

研究报告

鲜榨柠檬原汁对7种常见食源性致病菌抑菌效果及被膜形成的影响

朱安妮,袁宁,唐俊妮,王琼,史辉,马伊萨兰,陈娟,马力
(西南民族大学生命科学与技术学院,四川成都 610041)

摘要:目的 研究鲜榨柠檬果皮和果肉原汁对7种常见食源性致病菌的抑菌效果以及对生物被膜形成的影响。方法 对柠檬果皮和果肉分别榨汁测定总酸;采用顶空取样结合气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)分析鲜榨柠檬果皮和果肉原汁中的主要挥发性成分;采用平板抑菌试验研究两种鲜榨原汁的抑菌效果;采用试管法和96孔板法研究两种鲜榨原汁对细菌生物被膜形成的影响。结果 鲜榨柠檬果肉原汁总酸为98.86 g/kg,鲜榨柠檬果皮原汁总酸为6.05 g/kg;GC-MS结果表明鲜榨柠檬果皮和果肉原汁中主要挥发性成分以柠檬烯、 γ -萜品烯、 α -松油醇、柠檬醛等为主;鲜榨柠檬果肉原汁对7种常见食源性致病菌均具有明显抑菌效果,鲜榨柠檬果皮原汁均未出现明显抑菌作用;鲜榨柠檬果肉原汁对部分细菌被膜形成有抑制作用,鲜榨柠檬果皮原汁对部分细菌被膜形成有明显促进作用。结论 鲜榨柠檬原汁对常见食源性致病菌生长及被膜形成影响的研究为食源性致病菌的防控提供了科学依据。

关键词:鲜榨柠檬原汁;食源性致病菌;抑菌;被膜;气相色谱-质谱联用

中图分类号:R155.5;S666.5 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2016)01-0016-07

DOI:10.13590/j.cjfh.2016.01.004

Antibacterial activity of *Citrus limon* and its effects on biofilm formation to seven common foodborne pathogens

ZHU An-ni, YUAN Ning, TANG Jun-ni, WANG Qiong, SHI Hui, MA Yi-sa-lan, CHEN Juan, MA Li
(College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Sichuan Chengdu 610041, China)

Abstract: Objective To explore the antibacterial activity of lemon peel and pulp fresh juice against seven common foodborne pathogens and its effects on bacteria biofilm formation. **Methods** The fresh lemon peel and pulp juice were prepared by juice extractor. The total acids of fresh lemon peel and pulp juice were determined. Volatile compounds of lemon peel and pulp fresh juice were extracted by headspace sampling and the extracts were detected by gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS). The antibacterial tests of lemon peel and pulp fresh juice were examined on tryptic soy agar (TSA). The bacteria biofilm formations were tested by tube method and 96-well method. **Results** The total acids were 98.86 g/kg for pulp fresh juice, and 6.05 g/kg for peel fresh juice, respectively. GC-MS analysis showed limonene, γ -terpinene, α -terpineol and citral were the main volatile compounds in lemon peel and pulp fresh juice. The growths of seven target pathogens on TSA were inhibited distinctly by lemon pulp juice and did not affect by lemon peel juice. The tube and 96-well methods for the bacterial biofilm formation tests showed that the lemon pulp juice had obvious inhibition to several bacteria biofilm formation, and lemon peel juice had obvious promoting effects to most bacteria biofilm formation. **Conclusion** The effects of lemon juice on common foodborne pathogens and their biofilm formation provide meaningful scientific data for the prevention and control of foodborne pathogens.

Key words: *Citrus limon* fresh juice; foodborne pathogens; antibacterial activity; biofilm; gas chromatography-mass spectrometer

柠檬(*Citrus limon*)属于芸香科柑橘属,是世界

上第三大柑橘类水果作物^[1]。柠檬原产马来西亚,味酸微甘,性微寒,不仅为人体提供必需的维生素、膳食纤维、矿物质、精油,还含有丰富的促进人体健康的酚类化合物,具有消炎、杀菌、抗氧化、抗癌等功效^[2]。另外,柠檬中柠檬酸含量约为6%~7%,可增强胃肠道的酸性环境,弥补胃酸分泌之不足,使无活性的胃蛋白酶原转变成有活性的胃蛋白酶,有助于人体健康^[3]。目前关于柠檬的研究主要集中在果皮提取物的抑菌活性以及柠檬果皮挥发性

收稿日期:2015-10-13

基金项目:2014年度教育部回国留学启动项目;2014年度国家民委中青年英才培养计划;西南民族大学中央高校基本科研业务费专项资金项目(2015NZYQN59)

