

胎菊水提物对大肠杆菌的抑制作用及应用

Antimicrobial activity of *Chrysanthemum buds* aqueous extract on *Escherichia coli* and its application

费 鹏¹ 邢 敏¹ 焦超芹² 杨宝鑫² 胡新颖¹
FEI Peng¹ XING Min¹ JIAO Chao-qin² YANG Bao-xin² HU Xin-ying¹
邵安冉¹ 芦 淋² 康怀彬¹ 郭 鸽²
SHAO An-ran¹ LU Lin² KANG Huai-bin¹ GUO Ling²

(1. 河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471023;

2. 东北农业大学食品学院乳品科学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

(1. College of Food and Biological Engineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471023, China; 2. Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education Food Science College, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

摘要:研究旨在评估胎菊水提物对大肠杆菌的抑制作用并探讨其在肉制品中的应用。通过测量抑菌圈直径(DIZ)、最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)评价胎菊水提物对大肠杆菌的抑菌活性。通过对受试细菌生长曲线、胞内ATP浓度、细胞膜电位及细胞形态的研究揭示其作用机制。最后将胎菊水提物应用于熟猪肉的保鲜中。结果表明,胎菊水提物对大肠杆菌的DIZ、MIC和MBC分别为 $(12.40 \pm 0.32) \sim (13.80 \pm 0.41)$ mm、 $10 \sim 20$ mg/mL和 $20 \sim 40$ mg/mL。胎菊水提物能够延长大肠杆菌的迟缓期,缩短对数期、降低胞内ATP浓度,引起细胞膜去极化,破坏细胞形态,导致细胞液泄漏。此外,胎菊水提物可以降低熟猪肉贮藏期内大肠杆菌的数量($P < 0.05$),且当质量浓度为1 MIC时,胎菊水提物对熟猪肉色度的影响不显著($P > 0.05$)。

关键词:胎菊;水提物;大肠杆菌;抑制作用;肉制品;应用

Abstract: The purpose of this study was to evaluate the antimicrobial activity of *Chrysanthemum buds* aqueous extract (CBAE) on *Escherichia coli*, and discuss its application in meat products. The antimicrobial activity of CBAE against *E. coli* was evaluated by the determination of diameter of the inhibition zone (DIZ), minimum inhibitory concentration (MIC), and minimum bacteri-

cidal concentration (MBC). The possible action mechanism was revealed by the effect of CBAE on the growth curve, and the changes in intracellular ATP concentration, cell membrane potential, and cell morphology. Finally, the CBAE was used in the preservation of cooked pork. The results showed that the DIZ, MIC, and MBC values of CBAE against *E. coli* were (12.4 ± 0.32) mm to (13.8 ± 0.41) mm, $10 \sim 20$ mg/mL, and $20 \sim 40$ mg/mL, respectively. The CBAE could prolong the retardation period of *E. coli*, shorten the logarithmic period, reduce the intracellular ATP concentration, cause the depolarization of cell membrane, destroy cell morphology, and lead to cell fluid leakage. In addition, the CBAE could reduce the amount of *E. coli* during cooked pork storage ($P < 0.05$), and when the concentration was 1 MIC, the effect of CBAE on the color of cooked pork was not significant ($P > 0.05$).

Keywords: *Chrysanthemum buds* aqueous extract; *Escherichia coli*; antimicrobial activity; meat product; application

大肠杆菌(*Escherichia coli*)又称大肠埃希氏菌,是一种革兰氏阴性、无芽孢、兼性厌氧的食源性条件致病菌,广泛存在于蔬菜、水果、外界环境以及牛肉、鸡肉、牛奶等动物源食品中^[1-2]。该微生物为条件致病菌,一般条件下不致病,但某些特殊血清型的大肠杆菌可引起人或动物呕吐、腹泻、败血症等,严重者可导致患者死亡^[3]。目前,关于大肠杆菌污染食品及加工环境的报道已被大量报道^[4-7],因此,如何有效预防和控制大肠杆菌对食品污染是亟待解决的问题。

