

## 硫醚类香料对金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌的抑制作用

许宇航, 王岩, 毕景然, 侯红漫, 郝洪顺, 张公亮\*

(大连工业大学食品学院 辽宁大连 116034)

**摘要** 选取 10 种常见的硫醚类香料,通过测量其抑菌圈直径来研究各硫醚类香料对金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌的抑制能力,并分析硫醚香料的结构与抑菌能力的关系。筛选出抑菌能力最强的硫醚类香料,利用反转录荧光定量聚合酶链式反应来考察其对金黄色葡萄球菌耐热核酸酶 *nuc* 基因表达水平的影响。结果显示;二烯丙基二硫醚(DADS)、甲基糠基二硫醚(MFDS)和二烯丙基硫醚(DAS)对两种革兰氏阳性菌的抑菌效果较好,且抑菌能力为 DADS>MFDS>DAS。DADS 相较于其它 9 种硫醚类香料抑菌效果最好,对金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌的最低抑制浓度(MIC)分别为 312.5 mmol/L 和 1.25 mol/L。当 DADS 的浓度为亚抑制浓度时(1/16MIC、1/8MIC、1/4MIC、1/2MIC),均能显著降低金黄色葡萄球菌 *nuc* 基因的表达水平( $P<0.01$ )。以上结果说明,烯丙基和二硫键的存在能够增强硫醚类香料的抑菌能力,并且对抑制金黄色葡萄球菌毒力发挥重要作用。

**关键词** 硫醚类香料;金黄色葡萄球菌;单增李斯特菌;抑制能力;毒力基因

**文章编号** 1009-7848(2022)05-0062-08 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.05.008

近年来,由于天然香料的分离技术不断地改进,天然香料在市場中的比例逐渐增加,其中含硫香料在食品香料和食品添加剂中发挥着越来越重要的作用<sup>[1]</sup>。含硫香料作为一种安全、无毒的天然香料,在美国食品香料和萃取物制造协会(FEMA)公布的一些安全性物质中,也占了很大的比例<sup>[2]</sup>。硫醚香料作为含硫香料中的代表,主要来源于大蒜素<sup>[3-4]</sup>。目前,对于硫醚类香料的抑菌构效研究较少,多用于抗癌的研究,一般通过干扰细胞周期来诱导癌细胞的凋亡<sup>[5]</sup>。

金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌是食品中最常见的两种革兰氏阳性致病菌。金黄色葡萄球菌是多种临床感染的病原菌,它能够引发菌血症、感染性心内膜炎和骨关节感染,以及皮肤和软组织感染和化脓性脓肿形成<sup>[6-7]</sup>。单增李斯特菌可以进入人和动物的肠道,进而引起脑膜炎等疾病,感染人群主要集中于免疫力低下的人群,如孕妇、老人和新生儿等<sup>[8-9]</sup>。寻找一种新型、有效,可应用于食品行业的抑制剂,来控制食源性致病菌的传播和感染具有重要的研究意义。

耐热核酸酶与金黄色葡萄球菌侵染宿主细胞

的能力有着重要关系,直接影响它的毒性,由 *nuc* 基因编码,它的存在能够增强细菌侵袭能力,同时耐热核酸酶也是检测金黄色葡萄球菌污染食品的重要特征标志<sup>[10-11]</sup>。本研究选取 10 种硫醚类香料,通过测量抑菌圈的直径来比较和判断它们的抑菌效果,并讨论硫醚香料的结构与其抑菌能力的关系。同时也筛选出抑菌能力最强的硫醚类香料,研究其对金黄色葡萄球菌 *nuc* 基因表达量的影响,为硫醚类香料作为食源性致病菌的抑制剂在食品行业中的应用提供一定的理论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与试剂

本研究根据 GB 2760-2014《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》<sup>[12]</sup> 选取了 10 种硫醚类香料,均从美国 Sigma 公司订购。名称及结构见表 1。

金黄色葡萄球菌 ATCC 6538、单增李斯特菌 ATCC 19115 取自大连工业大学食品学院微生物实验室。

RNAprep pure 培养细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;SYBR® Premix Ex Taq™、Random primers[pd(N)6]、Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H-),5×M-MLV Buffer、dNTP Mixture、Recombinant RNase

收稿日期:2021-05-06

基金项目:国家重点研发计划项目(2019YFC1605902)

