

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2020.06.024

酚酸对水产品腐败希瓦氏菌的抑菌作用

Antibacterial effect of phenolic acid on *Shewanella putrefaciens* from aquatic product

朱金帅^{1,2} 李秋莹^{1,2} 于昕睿^{1,2} 孙彤^{1,2} 励建荣^{1,2}ZHU Jin-shuai^{1,2} LI Qiu-ying^{1,2} YU Xin-rui^{1,2} SUN Tong^{1,2} LI Jian-rong^{1,2}

(1. 渤海大学食品科学与工程学院, 辽宁 锦州 121013;

2. 生鲜农产品贮藏加工及安全控制技术国家地方联合工程研究中心, 辽宁 锦州 121013)

(1. College of Food Science and Engineering, Bohai University, Jinzhou, Liaoning 121013, China;

2. National & Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products, Jinzhou, Liaoning 121013, China)

摘要:比较了没食子酸、原儿茶酸和绿原酸3种酚酸对腐败希瓦氏菌的抑制活性,并通过扫描电镜、流式细胞仪、细胞膜完整性和通透性测定等探讨了没食子酸对腐败希瓦氏菌的抑菌作用。结果表明:3种酚酸中没食子酸对腐败希瓦氏菌的抑制活性最强,其最小抑菌浓度和最小杀菌浓度分别为1.25、2.50 mg/mL。经最小抑菌浓度没食子酸处理后,腐败希瓦氏菌细胞形态改变,表面有明显凹陷;细胞凋亡率明显增高;核酸和蛋白泄漏增加,细胞膜完整性遭到破坏;细胞膜通透性增加,胞内电解质大量泄漏至培养液中。

关键词:没食子酸;原儿茶酸;绿原酸;腐败希瓦氏菌;抑菌作用;水产品

Abstract: Compared the antibacterial activities of three phenolic acids (gallic acid, protocatechuic acid, and chlorogenic acid) against *S. putrefaciens*, and investigated the antibacterial effects of gallic acid on *S. putrefaciens* by means of scanning electron microscopy, flow cytometry, cell membrane integrity and permeability measurement. The results showed that gallic acid had the strongest antibacterial activity against *S. putrefaciens* among the three phenolic acids, and its minimal inhibitory concentration and minimal bactericidal concentration were 1.25 mg/mL and 2.5 mg/mL, respectively. After treatment with gallic acid at the minimum inhibitory concentration, the cell morphology of *S. putrefaciens* changed with obvious depression on the surface. The apoptotic rate increased significantly. The leakage of nucleic acid

and protein increased, and the integrity of cell membrane was destroyed. The permeability of cell membrane increased, and a large amount of intracellular electrolytes leaked into the culture medium.

Keywords: gallic acid; protocatechuic acid; chlorogenic acid; *Shewanella putrefaciens*; bacteriostasis; aquatic products

腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*)是一种革兰氏阴性运动杆菌,具有较强的致腐败能力,是水产品的特定腐败菌之一,其生长代谢活动中能够分解肌肉蛋白,将氨基酸脱羧生成腐胺、尸胺等生物胺^[1],产生H₂S等臭味物质^[2],其形成的生物被膜可导致水产品表面发黏。微生物的生长和繁殖是引起水产品腐败的主要因素。

酚酸是高等植物中分布广泛的一类含有酚羟基和羧基的重要次生代谢产物^[3],有调查^[4]显示,人体内每日摄入的酚酸是所摄入总酚含量的1/3,摄入含量为25~1 000 mg,目前许多保健品中均含有绿原酸及咖啡酸等成分,可以有效地促进血液循环、淡化黄褐斑、缓解腰酸腿痛等症状。将酚酸作为功能性食品添加剂,添加到各类啤酒和葡萄酒当中,能起到保肝护脾的作用^[5]。常见酚酸如没食子酸、原儿茶酸、绿原酸等,已被应用于食品加工和保鲜等领域^[6]。没食子酸作为一种较为常见的酚酸,对各种食源性致病菌如金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌和弗氏志贺菌均具有较强的抗菌作用^[7]。没食子酸在体外具有抗假单胞菌的效果^[8]。然而,目前尚未见没食子酸、原儿茶酸和绿原酸对水产品腐败希瓦氏菌的抑制作用的研究报道。研究拟比较没食子酸、原儿茶酸、绿原酸3种酚酸对腐败希瓦氏菌的抑制活性,并通过扫描电镜、流式细胞仪、细胞膜完整性和通透性测定

