DOI:10.12441/spyswjs.20240813002 [文章编号] 1673-1689(2025)10-0113-09

关键环境因子对ε-聚赖氨酸抑菌活性的影响

刘振杰[1,2,3,4,5] 黄培豪[2,4,5] 陈 述[2,4,5] 容 顺[2,4,5] 彭飞艇[2,4,5] 陈 玲[1,2,3,4,5] 郭伟鹏[1,2,3,4,5*]

(1. 广东省科学院微生物研究所,广东 广州 510070; 2. 广东省微生物分析检测中心,广东 广州 510070; 3. 华南应用微生物国家重点实验室,广东 广州 510070; 4. 广东省微生物安全与健康重点实验室,广东 广州 510070; 5. 国家卫生健康委微生物食品营养与安全科技创新平台,广东 广州 510070)

摘要:【目的】探究关键环境因子[水分活度(a_w)、pH及温度]对ε-聚赖氨酸(ε-PL)抑菌活性的影响,为其应用提供科学依据。【方法】以金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)为指示菌,采用微量稀释法、琼脂稀释法和抑菌动力学评价ε-PL的抑菌活性,通过蛋白质泄漏分析ε-PL对细胞膜活性的影响,通过Live/Dead荧光染色分析ε-PL对细胞膜通透性的影响。【结果】ε-PL对金黄色葡萄球菌的最小抑菌质量浓度(MIC)为40.0 μg/mL。琼脂稀释法结果显示,ε-PL抑菌活性随a_w升高而增强;当pH为5.0~7.0时,ε-PL抑菌活性较强;当pH为4.0时,有一定抑菌活性;当pH为8.0时,有微弱抑菌活性;当pH为9.0时,丧失抑菌活性;在中性条件下,当温度为30 ℃时,ε-PL有最大抑菌活性。抑菌动力学结果显示,ε-PL在不同pH条件下的抑菌活性与琼脂稀释法结果相近;在中性条件下,温度为25 ℃与30 ℃时,ε-PL的抑制作用强烈。在弱酸性及中性(pH 5.0~7.0)条件下,ε-PL对金黄色葡萄球菌细胞膜有很强破坏作用;在较低温度(25~30 ℃)下,ε-PL对细胞膜的破坏作用较强;而在较高温度(30~35 ℃)下,ε-PL对细胞膜的破坏作用变弱。Live/Dead荧光染色结果表明,当pH为4.0时,ε-PL可提高细胞膜的通透性;当pH为9.0时,失去破坏作用。【结论】a_w、pH及温度对ε-PL抑菌活性有显著影响。

关键词:ε-聚赖氨酸;水分活度;pH;温度;抑菌活性;膜通透性

Effects of Critical Environmental Factors on the Antimicrobial Activity of ε-Poly-*L*-lysine

LIU Zhenjie[1,2,3,4,5] *HUANG Peihao*[2,4,5] *CHEN Shu*[2,4,5] *RONG Shun*[2,4,5] *PENG Feiting*[2,4,5] *CHEN Ling*[1,2,3,4,5] *GUO Weipeng*[1,2,3,4,5*]

(1. Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510070, China; 2. Guangdong Detection Center of Microbiology, Guangzhou 510070, China; 3. State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangzhou 510070, China; 4. Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Safety and Health, Guangzhou 510070, China; 5. National Health Commission Science and Technology Innovation Platform for Nutrition and Safety of Microbial Food, Guangzhou 510070, China)

Abstract: [**Objective**] This study explored the effects of critical environmental factors [water activity (a_w), pH, and temperature] on the antimicrobial activity of ε-poly-*L*-lysine (ε-PL), aiming to provide a basis for the application of ε-PL. [**Method**] With *Staphylococcus aureus* as an indicator strain, the micro-broth dilution and agar dilution methods as well as antimicrobial growth kinetics were utilized to determine the antimicrobial activity of ε-PL. The protein leakage assay was employed to evaluate the bacterial membrane disruption activity of ε-PL. Live/Dead fluorescence staining was performed to observe the bacterial membrane permeability. [**Result**] The minimum inhibitory mass concentration (MIC) of ε-PL against *Staphylococcus aureus* was 40.0 μg/mL. The

基金项目:广东省科技厅重点实验室建设项目(2020B121201009)。

通信作者:郭伟鹏(1974—),男,本科,教授级高级工程师,主要从事微生物安全检测新技术研究。E-mail: guowp@yeah.net

收稿日期:2024-08-13 **修回日期:**2024-10-27

agar dilution method results indicated that the antimicrobial activity of ε-PL increased with the increase in a_w. Additionally, ε-PL demonstrated strong antimicrobial activity at pH 5.0~7.0, moderate antimicrobial activity at pH 4.0, weak antimicrobial activity at pH 8.0, and no antimicrobial activity at pH 9.0, while the maximum antimicrobial activity of ε-PL occurred at 30 ℃ under neutral conditions. The antimicrobial kinetic results showed that the antimicrobial efficacy of ε-PL under different pH conditions was consistent with the agar dilution method results, with strong inhibitory effects at 25 ℃ and 30 ℃ under neutral conditions. ε-PL had strong membrane disruption activity on *Staphylococcus aureus* under weakly acidic to neutral conditions (pH 5.0~7.0), and the membrane disruption activity of ε-PL was more pronounced at low temperatures (25~30 ℃) and weak at high temperatures (30~35 ℃). The Live/Dead fluorescence staining showed that the bacterial membrane permeability was enhanced by ε-PL at pH 4.0, while little effect was observed at pH 9.0. [**Conclusion**] The environmental factors a_w, pH, and temperature demonstrate significant influences on the antimicrobial activity of ε-PL.