作者简介:朱安妮 女 硕士生 研究方向为食品加工与安全

E-mail:zhuanni0421@163.com

通信作者:唐俊妮 女 教授 研究方向为食品安全与食品微生物

E-mail:junneytang@aliyun.com

成分分析等方面,如马中苏等^[4]研究了柠檬醛抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的效果评价。王雪梅等^[5]研究了柠檬烯的抑菌活性,认为柠檬烯的抑菌效果优于食品添加剂山梨酸钾和苯甲酸钠。张纬等^[6]认为柠檬提取物具有杀病毒作用。针对柠檬果皮精油的研究方面,如朱晓兰等^[7]的研究表明柠檬皮中主要挥发性成份是萜烯类化合物。章斌等^[8]采用气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)分析柠檬果皮精油抗氧化与抑菌活性。以上研究主要是针对柠檬果皮提取物进行的研究,而在我们日常生活中更多是直接食用新鲜柠檬,如饮用柠檬水,在蔬菜沙拉以及生鱼片等食物上直接挤入柠檬汁等。因此,探讨柠檬鲜榨原汁对食源性常见致病菌的抑菌活性对人们日常生活将具有更实际的指导作用。另一方面,目前细菌耐药引发了一系列公共卫生问题,细菌生物被膜的形成对食品安全以及医院临床治疗带来了严重危害。生物被膜是由微生物细胞及其分泌的胞外基质共同组成的聚合物^[9]。张宏梅等^[10]认为在亚抑菌浓度下提取的柠檬醛对细菌生物被膜形成有一定抑制作用,但新鲜柠檬果皮和果肉鲜榨原汁是否也对细菌被膜形成具有抑制效果还需进一步确认。

因此,本研究将探讨鲜榨新鲜柠檬果皮和果肉原汁对 7 种常见食源性致病菌(金黄色葡萄球菌、阪崎肠杆菌、蜡样芽胞杆菌、肠炎沙门菌、单核细胞增生李斯特菌、福氏志贺菌以及肠出血性大肠杆菌)的抑菌作用以及对各细菌生物被膜形成的影响。以期为人们日常生活提供指导意义,并为食品保健和致病菌的防控提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 样品与菌株来源

新鲜柠檬购于本地水果市场。单核细胞增生李斯特菌(ATCC 19111)、蜡样芽胞杆菌[CMCC(B) 63303]、阪崎肠杆菌(ATCC 29544)、金黄色葡萄球菌(ATCC 6538)由本实验室保藏,福氏志贺菌(CGMCC 1.1868)购自中国普通微生物菌种保藏中心,肠炎沙门菌(CICC 21482)以及肠出血性大肠杆菌 O157:H7(CICC 21530)购自中国工业微生物菌种保藏中心。

1.1.2 主要仪器与试剂

Trace DSQ 型气相色谱质谱联用仪(配备 Triplus 自动进样器,美国 Thermo)、50/30 μm DVB/CAR/PDMS 萃取头(美国 Supelco)、酶标仪(美国 Bio-Tek, Elx-808)、HZQ-F160 全温振荡培养箱、pH

计(pHS-4 C⁺酸度计)、榨汁机、96 孔培养板、UV-6100 分光光度计。

PALCAM 琼脂、PALCAM 琼脂添加剂、Baird-Parker 琼脂基础、阪崎显色培养基、山梨醇麦康凯(SMAC)琼脂、MYP 琼脂培养基、木糖赖氨酸脱氧胆盐(XLD)琼脂、SS 琼脂、胰蛋白胨大豆肉汤及琼脂(TSB 和 TSA)均购自青岛海博有限公司。

1.2 方法

1.2.1 鲜榨柠檬原汁的制备及酸度测定

将新鲜柠檬清洗干净,用无菌水冲洗后,在无菌条件下,将柠檬果皮、果肉分别置于无菌烧杯中,用组织捣碎机榨汁,再用无菌纱布过滤,得到新鲜柠檬果皮和果肉的鲜榨原汁备用。鲜榨柠檬果皮和果肉原汁的总酸测定按照 GB/T 29370—2012《柠檬》^[11]和 GB/T 8210—2011《柑桔鲜果检验方法》^[12]进行操作,并用 pH 计分别测定鲜榨柠檬果皮和果肉原汁的 pH 值。

1.2.2 鲜榨柠檬果皮和果肉原汁挥发性物质检测

将鲜榨新鲜柠檬果皮和果肉原汁适当稀释后,用移液枪分别吸取 5 ml 转入 20 ml 顶空瓶内,同时加入 2 g 氯化钠,加盖密封,作为测试样品。采用 50/30 μm DVB/CAR/PDMS 萃取头进行萃取,萃取温度 80 $^{\circ}\text{C}$,萃取时间 30 min。重复做 3 次。色谱条件参照文献[13]进行。质谱结果经计算机自动检索(NIST08)进行定性分析,同时由 Xcalibur 软件系统完成手动对照检索,要求正反向匹配因子均大于 850,可能性大于 60%。利用面积归一法计算并鉴定各种挥发性物质的相对百分含量。

1.2.3 细菌培养

金黄色葡萄球菌(SA)、阪崎肠杆菌(CRO)、单核细胞增生李斯特菌(LIS)、蜡样芽胞杆菌(BC)、肠炎沙门菌(SAL)、福氏志贺菌(SHI)、肠出血性大肠杆菌(EC)分别在各自的选择性培养基(Baird-Parker 琼脂、阪崎显色培养基、PALCAM 琼脂、MYP 琼脂培养基、XLD 琼脂、SS 琼脂以及 SMAC 琼脂)上划线,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 ~ 48 h,在无菌条件下接种 TSB 肉汤中,37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养备用。

1.2.4 平板抑菌试验测定^[14]