基金项目:“十三五”国家重点研发计划项目(编号:2016YFD0400805)

作者简介:朱金帅,女,渤海大学在读硕士研究生。

通信作者:李秋莹(1986—),女,渤海大学讲师,博士。

E-mail: liqiuying21@163.com

收稿日期:2020-03-27

研究没食子酸对腐败希瓦氏菌的抑菌作用及机制,以期为酚酸在水产品保鲜中的应用提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与amp;仪器

1.1.1 材料与amp;试剂

腐败希瓦氏菌 SP22(*Shewanella putrefaciens* SP22):渤海大学食品科学与工程学院实验室从腐败大菱蚌中分离获得并在-80℃下保藏;

LB 营养琼脂培养基、LB 营养肉汤:青岛高科园海博生物技术有限公司;

没食子酸、绿原酸、原儿茶酸:上海源叶生物科技有限公司;

蛋白浓度测定试剂盒:南京建成生物工程研究所;

碘化丙啶(PI)、戊二醛、PBS 溶液:北京索莱宝科技有限公司。

1.1.2 仪器设备

立式高压蒸汽灭菌锅:mLS-3030CH 型,日本三洋有限公司;

生化培养箱:LRH-150 型,上海恒科技有限公司;

超速离心机:cs 150 gx3 型,日本日立公司;

酶标仪:Victor X3 型,新加坡珀金埃尔默仪器有限公司;

紫外可见分光光度计:UV2550 型,尤尼柯仪器有限公司;

电子分析天平:MS105UD 型,瑞士 Mettler Toledo 公司;

扫描电镜:S-4800 型,美国 BIO-RAD 公司;

电导率仪:FE38-Meter 型,瑞士 Mettler Toledo 公司;

流式细胞仪:Accuri C6 Plus 型,美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 菌悬液制备 将贮藏于-80℃的腐败希瓦氏菌取出,接种于 LB 肉汤培养基中在 28℃,110 r/min 摇床震荡培养活化 2 代,并稀释菌液浓度为 10⁵ CFU/mL,备用。

1.2.2 不同酚酸的抑菌直径测定 分别配制浓度为 7.5, 5.0, 2.5 mg/mL 没食子酸(GA)、绿原酸(CA)和原儿茶酸(PA)水溶液。将 2 mL 菌悬液(10⁵ CFU/mL)加入到 200 mL 无菌 LB 营养琼脂培养基中混匀,向垂直放置 3 个牛津杯的培养皿中倾注约 20 mL,放置至 LB 营养琼脂彻底凝固。取出牛津杯,分别向孔中加入不同酚酸溶液 200 μL,每个浓度做 3 个平行组。将平板倒置于 28℃培养箱培养 24 h,用游标卡尺测定抑菌圈直径大小。

1.2.3 最小抑菌浓度(MIC)及最小杀菌浓度(MBC)测定 采用微量肉汤二倍稀释法^[9]进行抑菌剂 MIC 和 MBC 测定。采用 LB 液体培养基在 96 孔板中进行酚酸

溶液的二倍梯度稀释,分别获得最终浓度为 5.000 0, 2.500 0, 1.250 0, 0.625 0, 0.372 50, 0.156 25 mg/mL 的 3 种酚酸系列溶液。每孔接种 100 μL 腐败希瓦氏菌菌悬液(10⁵ CFU/mL),混匀后放入 28℃培养箱中培养 24 h。以肉眼观察,没有变浑浊的最低浓度为酚酸对该菌的 MIC,每组重复 3 次。将无菌生长的孔中的液体吸出涂布于 LB 营养琼脂培养基上,培养 24 h,无菌生长的浓度为酚酸的 MBC。

