶抑制剂的抑菌活性[J].现代食品科技,2020,36(12):43-51.
- [33] Abdallah M, Benoliel C, Drider D, et al. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments [J]. Archives of Microbiology, 2014, 196(7): 453-472.
- [34] 徐巧玲,孙凤军,冯伟,等. DNase I 对金黄色葡萄球菌生物膜形成的影响[J].南方医科大学学报,2015,35(9):1356-1359.
- [35] 付娇娇,王旭,刘海泉,等.不同培养条件下 sigB 对单增李斯特菌生物被膜形成的影响[J].上海海洋大学学报,2016,25(4):634-640.
- [36] Sedláčková P, Čeřovský M, Horsakova I, et al. Cell surface characteristic of *Asaia bogorensis*-spoilage microorganism of bottled water [J]. Czech Journal of Food Sciences, 2011, 29(4): 457-461.
- [37] 张晨,刘雅丽,陈思佳,等.柠檬精油,柠檬烯,茶多酚对变形链球菌表面疏水性及黏附的影响[J].实用口腔医学杂志,2016,32(4):471-474.
- [38] Harshey R M. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal [J]. Annual Reviews in Microbiology, 2003, 57(1): 249-273.
- [39] 于淑池,邢文君,冯紫蓝,等.基于群体感应研究苦丁茶多酚对荧光假单胞菌腐败特性的抑制作用[J].食品工业科技,2021,42(21):148-157.
- [40] 顾春涛,王雅莹,朱军莉,等.顺反式肉桂醛对肉源隆德假单胞菌生物被膜和致病性的抑制作用[J].微生物学报,2020,60(1):26-35.
- [41] 伏俊桦,邓晓东,周莉,等.夹江石斛水提取物对金黄色葡萄球菌的抑菌作用及机制研究[J].食品与发酵科技,2020,56(2):5.
- [42] 洪小利,严媛,林玲森,等.肉桂精油对食源性肠炎沙门氏菌和单增李斯特菌的抑菌作用[J].食品与发酵工业,2021,47(17):54-60.
- [43] Kang S, Kong F, Shi X, et al. Antibacterial activity and mechanism of lactobionic acid against *Pseudomonas fluorescens* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its application on whole milk [J]. Food Control, 2020, 108: 106876.
- [44] Bajpai V K, Sharma A, Baek K H. Antibacterial mode of action of cudrania tricuspidata fruit essential oil, affecting membrane permeability and surface characteristics of food-borne pathogens [J]. Food Control, 2013, 32(2): 582-590.
- [45] 赵姣颖,肖洋,杨龙,等.巨大芽孢杆菌 L2 发酵产物对魔芋软腐病菌的抑菌机制[J].食品科学,2019,40(21):14-20.
- [46] Li W, Yuan S, Sun J, et al. Ethyl p-coumarate exerts antifungal activity *in vitro* and *in vivo* against fruit alternaria alternata via membrane-targeted mechanism [J]. International Journal of Food Microbiology, 2018, 278: 26-35.
- [47] 陈雨晴,吕峰,马志洲.石菖醇提取物基于细胞膜损伤的抑菌作用[J].福建农林大学学报(自然科学版),2021,50(5):7.
- [48] 黄云坡,孙晶,梅红霞,等.苯乳酸对单增李斯特菌的细胞膜完整性和通透性的影响[J].食品工业科技,2019,40(5):130-135.
- [49] Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P, et al. Botrytis cinerea: the cause of grey mould disease [J]. Molecular Plant Pathology, 2007, 8(5): 561-580.
- [50] Wessels B, Schulzekaysers N, Damm S, et al. Effect of selected plant extracts on the inhibition of enzymatic browning in fresh-cut apple [J]. Journal of Applied Botany and Food Quality, 2014, 87: 16-23.
- [51] 罗泽萍,潘立卫,李丽.桉桐提取物抗菌活性及其对金黄色葡萄球菌的抗菌机理[J].南方农业学报,2019,50(12):2778-2786.