

DMDC 对假单胞菌浮游菌和被膜菌的杀菌效果及其应用

李春柳, 刘鑫鑫, 方金玉, 朱军莉, 陆海霞*

(浙江工商大学食品与生物工程学院 浙江省食品安全重点实验室 杭州 310018)

摘要 为探究二甲基二碳酸盐(DMDC)对食源性有害微生物的控制,本研究分析 DMDC 对生鲜食品特定腐败菌荧光假单胞菌和隆德假单胞菌的浮游菌和被膜菌的杀菌效果。通过 API ZYM 试剂盒、XTT 检测试剂盒、共聚焦显微镜观察分析 DMDC 处理对假单胞菌存活性、胞内酶活、成熟生物被膜的影响,并评价该处理对生鲜蔬菜品质的影响。结果表明:与 3 种致病菌相比,DMDC 对荧光假单胞菌和隆德假单胞菌杀菌效果显著,250 mg/L DMDC 处理 5 min 能完全杀灭 2 种细菌,其与抑制白氨酸芳氨酶和茶酚-AS-BI-磷酸水解酶的活性有关。DMDC 在 250 mg/L 质量浓度下能有效破坏荧光假单胞菌和隆德假单胞菌的成熟生物被膜,处理 15 min 内被膜菌数量分别降低 4.60 lg(CFU/cm²)和 4.15 lg(CFU/cm²),细胞活力也显著下降,被膜中死细菌显著增加,且厚度变薄。西红柿和生菜在 250 mg/L DMDC 处理下表面菌落总数、假单胞菌数及霉菌酵母数明显减少,其中菌落总数分别降低 2.60 lg(CFU/cm²)和 1.98 lg(CFU/cm²),假单胞菌数分别减少 2.56 lg(CFU/cm²)和 1.73 lg(CFU/cm²),未检测出霉菌和酵母,且不影响色泽等感官品质。可见,DMDC 能有效杀灭食品腐败的假单胞菌浮游态和被膜态,对 2 种果蔬微生物控制的应用效果良好。

关键词 二甲基二碳酸盐; 假单胞菌; 被膜; 生鲜食品

文章编号 1009-7848(2022)02-0253-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.02.027

我国是果蔬生产大国,蔬菜年产量 8 亿多 t,果品年产量近 3 亿 t。然而,由于采后流通保鲜及加工技术发展相对滞后,果蔬在运输、储藏和销售过程中未经过深加工处理,只做简单的保鲜处理即上架销售,很容易引起表面破损汁液流出,易受到微生物的污染。研究显示,我国每年因腐败损失的果蔬数量约占总产量 20%以上^[1],不仅造成严重的经济损失,还带来严重的环境污染。随着人们生活水平的提高,人们对果蔬品质更加关注,探索一种安全、快捷的杀菌方式,提供更高品质的生鲜果蔬,延长其货架期十分必要。

新鲜果蔬表面存在多种微生物,如细菌、酵母菌和霉菌,植物表面的细菌大多为革兰氏阴性菌^[2]。假单胞菌属隶属于革兰氏阴性菌,该菌属与环境、医学、生态以及动植物等都密切相关,是自然界微生物分布广泛的细菌之一,部分假单胞菌属于植物病原菌,侵染范围很广,可以危害多种农作物,导致果蔬腐烂^[3]。研究表明^[4-5],多种食源性致

病菌和腐败菌容易在食品表面和加工环境形成生物被膜。生物被膜是微生物黏附于物体表面,通过分泌多糖、蛋白质、核酸等而形成的具有三维结构的胞外聚合物,细菌被膜菌是微生物为适应生存环境黏附并包被于自体产生的黏性聚合基质中,形成的一种与浮游细胞生长方式不同的群体^[6]。假单胞菌能够在果蔬表面及其加工、运输和储藏过程中,通过分泌胞外复合物在其附着表面形成菌膜。菌膜的形成能够显著增强其对外部环境应激和抑菌剂的抵抗力。

二甲基二碳酸盐(Dimethyl dicarbonate, DMDC)常被用作果蔬饮料中的防腐剂,又名维果灵,它与微生物体内的酶系基团发生反应,通过改变酶的活性,有效抑制微生物的生长。DMDC 在我国食品饮料中规定添加的最大质量浓度为 250 mg/L^[7],由于其能够快速杀灭细菌、酵母等微生物,无不良气味,并且能在短时间内分解成二氧化碳和甲醇,因此 DMDC 是一种绿色高效的抑菌剂^[8]。目前 DMDC 多应用在果酒饮料中,如在茶枝柑果酒发酵中添加 DMDC 和巴氏杀菌均能有效杀灭污染的杂菌,提高乙醇得率和糖的有效利用率^[9]。巨峰冰葡萄酒发酵过程中,DMDC 能够有效抑制发酵过程中微生物的生长,减少还原糖、总糖的无效

收稿日期: 2021-02-25

基金项目: 浙江省公益计划项目(LGF19C20003); 浙江省教育厅项目(Y201942394)

作者简介: 李春柳(1992—),女,硕士生

通信作者: 陆海霞 E-mail: luhaixia77@zjgsu.edu.cn

消耗和总酸的生成与积累,提高葡萄酒发酵的酒精精度^[10]。DMDC 杀菌效果好,安全、快速,然而目前其对果蔬腐败菌及生物被膜的清除鲜有研究报道。本研究将比较 DMDC 对食源性致腐、致病微生物的杀菌作用,重点分析 DMDC 对假单胞菌的浮游菌和被膜菌的杀菌效果,并将其应用于生菜和番茄中,评价 DMDC 的杀菌效果,以期探索一种简便、快捷的清洗方式,延长蔬菜货架期。

1 材料与方法

1.1 菌种与试剂

1.1.1 菌株 荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)PF07 和隆德假单胞菌 (*Pseudomonas lundensis*)PL28 分别是从小鲜腐败食品中分离得到,细菌经过纯化和鉴定之后保存于本实验室,其 16S rDNA 的 NCBI 登录号分别为 KU173832 和 MK041549;单增李斯特菌 ATCC19115、鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028、金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 购于中国微生物菌种保存中心。