1.2.4 生长曲线和时间杀菌曲线的测定 将没食子酸添加到腐败希瓦氏菌菌悬液(10⁵ CFU/mL)中,使其最终浓度为 MIC,于 28℃、110 r/min 条件下培养。以未添加没食子酸的菌液为对照组。每隔 2 h 用酶标仪测定 OD_{595 nm} 值,每组重复 3 次,取平均值,绘制腐败希瓦氏菌生长曲线。每隔 2 h 吸取各组培养液 200 μL,进行平板活菌菌落计数并绘制时间杀菌曲线^[10]。

1.2.5 扫描电镜 取一定量已培养的腐败希瓦氏菌菌悬液,于 3 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液。将菌体用 0.1 mol/L PBS (pH=7.4)清洗 2 次,于 3 000 r/min 离心 10 min,再用 PBS 稀释,使菌悬液 OD_{595 nm} ≈ 0.5。将没食子酸添加到菌悬液中,使其终浓度为 MIC,置于 28℃震荡培养(161 r/min) 12 h。以未添加没食子酸的菌液为对照组。将各组培养液于 3 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液,用无菌水清洗 2 次。将菌体与 20 mL 2.5%的戊二醛溶液混匀,固定处理 2 h。无菌水清洗 2 次后,分别在 50%, 70%, 80%, 90%的乙醇中浸泡 30 min,在 100%的无水乙醇中浸泡 1 h 进行逐级脱水。取适量菌悬液于盖玻片上,37℃下干燥 72 h。将菌体进行喷金处理,采用扫描电镜对菌体微观形貌进行表征分析^[11]。

1.2.6 细胞凋亡测定 细菌前处理参照 1.2.5,置于 28℃震荡培养(161 r/min) 12 h 后,将培养液于 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,0.1 mol/L PBS (pH=7.4)清洗 2 次,于 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液。菌体用 1 mL PI 染色液染色,于 4℃避光放置 30 min。1 h 内用流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况^[12]。

1.2.7 细菌核酸泄漏测定 细菌前处理参照 1.2.5,置于 28℃震荡培养(161 r/min) 12 h 后,用 0.22 μm 滤膜过滤菌悬液,用酶标仪测定滤液在 260 nm 波长下 OD 值,每组重复测定 3 次^[13]。

1.2.8 细菌蛋白泄露测定 细菌前处理参照 1.2.5,置于 28℃震荡培养(161 r/min) 12 h 后,用 BCA 蛋白检测试剂盒对菌悬液蛋白浓度进行测定。

1.2.9 电导率测定 细菌前处理参照 1.2.5,置于 28℃震荡培养(161 r/min),每间隔 10 min 用电导率仪测定电导率,直至电导率值达到平衡值。

1.2.10 统计分析 采用 Excel 2010 及 Origin 8.5 软件处理数据和生成图表,数据为重复 3 次所得的平均值,用

SPSS 19.0 (统计分析系统)进行统计学分析, 检验数据的差异显著性, 显著性水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 酚酸对腐败希瓦氏菌的抑制活性

没食子酸、原儿茶酸和绿原酸对腐败希瓦氏菌的抑菌直径见表 1。抑菌直径最大的为 7.5 mg/mL 的没食子酸, 最小的为 5 mg/mL 的绿原酸, 而 2.5 mg/mL 绿原酸几乎没有抑菌圈出现。3 种酚酸的抑菌直径均随抑菌剂浓度的增加而增大, 表明酚酸抑菌活性与其浓度呈正比。同等浓度的没食子酸、原儿茶酸和绿原酸中, 没食子酸的抑菌直径均为最大, 其次是原儿茶酸。表明 3 种酚酸对水产品腐败希瓦氏菌抑菌活性从大到小依次为没食子酸 > 原儿茶酸 > 绿原酸。