Keywords: ε-poly-*L*-lysine; water activity; pH; temperature; antimicrobial activity; membrane permeability

ε-PL是一种微生物源的多阳离子型抗菌肽，由25~30个*L*-赖氨酸通过α-羧基与ε-氨基形成的肽键连接而成[1]。作为一种化学组成简单但具有独特结构的抗菌肽，ε-PL抑菌谱广，对细菌、酵母菌及霉菌均具有很强的抑菌活性[2-4]。ε-PL还具有亲水性好、耐热、可生物降解、安全无毒等特性[5-6]。因此，ε-PL是一种理想的天然食品防腐剂。在日本，ε-PL可用于米饭、软饮料、肉制品、果蔬等食品的防腐，美国和韩国等国家也已批准其作为食品防腐剂使用[7]。2014年，中国批准ε-PL及其盐酸盐为食品添加剂新品种，允许其用于果蔬汁、焙烤食品和熟肉制品等食品。

近年来，由于抗生素的不当使用，抗生素耐药菌的检出已相当常见，带来的风险与危害逐步加剧[8]。抗菌肽是一类新型抑菌物质，不易产生耐药性，可用于代替抗生素，其中细胞膜是其重要的作用靶点。抗菌肽分子一般含有多个碱性氨基酸，使其在生理条件下带正电荷，可非特异性地与带负电荷的微生物经静电作用吸附至微生物表面[9]。抗菌肽与微生物细胞膜的作用模型通常认为有3种：桶板模型（barrel-stave model）、环形孔模型（toroidal pore model）及地毯模型（carpet model）[10]。富含正电荷的ε-PL，通过地毯模型与微生物细胞膜发生反应，破坏细胞膜，导致胞内物质泄漏[11]。最新研究认为，ε-PL会造成细胞膜损伤，并进入细胞内作用于DNA，使毒理基因的表达下调[12-13]。但ε-PL在食品工业中的应用仍面临较大制约。与化学合成防腐剂相比，ε-PL的使用成本过高，且防腐效果仍相对较差。为更好地将ε-PL用于食品防腐，研究人员考察了其在干酪[14]、苹果[15]等食品中的应用效果。为提高ε-PL的抑菌效果，将其与其他抑菌物质或防腐方法联合应用也受到重视。冰藏条件下，ε-PL与迷迭香联合应用可将大黄鱼（*Pseudosciaena crocea*）货架期延长9 d[16]；超声波与ε-PL结合可改善鲜切莴苣的保鲜效果[17]；ε-PL与Nisin联合应用可防控蜡样芽孢杆菌（*Bacillus cereus*），协同抑菌效果显著[18]。

ε-PL是一种生物聚合物，聚合度大小对其抑菌活性有重要影响，10个以上聚合度是保持其抑菌活性必需的条件[19]。此外，由于ε-PL主链含有多个—NH_2基团，等电点为9.0[5]，使其在组成成分复杂的食品体系中可与其他成分（如负电荷多糖及蛋白质）发生反应，直接或间接影响其抑菌活性[20-21]。需指出的是，环境因子如pH和温度等不仅影响抗菌成分的稳定性，还对抑菌活性有较大影响，长久以来受到研究者的广泛关注[22-23]。作者拟系统研究a_w、pH及温度对ε-PL抑菌活性的影响，以期为ε-PL在食品防腐中的应用提供一定的理论和实践依据。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

ε-PL（相对分子质量3 500~4 000，纯度≥95%）：上海麦克林生化科技有限公司；Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit：美国赛默飞世尔科技公司。智能水分活度测定仪：HD-3A型，无锡市华科仪器仪表有限公司；紫外可见分光光度计：Ultrospec 6300pro型，美国Amershan Biosciences公司；荧光显微镜：DM RA2型，德国Leica公司。

1.2 菌株

金黄色葡萄球菌ATCC6538：广东省科学院微生物研究所保藏。

1.3 培养基

1）营养肉汤培养基：蛋白胨1.0 g/dL，牛肉浸粉0.3 g/dL，NaCl 0.5 g/dL。

2）营养琼脂培养基：蛋白胨1.0 g/dL，牛肉浸粉0.3 g/dL，NaCl 0.5 g/dL，琼脂1.8~2.0 g/dL。121 ℃灭菌20 min。

1.4 方法

1.4.1 金黄色葡萄球菌种子液及菌悬液制备

金黄色葡萄球菌划线至营养琼脂斜面，37 ℃培养24 h。取一环活化的菌种接入30 mL营养肉汤培养基中（150 mL三角瓶），于37 ℃、200 r/min条件下培养18 h，即为金黄色葡萄球菌种子液。吸取25 mL金黄色葡萄球菌种子液，于8 000 r/min离心10 min，弃上清液，用质量浓度0.85 g/dL的生理盐水重悬菌体，相同条件下再离心1次，弃上清液，用生理盐水将菌浓度稀释至1×10^9 CFU/mL，作为金黄色葡萄球菌菌悬液备用。

1.4.2 ε-PL溶液制备

称取500 mg ε-PL至烧杯，用去离子水溶解，转移至100 mL容量瓶并定容，即ε-PL溶液的质量浓度为0.5 g/dL，用0.22 μm无菌过滤器过滤除菌，得到ε-PL溶液备用。

1.4.3 MIC测定

采用微量稀释法测定MIC[24]。向无菌96孔板加入营养肉汤培养基、金黄色葡萄球菌菌悬液及ε-PL溶液，每孔总体积为200 μL，菌浓度为1×10^6 CFU/mL，ε-PL质量浓度为5.0~50.0 μg/mL（梯度5.0 μg/mL）。37 ℃培养24 h，观察有无微生物生长，无微生物生长对应的ε-PL质量浓度即为MIC。