基金项目:河南省科技公关项目(编号:202102110290);河南科技大学博士科研启动基金项目(编号:13480066)。

作者简介:费鹏,女,河南科技大学讲师,博士。

通信作者:郭鸽(1975—),女,东北农业大学副教授,博士。

E-mail: guoling@neau.edu.cn

收稿日期:2020-04-21

人们常在食品的运输、加工等过程中添加化学合成防腐剂以抑制或杀灭病原微生物来延长食品的货架期,保证食品质量^[8]。但随着食源性致病菌耐药性的增强及化学防腐剂对人体健康造成的不良影响,使得越来越多的研究者开始倾向于利用植物源活性物质作为天然的抑菌剂发挥杀菌功效^[9-10]。胎菊是杭白菊上品的一种,富含挥发油类、酚类、黄酮类化合物等活性成分,具有抗肿瘤、抗菌、抗氧化、降血压等生物活性^[11]。黄涵年^[12]通过牛津杯法测定了杭白菊总黄酮提取物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌及单核细胞增生李斯特菌的抑菌效果,结果表明杭白菊总黄酮提取物对4种供试菌均有一定的抑制作用。吕都^[13]发现杭白菊挥发油对大肠杆菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、枯草芽孢杆菌均有一定的抑菌活性,其最小抑菌浓度为0.325%~1.300%。上述研究表明胎菊提取物对食源性致病菌具有一定的抑菌效果,然而,其可能的抑菌机理和应用并未被深入挖掘。

研究拟以大肠杆菌为供试菌株,以水为溶剂对胎菊进行提取,并评估胎菊水提取物对大肠杆菌的抑菌效果;通过检测胎菊水提取物对大肠杆菌生长曲线、胞内ATP浓度、膜电位、细胞形态的影响揭示其可能的抑菌途径;将胎菊水提取物应用于熟猪肉的保藏中,以期开发一种新的天然防腐剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

胎菊:艺福堂菊博士胎菊,产自浙江省桐乡市胎菊生产基地,80 g,洛阳大张超市;

猪肉:试验所用猪肉为当天屠宰的猪的冷鲜里脊肉,洛阳大张超市;

大肠杆菌(*Escherichia coli*) O157:东北农业大学食品学院菌种库;

大肠杆菌分离菌株 2020-1、2020-2、2018-4、2018-5、2020-3、2019-8:分别从牛肉、鸡肉、黑芝麻糊及设备表面分离得到;

胰蛋白胨大豆琼脂(tryptone soya agar, TSA)、溶菌肉汤培养基(Luria-Bertani, LB):青岛海博生物有限公司;

乙醇、戊二醛、戊二醛、氢氧化钠等:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

ATP试剂盒:碧云天生物科技有限公司;

十二烷基琥珀酸酐、DiBAC4(3)荧光探针:索莱宝生物科技有限公司。

1.2 主要仪器设备

精密电子天平:Pl203型,梅特勒—托利多仪器有限公司;

生物超净工作台:Bcn-1360型,上海佳胜仪器制造有

限公司;

离心机:GL-21M型,上海市离心机械研究所;

电热恒温培养箱:DHP-9272型,上海一恒科技有限公司;

高压蒸汽灭菌锅:LDZY-50kB-Ⅲ型,上海申安医疗器械厂;

多功能酶标仪:Tecan Infinite 200 PRO型,北京普天新桥技术有限公司;

紫外分光光度计:DU-800型,美国Beckman公司;

透射电镜:H-7650型,日本日立公司;

色差计:Color meter ZE 6000型,上海过望化工有限公司。

1.3 方法

1.3.1 胎菊水提取物的制备 参照张赞等^[14]的方法。将胎菊粉碎成粉,过82目筛,以水为溶剂,在70℃、料液比($V_{\text{水}}:V_{\text{胎菊}}$)为1:30(g/mL)的条件下浸提80 min,收集滤渣,并在相同条件下重复浸提2次,合并所有滤液,40℃旋转蒸发进行浓缩以得到胎菊水提取物浓缩液,最后使用真空冷冻干燥装置将其干燥成粉末,冰箱冷藏备用。

1.3.2 受试菌株 参照吕都^[13]的方法对大肠杆菌O157和其他5株大肠杆菌进行活化,上述6种菌均用于胎菊水提取物抑菌活性的评估中,而大肠杆菌O157用于抑菌机理的探索和熟猪肉保藏的应用。

1.3.3 抑菌圈直径(DIZ)的测定 采用牛津杯法^[15]。无菌条件下吸取100 μL 浓度为 10^7 CFU/mL的菌悬液并涂布在TSA平板上,将3个无菌牛津杯均匀地插入培养基,并向每个牛津杯中加入200 μL 浓度为10 mg/mL的胎菊水提取物溶液,在37℃下培养24 h后测量抑菌圈直径。抑菌圈直径大小所代表的含义为:直径>20 mm,表示菌种对抑菌剂极敏感;15~20 mm为高度敏感;10~14 mm为中度敏感;7~9 mm为低敏;<6 mm为不敏感^[16]。