将过夜培养的 7 种细菌培养液分别在 TSA 平板上划线,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温过夜培养,用接种环挑取各自平板上的一个或两个单菌落,放置于无菌的生理盐水中混匀,配制 0.5 麦氏浊度菌悬液,每种细菌做 3 个平行,分别涂布于 TSA 平板上,待平板晾干后,在无菌条件下将平板进行打孔,用移液枪在每个孔里分别滴加 100 μl 的鲜榨柠檬果皮原汁和果肉原汁,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 12 h,观察鲜榨柠檬果皮及果肉

原汁分别对7种常见致病菌的抑菌活性。记录结果并量取抑菌圈直径。

1.2.5 生物被膜形成影响观察^[15]

试管法定性测定:在无菌条件下,将7种不同细菌的过夜培养物按1:100接种到试管中,设对照组、试验组1和试验组2,每组每个待测样品做3个平行。其中,试验组1中含10%的鲜榨柠檬果皮原汁,试验组2含10%的鲜榨柠檬果肉原汁,37℃培养48h。结晶紫染色之后,在自来水下冲洗试管直到所滴下来的水呈无色,将试管倒置晾干,记录观察。

96孔板法定量测定:在无菌条件下,将7种不同细菌的过夜培养物按1:100接种到96孔培养板中,设对照组、试验组1和试验组2,每组每个待测样品做3个平行。向对照组中加入180 μl的TSB和20 μl菌液,试验组中加入160 μl的TSB、20 μl菌液及20 μl鲜榨柠檬果皮或果肉原汁,盖上盖子,37℃培养48h。培养结束,用移液枪移除浮游菌体,吸取200 μl的PBS于96孔板中,洗涤3次,去掉浮游菌和松散的菌体细胞,然后加入100 μl甲醇固定15 min,吸去残液,晾干,再向每孔中加入100 μl 2%的结晶紫,室温放置5 min,吸去残余染液,用清水洗涤至无色水滴,甩尽残余水珠,37℃放置30 min,彻底干燥,加入100 μl 33%的冰乙酸溶解吸附的细胞和结晶紫,用酶标仪在630 nm处测定吸光度值。

1.3 统计学分析

数据采用SPSS 19.0统计软件处理,运用单因素方差分析法比较各组及组间差别, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 鲜榨柠檬果皮和果肉原液的总酸及pH值测定结果

采用碱滴定的方法测得鲜榨柠檬果肉原液的总酸含量为98.86 g/kg,鲜榨柠檬果皮原液的总酸为6.05 g/kg,采用pH计测得鲜榨柠檬果皮原液的pH=5.40,鲜榨柠檬果肉原液的pH=3.28。可见,鲜榨柠檬果肉原液的酸度较强,远远大于鲜榨柠檬果皮原汁。

2.2 鲜榨柠檬果皮和果肉原汁挥发性成分的检测结果

对鲜榨柠檬果皮和果肉原汁中挥发性成分进行检测,结果见表1。在所列举的挥发性物质中,鲜榨柠檬果皮和果肉原汁共有的挥发性物质有18种。鲜榨柠檬果皮原汁主要挥发性成分相对含

量依次为烯类物质35.23%、醛类物质12.99%、醇类物质10.8%、其他物质5.14%,其中以 α -蒎烯、*D*-柠檬烯、 α -松油醇、橙花乙酸酯、 γ -萜品烯、*Z*-柠檬醛、*E*-柠檬醛等为主。鲜榨柠檬果肉原汁主要挥发性成分相对含量:烯类物质43.99%、醛类物质4.55%、醇类物质8.19%、其他物质19.55%,其中以*D*-柠檬烯、 α -松油醇、橙花乙酸酯、 γ -萜品烯等为主。与鲜榨柠檬果皮原汁主要成分相比,鲜榨柠檬果肉原汁中柠檬醛所占比例较少并且不含 α -蒎烯。

2.3 鲜榨柠檬果皮和果肉原液的平板抑菌试验结果

由图1可以看出,在TSA平板上,鲜榨柠檬果肉原汁对7种食源性致病菌均具有很好的抑菌效果,出现了明显的抑菌圈,而鲜榨柠檬果皮原汁对7种食源性致病菌均未出现明显抑菌圈。表2描述的是鲜榨柠檬果皮和果肉原汁对7种致病菌抑菌圈的直径大小,由表2可以看出,鲜榨柠檬果肉原汁对7种细菌的抑菌强度大小依次是:LIS > SA > SHI > BC > EC > CRO > SAL。柠檬果肉的抑菌能力与细菌种类有关,通过SPSS 19.0进行方差分析,LIS与CRO、SAL、EC、SA、SHI及BC之间差异有统计学意义($P < 0.05$),其中,SHI与BC及SHI与SA之间差异无统计学意义($P > 0.05$),EC、CRO和SAL之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。鲜榨柠檬果肉原汁对革兰阳性细菌的抑菌能力要强于革兰阴性细菌(志贺菌除外)。