1.1.2 试剂 二甲基二碳酸盐 (DMDC),SIGMA 公司;胰酪大豆胨培养基 (TSA)、胰酪大豆胨液体培养基 TSB、孟加拉红 (虎红)培养基,杭州微生物试剂有限公司;假单胞菌 CFC 选择性培养基,青岛海博生物技术有限公司;API ZYM 酶活性试剂条,法国生物梅里埃公司;XTT 细胞活性测定试剂盒,凯基生物。

1.2 主要仪器设备

LRH-250A 生化培养箱,上海一恒科技有限公司;SIGMA3-30K 台式高速冷冻离心机,SIGMA 公司;Infinite 200 酶标仪,瑞士 Tecan 公司;Zeiss LSM 710 共聚焦扫描显微镜,德国蔡氏公司;CR400 色差仪,杭州柯盛行仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 菌株活化 将保存在-80℃冰箱的假单胞菌 PF07 和 PL28、单增李斯特菌、鼠伤寒沙门氏菌、金黄色葡萄球菌标准菌株接种于 TSB 培养基中,30℃过夜活化两次,备用。

1.3.2 DMDC 对 5 种腐败菌和致病菌的体外杀菌效果测定 将过夜活化的单增李斯特菌、鼠伤寒沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、荧光假单胞菌和隆德假单胞菌震荡均匀后,取 100 μL 菌液加入 PBS

中,使菌体浓度达到 10⁷ CFU/mL,添加 DMDC 的质量浓度为 250 mg/L,在 30℃下分别处理 0,3,5 min,取样、稀释,平板计数。进一步向活化和稀释的荧光和隆德假单胞菌中分别添加 50,100,150,200,250 mg/L DMDC,处理 0,1,3 min 后,平板计数。

1.3.3 胞内酶活性测定 取 5 mL 过夜培养的菌液于 10 mL 离心管中,8 000 r/min 离心 10 min,去上清液,用无菌生理盐水洗涤 1 次,重悬稀释至 10⁸ CFU/mL,处理组用 250 mg/L 的 DMDC 处理 20 min,未处理组为对照。采用 API ZYM 培养条检测酶活,具体步骤参照试剂盒使用说明书。加入菌体后置于 28℃培养箱中静置 4 h 后取出,加入表面活性剂 ZYM A 和显色剂 ZYM B,观察每孔的颜色变化。

1.3.4 被膜菌的活菌计数 将过夜活化的荧光假单胞菌和隆德假单胞菌以 1%接种量分别接种于 TSB 培养基中,为放入灭菌的不锈钢片 (1 cm×1 cm),在 28℃静置培养,使菌体在不锈钢片表面形成被膜菌。培养 24 h 时间后取出不锈钢片,用无菌 PBS 中冲洗 3 次后除去表面浮游菌。向含有被膜菌的不锈钢片上加入 250 mg/L DMDC,处理 0,5,10,15 min 后,加入无菌玻璃珠震荡,稀释,平板计数。

1.3.5 XTT 法检测被膜菌的细胞活性 将使用 TSB 稀释后的过夜活化菌液 (约 10⁴ CFU/mL)加入 96 孔板中,每孔 100 μL,在 28℃培养 24 h。到达培养时间后,除去菌液,用无菌生理盐水轻轻洗去表面浮游菌,处理组每孔加入 100 μL 质量浓度为 50 mg/L 的 DMDC,分别处理 5,10,15 min,除去 DMDC,每孔加入 100 μL 无菌生理盐水和 50 μL 配制好的 XTT 检测工作液。37℃下培养 1~4 h,用酶标仪在波长 450 nm 处测每孔的 OD 值。

1.3.6 CLSM 显微镜观察生物被膜 将过夜活化的荧光假单胞菌和隆德假单胞菌分别接种于 3 mL TSB 液体培养基中,接种量为 1%,在 28℃培养箱中静置培养 24 h。到达培养时间后,去除液体培养基,用无菌生理盐水轻轻洗去表面液体培养基,然后用 250 mg/L 的 DMDC 分别处理 0,5,10,15 min,除去 DMDC,在平皿底部均匀滴加 syto9 染料和 PI 染料,室温条件下避光处理 15 min,使用

CLSM 观察生物被膜。

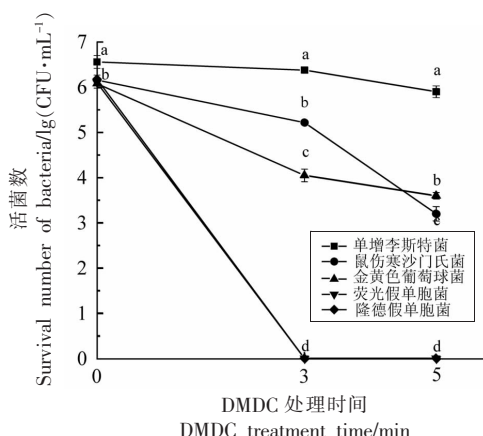
1.3.7 DMDC 对生菜和西红柿中的杀菌效果及色泽影响 取若干新鲜完好的生菜叶和小西红柿(大小均匀、质量相等)。以灭菌水浸泡为对照组,处理组分别在含有 250 mg/L DMDC 中浸泡 5, 10, 15 min, 取样, 自然晾干 10 min 后无菌取样 25 g, 拍打均质、稀释, 分别用 TSB、CFC 选择性培养基和孟加拉红平板培养菌落总数、假单胞菌和霉菌酵母, 置于 28 °C 下培养 2~5 d 计数。色差采用色差仪直接测量, 每组样品在相同处理条件下测 3 次。

1.3.8 数据处理 所有试验均设计 3 或 5 个平行试验, 采用 Microsoft Excel 2010 和 Origin 9.0 软件进行数据处理和作图, 并利用 SPSS 19.0 软件的 AVOVA 进行方差分析, $P < 0.05$ 表示有统计学显著性差异, 结果为平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$)。

2 结果与讨论

2.1 DMDC 对 5 种食源性腐败菌和致病菌的杀菌效果

DMDC 对单增李斯特菌、鼠伤寒沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、荧光假单胞菌和隆德假单胞菌 5 种菌在 PBS 中的杀菌效果如图 1 所示。250 mg/L 的 DMDC 对 5 种菌都表现出杀菌作用, 不同细菌对 DMDC 的敏感性具有差异性。单增李斯特菌对 DMDC 的耐受性最强, 当处理 5 min 时仅减少了 0.66 lg(CFU/mL), 而鼠伤寒沙门氏菌和金黄色葡萄球菌在 5 min 时分别减少了 2.96 lg(CFU/mL)