1.3.4 最小抑菌浓度(MIC)、最小杀菌浓度(MBC)的测定 MIC与MBC分别指抑制细菌生长及杀灭细菌的最低浓度。根据Fei等^[17]的方法。将灭菌后冷却至50℃的TSA培养基加入到24孔板中,加入胎菊水提取物并调整质量浓度为2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 80.0 mg/mL,每孔终体积为500 μL ,对照组使用0.1 mg/mL的氨苄青霉素处理。培养基凝固后,在各孔中央接种2 μL 浓度为 10^8 CFU/mL的菌悬液,在37℃下培养24 h后观察大肠杆菌生长情况, MIC值为肉眼看不见细菌生长的最低浓度。制备100 μL 菌悬液(10^8 CFU/mL),经过 ≥ 1.0 MIC的胎菊水提取物处理1 h后再进行培养,使菌落无法长出的最低浓度即为MBC值。

1.3.5 生长曲线测定 根据Shi等^[18]的方法。用LB培养基稀释菌悬液,使其 $OD_{600\text{ nm}}$ 为0.2。向25 μL 菌悬液

中加入胎菊水提取物,使其质量浓度分别为 0.5 MIC、1.0 MIC、1.5 MIC 和 2.0 MIC,并调整终体积为 250 μ L,未添加胎菊水提取物的菌液作为对照。在 37 $^{\circ}$ C 下培养 24 h,每隔 2 h 取出菌液,使用酶标仪检测其吸光值。以时间为横坐标,吸光值为纵坐标绘制生长曲线。

1.3.6 胞内 ATP 含量的测定 根据 Sánchez 等^[19]的方法。取 2 mL 菌悬液($OD_{600\text{ nm}}=0.5$),并加入胎菊水提取物,使胎菊水提取物终质量浓度分别为 0 MIC(对照组)、1 MIC 和 2 MIC。在 37 $^{\circ}$ C 下处理 30 min 后,利用试剂盒法对其胞内的 ATP 进行提取,并测定其相对发光值。

1.3.7 膜电位的测定 根据 Guo 等^[20]的报道。将 125 μ L 的菌悬液($OD_{600\text{ nm}}=0.5$)与 0.5 μ L 的 DiBAC4(3) 荧光探针加入到黑色不透明的 96 孔板中,然后加入胎菊水提取物,使其终质量浓度分别为 1 MIC 和 2 MIC,对照组为未经胎菊水提取物处理的菌悬液,37 $^{\circ}$ C 培养 30 min 后,使用多功能酶标仪测定样品在激发波长和发射波长分别为 492 nm 和 515 nm 下的荧光强度。

1.3.8 透射电镜观察 参照 Li 等^[21]的报道。如 1.3.6 所述,菌悬液($OD_{600\text{ nm}}=0.5$)经过质量浓度 0 MIC、1 MIC 和 2 MIC 的胎菊水提取物 37 $^{\circ}$ C 处理 4 h 后,于 8 000 g/min 下离心 5 min 制备菌泥。4 $^{\circ}$ C 下向菌泥中加入 2.5% 的戊二醛固定 2 h,离心并用磷酸缓冲液洗涤 3 次,再用 1% 锇酸固定 2 h,重复洗涤 3 次。用体积分数 50%,70%,90%,100% 的乙醇对上述样品进行脱水处理(10 min),利用十二烷基琥珀酸酐对其进行包埋,最后对样品进行醋酸铀酰和柠檬酸铅双重染色,并置于透射电镜下选取 10 000 $\times$ 放大倍数观察细胞形态。

1.3.9 胎菊水提取物在熟猪肉中的应用 根据 Guo 等^[22]的报道。将新鲜猪肉切成 1.5 g 左右的小块,于 121 $^{\circ}$ C 下灭菌 15 min 得到无菌熟猪肉,用质量浓度为 1 MIC 和 2 MIC 的胎菊水提取物浸泡 10 s 后在无菌培养皿中放置 30 min,未浸泡的熟肉样品作为对照组。将浓度为 10^3 CFU/mL 的大肠杆菌 O157 接种到熟猪肉样品中,无菌袋密闭保存在 4 $^{\circ}$ C 环境下 6 d,分别在第 0,3,6 天取出样品,对大肠杆菌进行平板计数,同时测定熟肉样品的色度(a^* 、 b^* 、 L^*)重复 3 次读数取平均值。