2.4 鲜榨柠檬果皮和果肉原汁对7种食源性致病菌生物被膜形成影响的观察

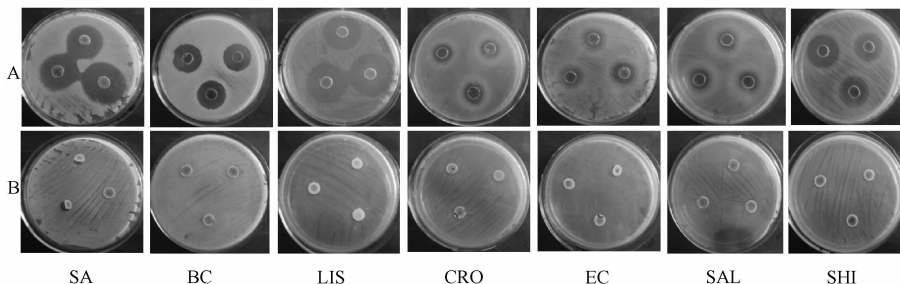
图2是采用试管法定性观察鲜榨柠檬果皮和果肉原汁对7种细菌生物被膜形成的影响,由图2可以看出,对照组TSB中,只有SA和BC两种细菌可以在试管上形成明显的生物被膜,添加鲜榨柠檬果皮原液的试验组中,SHI、CRO、EC和LIS4种细菌的生物被膜也形成明显,说明鲜榨柠檬果皮原汁对细菌被膜有很好的促进作用;相反,添加鲜榨柠檬果肉原液的试验组中,可以看出鲜榨柠檬果肉原汁对SA和BC两种细菌生物被膜形成有明显的清除作用。但是,也要注意鲜榨柠檬果皮原汁对SAL生物被膜形成影响和其他细菌不一致(见图2)。重复试验仍然证实鲜榨柠檬果皮原汁对沙门菌的被膜形成有部分抑制作用。

图3是采用96孔板法定量观察鲜榨柠檬果皮和果肉原汁对7种细菌生物被膜形成的影响。由图3可以看出,鲜榨柠檬果皮原汁对SHI、SA、CRO、EC、LIS以及SAL的生物被膜形成均有促进作用(BC除外),鲜榨柠檬果肉原汁对SA、BC、LIS以及

表1 鲜榨柠檬果皮/果肉原汁的主要挥发性物质
Table 1 Main volatile compounds of lemon peel fresh juice

化学式	分子式	相对百分含量/%		保留时间/min	
		柠檬果皮汁	柠檬果皮汁	柠檬果肉汁	柠檬果肉汁
反-1-甲基-4-(1-甲基乙基)-2-环己烯-1-醇	C ₁₀ H ₁₈ O	0.04	11.21	—	—
1-甲基-4-(1-甲基乙基)-环己醇*	C ₁₀ H ₁₈ O	0.03	11.52	11.40	0.17
顺-4-甲基-1-(1-甲基乙基)-3-环己烯-1-醇*	C ₁₀ H ₁₈ O	2.61	12.09	11.92	0.97
反-3,7-二甲基-,6-辛二烯-1-醇*	C ₁₀ H ₁₈ O	0.53	13.25	12.97	0.20
α-松油醇*	C ₁₀ H ₁₈ O	2.66	12.29	12.15	5.14
顺-3-甲基-6-(1-甲基乙基)-2-环己烯-1-醇	C ₁₀ H ₁₈ O	0.03	12.45	—	—
顺-3,7-二甲基-2,6-辛二烯-1-醇	C ₁₀ H ₁₈ O	0.55	12.81	—	—
对-薄荷-1(7),8(10)-二烯-9-醇	C ₁₀ H ₁₆ O	0.04	13.65	—	—
反-3,7,11-三甲基-1,6,10-十二碳烯-3-醇	C ₁₅ H ₂₆ O	0.03	17.02	—	—
红没药醇*	C ₁₅ H ₂₆ O	0.32	18.49	18.46	0.89
乙醇	C ₂ H ₆ O	—	—	1.57	0.29
3,7-二甲基-1,6-辛二烯-3-醇	C ₁₀ H ₁₈ O	—	—	10.66	0.24
2,6-二甲基-5,7-辛二烯-2-醇	C ₁₀ H ₁₈ O	—	—	11.65	0.29
3,7-二甲基-2,6-辛二烯酸甲酯	C ₁₁ H ₁₈ O ₂	0.05	2.27	—	—
橙花乙酸酯*	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	4.94	14.63	14.50	8.22
柠檬烯-6-醇特戊酸酯	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	0.01	16.95	—	—
反-3,7-二甲基-2,6-辛二烯-1-醇乙酸酯	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	—	—	14.73	3.27
1-乙烯基-1-甲基-2-(1-甲基乙基)-4-(1-甲基乙基)-环己烷	C ₁₅ H ₂₄	0.11	14.25	—	—
4-异丙烯基甲苯	C ₁₀ H ₁₂	—	—	10.55	5.68
3-己烯醛	C ₆ H ₁₀ O	0.02	5.40	—	—
反-2-己烯醛	C ₆ H ₁₀ O	0.03	6.39	—	—
壬醛*	C ₉ H ₁₈ O	1.58	10.97	10.73	0.78
癸醛*	C ₁₀ H ₂₀ O	0.55	12.36	12.27	1.26
E-柠檬醛*	C ₁₀ H ₁₆ O	6.52	13.51	13.22	1.20
Z-柠檬醛*	C ₁₀ H ₁₆ O	3.69	13.01	12.81	0.28
十一醛*	C ₁₁ H ₂₂ O	0.53	13.80	13.70	0.75
十四碳醛	C ₁₄ H ₂₈ O	0.04	17.55	—	—
3,7,11-三甲基-2,6,10-十二烷三烯醛	C ₁₅ H ₂₄ O	0.03	19.04	—	—
反-2-壬烯醛	C ₉ H ₁₆ O	—	—	11.59	0.12
3-氨基-2,3-二羟基苯甲酸	C ₇ H ₉ NO ₂	0.01	1.59	—	—
正十六烷酸*	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	0.02	21.18	21.18	0.14
十四烷酸	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	—	—	19.13	0.21
D-柠檬烯*	C ₁₀ H ₁₆	0.22	9.68	9.64	33.11
γ-蒈品烯*	C ₁₀ H ₁₆	11.04	10.62	10.07	8.06
2-羟基丙烯酰胺	C ₃ H ₇ NO ₂	0.14	1.56	—	—
α-蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	9.17	8.83	—	—
1,3,8-对薄荷三烯*	C ₁₀ H ₁₄	0.05	11.09	10.89	0.62
2,6-二甲基-6-(4-甲基-3-戊烯基)-双环[3.1.1]庚-2-烯*	C ₁₅ H ₂₄	0.27	15.32	15.49	1.12
α-石竹烯*	C ₁₅ H ₂₄	0.51	15.87	15.80	0.27
1-甲基-4-(1-亚甲基-5-甲基-4-己烯基)环己烯*	C ₁₅ H ₂₄	5.43	16.58	16.39	2.73
1-甲基-1,4-环己二烯	C ₇ H ₁₀	—	—	4.85	0.08
2-乙烯基-四氢-2,6,6-三甲基-二氢-吡喃	C ₁₀ H ₁₈ O	—	—	8.55	0.15
1,2,3,4-四氢-1,1,6-三甲基萘	C ₁₃ H ₁₈	—	—	11.82	1.18
3-乙基-2,3-二氢-1,1-二甲苯-1-氢-茛	C ₁₃ H ₁₆	—	—	14.94	0.10