注: 不同小写字母表示处理后活菌数存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

图 1 DMDC 对 5 种食源性细菌在 PBS 中的杀菌效果

Fig.1 Bactericidal effect of DMDC in PBS on five foodborne bacteria

和 2.48 lg(CFU/mL), 荧光假单胞菌和隆德假单胞菌对 DMDC 的敏感性最高, 处理 3 min 就未检测到活菌生长。在相同的处理条件下, DMDC 对假单胞菌的杀菌效果高于其它 3 种细菌。相似地, 刘红艳等^[11]使用 250 mg/L DMDC 处理葡萄醪, 使总菌、霉菌、酵母、乳酸菌和大肠菌活菌数分别减少 1.89, 0.18, 1.47, 0.20, 1.89 lg(CFU/mL)。韩波^[12]报道 DMDC 在极低浓度下对酵母菌、霉菌和细菌具有高效广谱的杀菌效果。

2.2 DMDC 对假单胞菌的体外杀菌作用

不同质量浓度 DMDC 对荧光假单胞菌和隆德假单胞菌的杀菌作用如表 1 所示。荧光假单胞菌和隆德假单胞菌在 50 mg/L DMDC 作用下, 细

表 1 不同质量浓度 DMDC 对两种假单胞菌在 PBS 中的杀菌作用

Table 1 Bactericidal effect of DMDC at the different mass concentration on two *Pseudomonas* strains in PBS

菌株	质量浓度/mg · L ⁻¹	细菌数量/lg(CFU · mL ⁻¹)			
		0 min	5 min	10 min	15 min
PF07	50	6.13 ± 0.03 ^a	5.84 ± 0.02 ^b	5.69 ± 0.03 ^c	5.63 ± 0.01 ^d
	100	6.12 ± 0.06 ^a	3.40 ± 0.02 ^b	2.63 ± 0.01 ^c	2.14 ± 0.09 ^d
	150	6.15 ± 0.05 ^a	2.11 ± 0.05 ^b	1.48 ± 0.07 ^c	0.81 ± 0.05 ^d
	200	6.10 ± 0.10 ^a	1.89 ± 0.05 ^b	ND	ND
	250	6.16 ± 0.07 ^a	ND	ND	ND
PL28	50	6.14 ± 0.02 ^a	5.89 ± 0.05 ^b	5.84 ± 0.02 ^b	5.61 ± 0.02 ^c
	100	6.10 ± 0.05 ^a	3.23 ± 0.04 ^b	2.11 ± 0.05 ^c	1.87 ± 0.04 ^d
	150	6.11 ± 0.04 ^a	1.65 ± 0.07 ^b	0.95 ± 0.07 ^c	ND
	200	6.14 ± 0.12 ^a	1.59 ± 0.13 ^b	ND	ND
	250	6.13 ± 0.07 ^a	ND	ND	ND

注: ND 表示未检出, 同一行中的不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

菌减少缓慢;高于 100 mg/L DMDC 时,两种假单胞菌活菌数显著降低;两种假单胞菌在 200 mg/L DMDC 处理 10 min 后都未检测到活菌,250 mg/L 作用 5 min 即可将两种菌全部杀灭。可见,随着 DMDC 质量浓度增加,DMDC 对两种假单胞菌的杀菌能力显著增加,呈现出质量浓度依赖性。相似地,章亚东等^[13]报道称,随着 DMDC 在溶液中的处理浓度增加,杀菌效果显著增加,而增幅并非完全呈正比例关系。王威利^[14]采用不同浓度 DMDC 处理荔枝汁,随着 DMDC 浓度增加,杀菌效率显著增强。Gouma 等^[15]报道称,UV-C 处理前添加 75 mg/L DMDC,短时间内即可有效杀灭大肠杆菌。

2.3 DMDC 对假单胞菌胞内酶活性的影响

经 DMDC 处理后,荧光假单胞菌两种胞内酶出现明显变化,其中白氨酸芳氨酶(6)失去酶活性,萘酚-AS-BI-磷酸水解酶(12)活性显著降低。

相似地,隆德假单胞菌处理前、后白氨酸芳氨酶活性(6)丧失,萘酚-AS-BI-磷酸水解酶(12)活性下降。结果表明,DMDC 主要通过抑制假单胞菌两种胞内酶活性,扰乱细胞内正常代谢,影响细菌活性。类似地,DMDC 处理大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、酿酒酵母和明串珠菌后也可以看出多种酶活性发生变化,从而导致微生物的失活^[12,16]。研究表明,DMDC 能够杀灭微生物与其细胞内的酶被焦碳酸基团修饰失活有很大关系,酶蛋白内的胺基、咪唑基、羟基等极易和焦碳酸基团发生亲核反应^[17]。Davidson 等^[18]通过焦碳酸基团与部分氨基酸进行反应,证实了细胞中的关键酶蛋白(如甘油醛-3-磷酸脱氢酶、乙醇脱氢酶)的组氨酸咪唑基部位甲氧基发生羧化反应,产生甲氧甲酰咪唑基团,酶的构象发生改变,活性消失,从而导致微生物的死亡。