1.3.10 数据分析 除透射电镜试验外,其他试验重复 3 次,试验结果以平均数 $\pm$ 标准偏差表示,使用 SPSS 软件对数据进行统计分析,显著性检验采用单因素方差分析($P<0.05$)。

2 结果与讨论

2.1 DIZ、MIC 和 MBC 值的测定

以抑菌圈直径(DIZ)、MIC 及 MBC 值作为评定指标来检测胎菊水提取物对大肠杆菌的抑菌效果,结果如表 1 所示。结果表明,胎菊水提取物对 7 株大肠杆菌 DIZ、MIC 和 MBC 的范围分别为 $(12.40 \pm 0.32) \sim (13.80 \pm$

0.41) mm,10~20 mg/mL 和 20~40 mg/mL。现有的研究也报道了一些植物源天然产物对大肠杆菌的抑制效果,例如乌梅有机酸和胡桃醌对大肠杆菌的 MIC 分别为 31.25 mg/mL 和 60.00 μ g/mL^[23-24],石榴皮多酚对大肠杆菌的 MBC 值为 31.25 mg/mL^[25],与上述天然产物相比,胎菊水提取物对大肠杆菌抑制作用处于中等偏上水平。为进一步探究胎菊水提取物对大肠杆菌的抑菌机制,选取大肠杆菌 O157 进行后续研究。

2.2 胎菊水提取物对细胞生长曲线的影响

胎菊水提取物对大肠杆菌 O157 生长曲线的影响如图 1 所示。与空白组相比,经过不同质量浓度胎菊水提取物处理后的大肠杆菌的生长被明显的抑制,且抑菌效果随着胎菊水提取物质量浓度的增加而增强。当胎菊水提取物质量浓度大于 2 MIC 时,大肠杆菌被完全抑制。此外,从图 1 中可知,胎菊水提取物对大肠杆菌的抑制主要是延长了迟缓期,缩短了对数期。

2.3 胎菊水提取物对胞内 ATP 浓度的影响

ATP 能够为所有活细胞生物体提供能量,与物质的代谢,能量的释放、储存和利用有关,是反映细胞存活状况的重要参数^[20]。由图 2 可知,与对照组相比,胎菊水提取物显著降低了菌体细胞中的 ATP 含量($P<0.05$),可能

表 1 胎菊水提取物对 7 株大肠杆菌菌株的 DIZ、MIC 和 MBC

Table 1 DIZ, MICs and MBCs of CBAE against seven *E. coli* strains

大肠杆菌	来源	DIZ/mm	MIC/(mg $\cdot$ mL $^{-1}$)	MBC/(mg $\cdot$ mL $^{-1}$)
O157	实验室菌株	12.4 $\pm$ 0.32	20	40
2020-1	牛肉	13.6 $\pm$ 0.66	10	20
2020-2	牛肉	13.8 $\pm$ 0.41	10	20
2018-5	鸡肉	13.5 $\pm$ 0.22	10	40
2018-4	鸡肉	13.6 $\pm$ 0.18	10	20
2020-3	黑芝麻糊	12.5 $\pm$ 0.32	20	40
2019-8	设备表面	13.2 $\pm$ 0.16	10	20

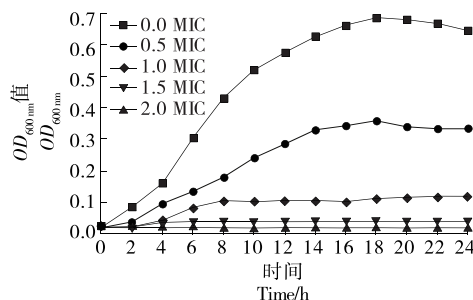


图 1 不同浓度的胎菊水提取物对大肠杆菌生长的影响
Figure 1 Effects of different concentrations of CBAE on the growth of *E. coli*

是由于胎菊水提取物作用下受试细菌细胞膜被破坏,导致胞内 ATP 的泄漏,进而影响细胞能量代谢,抑制大肠杆菌生长。类似地,Fei 等^[17]发现橄榄多酚能够降低阪崎克罗诺杆菌胞内 ATP 浓度,并将其归因于细胞膜损伤,与试验研究结果一致。此外,研究^[19, 26-27]表明,由于天然产物作用下 ATP 合成酶活性降低、K⁺ 的损失、细胞水解速率增加等均可以显著降低细菌胞内的 ATP 含量。