采用肉汤二倍稀释法测定不同酚酸的 MIC 和 MBC 的数值, 进一步比较各个酚酸对腐败希瓦氏菌的抑菌能力。没食子酸对腐败希瓦氏菌的 MIC 为 1.25 mg/mL, MBC 值为 2.5 mg/mL, 与其他两种酚酸相比, MIC 和 MBC 值均最低(表 2), 表明其具有较强的抗菌活性。李建科等^[14]研究了不同细菌对没食子酸的抑制效果, 研究表明没食子酸对金黄色葡萄球菌、蜡状芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌的 MIC 分别为 2, 4, 4, 4 mg/mL。表明没食子酸对腐败希瓦氏菌的抑菌效果比对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌等细菌的好。

2.2 没食子酸对腐败希瓦氏菌生长曲线和杀菌曲线的影响

腐败希瓦氏菌的生长曲线见图 1(a), 整个培养期, 对照组的腐败希瓦氏菌菌数呈逐渐增长趋势, 经历了延滞期、指数生长期和稳定期^[15]。而 1.25 mg/mL (MIC) 没食子酸处理组没有明显增长的趋势, 不能进入对数生长期。表明在此浓度下, 腐败希瓦氏菌的生长被完全抑制^[16]。时间杀菌曲线如图 1(b) 所示, 腐败希瓦氏菌培养

表 1 酚酸对腐败希瓦氏菌的抑菌圈直径

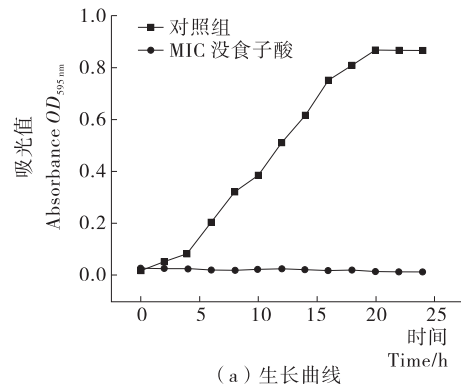
Table 1 Inhibitory zone diameter of phenolic acids against *S. putrefaciens*

酚酸	浓度/(mg · mL ⁻¹)	抑菌圈直径/mm
没食子酸	7.5	12.91 ± 0.02
	5.0	12.33 ± 0.03
	2.5	11.35 ± 0.08
原儿茶酸	7.5	12.07 ± 0.01
	5.0	10.46 ± 0.02
	2.5	9.42 ± 0.07
绿原酸	7.5	11.38 ± 0.02
	5.0	10.06 ± 0.04
	2.5	8.00 ± 0.02

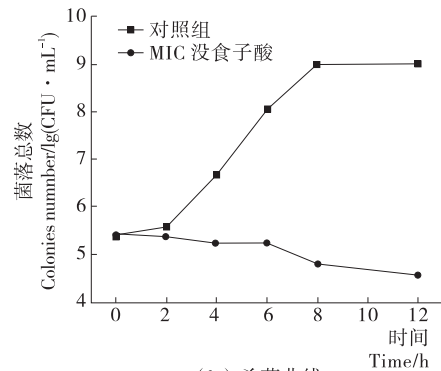
表 2 酚酸对腐败希瓦氏菌的最小抑菌浓度及最小杀菌浓度

Table 2 Minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of the phenolic acid to *S. putrefaciens*

酚酸	最小抑菌浓度	最小杀菌浓度
没食子酸	1.25	2.5
原儿茶酸	1.25	5.0
绿原酸	2.50	5.0



(a) 生长曲线



(b) 杀菌曲线

图 1 没食子酸对腐败希瓦氏菌的生长曲线和时间杀菌曲线
Figure 1 Growth curve and Time-killed curve of *S. putrefaciens* under the action of gallic acid

过程中, 对照组活菌数呈明显的上升趋势, 经历了延滞期、指数生长期和稳定期, 与生长曲线一致。没食子酸处理组的活菌数呈现下降趋势, 表明此浓度下的没食子酸具有一定杀菌活性。结合生长曲线与杀菌曲线可说明, 没食子酸在 1.25 mg/mL (MIC) 浓度下, 活菌数量逐渐减少, 能完全抑制腐败希瓦氏菌的生长。