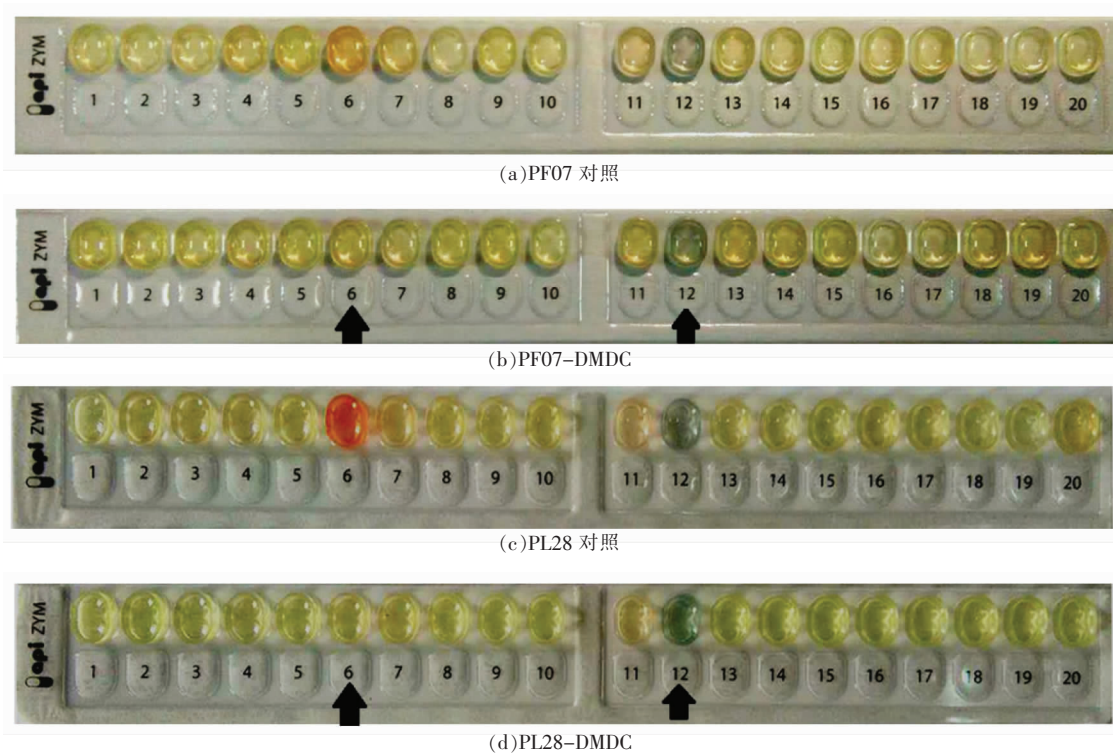


图 2 DMDC 对荧光假单胞菌和隆德假单胞菌胞内酶活的影响

Fig.2 Effect of DMDC on intracellular enzyme activities of *P. fluorescein* and *P. lund*

2.4 DMDC 对假单胞菌成熟生物被膜的清除作用

假单胞菌为强的被膜形成菌株,DMDC 对两

种假单胞菌被膜菌的清除作用如图 3 所示。荧光和隆德假单胞菌经 24 h 培养后形成生物被膜,其活菌数分别为 7.37 lg(CFU/cm²)和 7.04 lg(CFU/

cm²)。当 250 mg/L DMDC 处理 5 min 时, 荧光和隆德假单胞菌被膜菌分别减少 3.23 lg(CFU/cm²) 和 2.64 lg(CFU/cm²), 而 10 min 后两种被膜菌分别继续减少 1.04 lg(CFU/cm²) 和 0.99 lg(CFU/cm²), 处理至 15 min 两种被膜菌减少缓慢(图 3a)。进一步采用 XTT 法分析 250 mg/L DMDC 处理下荧光和隆德假单胞菌被膜菌细胞活力的变化(图 3b)。当 DMDC 处理 5 min 时, 两种假单胞菌细胞活力迅速降低, OD 值分别下降了 0.92 和 0.55, 处理 10 min 后 OD 值分别继续下降 0.10 和 0.21。可见, DMDC 处理显著降低假单胞菌被膜菌的数量和细胞活性, 然而随着 DMDC 处理的时间延长, 杀菌速率减慢, 生物被膜活菌计数和 XTT 法结果较一致。

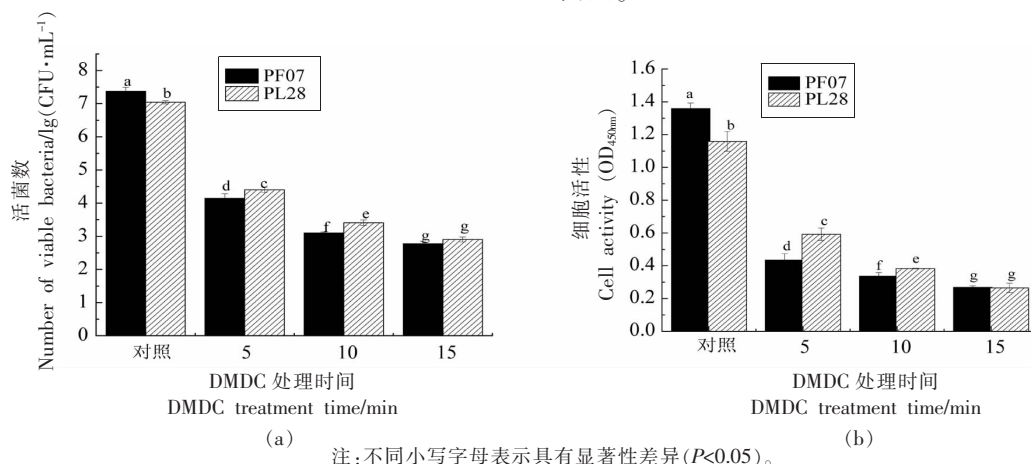


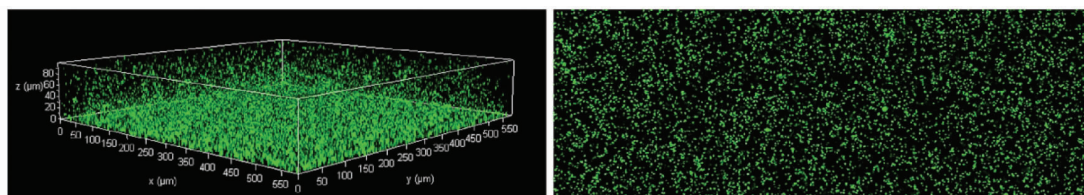
图 3 DMDC 对假单胞菌的成熟生物被膜菌体活菌数(a)和活性(b)的影响

Fig.3 Effect of DMDC on the bacterial number (a) and activity (b) in matured biofilm of *Pseudomonas*