2.4 胎菊水提取物对细胞膜电位的影响

DiBAC4(3)是一种膜电位敏感的亲脂性阴离子荧光染料,进入细胞后可与细胞中的蛋白质结合发出荧光,因此可以通过测定细胞中的荧光强度来判断细胞膜电位的变化^[18]。如图 3 所示,与空白对照组相比,经质量浓度为 1 MIC 和 2 MIC 的胎菊水提取物处理后,菌体细胞膜的相对荧光值显著增加($P<0.05$),表明在胎菊水提取物的作用下大肠杆菌细胞膜发生了去极化,且胎菊水提取物质量浓度越高,去极化现象越明显。细胞膜去极化是细胞膜透性发生改变的重要表现,与胞内 pH 的改变及细胞膜上 K⁺、Na⁺ 等浓度的改变有关^[28],因此上述结果表明胎菊水提取物破坏了大肠杆菌细胞膜,进而改变了细胞膜电位,从而影响细菌生长。

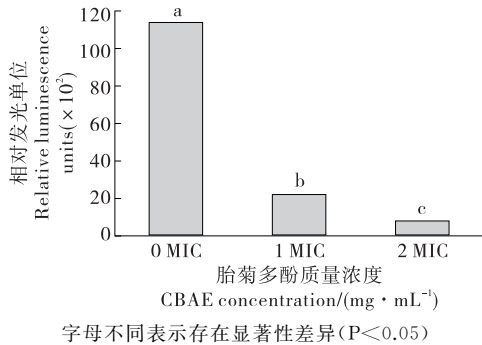


图 2 胎菊水提取物对大肠杆菌胞内 ATP 浓度的影响
Figure 2 Effect of CBAE on intracellular ATP concentration of *E. coli*

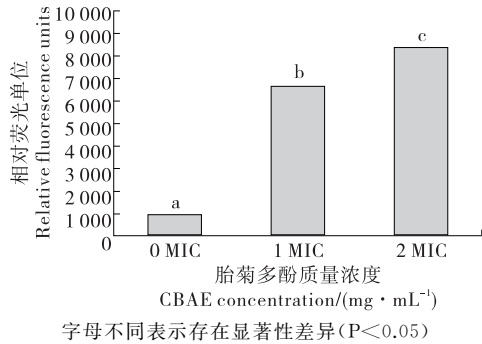


图 3 胎菊水提取物对大肠杆菌细胞膜电位的影响
Figure 3 Effect of CBAE on membrane potential of *E. coli*

2.5 透射电子显微镜结果分析

通过透射电子显微镜观察不同质量浓度胎菊水提取物对大肠杆菌细胞形态的影响,结果见图 4。与未受胎菊水提取物处理的对照组相比,经质量浓度为 1 MIC 和 2 MIC 胎菊水提取物处理(4 h)后的大肠杆菌细胞壁与细胞膜分离,内容物发生泄漏,菌体内部出现空腔,细胞变瘪变皱,发生严重的变形和塌陷;且随着胎菊水提取物质量浓度的增加破坏程度也随之加剧。由此可知,胎菊水提取物能够明显破坏大肠杆菌的细胞形态,从而导致不可逆的损伤。

2.6 胎菊水提取物在熟猪肉保藏中的应用

2.6.1 大肠杆菌菌落总数的变化 不同浓度胎菊水提取物对接种到熟猪肉储存期间大肠杆菌的抑制作用如图 5 所示。结果显示,与未经胎菊水提取物处理的对照组相比,在第 3 天和第 6 天,经质量浓度 1 MIC 和 2 MIC 胎菊水提取物处理后的熟猪肉中大肠杆菌数显著性下降($P<0.05$)。

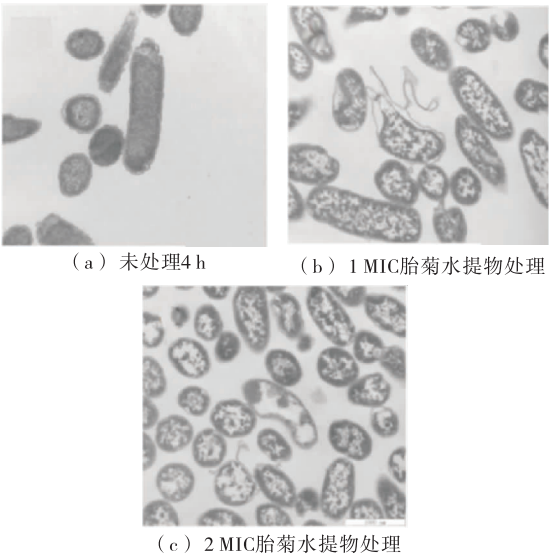


图 4 大肠杆菌细胞的透射电镜图
Figure 4 Transmission electron microscopy images of *E. coli* cells (10 000 ×)