作者简介:许宇航(1995—),男,硕士

通信作者:张公亮 E-mail: zgl\_mp@163.com

表1 10种硫醚类香料的名称及结构

Table 1 Name and structure of ten kinds of sulfide flavors

试验编号	中文名称	FEMA编号	英文名称	英文简称	结构
1	二甲基三硫醚	3275	Dimethyl trisulfide	DMTS	
2	甲基丙基二硫醚	3201	Methyl propyl disulfide	MPDS	
3	甲基 2-甲基-3-呋喃基二硫醚	3573	Methyl 2-methyl-3-furyl disulfide	MMFDS	
4	二烯丙基二硫醚	2028	Diallyl disulfide	DADS	
5	二烯丙基硫醚	2042	Diallyl sulfide	DAS	
6	二丙基二硫醚	3228	Dipropyl disulfide	DPDS	
7	2-甲基-3-甲硫基呋喃	3949	2-Methyl-3-methylthiofuran	MMTF	
8	甲基糠基二硫醚	3362	Methyl furfuryl disulfide	MFDS	
9	糠基异丙基硫醚	3161	Furfuryl isopropyl sulfide	FIPDS	
10	双(2-甲基-3-呋喃基)二硫醚	3259	Bis(2-methyl-3-furyl) disulfide	BMFDS	

Inhibitor, 宝生物工程(大连)有限公司; RNase-free water、荧光定量聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)引物, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 胰蛋白胨、酵母浸粉、氯化钠、琼脂粉、大豆蛋白胨、磷酸二氢钾、葡萄糖(分析纯级), 大连博诺生物化学试剂公司; 无水乙醇(分析纯级), 沈阳力诚试剂厂。

## 1.2 仪器与设备

FA(A)型电子天平, 上海民桥精密科学仪器有限公司; 01J2003-04型高压灭菌锅, 上海博讯实业有

限公司; ZHWY-1008型恒温培养振荡器、ZHWY-2102C型双层小容量全温度恒温摇床, 上海智城分析仪器制造有限公司; DRP-9162型电热恒温培养箱, 上海森信实验仪器有限公司; UV-1750型紫外-可见分光光度计, 日本津岛仪器有限公司; MyiQTM2型荧光定量PCR仪, 美国Bio-Rad公司。

## 1.3 方法

1.3.1 硫醚香料的处理 选择乙醇作为硫醚类香料的溶剂, 所需原液和无水乙醇的体积可按如下

公式计算出,稀释至适当浓度后,置于4℃冰箱密封备用。

$$c = \frac{\rho V_1}{M(V_1 + V_2)}$$

式中, $c$ ——稀释的硫醚类香料的浓度, mol/L;  $\rho$ ——硫醚类香料的密度, g/mL;  $V_1$ ——硫醚类香料的体积, L;  $M$ ——硫醚类香料的摩尔质量, g/mol;  $V_2$ ——无水乙醇的体积, L。

1.3.2 培养基的制备 金黄色葡萄球菌用溶菌肉汤(Lysogeny broth, LB培养基)培养,每配置100 mL培养基需要添加1 g胰蛋白胍、0.5 g酵母浸粉和1 g氯化钠,用100 mL去离子水将其混匀后,调节pH值至7.0,在121℃下灭菌20 min。

单增李斯特菌用胰蛋白胍大豆肉汤培养基培养,每配置100 mL培养基需要添加1.7 g胰蛋白胍、大豆蛋白胍0.3 g、氯化钠0.5 g、磷酸二氢钾0.25 g、葡萄糖0.25 g,最后用100 mL去离子水将其混匀后,调节pH值至(7.3±0.2),在121℃下灭菌20 min。

在配制固体培养基时,都需要向两种培养基中添加1.5 g/100 mL的琼脂粉。

1.3.3 菌种的活化及培养 取-80℃冰箱中冻存的菌液100 μL于100 mL的液体培养基中进行第1次传代,在37℃下震荡培养24 h后,在固体培养基上进行第2次传代,在37℃恒温箱培养12 h后,挑取单菌落至液体培养基并在37℃下震荡培养12 h。配制无菌的生理盐水并用其将上述得到的菌液稀释至10<sup>7</sup> CFU/mL,保存于4℃冰箱中备用。

