

硫醚类香料对沙门氏菌和副溶血性弧菌的抑制作用

张珂¹, 周倩倩¹, 毕景然^{1,3}, 郝洪顺², 侯红漫^{1,3}, 张公亮^{1,3*}

(¹大连工业大学食品学院 辽宁大连 116034

²大连工业大学纺织与材料工程学院 辽宁大连 116034

³辽宁省水产品加工质量安全与控制重点实验室 辽宁大连 116034)

摘要 研究硫醚类香料对沙门氏菌和副溶血性弧菌两种常见食源性致病菌的抑制作用,探讨该香料抑菌活性与其结构间的关系。采用滤纸片法测定抑菌圈直径,倍比肉汤稀释法确定不同香料的最小抑菌浓度(MIC),并用波长 600 nm 下菌液的吸光值绘制生长曲线。采用 qRT-PCR 法研究硫醚类香料对副溶血性弧菌特异性毒力基因 *tdh* 基因的调控作用。结果表明,这些硫醚类香料对两种菌的作用效果不同,其中甲基丙基二硫醚、甲基糠基二硫醚、糠基异丙基硫醚、二烯丙基硫醚、二烯丙基二硫醚对两种菌都有抑制效果。二烯丙基二硫醚抑制作用最显著,对沙门氏菌的 MIC 为 19.5 mmol/L,对副溶血性弧菌为 4.88 mmol/L。二烯丙基二硫醚对副溶血性弧菌毒力基因 *tdh* 的表达存在明显的抑制作用并与浓度呈正相关。硫醚类香料中硫原子个数和烯丙基可促进其抑菌效果,其中二烯丙基二硫醚抑菌效果最好。本研究结果为硫醚类香料在食品中的应用提供参考。

关键词 硫醚类香料; 二烯丙基二硫醚; 沙门氏菌; 副溶血性弧菌; 毒力基因

文章编号 1009-7848(2022)06-0125-08 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.06.013

近年来,由微生物引起的食物中毒越来越多,引起人们对食品安全问题的高度重视。一直以来都在使用抗生素治疗食源性食物中毒,使细菌产生了耐药性,作用效果明显降低^[1]。亟需利用天然物质来预防和控制食源性致病菌的污染和传播。含硫香料是一种天然食品添加剂,常见于十字花科植物,具有食用安全、阈值低、特征性强等特点,并具有抗癌、抗菌等活性。硫醚类香料是含硫香料的一种,常见于葱属植物,化学通式为 R-S-R。大蒜是一种公认的功能性食品,摄入大蒜被证实可通过降低癌症风险等改善人类健康,且大蒜中的一些成分具有抗血栓、预防心血管疾病、抗菌、抗癌、抗病毒、抗氧化等作用^[2-3]。大蒜不仅可作为食物,还具有多种活性成分,得到广泛应用^[4-5]。大蒜油的蒸馏产物中含有多种硫醚类化合物,如二烯丙基硫醚(DAS)、烯丙基三硫醚(DATS)、二烯丙基二硫醚(DADS)等^[4,6-7]。

沙门氏菌(*Salmonella*)和副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是两种典型的革兰氏阴性食

源性致病菌。沙门氏菌常见于肉类,也存在于新鲜的水果蔬菜中,甚至可在土壤、粪便、水等环境中存活很久,它所引起的食物中毒在微生物性食物中毒中占很大比例^[8-11]。副溶血性弧菌中等嗜盐,主要呈弧状、短棒状等,常见于水产品及沿海环境中,与海鲜有关的细菌性肠胃炎主要是由副溶血性弧菌直接或交叉污染引起的^[12-13]。*tdh* 基因是副溶血性弧菌重要的毒力基因之一,它编码耐热性溶血毒素(TDH),从而溶解红细胞,产生神奈川现象,是判断副溶血性弧菌是否具有致病性的依据,可使菌体具有耐热性并引起腹泻等一系列症状^[14-15]。鉴于此,有必要采取各种措施来减少沙门氏菌和副溶血性弧菌的污染。学者们发现,肉桂醛、香榧壳精油以及二氢杨梅素等天然物质可以抑制沙门氏菌和副溶血性弧菌^[16-17],异硫氰酸酯类香料也对这两种菌有一定抑制作用^[18],异硫氰酸苜蓿(BITC)可以通过对毒力基因的调控来抑制这两种菌的毒性^[19-20]。目前尚无硫醚类香料对沙门氏菌和副溶血性弧菌抑菌作用的研究。