注: * 为鲜榨柠檬果皮和果肉原汁中共有的挥发性物质;—为未检出



注: A 为鲜榨柠檬果肉原汁抑菌效果;B 为鲜榨柠檬果皮原汁抑菌效果;SA 为金黄色葡萄球菌;CRO 为阪崎肠杆菌; LIS 为单核细胞增生李斯特菌;BC 为蜡样芽胞杆菌;SAL 为肠炎沙门菌;SHI 为福氏志贺菌;EC 为肠出血性大肠杆菌

图1 鲜榨柠檬果皮及果肉原汁对7种食源性致病菌的平板抑菌效果

Figure 1 Antibacterial activity of lemon peel and pulp fresh juice against seven foodborne pathogens

表2 鲜榨柠檬果皮和果肉原汁对7种食源性致病菌抑菌圈的直径大小($\bar{x} \pm s$, cm)

Table 2 Inhibition zone size of lemon peel and pulp fresh juice against seven foodborne pathogens

菌株名称	鲜榨柠檬果皮原汁 抑菌圈直径	鲜榨柠檬果肉原汁 抑菌圈直径
SA	—	2.350 0 ± 0.546 81 ^b
BC	—	2.100 0 ± 0.154 92 ^c
LIS	—	2.733 3 ± 0.287 52 ^a
CRO	—	1.400 0 ± 0.109 54 ^d
EC	—	1.450 0 ± 0.137 84 ^d
SAL	—	1.400 0 ± 0.089 44 ^d
SHI	—	2.150 0 ± 0.207 36 ^{bc}

注:—表示无抑菌圈直径;a,b,c表示菌株之间差异,相同表示差异无统计学意义($P > 0.05$),不同则表示差异有统计学意义($P < 0.05$)

SAL生物被膜的形成均有抑制作用,但对SHI、CRO和EC的被膜形成有促进作用。

3 讨论

鲜柠檬具有清热解渴、增进食欲、解毒美容等功效。民间流传认为柠檬果实可治疗流行性疾病、消炎退烧及解酒;柠檬果皮可解毒、镇痛、化痰和增进食欲等。现代研究表明柠檬具有抗氧化、抗炎和抗感染等多种疗效^[16]。本试验利用新鲜柠檬分别将柠檬果皮和果肉分开进行榨汁,研究鲜榨柠檬果皮和果肉原汁分别对7种常见致病菌的抑菌效果以及对生物被膜形成的影响。

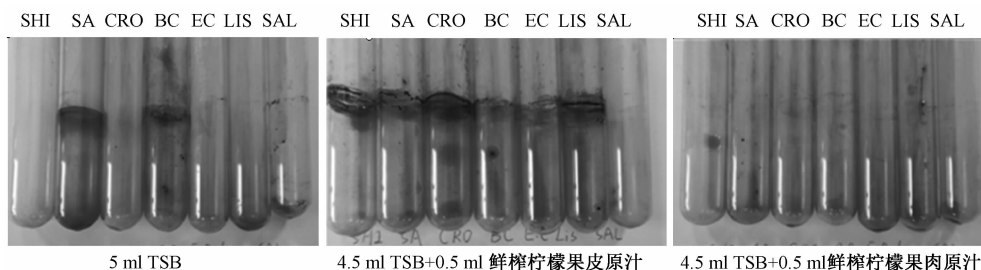


图2 试管法定性观察鲜榨柠檬果皮和果肉原汁对7种细菌生物被膜形成的影响

Figure 2 Influence of lemon peel and pulp fresh juice on seven foodborne pathogens biofilm formation by tube test method