1.3.4 抑菌圈的测定 抑菌圈的测定采用了滤纸片法<sup>[13-14]</sup>。取100 μL上述被稀释后的菌液于固体培养基上,用玻璃珠摇匀,使菌液能够均匀地分布在整个固体培养基上,将准备好的无菌直径为1 cm的滤纸片放置平板中央,添加6 μL浓度为5 mol/L的硫醚类香料于滤纸片上,最后将固体培养基放置于37℃的培养箱中培养18~24 h。每种硫醚类香料进行3次平行试验,最终结果取平均值。

1.3.5 最低抑菌浓度的测定 根据1.3.4节试验结果选取抑菌效果最好的硫醚类香料作为研究对象,用二倍稀释法测定它的最低抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC)。用60%的乙

醇水溶液将5 mol/L的硫醚类香料进行2倍稀释,分别为2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 mol/L以及0.15625 mol/L。精确量取0.1 mL菌液添加至0.8 mL的液体培养基中,再将0.1 mL不同浓度的硫醚类香料分别添加至液体培养基中,震荡混匀之后,在37℃下培养24 h。再取培养完之后的菌液100 μL接种于固体培养基中,用玻璃珠震荡混匀后,在37℃下培养24 h<sup>[15]</sup>。最后观察固体培养基上是否有菌生长,并且以无菌生长的硫醚类香料的最低浓度为MIC。每个浓度做3次平行试验,最终结果取平均值。

1.3.6 硫醚类香料对生长曲线的影响 根据1.3.4节和1.3.5节结果,将抑菌能力最强的硫醚类香料稀释至亚抑菌浓度1/16MIC、1/8MIC、1/4MIC、1/2MIC和MIC。先取1 mL的菌液于99 mL的液体培养基中培养,再将0.1 mL各亚抑菌浓度下的硫醚类香料分别滴加到液体培养基中,以仅添加0.1 mL无水乙醇的菌液为对照组,37℃下震荡培养24 h,并且每隔2 h测一次菌液在波长600 nm下的吸光度值,以吸光度值为纵坐标,时间为横坐标,绘制供试菌的生长曲线。

1.3.7 RNA的提取和反转录荧光定量PCR 在液体培养基中添加各亚抑菌浓度的硫醚类香料,以未添加硫醚香料的为对照组,培养12 h后,取适量的菌液,按照RNA试剂盒的说明书提取RNA并反转录为cDNA即可<sup>[16-17]</sup>。nuc基因引物:上游5'-GCCGATGATGGTGATACGGTT-3'、下游5'-AGCCAAGCCTTGACGAACATAAAGC-3'<sup>[18]</sup>;16S rRNA内参基因引物:上游5'-GCTGCCCTTTG-TATTGTC-3'、下游5'-AGATGTTGGGTTAAGTC-CC-3'<sup>[19]</sup>。最后在65~90℃的范围内建立溶解曲线,采用方程法2<sup>-ΔΔCT</sup>来确定基因的相对表达量<sup>[20]</sup>。

## 1.4 数据分析与处理

所有的数据都以平均值±标准差来表示,并均用SPSS软件进行显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 硫醚类香料对金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌的抑制效果

将各硫醚类香料都稀释至5 mol/L,在此浓度下对金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌的抑制效果

见表 2。结果表明,在 10 种硫醚类香料中,有 9 种抑制了金黄色葡萄球菌的生长,有 7 种抑制了单增李斯特菌的生长,说明单增李斯特菌对硫醚类香料不如金黄色葡萄球菌敏感,其中 DMTS、

DADS、DAS、MMTF、MFDS、FIPDS 对金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌均有抑制作用,MPDS、DPDS 和 BMFDS 只对金黄色葡萄球有抑制作用。