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,从中选取较常见的 10 种硫醚类香料,从抑菌活性、最小抑菌浓度、生长曲线等多个方面分别研究它们对于沙门氏菌以及

收稿日期: 2021-06-12

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFC1605902)

作者简介: 张珂(1995—),女,硕士生

通信作者: 张公亮 E-mail: zgl_mp@163.com

副溶血性弧菌两种食源性致病菌的抑菌作用,并通过对比它们对这两种菌抑制作用的不同,探讨硫醚类香料结构对其的抑菌效果,从而筛选抑菌效果最好的香料。通过 qRT-PCR 试验,研究硫醚类香料作用下,副溶血性弧菌 *tdh* 毒力基因的表达量差异,为天然含硫香料应用于食源性致病菌

的防治以及作为食品用抑菌剂提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 硫醚类香料

选出 10 种硫醚类香料(表 1),均购自美国 Sigma 公司。

表 1 10 种硫醚类香料的名称及结构

Table 1 Name and structure of 10 kinds of sulfide flavors

试验编号	FEMA 编号	中文名称	英文简称	结构
1	3201	甲基丙基二硫醚	MPDS	
2	3228	二丙基二硫醚	DPDS	
3	3275	二甲基三硫醚	DMTS	
4	2042	二烯丙基硫醚	DAS	
5	2028	二烯丙基二硫醚	DADS	
6	3949	2-甲基-3-甲硫基呋喃	MMTF	
7	3161	糠基异丙基硫醚	FIPS	
8	3573	甲基 2-甲基-3-呋喃基二硫醚	MMFDS	
9	3362	甲基糠基二硫醚	MFDS	
10	3259	双(2-甲基-3-呋喃基)二硫醚	BMFDS	

1.2 菌种及试剂

鼠伤寒沙门氏菌株 (*Salmonella*, ATCC 14028), 副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, CGMCC 1.1614), 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心。

RNA 提取试剂盒、溶菌酶、蛋白酶 K、溴化乙锭(EB)等,北京天根生化有限公司;DNA Marker、6×Loading Buffer、5×M-MLV Buffer、RTase M-MLV(RNase H-)、RNase Inhibitor、dNTP Mixture 等,宝生物工程(大连)有限公司;DEPC Water、50×TAE、RNase-free Water 等,生工生物工程(上海)股份有限公司;蛋白胨、牛肉膏等,北京奥博星

生物技术有限责任公司。

1.3 仪器及设备

YC-L 型层析实验冷柜,北京博医康实验仪器有限公司;ZHJH-C1112C 型超净工作台、ZHWHY-100B 型恒温培养振荡器,上海智城分析仪器制造有限公司;01J2003-04 型高压灭菌锅,上海博讯实业有限公司;MyiQTM2 型荧光定量 PCR 仪,美国 BIO-RAD 公司;UV-1750 型紫外分光光度计,日本岛津仪器有限公司;202-OAB 型电热恒温干燥箱,天津市泰斯特仪器有限公司;DRP-9162 型电热恒温培养箱、DGG-9140A 型电热恒温鼓风干燥箱,上海森信实验仪器有限公司。

1.4 样品处理及菌种活化

利用硫醚类香料的原液密度和分子质量,求出稀释所需的无水乙醇,并稀释成浓度为 5 mol/L 的预混液备用。

于液体培养基中添加适量冷冻保存的菌种,并在 37 °C、150 r/min 摇床振荡培养 24 h。用上述菌液涂布平板,再次活化培养制成 10⁸ CFU/mL 的菌悬液,备用。

1.5 抑菌活性的测定

根据张公亮等^[21]采用的滤纸片法,取 100 μL 菌悬液涂布平板,平板中央放置直径 10 mm 的圆形滤纸片,滴加用乙醇稀释好的不同浓度的硫醚类香料,37 °C 培养箱过夜培养。阴性对照滴加同等体积的无水乙醇,重复 3 次并取平均值。