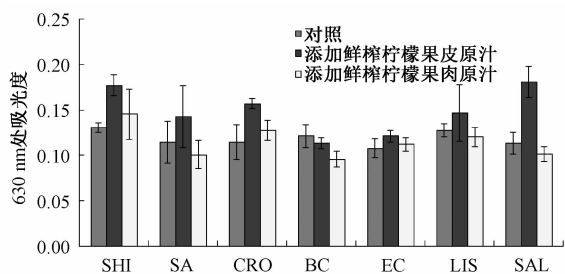


图3 96孔板法定量观察鲜榨柠檬果皮和果肉原汁对7种细菌生物被膜形成的影响

Figure 3 Influence of lemon peel and pulp fresh juice on seven foodborne pathogens biofilm formation by 96-well culture method

本研究采用顶空取样并结合GC-MS对鲜榨柠檬果皮和果肉原汁的挥发性成分进行分析和比较,在鲜榨柠檬果皮原汁中鉴定了32种挥发性成分,以D-柠檬烯、 α -蒎烯、 α -松油醇、 γ -萜品烯、橙花乙酸酯、Z-柠檬醛及E-柠檬醛为主要挥发性物质。章斌等^[8]采用GC-MS分析经水蒸气蒸馏法所提柠檬果皮精油的化学组分,共鉴定出23种挥发性成分,以D-柠檬烯、 γ -萜品烯、 α -松油醇和E-柠檬醛等为主。本研究的GC-MS结果与章斌等^[8]的结果具有很好的 consistency。目前很少有人针对鲜榨柠檬果肉原汁的挥发性成分进行检测,本研究所列举的31种果肉挥发性物质中,以D-柠檬烯、 α -松油醇、橙花乙酸酯、 γ -萜品烯为主,与鲜榨柠檬果皮原汁中的挥发性

成分相比,鲜榨柠檬果肉原汁中柠檬醛所含比例较少,另外,鲜榨柠檬果肉原汁中不含 α -蒎烯。现有的文献报道^[17],柠檬醛可以影响细菌的呼吸作用和细胞膜的功能,从而导致细菌的代谢紊乱。马中苏等^[4]的研究也显示柠檬醛对金黄色葡萄球菌的抑制能力明显强于大肠杆菌。王雪梅等^[5]认为柠檬烯对真菌的抑制效果较好,对大肠杆菌有一定抑菌活性,但对金黄色葡萄球菌抑菌不明显。柠檬醛和柠檬烯被证实是果皮精油的主要抑菌成分。本研究对鲜榨柠檬果皮和果肉原汁的抑菌活性分开进行探讨,鲜榨柠檬果皮原汁未出现明显的抑菌效果,与文献报道^[4-5,17]的果皮提取物抑菌活性有一定差异,究其原因,本研究用的是鲜榨柠檬果皮原汁而非提取的柠檬精油。另一方面,本研究的GC-MS试验结果显示,鲜榨柠檬果肉原汁中烯类物质的相对百分比含量大于醛类物质;鲜榨柠檬果皮原汁中醛类物质的相对百分比含量大于烯类物质,这些物质的差异可能会造成鲜榨柠檬果皮和果肉原汁抑菌活性的差异。进一步通过总酸的测定发现鲜榨柠檬果皮原汁的酸度为6.05 g/kg,而鲜榨柠檬果肉原汁的酸度为98.86 g/kg。鲜榨柠檬果肉原汁对7种常见食源性致病菌表现出很强的抑菌效果。综合GC-MS的检测结果和总酸测定结果,推测酸度在鲜榨柠檬果肉原汁抑菌活性中起着决定性的作用。马艳丽等^[18]也通过最小抑菌浓度试验证明柠檬酸

对嗜水气单胞菌、副溶血性弧菌和荧光假单胞菌有明显抑菌效果,这一点吻合了本试验的推测。本研究同时发现鲜榨柠檬果肉原汁对革兰阳性细菌抑菌强度更好,推测革兰阳性细菌的耐酸能力可能弱于革兰阴性细菌。另外,值得一提的是柠檬烯在鲜榨柠檬果肉原汁中的含量比鲜榨柠檬果皮原汁丰富,因此,鲜榨柠檬果肉原汁的强烈抑菌活性除了酸的作用,柠檬烯的抑菌作用也不能排除,但还需要进一步证实。通过本试验的研究,认为在日常生活中饮用柠檬水,或采用柠檬汁作为凉拌菜的调味料都能起到很好的抑菌效果。目前抗生素的耐药是严重的公共卫生问题,柠檬汁的抑菌效果也许可为临床治疗打开一个新的思路。