表 2 10 种硫醚类香料抑制作用

Table 2 The inhibitory effect of ten kinds of isulfide flavors

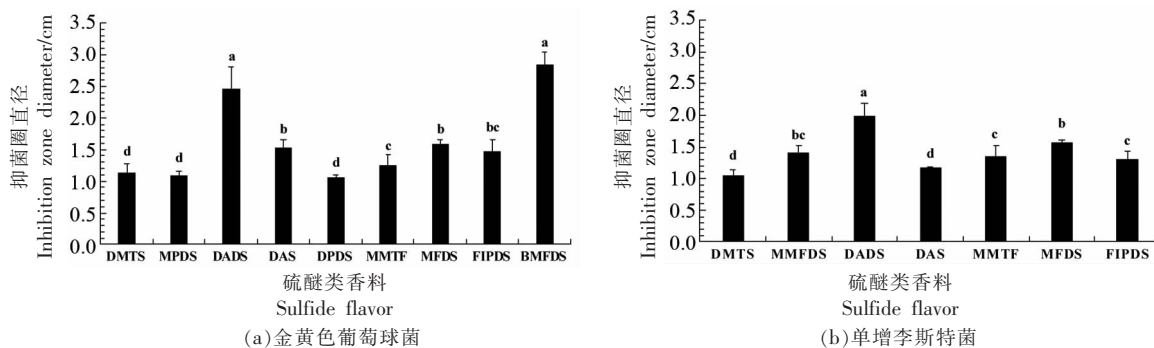
菌种	乙醇	硫醚类香料									
		DMTS	MPDS	MMFDS	DADS	DAS	DPDS	MMTF	MFDS	FIPDS	BMFDS
金黄色葡萄球菌	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
单增李斯特菌	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-

注:“-”表示无抑菌效果,“+”表示有抑菌效果。

## 2.2 硫醚类香料的抑菌作用

选取具有抑菌能力的硫醚类香料进行抑菌试验,得到的抑菌圈结果如图 1 所示。在图 1a 中,9 种硫醚类香料对金黄色葡萄球菌的抑制作用各不相同,抑菌能力依次为:BMFDS $\approx$ DADS $>$ MFDS $\approx$ DAS $>$ FIPDS $\approx$ MMTF $>$ DMTS $\approx$ MPDS $\approx$ DPDS。

BMFDS 和 DADS 有显著的抑菌效果,抑菌圈直径分别达到(2.83 $\pm$ 0.21) cm 和(2.46 $\pm$ 0.35) cm。在图 1b 中,7 种有抑菌作用的硫醚类香料对单增李斯特菌的抑菌能力为:DADS $>$ MFDS $>$ MMFDS $\approx$ MMTF $\approx$ FIPDS $>$ DAS $\approx$ DMTS,其中 DADS 有最强的抑菌效果,抑菌圈直径为(1.98 $\pm$ 0.22) cm。



注:不同字母表示显著性差异(P<0.05)。

图 1 硫醚类香料对金黄色葡萄球菌(a)和单增李斯特菌(b)的抑制作用

Fig.1 Inhibitory effects of sulfide flavors on *Staphylococcus aureus* (a) and *Listeria monocytogenes* (b)

MPDS 和 DADS 虽然含有相同数目的硫原子,但是侧链不一样,MPDS 的-S-S-两侧连接的基团是甲基和丙基,DADS 是烯丙基,DADS 对金黄色葡萄球菌的抑菌效果比 MPDS 强 ( $P<0.05$ ),并且根据 2.1 节得出 MPDS 对单增李斯特菌无明显抑制作用,可以推测出由于 DADS 的侧链中烯丙基或是双键的存在,增强了硫醚类香料的抑菌活性。这与前期研究<sup>[21]</sup>含有双键可能会影响二硫醚类化合物的抑制效果,存在二烯丙基的单硫醚化合物会有很好的抑制效果的结论相似。

DADS 和 DAS 虽具有相同的侧链烯丙基,但

是前者拥有的硫原子多于后者,DADS 中有 2 个硫原子形成了二硫键。从图 1 结果可以看出,DADS 对金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌的抑制能力均强于 DAS ( $P<0.05$ ),可见对于结构简单的对称型硫醚类香料,侧链的基团相同,随着所含硫原子数目的增多,抑菌能力增强。

MMFDS 和 MFDS 是同分异构体,它们的分子式都是  $C_6H_8OS_2$ ,MMFDS 二硫键连接着咪唑基,MFDS 连接的基团是糠基,MFDS 对金黄色葡萄球菌的抑菌效果更强,而 MMFDS 无抑菌作用,显示出对于 MMFDS 和 MFDS,含有糠基的硫醚类香料



的抑菌效果比呋喃基强。对于 MMFDS 和 MMTF, 两者所含的硫原子数目不一样, 侧链所含的基团相同, 对于单增李斯特菌, 两者的抑菌效果无明显差异 ( $P>0.05$ ), 说明如果硫醚类香料的结构比较复杂, 所含有硫原子数目的多少对其抑制作用没有太大的影响。