1.4.4 a_w对ε-PL抑菌活性的影响

在营养肉汤培养基中添加不同质量浓度（1.50、1.75、2.00、2.25、2.50 g/dL）的琼脂调节a_w，利用智能水分活度测定仪测定a_w。吸取适当稀释的金黄色葡萄球菌菌悬液1 mL（菌浓度200~300 CFU/mL）于直径9 cm的培养皿中，加入ε-PL溶液，以及融化的、约45 ℃的含不同质量浓度琼脂的营养肉汤培养基，每皿总体积为20 mL，ε-PL质量浓度为5.0~30.0 μg/mL（梯度5.0 μg/mL），混匀，待凝固后于37 ℃倒置培养24 h，然后进行菌落计数。用无菌水替代ε-PL溶液作为对照。按式（1）计算抑菌率。

$$I_R=\frac{N_0-N}{N_0}\times100\% \quad (1)$$

式中：

I_R——抑菌率，%；

N_0——对照平板上的菌落数，个；

N——相同条件下添加ε-PL平板上的菌落数，个。

1.4.5 pH和温度对ε-PL抑菌活性的影响

采用琼脂稀释法检测pH和温度对ε-PL抑菌活性的影响[25]。按照每培养皿营养琼脂、金黄色葡萄球菌菌悬液和ε-PL溶液总体积为20 mL，以及ε-PL质量浓度为12.5 μg/mL、菌浓度为200~300 CFU/皿的条件进行试验。

1）pH对ε-PL抑菌活性的影响：将融化的灭菌营养琼脂培养基用1 mol/L的HCl溶液或NaOH溶液分别调pH至4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0。制备好的培养皿于37 ℃培养24 h后进行菌落计数。将相同pH下用无菌水替代ε-PL溶液的平板作为对照。按式（1）计算抑菌率。

2）温度对ε-PL抑菌活性的影响：在营养琼脂培养基的自然pH（7.0）条件下，将制备好的平板分别于25、30、35、40 ℃下培养24 h后进行菌落计数。将相同温度下用无菌水替代ε-PL溶液的平板作为对照。按式（1）计算抑菌率。

1.4.6 抑菌动力学曲线的绘制

每150 mL三角瓶装30 mL营养肉汤培养基，设置ε-PL质量浓度为1/2MIC。为考察pH的影响，用1 mol/L的HCl溶液或NaOH溶液将营养肉汤培养基pH分别调至4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0。按体积分数1%接种金黄色葡萄球菌种子液。于37 ℃、200 r/min条件下培养18 h，每2 h取样，测定OD_{600}值。将相同pH、未添加ε-PL的处理作为对照。为考察温度的影响，在营养肉汤培养基的自然pH条件下，设置培养温度分别为25、30、35、40 ℃。将相同培养温度、未添加ε-PL的处理作为对照。以培养时间为横坐标、OD_{600}值为纵坐标绘制抑菌动力学曲线。

1.4.7 蛋白质泄漏测定

为考察pH的影响，吸取金黄色葡萄球菌菌悬液（1×10^9 CFU/mL）5 mL，分别调pH至4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0，加入ε-PL溶液使ε-PL质量浓度为100 μg/mL，混匀，室温静置1 h，8 000 r/min离

心 10 min，吸取上清液，用考马斯亮蓝法测定蛋白质质量浓度。将相同 pH、未添加 ε-PL 的处理作为对照。

为考察温度的影响，吸取金黄色葡萄球菌菌悬液 5 mL，加入 ε-PL 溶液使 ε-PL 质量浓度为 100 μg/mL，分别置于 25、30、35、40 ℃水浴锅中水浴 1 h，8 000 r/min 离心 10 min，吸取上清液，用考马斯亮蓝法测定蛋白质质量浓度。将相同温度、未添加 ε-PL 的处理作为对照。

1.4.8 Live/Dead 荧光染色分析

适当稀释金黄色葡萄球菌菌悬液，将 pH 分别调至 4.0 和 9.0，添加 ε-PL 溶液使 ε-PL 质量浓度为 100 μg/mL，作用 1 h 后调 pH 至 7.0，立即染色。将相同 pH 下用无菌水替代 ε-PL 溶液的处理作为对照。按照试剂盒说明书进行染色，用荧光显微镜观察，激发波长为 488 nm，绿色荧光检测波长为 550 nm，红色荧光检测波长为 610 nm。

1.5 数据处理

所有试验均设 3 个重复，结果以平均值±标准差表示。用 Origin 8.0 软件绘图。利用 SPSS 16.0 软件检验不同处理组之间的差异显著性，$P<0.05$ 代表差异显著。

2 结果和讨论

2.1 ε-PL 对金黄色葡萄球菌的 MIC

ε-PL 质量浓度≤35.0 μg/mL 时，不能完全抑制金黄色葡萄球菌生长；当 ε-PL 质量浓度提高至 40.0 μg/mL 及以上时，菌体生长完全停滞。因此，ε-PL 对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 40.0 μg/mL。多项研究显示，ε-PL 对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 12.5 μg/mL[11,25]，与本研究有一定差异。

2.2 a_w 对 ε-PL 抑菌活性的影响结果

由图 1 可知，不同 a_w 下的抑菌率均随 ε-PL 质量浓度升高而增大。a_w 为 0.994~0.999、ε-PL 质量浓度为 25.0 μg/mL 时，金黄色葡萄球菌停止生长；a_w 降至 0.982 和 0.986 时，有效抑制金黄色葡萄球菌生长的 ε-PL 质量浓度需超过 30.0 μg/mL。综上，高 a_w 时的 ε-PL 抑菌活性更强，可能与高 a_w 有利于 ε-PL 与菌体接触及吸附有关。这与 Sun 等[26]针对沙门氏菌的研究结果类似。

2.3 pH 和温度对 ε-PL 抑菌活性的影响结果

2.3.1 pH 的影响

由图 2 可知，对照组抑菌率在 pH<7.0 时随 pH 升高而下降，当 pH 升至碱性区时抑菌率又开始上升，说明在酸性及碱性条件下金黄色葡萄球菌受到抑制。处理组抑菌率随 pH 升高呈下降、上升、下降再上升的复杂变化趋势，表明不同 pH 条件下 ε-PL 的抑菌活性会发生变化。