2.3 没食子酸对腐败希瓦氏菌细胞形态的影响

通过 SEM 观察 1.25 mg/mL (MIC) 没食子酸处理前后腐败希瓦氏菌细胞的形态变化。如图 2(a) 所示, 对照组的腐败希瓦氏菌菌体完整饱满, 菌体表面没有破损。而经没食子酸[图 2(b)]处理细菌形貌发生变化, 细胞破

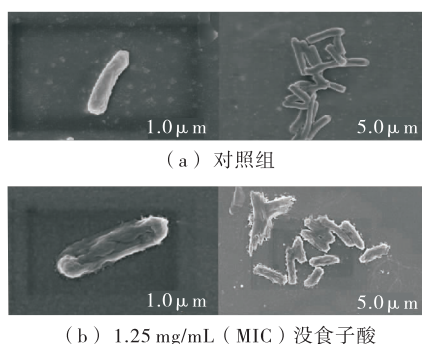


图 2 没食子酸对腐败希瓦氏菌细胞形态的影响

Figure 2 Effect of gallic acid on cellular morphology of *S. putrefaciens*

裂,扭曲变形,一些部位开始凹陷。可能是细胞膜破损造成细胞内容物的大量泄露,从而使细胞明显变形,粘连在一起。结果表明,没食子酸可引起腐败希瓦氏菌细胞的破损和变形,严重影响细胞正常生长,甚至造成细胞死亡。没食子酸分子结构中的酚羟基可能是其产生抑菌作用的活性基团,与细菌细胞膜上的蛋白质、脂类等发生反应,改变细菌细胞膜通透性,从而破坏细胞膜的完整性,导致细菌细胞形变^[17]。

2.4 没食子酸对腐败希瓦氏菌细胞凋亡的影响

流式细胞图分为 4 个区域,LL 区为细胞存活,LR 区为早期凋亡,UR 区为晚期凋亡,UL 区为细胞坏死。图 3 (a)为对照组流式细胞分析结果,LL 区细胞存活率高达 96.1%,细胞坏死率为 2.5%,早期凋亡率和晚期凋亡率分别为 0.6%和 0.8%。由此可见,未经处理的细菌存活率非常高。经 MIC 没食子酸[图 3(b)]处理的腐败希瓦氏菌,存活率达到 78.6%,细胞坏死率为 20.8%,早期凋亡率和晚期凋亡率分别为 0.0%,0.6%,坏死率显著高于对照组。较对照组相比,经没食子酸作用后的腐败希瓦氏菌的凋亡率明显增大,可能是没食子酸能够破坏细胞壁膜结构,使细胞膜通透性增大。

2.5 没食子酸对腐败希瓦氏菌细胞膜完整性的影响

经没食子酸处理的腐败希瓦氏菌细胞中蛋白及核酸泄漏情况用于反映细菌细胞膜完整性的变化。图 4(a)是 1.25 mg/mL (MIC)没食子酸处理的腐败希瓦氏菌菌悬液在 260 nm 下的吸光值。对照组的 $OD_{260\text{ nm}}$ 为 0.526,经没食子酸处理后的腐败希瓦氏菌菌悬液的 $OD_{260\text{ nm}}$ 达到 1.024,显著高于对照组,表明没食子酸处理引起腐败希瓦氏菌核酸的外泄。对照组腐败希瓦氏菌菌悬液中总蛋白浓度为 3.689 mg/mL,没食子酸处理后的蛋白浓度明显增加至 15.841 mg/mL,表明没食子酸处理引起腐败希瓦氏菌蛋白的外泄。以上结果说明腐败希瓦氏菌的膜结构被破坏,导致细胞的内容物渗漏,进一步影响了菌体的代谢与生长。这可能是因为没食子酸具有较强的抗氧化性