1.6 最小抑菌浓度(MIC)的测定

根据 1.5 节的试验结果,以二烯丙基二硫醚(DADS)为研究对象,利用倍比肉汤稀释法^[22],用乙醇将该香料从 5 mol/L 稀释到 0.61 mmol/L,将不同浓度的香料、菌悬液按照一定比例分别加入到试管装液体培养基中,37 °C 培养 24 h。取培养好的液体进行涂板培养并观察,阳性(+)表示培养基上有菌生长,阴性(-)则无菌生长。MIC 即为无细菌生长的最小含硫香料浓度。试验重复 3 次。

1.7 生长曲线的测定

向液体培养基中加入 1 mL 浓度为 10⁸ CFU/mL 的菌液及不同浓度的 DADS,于 37 °C 摇床下振荡培养,每 2 h 测定其 600 nm 下的吸光值,并以吸光值为纵坐标,以时间(h)为横坐标绘制生长曲线。

1.8 细菌总 RNA 的提取及检测

根据天根生化有限公司细菌总 RNA 提取试剂盒的方法^[23],提取经不同浓度香料处理 12 h 后副溶血性弧菌的总 RNA,并用分光光度计对 RNA 浓度及纯度进行检测。

1.9 qRT-PCR 法测定 DADS 对副溶血性弧菌毒力基因表达的影响

目的基因为 *tdh*,内参基因为 *16S rRNA*,引物序列如表 2 所示,并由生工生物工程股份有限公司合成。根据试剂盒对 RNA 进行反转录,并以总体积为 25 μL 来进行 qRT-PCR 反应,其中 SYBRR Premix Ex TaqTM 12.5 μL,引物对各 0.5 μL,DEPC Water 9.5 μL,cDNA 模板 2 μL。参数设置:95 °C 1 min;95 °C 20 s,62 °C 20 s,于 80 °C 处停留 15 s,收集荧光信号,循环 40 次;在 60~95 °C 范围建立熔解曲线。通过 2^{-ΔΔCT} 计算 *tdh* 基因相对表达量^[24]。

表 2 荧光定量 PCR 基因引物序列

Table 2 The primers for qPCR

基因	序列(5'→3')	扩增片段/bp
<i>tdh</i> ^[25]	上游引物:5'-CTCCATAAAGGTGACCCT-3'	269
	下游引物:5'-CAGCAGCCGCGTAATTC-3'	
<i>16s rRNA</i> ^[26]	上游引物:5'-CTCCATAAAGGTGACCCT-3'	174
	下游引物:5'-CAGCAGCCGCGTAATTC-3'	

1.10 统计学分析

利用 <http://www.physics.csbsju.edu/stats/t-test.html> 在线软件进行 student's t 检验进行显著性分析, $P < 0.05$ 具有显著差异性,且 $P < 0.01$ 具有极显著差异性。以平均值±标准偏差来呈现数据。

2 结果与分析

2.1 硫醚类香料对沙门氏菌和副溶血性弧菌的抑菌效果

10 种硫醚类香料,在结构上具备几个特点。

一部分为对称性硫醚类香料,如二丙基二硫醚(DPDS)、二甲基三硫醚(DMTS)、二烯丙基硫醚(DAS)、二烯丙基二硫醚(DADS)和双(2-甲基-3-咪喃基)二硫醚(BMFDS)等,侧链取代基及硫原子个数不同。还有一部分含有咪喃环,如 2-甲基-3-甲硫基咪喃(MMTF)等。其中一些为同分异构体,如甲基 2-甲基-3-咪喃基二硫醚(MMFDS)、甲基糠基二硫醚(MFDS),化学式均为 C₆H₈OS₂。

5 mol/L 的各硫醚类香料对两种菌的抑制效果见表 3。可以看出,甲基丙基二硫醚(MPDS)、二

丙基二硫醚(DPDS)、二甲基三硫醚(DMTS)、二烯丙基硫醚(DAS)、二烯丙基二硫醚(DADS)、2-甲基-3-甲硫基呋喃(MMTF)、糠基异丙基硫醚(FIPS)、甲基2-甲基-3-呋喃基二硫醚(MMFDS)、甲基糠基二硫醚(MFDS)和双(2-甲基-3-呋喃基)二硫醚(BMFDS)这10种硫醚类香料对副溶血性