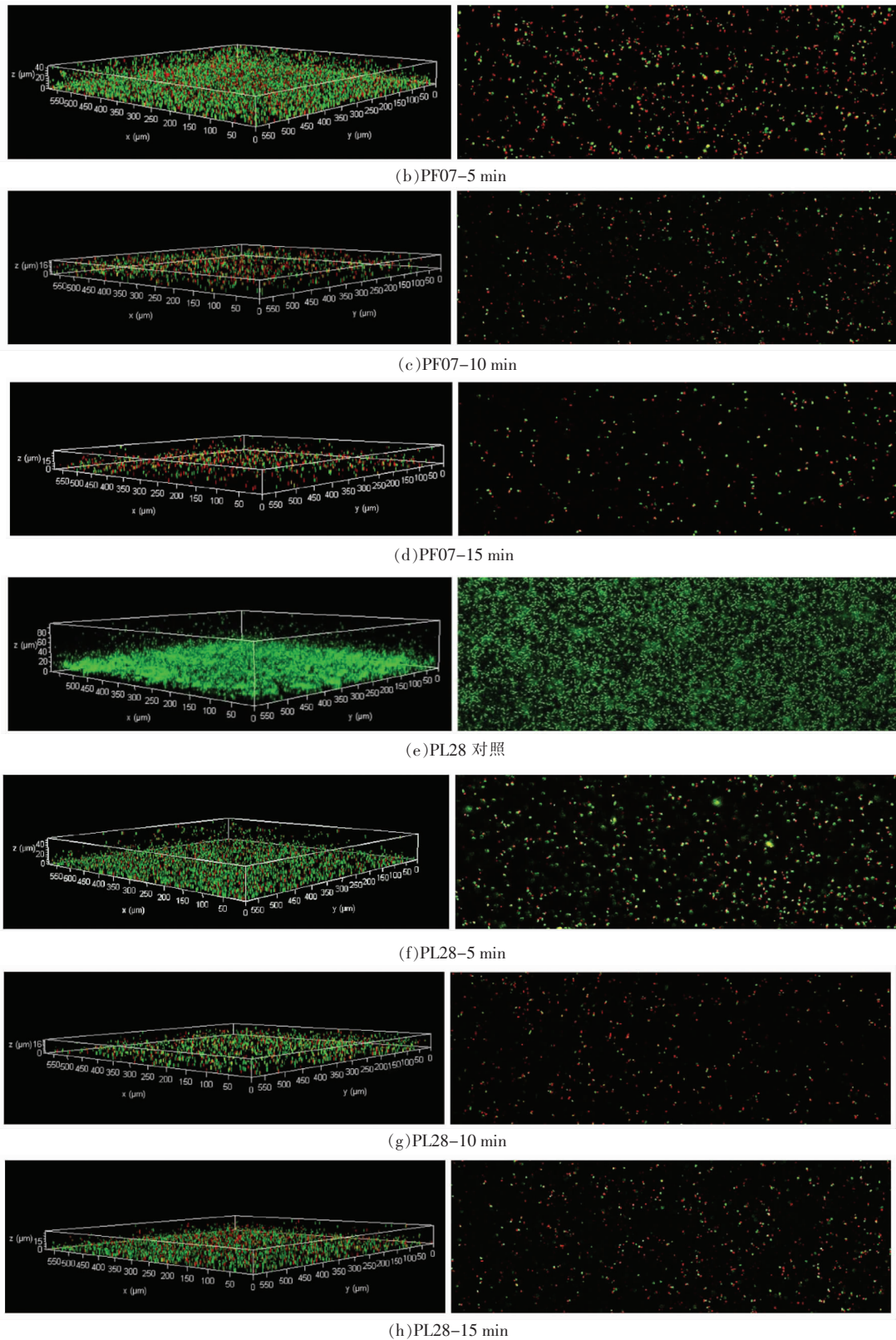
2.5 DMDC 对假单胞菌成熟被膜结构的影响

采用 CLSM 观察两种假单胞菌在 DMDC 处理前、后的生物被膜三维结构的变化, 如图 4 和图 5 所示。荧光假单胞菌和隆德假单胞菌经 24 h 培养后形成致密的生物被膜, 在三维和二维结构中布满强烈的绿色荧光信号, 两种细菌菌体分布密集, 被膜厚度分别为 80 μm 和 75 μm 。经 250 mg/L

DMDC 处理后, 两种假单胞菌生物被膜的结构明显破坏, 处理 5 min 后被膜中的活细菌明显降低, 死细胞增加, 被膜厚度分别降低到 40 μm 和 30 μm 。当样品处理 10 min 时生物被膜厚度降低到 16 μm , 而处理 15 min 后样品中存在大量死菌, 被膜厚度显著降低。可见, 随着 DMDC 处理时间的延长, 两种假单胞菌生物被膜结构被破坏, 被膜厚



(a)PF07 对照



注:左图为三维结构图,右图为二维结构图; x 和 y 代表生物被膜宽度; z 代表生物被膜厚度。

图4 CLSM观察DMDC(250 mg/L)处理对荧光假单胞菌和隆德假单胞菌生物被膜结构的影响

Fig.4 Effect of DMDC (250 mg/L) on the biofilm structures of *P. fluorescens* and *P. lund* observed by CLSM

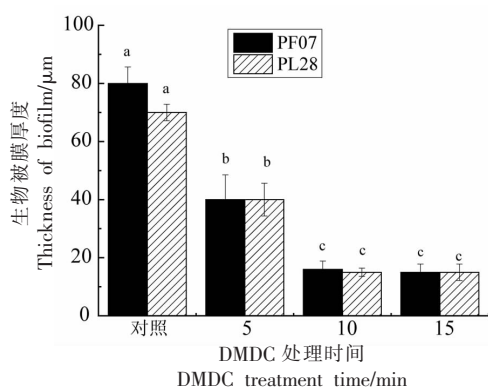


图 5 DMDC(250 mg/L)处理对两种假单胞菌生物被膜厚度的影响

Fig.5 Effects of DMDC (250 mg/L) treatment on biofilm thickness of the two *Pseudomonas*