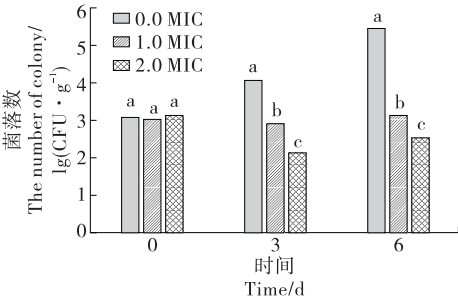


图 5 4 °C 下胎菊水提取物对接种到熟猪肉中大肠杆菌的抑制作用
Figure 5 Antibacterial effect of CBAE on *E. coli* inoculated into cooked pork and stored at 4 °C

此外,未经胎菊水提物处理的熟猪肉中的大肠杆菌在贮藏期内一直呈增长状态,而在胎菊水提物的作用下,在整个贮藏期内大肠杆菌的数目没有增加。这表明,胎菊水提物可抑制大肠杆菌的生长,从而延长熟猪肉的保质期。

2.6.2 色差的变化 对不同浓度胎菊水提物处理后熟猪肉的色度进行测定,结果如表 2 所示。与对照组相比,质量浓度为 1 MIC 的胎菊水提物虽然均可以降低样品的

L^* (亮度)值,并提高 b^* (黄度)值,但差异不显著($P>0.05$)。当质量浓度为 2 MIC 时,胎菊水提物则可以显著的改变熟猪肉的 L^* 和 b^* 值($P<0.05$)。此外,胎菊水提物对熟猪肉的 a^* (红度)值无显著性差异($P>0.05$)。胎菊水提物呈微黄色,结合上述结果可知,1 MIC 的胎菊水提物对熟猪肉的色差影响不显著,可作为熟猪肉潜在的防腐剂。

表 2 不同质量浓度的胎菊水提物对熟猪肉色泽的影响[†]

Table 2 Effects of different concentrations of CBAE on the color of cooked pork

质量 浓度	0 d			3 d			6 d		
	L^* 值	a^* 值	b^* 值	L^* 值	a^* 值	b^* 值	L^* 值	a^* 值	b^* 值
0 MIC	60.60±0.16 ^a	3.45±0.12 ^a	16.81±0.34 ^a	60.45±0.04 ^a	3.54±0.19 ^a	16.97±0.26 ^a	60.88±0.06 ^a	3.50±0.20 ^a	17.27±0.32 ^a
1 MIC	59.56±0.23 ^a	3.55±0.22 ^a	17.18±0.38 ^a	59.87±0.28 ^a	3.65±0.33 ^a	17.20±0.25 ^a	59.67±0.27 ^a	3.60±0.27 ^a	17.12±0.22 ^a
2 MIC	51.82±0.52 ^b	3.47±0.28 ^a	18.18±0.28 ^b	52.10±0.46 ^b	3.52±0.37 ^a	18.27±0.33 ^b	52.31±0.67 ^b	3.61±0.24 ^a	18.21±0.19 ^b

[†] 同列字母不同表示差异性显著($P<0.05$)。

3 结论

胎菊水提物对大肠杆菌具有良好的抑制作用,而这种抑菌作用与胎菊水提物能够延长大肠杆菌生长的迟缓期、缩短对数期、降低胞内 ATP 浓度、引起细胞膜去极化和破坏细胞形态造成胞内物质的泄漏有关。此外,胎菊水提物在熟猪肉 6 d 的贮藏期内可以降低样品中的大肠杆菌总数,且 1 MIC 的质量浓度对产品的色泽没有显著的影响。综上,胎菊水提物有潜力作为一种新型抑菌剂和防腐剂运用于食品工业中。在今后的研究中,还需对胎菊水提物对产品感官品质、加入剂量和安全性进行深入的探讨,从而为更好地将胎菊水提物应用于食品的贮藏提供理论依据。

参考文献

[1] YANG Han-chun, CHEN Sheng, WHITE D G, et al. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42(8): 3 483-3 489.

[2] 郭伟钰, 陈文学, 陈海明, 等. 芳樟醇对大肠杆菌的抑菌机制研究[J]. 现代食品科技, 2020, 36(4): 113-118.

[3] AIJUKA M, BUYS E M. Persistence of foodborne diarrheagenic *Escherichia coli* in the agricultural and food production environment: Implications for food safety and public health[J]. Food Microbiology, 2019, 82: 363-370.