弧菌都有不同的抑制效果,而二甲基三硫醚(DMTS)、甲基2-甲基-3-呋喃基二硫醚(MMFDS)、二丙基二硫醚(DPDS)、2-甲基-3-甲硫基呋喃(MMTF)、双(2-甲基-3-呋喃基)二硫醚(BMFDS)和对沙门氏菌不具备抑菌能力。副溶血性弧菌比沙门氏菌对上述硫醚类香料更加敏感。

表3 硫醚类香料对供试菌的抑制效果

Table 3 Inhibitory effect of sulfide flavors on the tested bacteria

菌种	样品 乙醇	硫醚类香料									
		MPDS	DPDS	DMTS	DAS	DADS	MMTF	FIPS	MMFDS	MFDS	BMFDS
沙门氏菌	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-
副溶血性弧菌	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注:“+”表示有抑菌效果;“-”表示没有抑菌效果。

2.2 硫醚类香料对沙门氏菌的抑制作用

图1为5种对沙门氏菌有抑菌效果的硫醚类香料的抑菌圈结果,包括MPDS、DADS、DAS、MFDS和FIPS,它们的抑制作用大小为DADS>MFDS>(MPDS≈DAS≈FIPS)。其中DADS的抑菌圈直径最大,为(1.54±0.04)cm,即抑菌效果最好,其次是直径为(1.36±0.08)cm的MFDS,而剩下的3种硫化物MPDS、DAS和FIPS抑菌圈直径几乎相同。DADS的抑菌活性比MPDS、DAS显著增高(P<0.05),DADS与MPDS相比,多了两个烯丙基,DADS与DAS相比,多了一个硫原子,可见硫醚类香料对沙门氏菌抑菌作用受到硫原子个数和烯丙基的影响。且含有呋喃基的对称性硫醚类香料,如BMFDS对沙门氏菌没有抑制效果。

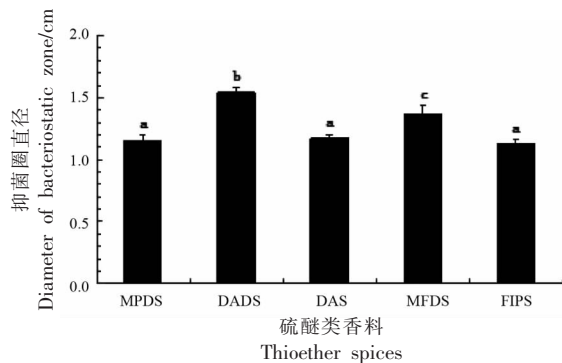


图1 硫醚类香料对沙门氏菌的抑制效果
Fig.1 Inhibitory effect of thioether spices on *Salmonella*

2.3 硫醚类香料对副溶血性弧菌的抑制作用

图2为10种对副溶血性弧菌有抑菌效果的硫醚类香料的抑菌圈。与沙门氏菌相比,有抑菌效果的香料种类更多,且抑菌效果各不相同,其中,DADS、DAS、DPDS、MFDS、FIPS和BMFDS对副溶血性弧菌有很好的抑制作用。与沙门氏菌结果一致,DADS抑制效果最强(P<0.05),抑菌圈直径达到了(4.49±0.32)cm。与2.2节的结果相比,硫醚类香料对副溶血性弧菌比对沙门氏菌的抑制效果更显著。DADS与DPDS相比,-S-S-侧链两边多了双键,变为烯丙基。DADS的抑菌活性最好,这说明双键的存在增强了抑制效果。当同分异构体的MMFDS和MFDS两者进行分析时,MFDS的抑菌能力显著强于MMFDS,反映出侧链为糠基抑菌作