由此可见, 硫醚类香料的结构对于它们的抑菌活性有着重要的影响, 硫原子的数量和侧链的结构在很大程度上决定了它们的抑菌能力, 这一结论与前期研究含氧硫醚类香料的抑菌作用的结论类似<sup>[22]</sup>。根据本研究的结果可以看出, DADS 由于硫原子的数目多和侧链上带有烯丙基的结构, 导致了它的抑菌能力明显强于其它的硫醚类香料。与此结论类似的是, 有研究表明异硫氰酸酯类含硫香料由于它们侧链的结构不同, 同样导致了它们对金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌的抑制效果不同, 侧链上的苯基能够大幅度提高异硫氰酸酯类香料的抑菌效果<sup>[23]</sup>。

### 2.3 DADS 对金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌的 MIC

选取对金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌抑菌效果最好的 DADS 作为研究对象, 测定其 MIC, 结果见表 3。当 DADS 的浓度大于或者等于 1.25 mol/L 时, 两种菌都无法生长, 该浓度的 DADS 对这两种革兰氏阳性致病菌都有着很强的抑制作用。当 DADS 的浓度低于 1.25 mol/L 时, 可以观察到单增李斯特菌能生长, 因此, 单增李斯特菌的 MIC 为 1.25 mol/L; 当 DADS 的浓度低于 0.3125 mol/L 时, 可以观察到金黄色葡萄球菌能生长, 因此, 金黄色葡萄球菌的 MIC 为 0.3125 mol/L。

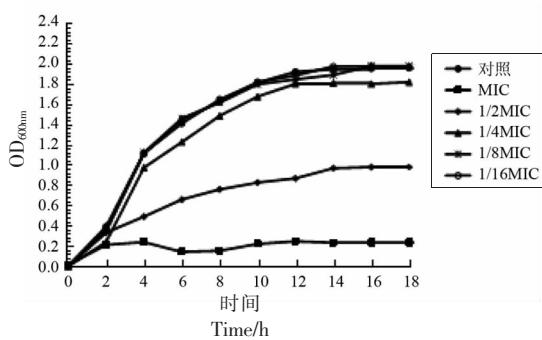
表 3 DADS 对两种革兰氏阳性致病菌的 MIC

Table 3 MIC of DADS against two Gram-positive pathogens		
浓度/mol·L <sup>-1</sup>	金黄色葡萄球菌	单增李斯特菌
5.0	-	-
2.5	-	-
1.25	-	-
0.625	-	+
0.3125	-	+
0.15625	+	+

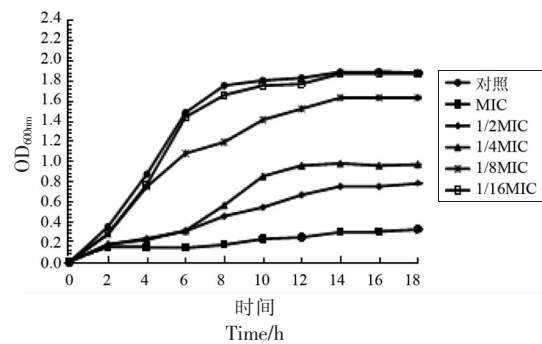
注:“-”表示无菌生长,“+”表示有菌生长。

### 2.4 DADS 对两种革兰氏阳性致病菌生长曲线的影响

在亚抑菌浓度下的 DADS 对两种革兰氏阳性菌正在曲线的影响见图 2。当 DADS 的浓度在 1/16MIC 和 1/8MIC 时, 金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌的生长并没有受到明显的影响, 它们的生长曲线与对照组几乎一致; 当 DADS 的浓度提高到 1/4MIC 时, 此时能够观察到两种菌的生长开始受到抑制, 只是在该浓度下, DADS 对金黄色葡萄球菌的抑制作用并不明显, 而该浓度的 DADS 对单增李斯特菌已经有了相当明显的抑制效果, 当进入稳定期后, OD<sub>600nm</sub> 的值仅有对照组的一半, 菌液的密度已经大幅度减少; 当 DADS 的浓度提高到 1/2MIC 时, 此时两种革兰氏阳性菌的生长均受到了明显的抑制; 当 DADS 的浓度继续提高至 MIC 时, 可以看到两种菌几乎停止了生长。由此可见, DADS 的浓度在 1/16MIC~MIC 时, 它对金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌的抑制作用都具有浓度依赖性。与此结论类似的是, DADS 对大肠杆菌的抑制同样具有浓度依耐性<sup>[24]</sup>。