度降低,表现良好地清除效果。Liu 等^[22]通过 CLSM 也观察到磺化壳聚糖和壳聚糖盐酸盐对铜绿假单胞菌的生物被膜有明显的抑制作用,且呈现浓度依赖性。

2.6 DMDC 对两种生鲜蔬菜品质的影响

鲜切果蔬表面微生物多为腐败菌,如欧文氏菌、假单胞菌属于优势菌群。当果蔬表面微环境改变时,还会导致梭状芽孢杆菌、李斯特菌、耶尔森氏菌等致病菌的加速生长,并产生毒素,危及人们的身体健康甚至生命^[23]。DMDC 对西红柿和生菜两种蔬菜表面杀菌效果如表 2 所示,DMDC 对两

种蔬菜表面的菌落总数、假单胞菌数、霉菌酵母总数表现相似的杀菌作用,随质量浓度的增加杀菌效果增强。在 250 mg/L DMDC 处理 15 min 时,西红柿菌落总数降低 2.6 lg(CFU/g),假单胞菌降低 1.98 lg(CFU/g);生菜表面的菌落总数和假单胞菌总数分别降低 2.59 lg(CFU/g)和 1.73 lg(CFU/g)。相对于细菌,DMDC 对蔬菜中真菌的杀菌效果显著,经 150 mg/L DMDC 处理 5 min 后西红柿和生菜中均未检测出霉菌和酵母。另外,在相同质量浓度的处理条件下,生菜的杀菌速率低于西红柿,可能是西红柿表面较光滑,更容易杀灭细菌。陈梦曦等^[24]通过臭氧消毒柜对不同载体表面的消毒效果,也发现消毒柜对光滑硬质表面的细菌更容易杀灭。Chen 等^[25]也报道 DMDC 对大白菜不同组织的灭菌效果有差异,DMDC 处理白菜茎和叶时菌落总数分别降低 4.49 lg(CFU/g)和 4.45 lg(CFU/g),而在处理花和花蕾时,菌落总数仅降低 2.74 lg(CFU/g)。研究还发现,果蔬表面的假单胞菌对 DMDC 比体外 PBS 中的假单胞菌具有更强耐受性,在 250 mg/L DMDC 处理 15 min 后两种蔬菜表面仍能检测少量的假单胞菌,可能是果蔬表面的细菌多为被膜菌有关。Marlies 等^[26]和 Tamara 等^[27]报道细菌主要以生物膜的形式在非生物接触面生长,其比浮游细胞或菌落更具抵抗力。

表 2 不同质量浓度 DMDC 处理对西红柿和生菜中微生物总数的影响

Table 2 Effects of DMDC at different mass concentrations on total number of microorganisms in tomato and lettuce

质量浓度/ mg·L ⁻¹	时间/min	西红柿/lg(CFU·g ⁻¹)			生菜/lg(CFU·g ⁻¹)		
		菌落总数	假单胞菌	霉菌酵母	菌落总数	假单胞菌	霉菌酵母
对照	0	5.87 ± 0.05 ^a	4.84 ± 0.07 ^a	4.47 ± 0.01	6.27 ± 0.07 ^a	4.81 ± 0.06 ^a	4.04 ± 0.06
150	5	4.68 ± 0.01 ^b	3.99 ± 0.12 ^b	ND	5.93 ± 0.03 ^b	4.77 ± 0.06 ^a	ND
	10	4.18 ± 0.05 ^c	3.67 ± 0.04 ^c	ND	5.86 ± 0.12 ^b	4.26 ± 0.10 ^b	ND
	15	4.13 ± 0.07 ^c	3.35 ± 0.07 ^c	ND	5.40 ± 0.07 ^c	3.90 ± 0.04 ^c	ND
200	5	4.46 ± 0.02 ^b	3.65 ± 0.09 ^b	ND	4.90 ± 0.06 ^b	4.13 ± 0.07 ^b	ND
	10	4.17 ± 0.05 ^c	3.35 ± 0.10 ^c	ND	4.88 ± 0.08 ^b	3.73 ± 0.05 ^c	ND
	15	4.03 ± 0.09 ^d	3.01 ± 0.15 ^d	ND	4.31 ± 0.08 ^c	3.46 ± 0.10 ^d	ND
250	5	3.85 ± 0.02 ^b	3.09 ± 0.07 ^b	ND	4.22 ± 0.20 ^b	3.69 ± 0.12 ^b	ND
	10	3.38 ± 0.03 ^c	2.90 ± 0.08 ^c	ND	3.93 ± 0.04 ^c	3.25 ± 0.03 ^c	ND
	15	3.27 ± 0.10 ^d	2.86 ± 0.05 ^d	ND	3.68 ± 0.06 ^d	3.08 ± 0.05 ^d	ND