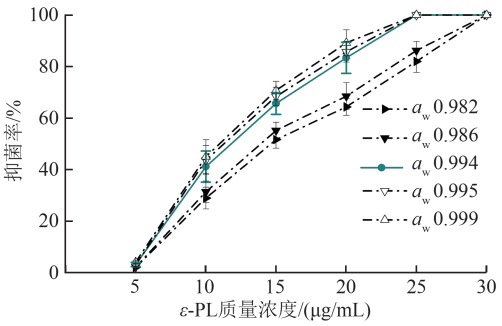
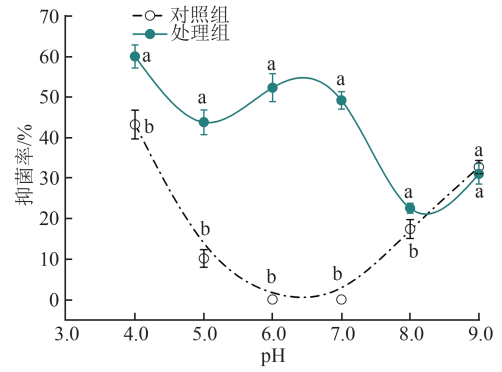


图 1 不同 a_w 下 ε-PL 对金黄色葡萄球菌的抑菌率

Fig. 1 Inhibition rates of ε-PL against *Staphylococcus aureus* under different a_w



不同小写字母表示相同 pH 下对照组与处理组差异显著（$P<0.05$）。

图 2 不同 pH 下 ε-PL 对金黄色葡萄球菌的抑菌率

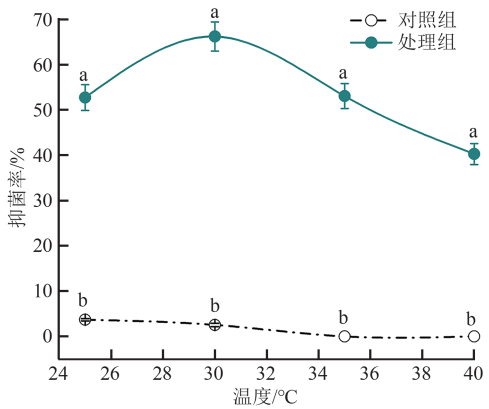
Fig. 2 Inhibition rates of ε-PL against *Staphylococcus aureus* under different pH

当 pH 为 4.0 时，对照组对金黄色葡萄球菌有抑制作用，抑菌率为（43.27±3.56）%，而处理组抑菌率为（60.07±2.87）%，两者之间差异显著（$P<0.05$），说明 ε-PL 显示出抑菌活性。当 pH 为 5.0 及 6.0 时，ε-PL 的抑菌作用明显，抑菌率分别为（43.81±3.05）%和（52.36±3.46）%，显然弱酸性条件下 ε-PL 的抑菌活性更强。当 pH 为 8.0 时，对照组和处理组的抑菌率分别为（17.42±2.33）%和（22.54±1.23）%，说明 ε-PL 显示出一定的抑菌活性（$P<0.05$）。当 pH 为 9.0 时，对照组和处理组的抑菌率分别为（32.76±1.63）%和（31.07±2.53）%，两者间无统计学差异，说明碱性条件下 ε-PL 无抑菌活性。碱性条件下 ε-PL 的抑菌活性下降甚至丧失，可能是

由于OH^-使ε-PL主链上离子化的氨基去质子化，净正电荷趋于零，导致其失去与细胞膜发生静电相互作用的能力，不能吸附至菌体。Ye等[12]的研究也发现，在碱性条件下ε-PL的抑菌活性会减弱。

2.3.2　温度的影响

由图3可知，温度对ε-PL的抑菌活性有较大影响，30 ℃时ε-PL的抑菌率最高。由于ε-PL耐热性能好，其在较高温度下的抑菌活性下降与降解无关，推测与以下2个因素有关：1）与25、30 ℃相比，35、40 ℃更适合金黄色葡萄球菌生长，这在一定程度上抵消了ε-PL对金黄色葡萄球菌的抑制或杀灭作用；2）较高温度下ε-PL与菌体的结合力变弱，降低了其对细胞膜的破坏活性。Ye等[12]研究发现，ε-PL在37 ℃下的抑菌活性高于4 ℃，与本研究结果不同，这可能与培养基物理状态及测试温度不同有关。



相同温度下不同小写字母表示对照组与处理组间差异显著（$P<0.05$）。

图3　不同温度下ε-PL对金黄色葡萄球菌的抑菌率

Fig. 3　Inhibition rates of ε-PL against *Staphylococcus aureus* at different temperatures

2.4　不同pH和温度下ε-PL的抑菌动力学曲线

2.4.1　pH对ε-PL抑菌动力学曲线的影响

由图4可知，当pH为4.0时，对照组和处理组的OD_{600}值缓慢增加，且处理组的增加幅度比对照组更小；在弱酸性及中性（pH 5.0~7.0）条件下，2组菌体生长速度加快，但处理组的菌体生长速度较对照组明显放缓；当pH为8.0时，2组菌体之间的差异明显变小；当pH为9.0时，2组菌体之间的差异不再明显。结果表明，在弱酸性及中性条件下，ε-PL对金黄色葡萄球菌的抑