(a)金黄色葡萄球菌



(b)单增李斯特菌

图 2 DADS 对金黄色葡萄球菌(a)和单增李斯特菌(b)生长曲线的影响

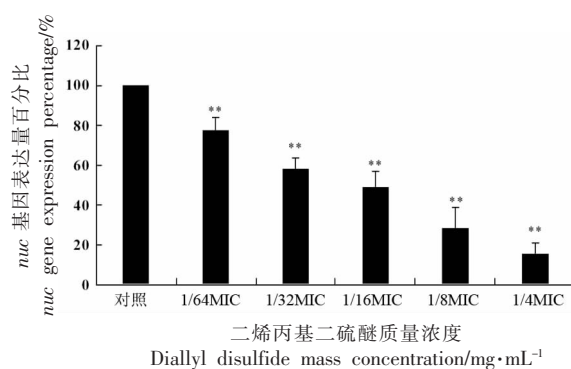
Fig.2 Effect of DADS on the growth curve of *Staphylococcus aureus* (a) and *Listeria monocytogenes* (b)

## 2.5 DADS 对金黄色葡萄球菌毒力基因 *nuc* 表达的影响

如图 3 所示,与未添加 DADS 的对照组相比,添加不同亚抑菌浓度的 DADS 后,毒力基因 *nuc* 的表达水平均显著降低( $P < 0.01$ )。DADS 的亚抑菌浓度由 1/64MIC、1/32MIC、1/16MIC、1/8MIC 增加至 1/4MIC,与未添加 DADS 相比,*nuc* 的相对表达水平分别为 77.08%、57.59%、48.7%、28.29% 和 15.22%。结果表明:逐渐增加 DADS 的浓度,*nuc* 基因的相对表达水平逐渐降低,即 DADS 浓度增加,对 *nuc* 基因的抑制作用增强,具有明显的浓度依耐性。与本研究结论类似的是,有研究表明大蒜素同样以一种剂量依赖性的方式来抑制金黄色葡萄球菌 *hla* 基因的表达水平,而大蒜素的主要成分就是二烯丙基二硫醚等硫醚类香料<sup>[19]</sup>。也有研究表明,DADS 对单增李斯特菌毒力基因 *inlA*、*hylA* 和 *prfA* 的表达水平也具有一定的抑制作用,并且也呈浓度依耐性<sup>[25]</sup>。DADS 对大肠杆菌的毒力基因同样也存在着抑制作用,随着 DADS 的浓度提升,大肠杆菌的毒力基因的表达水平逐渐降低<sup>[24]</sup>。综合来看,DADS 对食源性致病菌的毒力基因的表达具有很强的抑制作用,随着浓度的提升,对其表达水平的抑制也增强,具有浓度依耐性。将 DADS 与其它含硫香料相比较,在周倩倩等<sup>[26]</sup>的研究中,异硫氰酸苄酯(Benzyl isothiocyanate, BITC)的浓度为 1/4MIC 时,此时副溶血弧菌 *tdh* 基因的表达水平相比于对照组降低了 4.8 倍,与本研究结果相类似,可见硫醚类香料和异硫氰酸酯类香料对于食源性致病菌毒力基因的表达均有着很强的抑制能力。

## 3 结论

在本研究选取的 10 种硫醚类香料中,DADS、MFDS 和 DAS 均对金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌有着不错的抑制效果,其中抑制能力最强的是 DADS,原因可能是 DADS 侧链中烯丙基的存在以及硫原子的数目较多,从而增强了硫醚类香料对这两种革兰氏阳性致病菌的抑制能力。DADS 对金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌的 MIC 分别为 0.3125 mol/L 和 1.25 mol/L。DADS 对两种菌的抑制作用均呈现浓度依赖性。DADS 在亚抑菌浓度