[4] 嵇辛勤, 李基棕. 市售鲜猪肉葡萄球菌和大肠杆菌污染及其 PCR 快速检测[J]. 贵州畜牧兽医, 2012, 36(4): 1-3.

[5] 史秋梅, 张艳英, 高桂生, 等. 河北省部分地区肉、蛋食品大肠杆菌污染状况的检测[J]. 河北科技师范学院学报, 2012 (4): 11-15.

[6] 薛艳蓉, 靳光, 梁茂文, 等. 肉牛屠宰线不同工序中沙门菌

和大肠杆菌污染调查及分离鉴定[J]. 畜牧与饲料科学, 2019, 40(1): 19-23.

[7] 毕旺来, 谈笑, 陈程, 等. 武汉市部分菜场肉类食品中产志贺毒素大肠杆菌污染状况分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(1): 67-70.

[8] MISHRA B B, CAUTAM S, SHARMA A. Shelf life extension of sugarcane juice using preservatives and gamma radiation processing[J]. Journal of Food Ence, 2011, 76(8): 203-208.

[9] 向双云, 周珍辉, 杨生涛, 等. 大肠杆菌耐药性测定[J]. 山东畜牧兽医, 2020, 41(2): 4-6.

[10] CHEN Ming-shun, ZHAO Zhen-gang, MENG He-cheng, et al. The antibiotic activity and mechanisms of sugar beet (*Beta vulgaris*) molasses polyphenols against selected food-borne pathogens[J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 82: 354-360.

[11] 钟爱娇, 姜哲, 李雪征, 等. 杭白菊化学成分和药理活性的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2014, 29(7): 824-830.

[12] 黄涵年. 杭白菊总黄酮提取物的体外抗氧化性及抑菌活性研究[J]. 现代农业科技, 2019(23): 221-222.

[13] 吕都. 杭白菊挥发油提取及其抗氧化、抑菌功能的研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2015: 32-33.

[14] 张赞, 张涛, 罗婷, 等. 艾草水提取物对大肠杆菌的抑制机理初步研究[J]. 湖北农业科学, 2019, 58(18): 45-48, 54.

[15] 石超. 柠檬醛对阪崎克罗诺杆菌抑菌和抗感染作用及其分子机制[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017: 23.

[16] 韩红艳, 冀爱青, 李洪燕. 5 种中药材体外抑菌活性研究[J]. 中兽医医药杂志, 2020, 39(2): 63-66.

[17] FEI Peng, ALI M A, GONG Shao-ying, et al. Antimicrobial activity and mechanism of action of olive oil polyphenols extract against *Cronobacter sakazakii*[J]. Food Control, 2018, 94: 289-294.

(下转第 171 页)