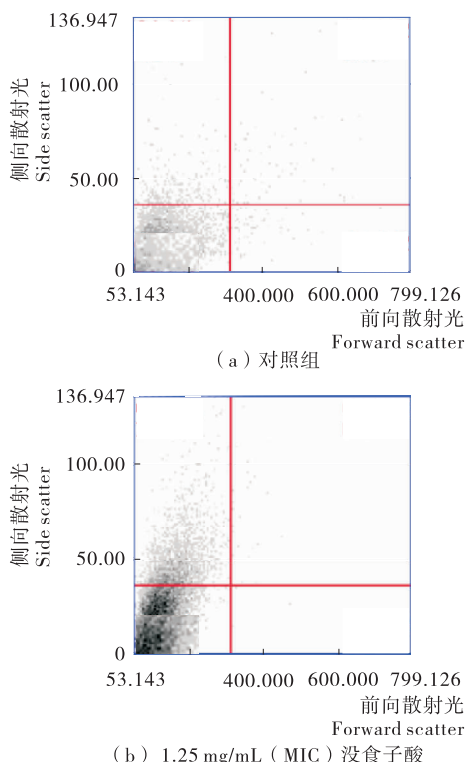


图 3 没食子酸对腐败希瓦氏菌细胞凋亡的影响

Figure 3 Effect of gallic acid on apoptosis of *S. putrefaciens*

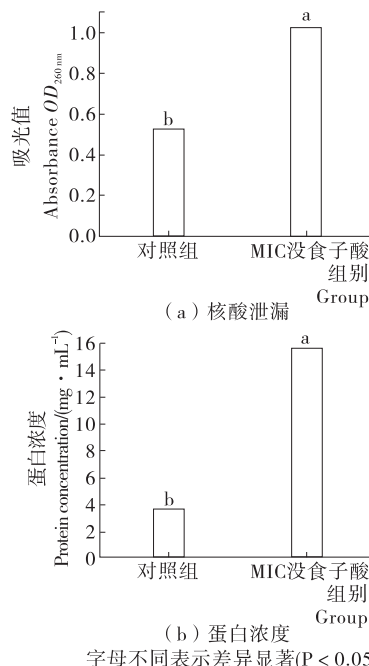


图 4 没食子酸对腐败希瓦氏菌细胞完整性的影响

Figure 4 Effect of gallic acid on cell membrane integrity of *S. putrefaciens*

能,酚羟基能够提供质子,直接吸附于细胞,打破菌体原有的保护屏障,从而导致胞内物质的泄漏增加^[18]。

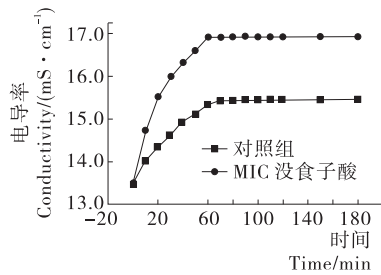


图5 没食子酸对腐败希瓦氏菌细胞膜通透性的影响

Figure 5 Effect of gallic acid on membrane permeability of *S. putrefaciens*

2.6 没食子酸对腐败希瓦氏菌细胞膜通透性的影响

测定 1.25 mg/mL (MIC) 没食子酸处理对腐败希瓦氏菌菌悬液电导率的变化, 进而分析对细胞膜通透性的影响(图5)。前 60 min, 各组电导率均有所增加, 对照组电导率从 13.46 mS/cm 升至 15.32 mS/cm, 没食子酸处理组腐败希瓦氏菌菌悬液电导率从 13.46 mS/cm 迅速增加至 16.91 mS/cm, 其电导率显著高于对照组。60 min 后, 随着时间的延长, 各组电导率趋于稳定。这一趋势与 Li 等^[19]的研究结果相似, 其研究发现 ϵ -聚赖氨酸处理的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的电导率在培养前 45 min 下显著增加。结果表明, 没食子酸处理使菌体的细胞膜通透性增加, 导致胞内大量的电解质泄露至培养液中, 电导率增加, 这会其正常代谢, 最终导致死亡^[18]。

3 结论

没食子酸、原儿茶酸和绿原酸对腐败希瓦氏菌均具有较好的抑制作用, 其中没食子酸对腐败希瓦氏菌的抑制作用更强, 其最小抑菌浓度为 1.25 mg/mL。1.25 mg/mL (MIC) 没食子酸处理引起腐败希瓦氏菌细胞形态的改变, 细胞膜完整性破坏, 细胞膜通透性增大, 核酸、蛋白质等大分子大量泄漏, 致使细菌细胞凋亡率增加。没食子酸是一种具有潜在应用前景的水产品保鲜剂, 后续研究可考虑探究没食子酸在水产品保鲜中的应用。

参考文献

[1] LI Meng, LIN Hong, MUHAMMAD Naseem Khan, et al. Effects of bacteriophage on the quality and shelf life of *Paralichthys olivaceus* during chilled storage[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2014, 94(8): 1 657-1 662.