注:ND 表示未检测出,同一列中的不同字母表示与对照组相比差异显著($P < 0.05$)。

DMDC 对西红柿和生菜色泽的影响如图 6 所示。西红柿和生菜在 15 min 内样品色泽无显著性

变化,ΔE 值在 15 min 内均无显著性差异,表明经 DMDC 短时间处理,对蔬菜的色泽无显著性影响。

DMDC 有效地抑制菜心中微生物的生长繁殖,延缓鲜切菜心的衰老和腐败变质,保持了鲜切菜心

的外观品质^[28]。

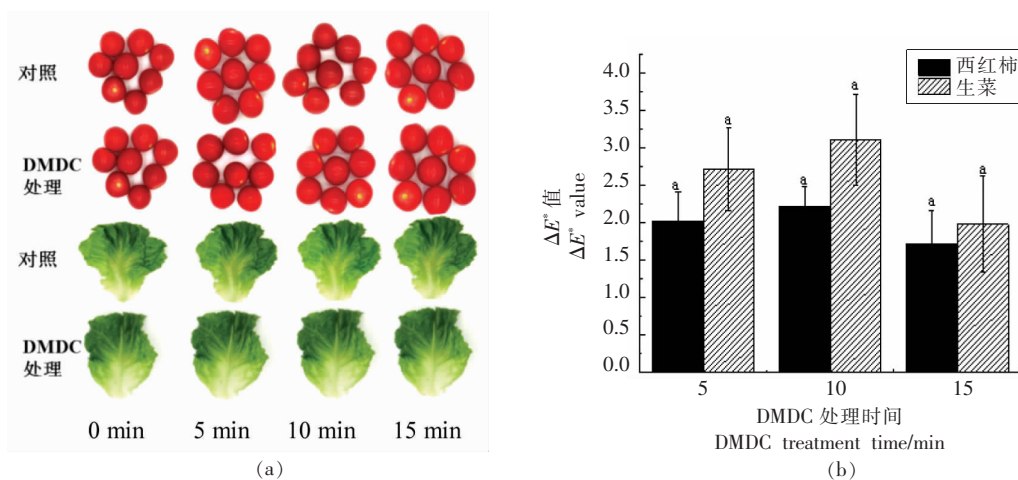


图6 DMDC(250 mg/L)对西红柿和生菜色泽的影响

Fig.6 Effects of DMDC (250 mg/L) on color of tomato and lettuce

3 结论

DMDC 是一种绿色高效的果汁饮料防腐剂。研究发现,DMDC 对生鲜食品中的优势腐败菌荧光假单胞菌和隆德假单胞菌具有良好的杀菌作用,其显著降低胞内的白氨酸芳胺酶和萘酚-AS-BI-磷酸水解酶的活性,有效地杀灭两种假单胞菌的浮游菌,杀菌效果呈现质量浓度和时间的依赖性。并且高质量浓度的 DMDC 还能够显著清除两种假单胞菌的被膜菌,降低细胞活性、增加死细胞数量,破坏被膜结构。DMDC 处理在不影响蔬菜色泽条件下,能有效的降低菌落总数、假单胞菌数,杀灭霉菌酵母。DMDC 有望成为一种新型的果蔬清洗剂,降低果蔬表面的初始菌落和腐败假单胞菌,提高生鲜蔬菜的品质。

参 考 文 献

- [1] 冯双庆. 果蔬贮运学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008: 2.
FENG S Q. Storage and transportation of fruits and vegetables[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2008: 2.
- [2] MAHDIEH M, MOHAMMAD R S, FAEZEH S, et al. A review of recent trends in the development of the microbial safety of fruits and vegetables [J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 103:

321-332.

- [3] 卢松玉. 假单胞菌属植物病原菌 DNA 条形码检测技术研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2017.
LU S Y. DNA barcoding method for plant pathogenic bacteria of *Pseudomonas* detection[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2017.
- [4] 刘星宇, 向绪稳, 陶辉, 等. 调节生物被膜化合物的研究进展[J]. 生物工程学报, 2017, 33(9): 1433-1465.
LIU X Y, XIANG X W, TAO H, et al. Chemical agents modulating bacterial biofilm formation and development[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2017, 33(9): 1433-1465.
- [5] 姜春新, 王雅莹, 洪小利, 等. 柠檬酸和乙酸对致病假单胞菌的抗生物被膜研究[J]. 核农学报, 2021, 35(1): 120-127.
JIANG C X, WANG Y Y, HONG X L, et al. Antibiofilm of citric acid and acetic acid against spoilage related *Pseudomonas*[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2021, 35(1): 120-127.
- [6] 王雅莹. 基于群体感应研究香芹酚对鱼源荧光假单胞菌单/混生物被膜的抑制作用[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2020.
WANG Y Y. Inhibition of carvacrol against the mono/dual-biofilm of *Pseudomonas fluorescens* based on quorum sensing[D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2020.
- [7] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品

- 安全国家标准 食品添加剂使用标准: GB 2760-2014[S]. 北京:中国标准出版社, 2014.
- National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. National food safety standards -standards of using food additives: GB 2760-2014[S]. Beijing: China Standards Press, 2014.
- [8] 程银棋, 余元善, 吴继军, 等. DMDC 处理对桑果汁品质的影响[J]. 热带作物学报, 2014, 35(7): 1439-1443.
- CHENG Y Q, YU Y S, WU J J, et al. Effect of dimethyl dicarbonate on quality attributes of mulberry juice[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2014, 35(7): 1439-1443.
- [9] 邓莎莎, 吴继军, 刘忠义, 等. 二甲基二碳酸盐发酵前处理对茶枝柑果酒发酵特性的影响[J]. 食品科学, 2016, 37(21): 7-13.
- DENG S S, WU J J, LIU Z Y, et al. Effect of dimethyl dicarbonate pretreatment on fermentation characteristics of *Citrus Reticulata* cv. Chachiensis fruit wine[J]. Food Science, 2016, 37(21): 7-13.
- [10] 刘忠义, 刘红艳, 付满, 等. DMDC 前处理对巨峰冰葡萄酒发酵及其品质的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2020, 48(5): 123-130, 137.
- LIU Z Y, LIU H Y, FU M, et al. Effect of DMDC pretreatment on fermentation and quality of khoyo ice wine[J]. Journal of Northwest A&F University(Nat. Sco. Ed.), 2020, 48(5): 123-130, 137.
- [11] 刘红艳, 刘忠义, 吴小艳, 等. DMDC 预处理对葡萄醪微生物及部分理化指标的影响[J]. 钦州学院学报, 2019, 34(7): 24-29.
- LIU H Y, LIU Z Y, WU X Y, et al. Effects of dimethyl dicarbonate (DMDC) pretreatment on micro-organism and some physical and chemical index of grape mash[J]. Journal of Qinzhou University, 2019, 34(7): 24-29.
- [12] 韩波. 朗盛化学: 饮料冷杀菌[J]. 饮料工业, 2011, 14(10): 52-53.
- HAN B. Lanxess chemical: Beverage cold sterilization[J]. Beverage Industry, 2011, 14(10): 52-53.
- [13] 章亚东, 蒋自伟. 二碳酸二甲酯的分解动力学研究[J]. 郑州大学学报(工学版), 2011, 32(5): 34-37.
- ZHANG Y D, JIANG Z W. Study on the kinetics of decomposition reaction of dimethyl dicarbonate[J]. Journal of Zhengzhou University (Engineering Science), 2011, 32(5): 34-37.
- [14] 王威利. 二甲基二碳酸盐在荔枝汁中杀菌研究[D]. 南昌: 江西农业大学, 2013.
- WANG W L. Study on dimethyl dicarbonate in Litchi juice[D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2013.
- [15] GOUMA M, GAYÁN E, RASO J, et al. Influence of dimethyl dicarbonate on the resistance of *Escherichia coli* to a combined UV-heat treatment in apple juice[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 501.
- [16] BIZRI J N, WAHEM I A. Citric acid and antimicrobials affect microbiological stability and quality of tomato juice[J]. Food Sci, 1994, 59(1): 130-134.
- [17] 邓莎莎. 二甲基二碳酸盐发酵前处理在果酒发酵中的应用[D]. 湘潭: 湘潭大学, 2016.
- DENG S S. Application of dimethyl dicarbonate fermentation pre-treatment in the fermentation of fruit wine[D]. Xiangtan: Xiangtan University, 2016.
- [18] DAVIDSON P M, SOFOS J N, BRANEN A L. Antimicrobials in food[M]. 3 ed. New York: Taylor & Francis Group, 2005: 305-326.
- [19] 吴晓晓, 贾毅飞, 段真真, 等. 不同浓度大蒜素溶液对奶牛乳房炎金黄色葡萄球菌 N2 分离株生物被膜的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2019, 14: 128-129, 135, 177.
- WU X X, JIA Y F, DUAN Z Z, et al. The effect of different concentrations of allicin solution on the biofilm of *Staphylococcus aureus* N2 isolate in bovine mastitis[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2019, 14: 128-129, 135, 177.
- [20] 朱军莉, 王慧敏, 王桂洋, 等. 茶多酚和葡萄籽提取物对假单胞菌抗生物被膜的抑制作用[J]. 中国食品学报, 2016, 16(1): 84-90.
- ZHU J L, WANG H M, WANG G Y, et al. Inhibition activity of tea polyphenols and grape seed extract on biofilm formation of *Pseudomonas*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016, 16(1): 84-90.
- [21] 张丽蓉, 宋金武, 黎英文, 等. 细菌生物被膜与游离菌对消毒剂抗性比较研究[J]. 中国医疗器械信息, 2018, 24(23): 25-28.
- ZHANG L R, SONG J W, LI Y W, et al. Comparative study on bacterial biofilm and bacteria resistance to disinfectant[J]. China Medical Device Information, 2018, 24(23): 25-28.