- Camellia sinensis*, Fu Zhuan tea, regulates hyperlipidemia and transcription factors involved in lipid catabolism [J]. Food Research International, 2011, 44(9): 2 999-3 005.
- [4] 崔锐谦. 12 世纪饮料——茶饮料[J]. 食品科学, 1995, 16(8): 13-18.
- [5] 前瞻经济学人. 一文了解 2020 年中国茶饮料行业市场现状及竞争格局 康师傅稳居第一[EB/OL]. (2020-09-10)[2020-10-13]. <https://baijiahao.baidu.com/s?id=1677430346011436850&wfr=spider&for=pc>.
- [6] 罗龙新. 国内外茶饮料发展现状和趋势[J]. 中国茶叶, 2019, 41(1): 14-18.
- [7] 刘盼盼, 刘晓辉, 罗龙新, 等. 烘焙程度对绿茶香气品质的影响[J]. 饮料工业, 2015(5): 1-7.
- [8] 张凌云, 王登良. 不同品种原料绿茶饮料加工特性研究[J]. 华南农业大学学报, 2006(3): 103-107.
- [9] 袁海波, 滑金杰, 邓余良, 等. 原料茶干燥工艺对绿茶饮料品质的影响[J]. 茶叶科学, 2017, 37(6): 631-637.
- [10] 尹军峰, 林智, 谭俊峰, 等. 绿茶初制工艺对饮料加工特性的影响[J]. 茶叶科学, 2005(3): 189-202.
- [11] 张瑞莲. 原料茶加工工艺对绿茶饮料茶汤稳定性的影响研究[D]. 杭州: 中国农业科学院, 2010: 15-16.
- [12] 马梦君, 常睿, 罗理勇, 等. 花香绿茶饮料的生成分变化及物性特征[J]. 食品科学, 2015(6): 109-113.
- [13] 袁海波, 许勇泉, 邓余良, 等. 两种香型原料茶饮料适制性研究[J]. 茶叶科学, 2010(增刊 1): 544-550.
- [14] 张俊, 唐德松, 龚淑英, 等. 烘焙处理对夏秋绿茶香气品质的影响[J]. 中国食品学报, 2010, 10(6): 94-100.
- [15] 李艳, 何春雷, 孟雪莉, 等. 干热后处理改善夏季成品绿茶风味品质研究[J]. 食品与机械, 2016, 32(12): 189-195.
- [16] FU Yan-qing, WANG Jie-qiong, CHEN Jian-xin, et al. Effect of baking on the flavor stability of green tea beverages[J]. Food Chemistry, 2020, 331: 127258.
- [17] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 茶叶感官审评方法: GB/T 23776—2018[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018: 4-6.
- [18] 中华人民共和国国家出入境检验检疫局. 进出口茶叶水浸出物测定方法: SN/T 0920—2000[S]. 北京: 中国标准出版社, 2000: 2.
- [19] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 茶 茶多酚测定: GB/T 8313—2002[S]. 北京: 中国标准出版社, 2002: 1-2.
- [20] 湛赛男, 王河山, 曾靖舒, 等. HPLC 法同时测定钩吻茎中胡蔓藤碱丙等 6 个生物碱的含量[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(4): 595-601.
- [21] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 茶 游离氨基酸总量的测定: GB/T 8314—2013[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013: 1-3.
- [22] 钟萝. 茶叶品质理化分析[M]. 上海: 上海科学出版社, 1989: 449-450.
- [23] 张凤霞. 微波浸提乌龙茶饮料香气组成初探[D]. 广州: 华南农业大学, 2011: 16.
- [24] Leffingwell & Associates. Odor & flavor detection thresholds in water (In Parts per Billion) [EB/OL]. [2020-05-10]. <http://www.leffingwell.com/odorthre.htm>.
- [25] The good scents company information system providing information for the flavor, fragrance, food and cosmetic industries[DB/OL]. [2020-05-10]. <http://www.thegoodscentscompany.com>.
- (上接第 132 页)
- [18] SHI Chao, SONG Kai-kuo, ZHANG Xiao-rong, et al. Antimicrobial activity and possible mechanism of action of citral against *Cronobacter sakazakii* [J]. PLoS one, 2017, 11(7): e0159006.
- [19] SANCHEZ E, HEREDIA N, CAMACHO-CORONA M R, et al. Isolation, characterization and mode of antimicrobial action against *Vibrio cholerae* of methyl gallate isolated from *Acacia farnesiana* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2013, 115(6): 1 307-1 316.
- [20] GUO Ling, SU Qi, GONG Shao-ying, et al. Antimicrobial activity and action approach of the olive oil polyphenols extract against *Listeria monocytogenes* [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1 586.
- [21] LI Ran, FEI Peng, MAN Chao-xing, et al. Tea polyphenols inactivate *Cronobacter sakazakii* isolated from powdered infant formula [J]. Journal of Dairy Science, 2016, 99(2): 1 019-1 028.
- [22] GUO Ling, WANG Yan-yan, BI Xue, et al. Antimicrobial activity and mechanism of action of the *Amaranthus tricolor* Crude extract against *Staphylococcus aureus* and potential application in cooked meat [J]. Foods, 2020, 9: 359.
- [23] 张丹丹, 姜修婷. 乌梅有机酸的提取工艺及其抑菌活性[J]. 生物加工过程, 2018, 16(3): 47-52.
- [24] 刘婷. 胡桃醌的抗氧化、抑菌活性及抑菌机理研究[D]. 临汾: 山西师范大学, 2018: 21.
- [25] 陈孝娟, 顾政一, 黄华, 等. 石榴皮总多酚抗菌消炎作用的初步研究[J]. 西北药学杂志, 2011, 26(4): 268-270.
- [26] IMRAN K, ASHUTOSH B, PRADEEP K, et al. Antimicrobial potential of carvacrol against uropathogenic *Escherichia coli* via membrane disruption, depolarization, and reactive oxygen species generation [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 2 421.
- [27] PASQUA R D, MAMONE G, FERRANTI P, et al. Changes in the proteome of salmonella enterica serovar thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol [J]. Proteomics, 2010, 10(5): 1 040-1 049.
- [28] BOT C, PRODAN C. Probing the membrane potential of living cells by dielectric spectroscopy [J]. European Biophysics Journal, 2009, 38(8): 1 049-1 059.