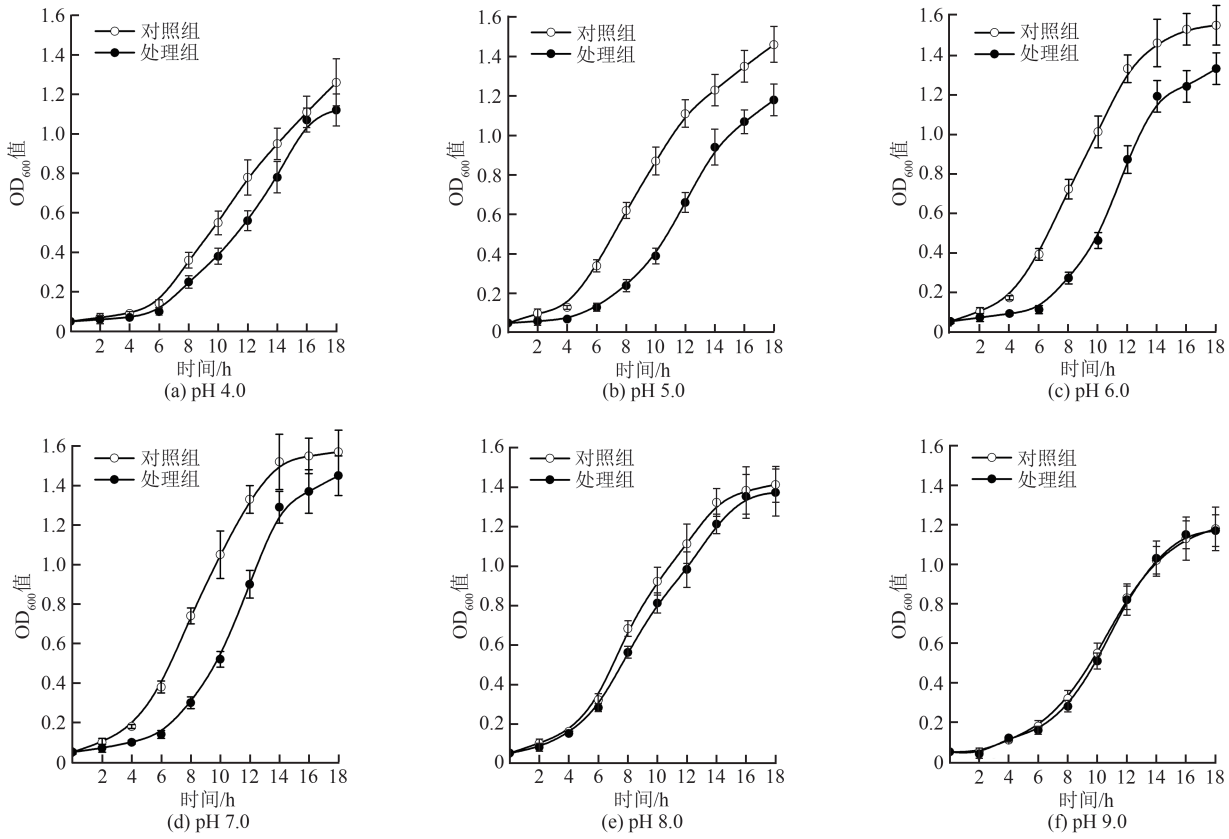


图4　不同pH下ε-PL抑制金黄色葡萄球菌的动力学曲线

Fig. 4　Kinetic curves of *Staphylococcus aureus* inhibition by ε-PL under different pH

菌活性较强，而碱性条件下 ε-PL 无明显抑菌活性。

2.4.2 温度对 ε-PL 抑菌动力学曲线的影响

由图 5 可知，当温度为 25~35 ℃时，对照组与处理组的菌体生长速度的差异较为显著；当温度为 40 ℃时，2 组之间的差异不再明显，说明 ε-PL 在较低温度下具有较强的抑菌活性，但在较高温度下的抑菌活性较弱，这可能与较高温度有利于金黄色葡萄球菌生长，以及较高温度会降低 ε-PL 与菌体的结合力有关。