注:图中 \*\* 表示与对照组比较差异极显著( $P < 0.01$ )。

图 3 二烯丙基二硫醚对 *nuc* 基因表达的影响

Fig.3 Effects of diallyl disulfide on expression of *nuc* gene

下同样以浓度依赖性的方式降低了金黄色葡萄球菌耐热核酸酶基因 *nuc* 的表达水平。

## 参 考 文 献

- [1] AKACHA N B, GARGOURI M. Microbial and enzymatic technologies used for the production of natural aroma compounds: Synthesis, recovery modeling, and bioprocesses[J]. Food & Bioprocesses, 2015, 94: 675-706.
- [2] SMITH R L, DOULL J, FERON V J, et al. GRAS flavoring substances 20[J]. Food Technology, 2001, 55(12): 34-55.
- [3] 彭光华. 三种大蒜有机硫化物抑菌性能的比较[J]. 西藏科技, 2009(4): 10-12.  
PENG G H. Comparison of antibacterial properties of three kinds of garlic organosulfur compounds[J]. Tibet's Science and Technology, 2009(4): 10-12.
- [4] 杨转琴, 魏红, 曹雯, 等. 大蒜提取液及食醋抑菌作用的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(1): 69-73.  
YANG Z Q, WEI H, CAO W, et al. Antimicrobial activity of vinegar and garlic extracts[J]. Food Science, 2008, 29(1): 69-73.
- [5] LEI X Y, YAO S Q, ZU X Y, et al. Apoptosis induced by diallyl disulfide in human breast cancer cell line MCF-7[J]. Acta Pharmacol Sin, 2008, 29: 1233-1239.
- [6] COATES R, MORAN J, HORSBURGH M. *Staphylococci*: Colonizers and pathogens of human skin[J]. Future Microbiol, 2014, 9: 75-91.
- [7] 梁颖, 朱俊雅, 张公亮, 等. 含氧硫醚类香料对常

- 见致病菌的体外抑菌活性研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(18): 108-112.
- LIANG Y, ZHU J Y, ZHANG G L, et al. Antibacterial activity of oxygen-containing sulfide flavors against some common pathogenic bacteria *in vitro*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(18): 108-112.
- [8] JACKSON K A, IWAMOTO M, SWERDLOW D. Pregnancy-associated listeriosis[J]. Epidemiology & Infection, 2010, 138(10): 1503-1509.
- [9] LANG H E, NEUHAUS K, SCHERER S. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov. isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond[J]. International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology, 2013, 63(2): 641-647.
- [10] 唐俊妮, 史贤明, 张荣, 等. 不同条件对金黄色葡萄球菌耐热核酸酶活性影响的研究[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2010, 36(4): 589-592.
- TANG J N, SHI X M, ZHANG R, et al. The influences of different conditions on thermonuclease activity in *S. aureus*[J]. Journal of Southwest University for Nationalities: Natural Science Edition, 2010, 36(4): 589-592.
- [11] VANCRAEYNEST D, HAESBROUCK F, HERMANS K. Multiplex PCR assay for the detection of high virulence rabbit *Staphylococcus aureus* strains[J]. Veterinary Microbiology, 2007, 121(3/4): 368-372.
- [12] 国家卫生和计划生育委员会. 食品添加剂使用标准: GB 2760-2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014: 135-183.
- National Health and Family Planning Commission. Standard for the use of food additives: GB 2760-2014[S]. Beijing: China Standard Press, 2014: 135-183.
- [13] 江洁芳. 花椒中抑菌活性成分提取工艺的研究[J]. 中国调味品, 2011, 36(3): 30-32.
- JIANG J F. Study on extraction process of the bacteriostatic active compound from the pepper[J]. China Condiment, 2011, 36(3): 30-32.
- [14] 贺菊萍, 赵勇, 孙晓红, 等. 牛蒡提取液对副溶血性弧菌的抑制作用[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(3): 381-384.
- HE J P, ZHAO Y, SUN X H, et al. Antibacterial effects of burdock (*Arctium Lappa* L.) concentrate on *Vibrio parahemolyticus* [J]. Natural Product Research and Development, 2012, 24(3): 381-384.
- [15] LAMBERT R J W, SKANDAMIS P N, COOTE P, et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol[J]. Journal of Applied Microbiology, 2001, 91: 453-462.
- [16] UPADHYAY A, JOHNY A K, AMALARADJOU M A, et al. Plant derived antimicrobials reduce *Listeria monocytogenes* virulence factors *in vitro*, and down-regulate expression of virulence genes[J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 157(1): 88-94.
- [17] QIU J, LI H, MENG H, et al. Impact of luteolin on the production of alpha-toxin by *Staphylococcus aureus*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2011, 53(2): 238-243.
- [18] 谢秀兰, 刘溪源, 王建东, 等. 奶牛乳房炎金黄色葡萄球菌 8 种毒力基因的 PCR 检测[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(10): 47-50.
- XIE X L, LIU X Y, WANG J D, et al. Detection of the main 8 virulence genes of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2014, 41(10): 47-50.
- [19] LENG B F, QIU J Z, DAI X H, et al. Allicin reduces the production of  $\alpha$ -toxin by *Staphylococcus aureus*[J]. Molecules, 2011, 16(9): 7958-7968.
- [20] UPADHYAY A, JOHNY A K, AMALARADJOU M A R, et al. Plant-derived antimicrobials reduce *Listeria monocytogenes*, virulence factors *in vitro*, and down-regulate expression of virulence genes[J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 157(1): 88-94.
- [21] 张公亮, 丁佳琪, 董伟峰, 等. 几种硫醚类香料抑菌活性的研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(9): 127-130.
- ZHANG G L, DING J Q, DONG F W, et al. Study on antibacterial activity of several sulfide flavors[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(9): 127-130.
- [22] 梁颖, 朱俊雅, 张公亮, 等. 含氧硫醚类香料对常见致病菌的体外抑菌活性研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(18): 108-112.
- LIANG Y, ZHU J Y, ZHANG G L, et al. Antibacterial activity of oxygen-containing sulfide flavors against some common pathogenic bacteria *in*