- [22] LIU Y H, JIANG Y, ZHU J L, et al. Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation of sulfonated chitosan against *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 206: 412–419.
- [23] 果雅凝, 陆胜民, 谢晶. 鲜切果蔬中的微生物与控制[J]. 保鲜与加工, 2005, 6: 1–4.
GUO Y N, LU S M, XIE J. Microorganism and control of fresh-cut fruit and vegetable[J]. Storage and Process, 2005, 6: 1–4.
- [24] 陈梦曦, 李欣洋, 代黄梅, 等. 臭氧消毒柜对不同材料表面消毒效果的研究[J]. 中国消毒学杂志, 2019, 36(5): 329–331.
CHEN M X, LI X Y, DAI H M, et al. Study on the disinfection effect of ozone disinfectant on the surface of different materials[J]. Chinese Journal of Disinfection, 2019, 36(5): 329–331.
- [25] CHEN Y L, WANG H H, XU Y J, et al. Effect of treatment with dimethyl dicarbonate on microorganisms and quality of Chinese cabbage[J]. Postharvest Biology and Technology, 2013, 76: 139–144.
- [26] MARLIES G, CINDY S, LAURENS V, et al. Influence of plasma characteristics on the efficacy of cold atmospheric plasma (CAP) for inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium biofilms[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2019, 52: 376–386.
- [27] TAMARA M, UROŠ A, MARTINA Š G, et al. Foodborne pathogens and their toxins [J]. Journal of Proteomics, 2016, 147: 226–235.
- [28] 王惠惠, 王维民, 陈于陇, 等. DMDC 杀菌对鲜切菜心品质的影响[J]. 食品工业科技, 2013, 34(13): 303–308, 312.
WANG H H, WANG W M, CHEN Y L, et al. Effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) as disinfectant on the quality of fresh-cut flowering cabbages [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(13): 303–308, 312.

Bactericidal Effect and Application of DMDC on *Pseudomonas* Planktonic and Biofilm Bacteria

Li Chunliu, Liu Xinxin, Fang Jinyu, Zhu Junli, Lu Haixia*

(School of Food Science & Biotechnology, Key Laboratory of Food Safety of Zhejiang Province, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018)

Abstract To explore the bactericidal effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) on foodborne harmful microorganism, the bactericidal effect of DMDC on the planktonic and biofilm bacteria of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas lund* of spoilage organism in fresh food were comparatively evaluated in the present study. Effects of DMDC on the bacterial activity, intracellular enzyme activity and mature biofilm of *Pseudomonas* were measured by using API ZYM kit, XTT kits and confocal microscope. Meanwhile, antibacterial activity of DMDC at different mass concentration in tomato and lettuce were performed. The results showed that DMDC had stronger bactericidal action against the two *Pseudomonas* compared with other three pathogens. The two *Pseudomonas* were inactivated by 250 mg/L DMDC treatment for 5 min, which was attributed to the decreasing activities of alanine aminase and naphthol-AS-BI-phosphohydrolas. In addition, mature biofilm of *P. fluorescein* and *P. lund* could be effectively destroyed. The population in biofilm cell decreased by 4.60 lg (CFU/cm²) and 4.15 lg (CFU/cm²), respectively, and the cell activity significantly dropped, resulting in the increase of dead cell and the thinner biofilm structure, when treated by 250 mg/L DMDC. Moreover, the aerobic plant count (APC), *Pseudomonas* number (PA), and mold and yeast count (MYC) of tomato and lettuce were significantly reduced by treatment of DMDC at 250 mg/L. The APC and PA in tomato was reduced by 2.60 lg (CFU/cm²) and 1.73 lg (CFU/cm²), and in lettuce was decreased by 2.56 lg(CFU/cm²) and 1.98 lg(CFU/cm²), respectively, for 15 min treatment, accompanied by no detection of mold and yeast after 5 min treatment. Sensory qualities were not affected. Thus, DMDC significantly killed the planktonic and mature biofilm of two *Pseudomonas*, and has a good bactericidal effects when applied to the surface of two kinds of fruits and vegetables, which is expected to become a new cleaning agent in fruit and vegetable.

Keywords dimethyl dicarbonate; *Pseudomonas*; biofilm; fresh food