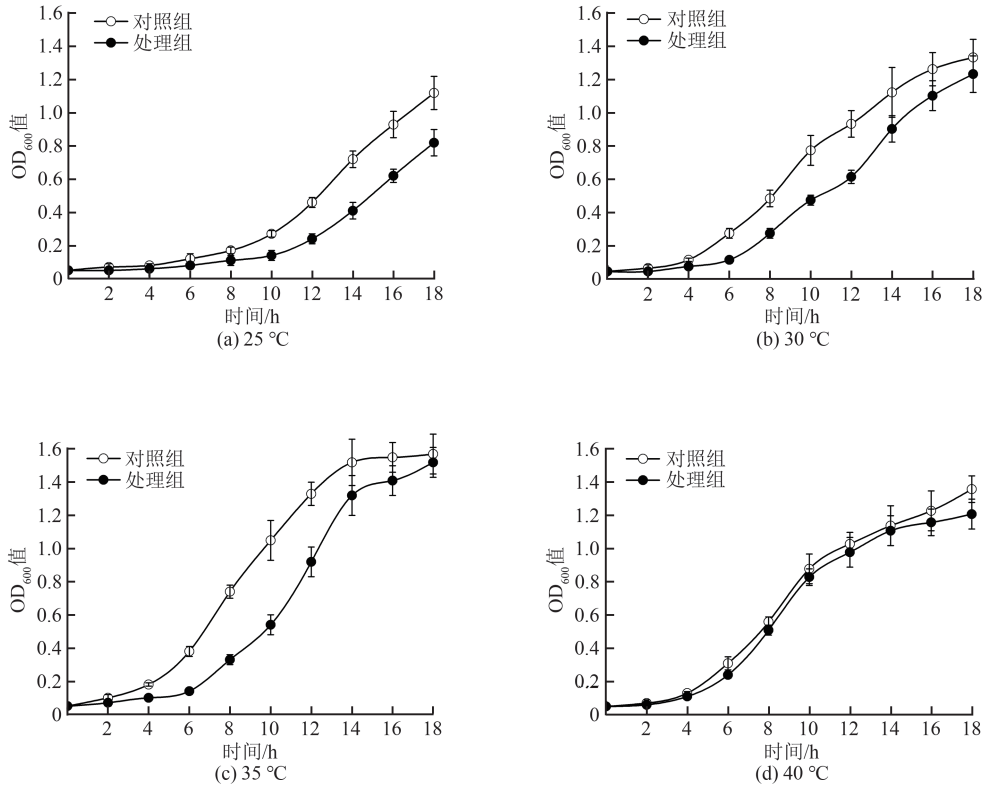


图 5 不同温度下 ε-PL 抑制金黄色葡萄球菌的动力学曲线

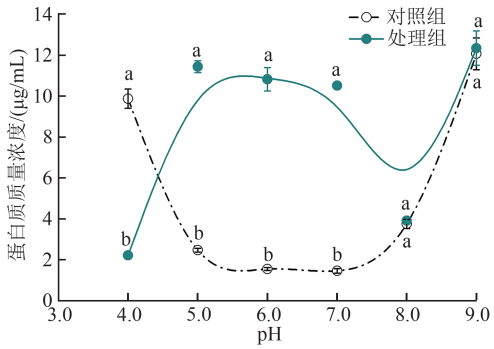
Fig. 5 Kinetic curves of *Staphylococcus aureus* inhibition by ε-PL at different temperatures

2.5 不同 pH 和温度下 ε-PL 对金黄色葡萄球菌细胞膜破坏活性的影响

2.5.1 pH 的影响

生物大分子（核酸及蛋白质）泄漏是评估细胞膜通透性变化的重要指标[25,27]。由图 6 可知，弱酸性及中性（pH 5.0~7.0）条件下，对照组蛋白质泄漏量极低，上清液中蛋白质质量浓度仅为 1.47~2.48 μg/mL，而处理组蛋白质泄漏量较大，上清液中蛋白质质量浓度达到 10.52~11.44 μg/mL，说明弱酸性及中性条件下 ε-PL 对金黄色葡萄球菌细胞膜的破坏作用较强。

当 pH 为 4.0 时，对照组胞内蛋白质有明显泄漏，上清液中蛋白质质量浓度达到 9.88 μg/mL，而处理组上清液中蛋白质质量浓度仅为 2.23 μg/mL，说明添加 ε-PL 抑制了胞内蛋白质的泄漏。由于 ε-PL 在酸性环境下呈 β 折叠构型，而不是无规卷曲[28]，因此推测酸性条件下 ε-PL 可迅速透过细胞膜进入细



不同小写字母表示相同 pH 下对照组与处理组差异显著（$P<0.05$）。

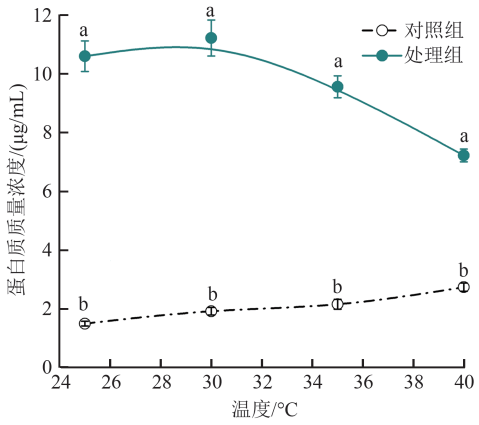
图 6 不同 pH 下 ε-PL 对金黄色葡萄球菌胞内蛋白质泄漏量的影响

Fig. 6 Effect of ε-PL on the intracellular protein leakage of *Staphylococcus aureus* under different pH

胞内，并与胞内物质发生反应，从而抑制蛋白质泄漏。当pH为8.0~9.0时，对照组与处理组的上清液中蛋白质质量浓度差异不明显，表明ε-PL在碱性条件下对金黄色葡萄球菌的细胞膜破坏活性基本丧失，推测是由于ε-PL所带的正电荷被OH^-中和，失去了多聚阳离子特性，不能吸附和结合菌体，从而失去了细胞膜破坏活性。

2.5.2　温度的影响

由图7可知，对照组的蛋白质泄漏量随温度升高而略微增加，但不同温度下的胞内蛋白质泄漏量均极低，上清液中蛋白质质量浓度仅为1.52~2.76 μg/mL；处理组上清液中蛋白质质量浓度随温度升高先增加后降低，当温度为30 ℃时，蛋白质泄漏量最大，而高于该温度后开始下降。表明较低温度下ε-PL对金黄色葡萄球菌的细胞膜破坏活性较大，这可能与较低温度下ε-PL与菌体细胞结合紧密有关，而较高温度下由于ε-PL的扩散能力较强，使得其吸附的菌体量变少，对细胞膜的破坏作用变弱。



不同小写字母表示相同温度下对照组与处理组差异显著（$P<0.05$）。

图7　不同温度下ε-PL对金黄色葡萄球菌胞内蛋白质泄漏的影响

Fig. 7　Effect of ε-PL on the intracellular protein leakage of *Staphylococcus aureus* at different temperatures

2.6　酸性及碱性条件下ε-PL对金黄色葡萄球菌细胞膜通透性的影响

不同pH下，对照组和处理组对金黄色葡萄球菌的Live/Dead荧光染色的荧光显微镜结果见图8。

当pH为4.0时，对照组的菌体大部分呈黄色，绿色、红色和黄色菌体占比分别为（0.76±0.23）%、（0.38±0.06）%、（98.86±12.03）%。推测黄色荧光的形成是由于细胞膜通透性增加，但不足以允许PI染料自由进入细胞，使得核酸仅结合少量PI染料并同时结合较多的SYTO9染料，因此在激光作用下发射黄色荧光。当pH为4.0时，处理组中绿色、红色和黄色菌体占比分别为（2.35±0.62）%、（64.51±8.06）%、（33.14±5.22）%。与对照组相比，处理组中红色菌体占比显著提高，说明酸性条件下ε-PL提高了金黄色葡萄球菌细胞膜的通透性。