- vitro*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(18): 108-112.
- [23] 王岩, 周倩倩, 张公亮, 等. 异硫氰酸酯类香料对两种革兰氏阳性致病菌的抑制作用[J]. 食品科学, 2017, 38(21): 15-20.  
WANG Y, ZHOU Q Q, ZHANG G L, et al. Inhibitory effect of isothiocyanate flavors on two Gram-positive pathogenic bacteria[J]. Food Science, 2017, 38(21): 15-20.
- [24] 李鑫鑫, 杨春雪, 张公亮, 等. 二烯丙基二硫醚对产志贺毒性大肠杆菌毒力基因表达及生物学特性的影响[J]. 中国食品学报, 2020, 20(1): 76-82.  
LI X X, YANG C X, ZHANG G L, et al. The effect of diallyl disulfide on the shiga toxin-producing *Escherichia coli* in the expression of virulence gene and biological characteristics[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(1): 76-82.
- [25] 魏丽娜, 吴虹燕, 张公亮, 等. 二烯丙基二硫醚对单增李斯特菌毒力基因表达的影响[J]. 中国食品学报, 2020, 20(1): 83-89.  
WEI L N, WU H Y, ZHANG G L, et al. The effect of diallyl disulfide on the expression of virulence gene in *Listeria monocytogenes*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(1): 83-89.
- [26] 周倩倩, 王岩, 张公亮, 等. 异硫氰酸酯类香料对两种革兰氏阴性致病菌的抑制作用[J]. 中国食品学报, 2019, 19(1): 255-261.  
ZHOU Q Q, WANG Y, ZHANG G L, et al. Inhibitory effect of isothiocyanate flavors on two Gram-negative pathogenic bacteria[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(1): 255-261.

### Inhibitory Effect of Sulfide Flavors on *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*

Xu Yuhang, Wang Yan, Bi Jingran, Hou Hongman, Hao Hongshun, Zhang Gongliang\*  
(School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning)

**Abstract** Ten kinds of common sulfide flavors were selected and their inhibitory ability on *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* was investigated by measuring the diameter of inhibition zone. The relationship between the structure of sulfide flavors and the antibacterial ability was also analyzed. The sulfide flavor with the strongest antibacterial activity was selected and its effect on the expression of *nuc* gene in *Staphylococcus aureus* was investigated by qRT-PCR. The results showed that diallyl disulfide (DADS), methyl furfuryl disulfide (MFDS) and allyl sulfide (DAS) had good antibacterial effects on two Gram-positive bacteria, and the antibacterial activity was DADS > MFDS > DAS. Among the 10 kinds of sulfide flavors, DADS had the strongest antibacterial activity, and the minimum inhibitory concentration (MIC) of DADS against *S. aureus* and *L. monocytogenes* were 312.5 mmol/L and 1.25 mol/L, respectively. At the subinhibitory concentrations (1/16 MIC, 1/8 MIC, 1/4 MIC and 1/2 MIC), DADS significantly decreased the expression level of *nuc* gene in *S. aureus* ( $P < 0.01$ ). These results indicated that allyl and disulfide bonds could enhance the antibacterial activity of sulfide flavors and play an important role in inhibiting the virulence of *S. aureus*.

**Keywords** sulfide flavors; *Staphylococcus aureus*; *Listeria monocytogenes*; inhibitory ability; virulence gene