在生物被膜测试试验中,试管法和96孔板法两种方法之间可能存在一定差异,可能不同的试验材质对细菌被膜形成会造成很大影响。试管法的结果让本课题组意外发现鲜榨柠檬果皮原汁能强烈促进部分细菌生物被膜的形成,这个论点目前鲜见描述。对于4株在TSB中不形成被膜的细菌(福氏志贺菌、阪崎肠杆菌、肠出血性大肠杆菌和单核细胞增生李斯特菌),通过在培养基中加入1/10的鲜榨柠檬果皮原汁,4种细菌的被膜形成能力明显增强,采用试管法非常直观,说明柠檬果皮中的某些物质对细菌生物被膜形成具有很好促进作用。相反,鲜榨柠檬果肉原汁对两株本来在TSB中形成被膜的细菌(金黄色葡萄球菌和蜡样芽胞杆菌)有明显的去除作用。细菌生物被膜是细菌细胞通过自身合成分泌的蛋白质、脂质、核酸和多糖等胞外多聚物粘附在固体表面,以固着的方式生长,最后形成具有三维结构的成熟生物被膜^[19-21]。可见,生物被膜的形成受到细菌自身生长、代谢和环境等多方面因素的影响。本研究中发现鲜榨柠檬果肉原汁可以抑制细菌生物被膜的形成,分析其原因,一方面可能是由于鲜榨柠檬果肉原汁使细菌自身的生长或代谢受到抑制,另一方面也可能是鲜榨柠檬果肉原汁抑制细菌生物被膜的形成。而鲜榨柠檬果皮原汁对4种细菌(福氏志贺菌、阪崎肠杆菌、肠出血性大肠杆菌和单核细胞增生李斯特菌)的生物被膜形成有明显的促进作用,同时鲜榨柠檬果皮原汁对细菌生长没有抑制作用。鲜榨柠檬果皮和果肉原汁对生物被膜形成影响的具体机制还需要在今后的研究中进一步深入。另外,受试材质也是一个很重要的影响因素,例如:张娜等^[22]研究了不同食品接触表面对金黄色葡萄球菌被膜形成的影响,认为不锈钢材质表面被膜形成的效果最好,玻璃其次,PE塑料的效果最差。可见,不同接触材质可以明显影

响细菌被膜的形成,这个结果也可部分解释本试验中两种材质造成细菌被膜形成的差异性。总的说来,鲜榨柠檬果皮原汁成分能够促进部分细菌的生物被膜形成,而鲜榨柠檬果肉原汁成分能抑制部分细菌的生物被膜形成。

综上所述,本研究表明鲜榨柠檬果肉原汁对7种常见致病菌具有明显的抑菌效果,对革兰阳性细菌的抑菌活性大于革兰阴性细菌,鲜榨柠檬果皮原汁对7种常见致病菌均未出现明显的抑菌作用。试管法和96孔板法针对细菌生物被膜形成能力试验结果表明鲜榨柠檬果肉原汁对细菌被膜形成能力具有一定抑制作用,而鲜榨柠檬果皮原汁对细菌成膜能力具有部分促进作用。本研究结果可为食品保鲜保健以及食源性致病菌的防控提供一定的科学依据,也对人们日常生活具有很好的指导意义。

参考文献

- [1] 周先艳,朱春华,沈正松,等. 柠檬抗癌活性成分研究进展[J]. 江西农业学报,2014,26(6):49-53.
- [2] González-Molina E, Domínguez-Perles R, Moreno D A, et al. Natural bioactive compounds of *Citrus limon* for food and health [J]. J Pharm Biomed Anal,2010,51(2):327-45.
- [3] 朱珍,谢向党,潘虹,等. 柠檬酸、唑乙醇对早期断奶仔猪生长的影响[J]. 畜牧与兽医,1997,29(2):66-67.
- [4] 马中苏,王新伟,刘欢,等. 牛至油、香芹酚、柠檬醛和肉桂醛抑菌作用研究[J]. 食品工业,2010(5):13-15.
- [5] 王雪梅,谌徽,李雪蛟,等. 天然活性单萜——柠檬烯的抑菌性能研究[J]. 吉林农业大学学报,2010,32(1):24-28.
- [6] 张纬,黄海,孙晓明,等. 柠檬提取物抑菌、杀灭病毒作用机制研究[J]. 中国微生态学杂志,2009,21(5):431-433.
- [7] 朱晓兰,吕春伟. 柠檬皮挥发性化学成份的气相色谱-质谱分析[J]. 安徽农业大学学报,2003,30(2):224-226.
- [8] 章斌,侯小桢,秦铁等. 柠檬果皮精油的化学组成、抗氧化及抑菌活性研究[J]. 食品工业科技,2015,36(5):126-131.
- [9] 王琼,唐俊妮,陈娟,等. 金黄色葡萄球菌生物被膜检测及控制方法研究进展[J]. 食品工业科技,2014,35(22):371-375.
- [10] 张宏梅,张文艳,谢斯丽,等. 茶多酚、柠檬醛和肉桂醛对食源菌生物被膜的影响研究[J]. 中国调味品,2012,37(11):55-58.
- [11] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. GB/T 29370—2012 柠檬[S]. 北京:中国标准出版社,2012.
- [12] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. GB/T 8210—2011 柑桔鲜果检验方法[S]. 北京:中国标准出版社,2011.
- [13] 史辉,唐俊妮,陈娟,等. 顶空固相微萃取分析金黄色葡萄球菌挥发性代谢产物的条件优化[J]. 食品科学,2015,36(12):185-190.
- [14] 唐俊妮,王琼,陈娟,等. 洋葱汁对五种常见食源性病原细菌抑菌效果研究[J]. 西南民族大学学报:自然科学版,2015,41(3):277-284.
- [15] 唐俊妮,康名松,陈焕春,等. 葡萄球菌核酸酶对金黄色葡萄