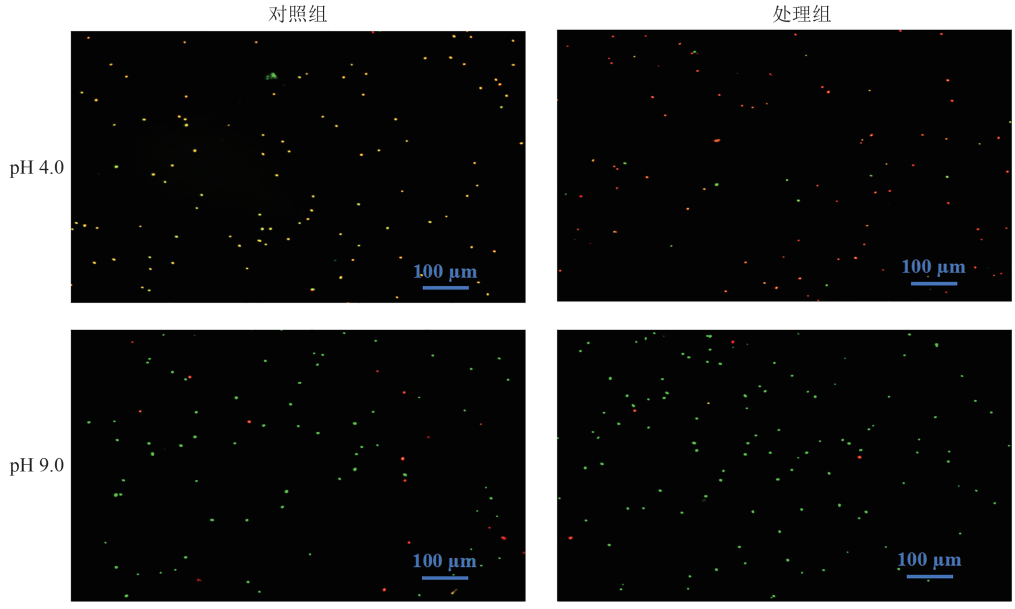


图8　pH 4.0和9.0下ε-PL处理的金黄色葡萄球菌的Live/Dead荧光染色结果

Fig. 8　Live/Dead fluorescence staining results of *Staphylococcus aureus* treated with ε-PL at pH 4.0 and 9.0

Live/Dead荧光染色时，菌体呈非典型黄色荧光较为常见[29]，由此推测试验中的黄色菌体仍有活性。

当pH为9.0时，对照组和处理组的菌体大部分均呈绿色，绿色菌体占比分别为(84.27±11.21)%和(92.23±6.72)%，红色菌体占比分别为(15.73±2.44)%和(7.77±0.83)%，说明碱性条件下ε-PL已失去对金黄色葡萄球菌细胞膜的破坏作用。

3 结论

环境因子pH和温度影响抑菌成分的稳定性和抑菌活性，a_w则与微生物生长有密切关系。作者研究了a_w、pH和温度对ε-PL抑菌活性的影响。结果表明，ε-PL对金黄色葡萄球菌的MIC为40.0 μg/mL，ε-PL对金黄色葡萄球菌的抑菌活性随a_w升高而增强。ε-PL在弱酸性及中性(pH 5.0~7.0)条件下的抑菌活性较强，在酸性(pH 4.0)条件下仍有抑菌活性，在碱性(pH 8.0~9.0)条件下仅有微弱活性或者丧失活性；在中性条件下，30 ℃时ε-PL的抑菌活性最强。ε-PL在弱酸性及中性(pH 5.0~7.0)条件下可导致胞内蛋白质大量泄漏，在酸性(pH 4.0)条件下会抑制蛋白质泄漏，在碱性(pH 8.0~9.0)条件下无影响。在中性条件下，30 ℃时ε-PL对金黄色葡萄球菌的细胞膜破坏活性最强。ε-PL在pH 4.0条件下能提高细胞膜通透性，而在pH 9.0条件下无细胞膜破坏活性。该研究可为ε-PL的抑菌和防腐应用提供参考，同时可为其抑菌机理研究提供理论基础。

参考文献

[1] SHIMA S, SAKAI H. Polylysine produced by *Streptomyces*[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1977,41(9):1807-1809.

[2] HYLDGAARD M, MYGIND T, VAD B S, et al. The antimicrobial mechanism of action of epsilon-poly-*L*-lysine [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(24):7758-7770.

[3] 肖媛，潘兆平，尹春晓，等. ε-聚赖氨酸对柑橘酸腐菌的抑菌活性及作用机制[J]. 食品科学，2020，41(19)：221-229.
XIAO Y, PAN Z P, YIN C X, et al. Antifungal activity and mechanism of ε-polylysine against *Geotrichum citri-aurantii*[J]. Food Science, 2020, 41(19): 221-229. (in Chinese)

[4] HOU Y, WANG F P, TAN Z L, et al. Antifungal mechanisms of ε-poly-*L*-lysine with different molecular weights on *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Korean Journal of Chemical Engineering, 2020, 37(3): 482-492.

[5] HIRAKI J. Basic and applied studies on ε-polylysine[J]. Journal of Antibacterial Antifungal Agents, 1995, 23: 349-354.

[6] HIRAKI J, ICHIKAWA T, NINOMIYA S I, et al. Use of ADME studies to confirm the safety of ε-polylysine as a preservative in food [J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2003, 37(2): 328-340.

[7] SHIH I L, SHEN M H, VAN Y T. Microbial synthesis of poly (ε-lysine) and its various applications [J]. Bioresource Technology, 2006, 97(9): 1148-1159.

[8] MUKHOPADHYAY S, BHARATH PRASAD A S, MEHTA C H, et al. Antimicrobial peptide polymers: no escape to ESKAPE pathogens—a review [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2020, 36(9): 131.