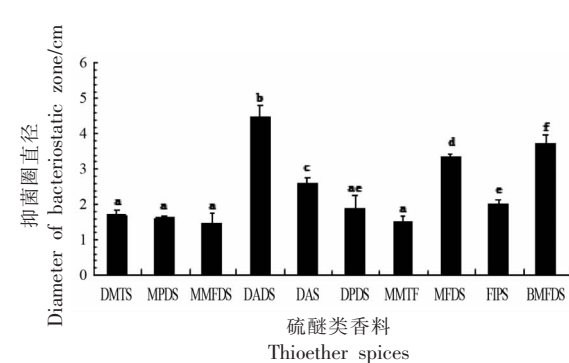


图2 硫醚类香料对副溶血性弧菌的抑制效果
Fig.2 Inhibitory effect of thioether spices on *V. parahaemolyticus*

用强于侧链为咪喃基。

2.4 二烯丙基二硫醚对两种菌的 MIC

表 4 为对沙门氏菌和副溶血性弧菌抑菌作用都最强的二烯丙基二硫醚(DADS)对这两种菌的最小抑菌浓度。从表 4 可以看出,当 DADS 浓度大于 19.5 mmol/L 时,对两种菌都有很好的抑制作用,且沙门氏菌对 DADS 的敏感程度低于副溶血性弧菌。DADS 对沙门氏菌的 MIC 为 19.5 mmol/L,对副溶血性弧菌的 MIC 为 4.88 mmol/L。

2.5 二烯丙基二硫醚对两种菌生长曲线的影响

测定二烯丙基二硫醚(DADS)对沙门氏菌和副溶血性弧菌生长曲线的影响。如图 3 所示,空白组的沙门氏菌生长曲线呈 S 型,而在 MIC 浓度的 DADS 作用下 OD 值没有明显改变,即细菌几乎不生长。当添加的 DADS 浓度为 1/2 MIC 时,很大一部分细菌无法生长,且延滞期较长。1/4 MIC 浓度下细菌与空白组差距很小,但仍有一部分细菌的生长受到抑制。综上,沙门氏菌的生长受 DADS 的影响呈现出浓度依赖性。

如图 4 所示,与沙门氏菌生长曲线图结果一致,与空白组相比,MIC 浓度的 DADS 作用下,副溶血性弧菌的生长完全被抑制,当 DADS 浓度为 1/2 MIC 时,大部分菌的生长被抑制,当浓度逐渐

表 4 二烯丙基二硫醚对供试菌的 MIC

Table 4 Minimum concentration of diallyl disulfide on tested bacteria

最小抑菌浓度	沙门氏菌	副溶血性弧菌
空白	+	+
0	+	+
5 mol/L	-	-
2.5 mol/L	-	-
1.25 mol/L	-	-
625 mmol/L	-	-
312 mmol/L	-	-
156 mmol/L	-	-
78 mmol/L	-	-
39 mmol/L	-	-
19.5 mmol/L	-	-
9.76 mmol/L	+	-
4.88 mmol/L	+	-
2.44 mmol/L	+	+
1.22 mmol/L	+	+
0.61 mmol/L	+	+