- 球菌和其他细菌生物被膜形成的抑制作用[J]. 中国科学:生命科学, 2011, 41(7):586-592.
- [16] 邱良雪. 柠檬提取物体外对新城疫病毒和柯萨奇病毒 B₃ 的杀灭作用及其抑菌作用的研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2006.
- [17] 方德秋. 柠檬醛及香精油的抗菌性研究概述[J]. 天然产物研究与开发, 1994, 6(2):75-77.
- [18] 马艳丽, 齐树亭, 樊盛菊. 柠檬酸对 3 种常见水产病原菌的抑菌作用[J]. 城市环境与城市生态, 2005, 18(3):14-16.
- [19] Bullitt E, Makowski L. Structural polymorphism of bacterial adhesion pili[J]. Nature, 1995, 373(6510):164-167.
- [20] Flemming H C, Wingender J. The biofilm matrix[J]. Nat Rev Microbiol, 2010, 8(9):623-633.
- [21] 戚韩英, 汪文斌, 朱亮. 生物膜形成机理及影响因素探究[J]. 微生物学通报, 2013, 40(4):677-685.
- [22] 张娜, 韩北忠, 李敏, 等. 食品接触表面对金黄色葡萄球菌生物被膜形成的影响[J]. 食品研究与开发, 2006, 127(7):33-35.

研究报告

柠檬苦素对自然衰老大鼠抗氧化和学习记忆能力的影响

李林子, 胡文敏, 唐靓, 张岭, 张丽婧, 胡志航, 陈建国, 刘冬英, 刘臻, 王茵
(浙江省医学科学院, 浙江 杭州 310013)

摘要:目的 探讨柠檬苦素(limonin)对自然衰老大鼠学习记忆能力及因衰老而导致机体氧化损伤的影响。方法 采用 18 月龄雄性 SD 大鼠作为自然衰老模型, 随机分为衰老对照组和 Limonin 组(50、150 mg/kg), 连续灌胃 6 周。试验第 7 周时采用 Morris 水迷宫测定大鼠学习记忆能力, 并进行大鼠血清及脑组织氧化水平及抗氧化能力检测。结果 与衰老对照组相比, Limonin 高、低剂量组大鼠在隐藏平台获得试验中潜伏期和游泳总路程均明显减少, 在空间探索试验中穿过原安全平台次数、原安全平台所在象限活动时间和活动路程均明显增加, 同时 Limonin 能降低衰老模型小鼠血清及脑组织丙二醛、脂褐素水平, 提高血清及脑组织中超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶活力及脑组织中总抗氧化的能力。结论 Limonin 能改善自然衰老大鼠的学习记忆能力, 提高脑组织的抗氧化能力, 具有一定的延缓脑衰老的作用。

关键词:柠檬苦素; 衰老; 抗氧化; 学习记忆; Morris 水迷宫; 抗衰老; 保健食品

中图分类号: R155.5; S865.1⁺2 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2016)01-0022-06

DOI: 10.13590/j.cjfh.2016.01.005

Effect of limonin on learning and memory ability and antioxidant capacity of natural apolexis rats

LI Lin-zi, HU Wen-min, TANG Liang, ZHANG Ling, ZHANG Li-jing, HU Zhi-hang,
CHEN Jian-guo, LIU Dong-ying, LIU Zhen, WANG Yin
(Zhejiang Academy of Medical Sciences, Zhejiang Hangzhou 310013, China)

Abstract: Objective This study aims to investigate the effects of limonin on learning and memory abilities and antioxidant capacity of natural apolexis rats. **Methods** 18 months male SD rats was used as natural apolexis model, and randomly divided into control group and limonin group (50, 150 mg/kg), and then continuous lavage for 6 weeks. At seventh week of the experiment, the learning and memory ability were determined by Morris water maze, and the oxidation and anti-oxidation ability was detected in rat serum and brain tissue. **Results** Different doses of limonin could reduce the time of reaching the end and the total distance of swimming, the times through original security platform, the original security platform in quadrant activity time and distance in space exploration test were significantly increased, and limonin could reduce MDA and Lipo levels in natural apolexis rats serum and brain tissue, increase the SOD, GSH-Px activities in serum and brain tissue and the ability of T-AOC in brain tissue. **Conclusion** Limonin could improve the learning and memory ability of natural apolexis rats, improve the antioxidant ability of brain tissue, delay the aging of the brain function.

收稿日期: 2015-09-26

基金项目: 食品(保健食品)质量安全评价研究实验室建设(2015F10014); 浙江省医药卫生平台重点资助计划(2014ZDA004); 浙江省营养学医学支撑学科建设(11-zc03); 浙江省科技厅项目(2011F20038); 浙江省 151 人才培养项目

作者简介: 李林子 男 初级研究员 研究方向为生物活性物质的功效与毒理学 E-mail: lilinzi1989@163.com

通信作者: 王茵 女 研究员 研究方向为营养与健康关系 E-mail: wy3333@163.com