[9] 苏琰，李融. 抗菌肽的食品保鲜应用及生物合成研究进展[J]. 食品与机械，2024，40(7)：208-215.
SU Y, LI R. Advance on biosynthesis of antibacterial peptides and its application in food preservation[J]. Food & Machinery, 2024, 40(7): 208-215. (in Chinese)

[10] TUERSUNTUOHETI T, WANG Z H, WANG Z Y, et al. Review of the application of ε-poly-*L*-lysine in improving food quality and preservation [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2019, 43(10): e14153.

[11] 许超群，陈飞平，梁旭茹，等. 肉桂醛与ε-聚赖氨酸盐酸盐的抑菌活性及其协同抑菌机制初探[J]. 现代食品科技，2023，39(7)：24-31.
XU C Q, CHEN F P, LIANG X R, et al. Preliminary investigation of the antimicrobial activities and synergies of cinnamaldehyde and ε-polylysine hydrochloride [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(7): 24-31. (in Chinese)

[12] YE R S, XU H Y, WAN C X, et al. Antibacterial activity and mechanism of action of ε-poly-*L*-lysine [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2013, 439(1): 148-153.

[13] TAN Z L, SHI Y F, XING B, et al. The antimicrobial effects and mechanism of ε-poly-lysine against *Staphylococcus aureus*[J]. Bioresources and Bioprocessing, 2019, 6(1): 11.

[14] LIN L, GU Y L, LI C Z, et al. Antibacterial mechanism of ε-poly-lysine against *Listeria monocytogenes* and its application on cheese[J]. Food Control, 2018, 91: 76-84.

[15] DOU Y, ROUTLEDGE M N, GONG Y Y, et al. Efficacy of epsilon-poly-*L*-lysine inhibition of postharvest blue mold in apples and potential mechanisms[J]. Postharvest Biology and Technology, 2021, 171: 111346.

[16] LAN W Q，SUN Y Q，ZHANG N N，et al. Effects of ε-polylysine and rosemary extract on quality attributes and microbial communities in vacuum-packaged large yellow croaker（*Pseudosciaena crocea*）during ice storage[J]. Food Science and Biotechnology，2021，30(3)：465-474.

[17] FAN K，ZHANG M，BHANDARI B，et al. A combination treatment of ultrasound and ε-polylysine to improve microorganisms and storage quality of fresh-cut lettuce[J]. LWT-Food Science and Technology，2019，113：108315.

[18] 史文艳，孙震. ε-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 ε-polylysine hydrochloride and Nisin on *Bacillus cereus*[J]. Food & Machinery，2019，35(3)：15-19，103.（in Chinese）

[19] JIA S R，FAN B Q，DAI Y J，et al. Fractionation and characterization of ε-poly-*L*-lysine from *Streptomyces albulus* CGMCC1986 [J]. Food Science and Biotechnology，2010，19(2)：361-366.

[20] CHANG Y H，MCLANDSBOROUGH L，MCCLEMENTS D J. Interaction of cationic antimicrobial（ε-polylysine）with food-grade biopolymers：dextran，chitosan，carrageenan，alginate，and pectin[J]. Food Research International，2014，64：396-401.

[21] 谭之磊，武雅楠，方思棋，等. ε-聚赖氨酸与卵白蛋白间相互作用及对抑菌活性的影响[J]. 食品科学，2018，39(1)：73-77.
TAN Z L，WU Y N，FANG S Q，et al. Interaction of ε-poly-*L*-lysine with ovalbumin and its influence on antibacterial activity[J]. Food Science，2018，39(1)：73-77.（in Chinese）

[22] 江宇航，周褒宇，辛维岗，等. 布氏乳杆菌细菌素BSX01对金黄色葡萄球菌及其生物被膜形成的影响[J]. 食品与生物技术学报，2023，42(11)：19-26.
JIANG Y H，ZHOU H Y，XIN W G，et al. Effect of *Lactobacillus buchneri* bacteriocin BSX01 on *Staphylococcus aureus* and its biofilm formation[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2023，42(11)：19-26.（in Chinese）

[23] YOON J Y，YEOM W，KIM H，et al. Effects of temperature，pH and sodium chloride on antimicrobial activity of magnesium oxide nanoparticles against *E. coli* O157：H7[J]. Journal of Applied Microbiology，2022，133(4)：2474-2483.

[24] JIANG L，WANG F，HAN F，et al. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antimicrobial activity of water-soluble chitosan derivatives[J]. Journal of Applied Microbiology，2013，114(4)：956-963.

[25] LI Y Q，HAN Q，FENG J L，et al. Antibacterial characteristics and mechanisms of ε-poly-lysine against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*[J]. Food Control，2014，43：22-27.

[26] SUN S C，YANG R，XIE Y C，et al. The effect of water activity on thermal resistance of *Salmonella* in chocolate products with different fat contents[J]. Food Control，2024，162：110443.

[27] 肖怀秋，李玉珍，林亲录，等. 金属抗菌肽SIF_4对金黄色葡萄球菌细胞通透性的影响机制[J]. 食品与生物技术学报，2023，42(2)：97-103.
XIAO H Q，LI Y Z，LIN Q L，et al. Mechanism of metal antimicrobial peptide SIF_4 against *Staphylococcus aureus* cell permeability[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2023，42(2)：97-103.（in Chinese）

[28] LIU J N，CHANG S L，XU P W，et al. Structural changes and antibacterial activity of epsilon-poly-*L*-lysine in response to pH and phase transition and their mechanisms [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry，2020，68(4)：1101-1109.

[29] GIÃO M S，WILKS S A，AZEVEDO N F，et al. Validation of SYTO 9/propidium iodide uptake for rapid detection of viable but noncultivable *Legionella pneumophila* [J]. Microbial Ecology，2009，58(1)：56-62.

（责任编辑：闫林红）