注:“+”表示有菌生长;“-”表示无菌生长;“0”代表乙醇对照。

减小为 1/4 MIC 时,菌的生长与空白组差异较小,呈现出明显的浓度依赖性。

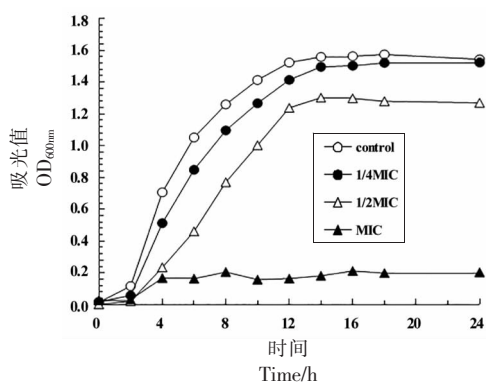


图 3 DADS 对沙门氏菌生长曲线影响

Fig.3 Effect of diallyl disulfide on the growth curve of *Salmonella*

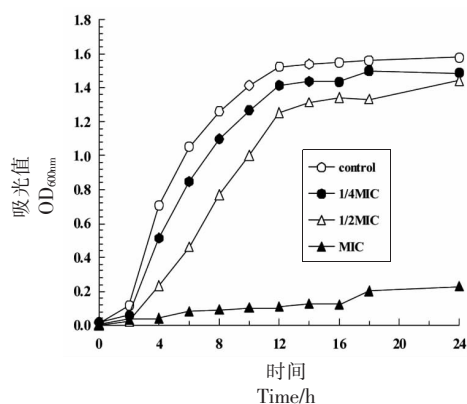


图 4 DADS 对副溶血性弧菌生长曲线影响

Fig.4 Effect of diallyl disulfide on the growth curve of *V. parahaemolyticus*

2.6 二烯丙基二硫醚对副溶血性弧菌 *tdh* 毒力基因表达的影响

选取对副溶血性弧菌有明显抑菌效果的 DADS,分析经不同浓度 DADS 作用后 *tdh* 毒力基

因的表达量差异。结果如图 5 所示,不同浓度 DADS 处理过的副溶血性弧菌中 *tdh* 的表达量不同,随着 DADS 浓度的增加,*tdh* 毒力基因的相对表达量逐渐降低,与 DADS 浓度呈负相关。与空白

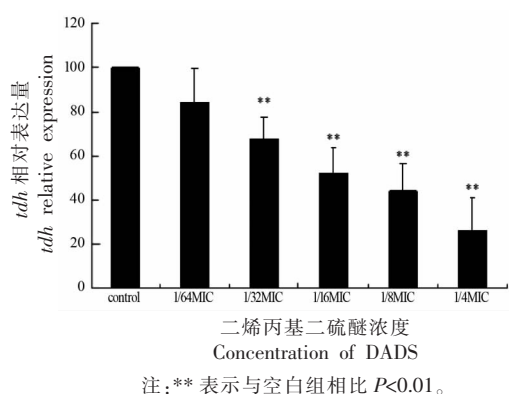


图5 二烯丙基二硫醚对副溶血性弧菌 *tdh* 基因表达的影响

Fig.5 Effect of DADS on expression of *tdh* gene in *V. parahaemolyticus*

组相比,1/64 MIC 浓度的 DADS 作用后 *tdh* 基因表达量有所降低,但无显著性差异。而 DADS 浓度以二倍递增,当副溶血性弧菌被这些亚抑制浓度的 DADS 作用后,毒力基因 *tdh* 的表达量变化差异都极显著,且当 DADS 浓度为 1/4MIC 时,*tdh* 毒力基因下调了 4.4 倍。由此可知,二烯丙基二硫醚对副溶血性弧菌 *tdh* 毒力基因的作用效果呈剂量依赖性。

3 结论

1) 在 10 种硫醚类香料中,5 种对沙门氏菌有很强作用效果,全部 10 种对副溶血性弧菌有很强作用效果,证明沙门氏菌对硫醚类香料的敏感程度低于副溶血性弧菌。其中二烯丙基二硫醚(DADS)对两种菌的抑菌作用都最强,表明硫原子个数、烯丙基等可以增强硫醚类香料的抑菌作用。

2) DADS 对沙门氏菌的 MIC 为 19.5 mmol/L,对副溶血性弧菌的 MIC 为 4.88 mmol/L,与上述结论一致,副溶血性弧菌对硫醚类香料更加敏感。且这两种致病菌的生长受 DADS 的影响呈现浓度依赖性。

3) 在不同浓度 DADS 的作用下,副溶血性弧菌的 *tdh* 基因的表达量随 DADS 浓度增加而下调。其中 DADS 浓度为 1/32 MIC、1/16 MIC、1/8 MIC、1/4 MIC 时,*tdh* 毒力基因相对表达量变化均极显著,通过抑制毒力基因的表达,从而抑制副溶