[2] HEISING J, VAN BOEKEL M, DEKKER M. Mathematical models for the trimethylamine (TMA) formation on packed cod fish fillets at different temperatures[J]. Food Research International, 2014(56): 272-278.

[3] 乔丽萍. 超声场中柑橘皮多酚稳定性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2015: 1-5.

[4] 侯晋, 付杰, 张志明, 等. 咖啡酸衍生物的生物活性与化学结构的改造[J]. 复旦学报: 医学版, 2011, 38(6): 546-552.

[5] AYAZ F A, HAYIRLIOGLU-AYAZ S, ALPAY-KARAOGLU S, et al. Phenolic acid contents of kale extracts and their antioxidant and antibacterial activities[J]. Food Chemistry, 2008, 107(1): 19-25.

[6] KANG Jia-mu, LIU Liu, LIU Mei-hui, et al. Antibacterial activity of gallic acid against *Shigella flexneri* and its effect on biofilm formation by repressing *mdoH* gene expression[J]. Food Control, 2018, 94: 147-154.

[7] 乔丽萍, 傅瑜, 叶兴乾, 等. 酚酸生物活性研究进展[J]. 中国食品学报, 2013(10): 144-152.

[8] SORRENTINO E, SUCCI M, TIPALDI L, et al. Antimicrobial activity of gallic acid against food-related, *Pseudomonas*, strains and its use as biocontrol tool to improve the shelf life of fresh black truffles[J]. International Journal of Food Microbiology, 2018, 266: 183-189.

[9] 邹金晶. 抗白念珠菌(*Candida Albicans*)中药材的筛选及复方 MZ1711B 抗菌功效与作用机制探究[D]. 成都: 西南交通大学, 2019: 1-5.

[10] 周倩倩, 方士元, 梅俊, 等. 丁香酚对腐败希瓦氏菌和荧光假单胞菌的抑制机理[J/OL]. 食品科学. [2020-01-21]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20190917.1332.002.html>.

[11] 张东栋. 以壳聚糖为基质的双层复合涂膜及电纺纳米纤维的研究[D]. 锦州: 渤海大学, 2019: 24-32.

[12] 王杰. 壮药壤笃总黄酮抑制鼻咽癌细胞株 CNE-1 作用的初步研究及安全性评价[D]. 南宁: 广西中医药大学, 2015: 22-23.

[13] 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): 21-25, 109.

[14] 张雅丽, 李建科, 刘柳. 没食子酸的体外抑菌作用研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(11): 81-84.

[15] 王彬容. 金钗石斛提取物的绿色制备工艺、抗氧化活性及对斑马鱼胚胎的毒性研究[D]. 成都: 西华大学, 2019: 3-4.

[16] ROUNDS L, HAVENS C M, FEINSTEIN Y, et al. Plant extracts, spices and essential oils inactivate *Escherichia coli* O157: H7 and reduce formation of potentially carcinogenic heterocyclic amines in cooked beef patties[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(14): 3 792-3 799.

[17] 于翠芳, 王鹏, 朱英莲. 乳酸菌发酵液对金黄色葡萄球菌的抑菌效果[J]. 生物加工过程, 2019(6): 662-666.

[18] DIAO Wen-rui, HU Qing-ping, ZHANG Hong, et al. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare*, Mill.)[J]. Food Control, 2014, 35(1): 109-116.

[19] LI Ying-qi, HAN Qing, FENG Jian-ling, et al. Antibacterial characteristics and mechanisms of ϵ -poly-lysine against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*[J]. Food Control, 2014, 43: 22-27.