血性弧菌的毒性。

参 考 文 献

- [1] ZHU M Y, LI W, DONG X, et al. Benzyl-isothiocyanate induces apoptosis and inhibits migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells *in vitro*[J]. *Journal of Cancer*, 2017, 8(2): 240-248.
- [2] 彭敏. 大蒜素药理学作用机制及研究进展[J]. *现代中西医结合杂志*, 2018, 27(14): 119-122. PENG M. Pharmacological mechanism and research progress of allicin[J]. *Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine*, 2018, 27(14): 119-122.
- [3] 胡斌, 匡海学, 辛运杰, 等. 大蒜降血脂作用及机制研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(8): 181-186. HU B, KUANG H X, XIN Y J, et al. Lipid-lowering activity and mechanism of *Allii Sativi* Bulbus [J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2019, 25(8): 181-186.
- [4] CORZO -MARTÍNEZ M, CORZO N, VILLAMIEL M. Biological properties of onions and garlic [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2007, 18(12): 609-625.
- [5] ALI M, THOMSON M, AFZAL M. Garlic and onions: their effect on eicosanoid metabolism and its clinical relevance[J]. *Prostaglandins Leukotrienes & Essential Fatty Acids*, 2000, 62(2): 55-73.
- [6] 冯少龙. 大蒜提取物中有机硫化物对阪崎克罗诺杆菌的抑菌活性与抑菌机理的研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2014. MA S L. Investigating the antimicrobial activity and mechanism of garlic-derived organosulfur compounds to *Cronobacter sakazakii*[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2014.
- [7] 苏凤贤. 大蒜素杀菌作用及其在食品中应用[J]. *粮食与油脂*, 2006, 19(4): 43-45. SU F X. The sterilization of allicin and its application in foods[J]. *Cereals & Oils*, 2006, 19(4): 43-45.
- [8] 吴得海. 食品安全事件之警示与思考[M]. 兰州: 甘肃文化出版社, 2016. WU D H. Warning and thinking of food safety incidents[M]. Lanzhou: Gansu Culture Press, 2016.

- [9] 李欣, 俞佳莉, 乔雪飞, 等. 沙门氏菌在食品与食源性疾病中分布及病原特征分析[J]. 实用预防医学, 2020, 27(7): 801-806.
LI X, YU J L, QIAO X F, et al. Distribution and pathogenic characteristics of *Salmonella* in food and foodborne diseases[J]. Practical Preventive Medicine, 2020, 27(7): 801-806.
- [10] PEZZOLI L, ELSON R, LITTLE C L, et al. Packed with *Salmonella*—investigation of an international outbreak of *Salmonella* Senftenberg infection linked to contamination of prepacked basil in 2007 [J]. Foodborne Pathogens & Disease, 2008, 5(5): 661.
- [11] 贺丽丽. 食品中的致病微生物沙门氏菌的商业化检测技术[J]. 食品安全导刊, 2019(22): 27-29.
HE L L. Commercial detection technology of pathogenic microorganism *Salmonella* in food[J]. China Food Safety Magazine, 2019(22): 27-29.
- [12] SU Y C, LIU C. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety[J]. Food Microbiology, 2007, 24(6): 549-558.
- [13] THONGJUN J, TANSILA N, PANTHONG K, et al. Inhibitory potential of biosurfactants from *Bacillus amyloliquefaciens* derived from mangrove soil against *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Annals of Microbiology, 2016, 66(3): 1257-1263.
- [14] 沈月华, 严伟, 朱晓娟, 等. 65株副溶血性弧菌分子分型及耐药特征分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2020, 30(8): 45-47, 54.
SHEN Y H, YAN W, ZHU X J, et al. Molecular typing and drug resistance characteristics of 65 strains of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2020, 30(8): 45-47, 54.
- [15] 胡利春, 俞刚, 冯维, 等. 腹泻标本分离的副溶血性弧菌的 PFGE 分型与 *tdh* 毒力基因的检测[J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(11): 29-33.
HU L C, YU G, FENG W, et al. PFGE typing and detection of *tdh* virulence gene of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from patients with diarrhea[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2019, 29(11): 29-33.
- [16] 何学文, 戴雨芸, 李欣越, 等. 肉桂醛体外对鼠伤寒沙门氏菌的抑菌机制[J]. 江西农业大学学报, 2020, 42(1): 156-162.
HE X W, DAI Y Y, LI X Y, et al. Antibacterial mechanism of cinnamaldehyde on *Salmonella typhimurium* in vitro[J]. Acta Agriculture Universitatis Jiangxiensis, 2020, 42(1): 156-162.
- [17] LIU D, PANG W, DING L, et al. An insight into the inhibitory activity of dihydromyricetin against *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Food Control, 2016, 67: 25-30.
- [18] 周倩倩, 王岩, 万锈琳, 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, WAN X 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.
- [19] SONG J, HOU H M, WU H Y, et al. Transcriptomic analysis of *Vibrio parahaemolyticus* reveals different virulence gene expression in response to benzyl isothiocyanate [J]. Molecules, 2019, 24(4): 761.
- [20] NIU T X, WANG X N, WU H Y, et al. Transcriptomic analysis, motility and biofilm formation characteristics of *Salmonella typhimurium* exposed to benzyl isothiocyanate treatment[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(3): 1025.
- [21] 张公亮, 丁佳琦, 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 W F, et al. Study on antibacterial activity of several sulfide flavors[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(9): 127-130.
- [22] BURT S A. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 94(3): 223-253.
- [23] 桑雪, 朱耀磊, 朱雅慧, 等. 环境因素对单增李斯特菌 *inlB* 毒力基因表达的影响[J]. 食品工业科技, 2015, 36(20): 175-179.
SANG X, ZHU Y L, ZHU Y H, et al. Effect of environmental factors on *Listeria monocytogenes inlB* gene expression[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(20): 175-179.
- [24] VIKRAM A, ANTE V M, BINA X R, et al. Cyclo (valine -valine) inhibits *Vibrio cholerae* virulence gene expression [J]. Microbiology, 2014, 160(6):

- 1054-1062.
- [25] 强世龙. 双重 PCR 快速检测海水贝类中副溶血性弧菌[D]. 大连: 大连工业大学, 2014.
- QIANG S L. Rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in sea shellfish with the duplex PCR [D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2014.
- [26] 吴葵, 吴清平, 张菊梅, 等. 乙醇促进副溶血性弧菌直接耐热溶血素的基因表达[J]. 现代食品科技, 2015, 31(5): 43-48.
- WU K, WU Q P, ZHANG J M, et al. Ethanol treatment enhances expression of thermostable direct hemolysin gene by *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Modern Food Science & Technology, 2015, 31(5): 43-48.

The Inhibitory Effect of Thioether Spices on *Salmonella* and *Vibrio parahaemolyticus*

Zhang Ke¹, Zhou Qianqian¹, Bi Jingran^{1,3}, Hao Hongshun², Hou Hongman^{1,3}, Zhang Gongliang^{1,3*}
(¹School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning
²School of Textile and Material Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning
³Liaoning Key Lab for Aquatic Product Processing Quality and Safety, Dalian 116034, Liaoning)

Abstract To study the inhibitory effects of thioether spices on two common food-borne pathogens—*Salmonella* and *Vibrio parahaemolyticus*, and explore the relationship between the antibacterial activity of spices and their structure. The diameter of the inhibition zone was measured by the filter paper method, and the minimum inhibitory concentration (MIC) of different spices was determined by the broth dilution method, and the growth curve was drawn using the absorbance value of the bacterial liquid at 600 nm. qRT-PCR was used to study its regulatory effect on the specific virulence gene *tdh* gene of *Vibrio parahaemolyticus*. The results show that these sulfide fragrances have different effects on the two bacteria. Among them, methyl propyl disulfide, methyl furfuryl disulfide, furfuryl isopropyl sulfide, diallyl sulfide, diallyl disulfide has an inhibitory effect on both bacteria. And diallyl disulfide has the most significant inhibitory effect. The MIC for *Salmonella* is 19.5 mmol/L and that for *Vibrio parahaemolyticus* is 4.88 mmol/L. Diallyl disulfide significantly inhibits the expression of the virulence gene *tdh* of *Vibrio parahaemolyticus* and is positively correlated with the concentration. Studies have shown that the number of sulfur atoms and allyl groups in thioether spices will promote their antibacterial effect. Among them, diallyl disulfide has the best antibacterial effect, laying a foundation for the application of thioether spices in food basis.

Keywords thioether fragrances; diallyl disulfide; *Salmonella*; *Vibrio parahaemolyticus*; virulence gene