

8 种单烷基酚类香料对大肠杆菌的抑制机理

韩 帅, 孙洁雯, 刘玉平*, 孙宝国
(北京工商大学轻工科学与工程学院 北京 100048)

摘要 采用分光光度法、电导率法和扫描电镜技术初步探讨 GB 2760-2014《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》中规定的可以使用的 8 种单烷基酚类食用香料,对大肠杆菌的抑制机理和抑制效果及其与其结构的关系。试验结果表明:8 种单烷基酚类食用香料质量浓度在 0.195~0.781 mg/mL 范围均能不同程度地影响大肠杆菌的生长曲线,增加大肠杆菌细胞膜的通透性,使得胞内离子外渗。随着单烷基酚类浓度的增加,大肠杆菌细胞溶出物释放量增加。扫描电子显微镜分析观察结果表明:8 种单烷基酚类食用香料在它们的最小抑菌浓度时均能对大肠杆菌的细胞壁和细胞膜造成一定程度的破坏,使其不能维持正常的形态,表现出不同程度的弯曲、褶皱和凹陷。单烷基酚类食用香料对大肠杆菌的抑制作用与其结构有关,其中丙基苯酚的抑制效果优于乙基苯酚的效果,乙基苯酚的抑制效果优于甲基苯酚的效果。当烷基相同时,烷基在羟基的对位时的抑菌效果更佳。单烷基酚类食用香料能够通过破坏大肠杆菌细胞膜的完整性和通透性,达到抗菌作用。本研究结果为利用单烷基酚类食用香料开发食品防腐剂奠定了理论基础。

关键词 单烷基酚类; 大肠杆菌; 抑菌机理; 构效关系

文章编号 1009-7848(2023)11-0066-08 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.11.007

防腐抑菌是食品加工过程中需要面临的一个重要问题,为此人们一直在寻找高效、安全的食品用防腐剂。目前研究的防腐剂有天然植物提取物^[1-2]、动物提取物^[3-4]、微生物提取物等^[5-6],其中天然植物提取物由于来源广泛,使用历史悠久,因此研究较多^[7]。随着分析技术的快速发展,提取物中的关键抑菌成分被分离与鉴定出来,有的被批准用作食品防腐剂,如从肉桂油中分离出的肉桂醛是我国允许使用的防腐剂^[8]。近年来香料化合物的防腐抑菌效果引起科研人员的关注。如许宇航等^[9]研究了 10 种硫醚类香料对 2 种致病菌的抑制效果,周倩倩等^[10]考察了 9 种异硫氰酸酯类香料化合物对两种革兰氏阴性致病菌的抑制能力,梅佳林等^[11]研究了芳樟醇对源于三文鱼的莓实假单胞菌的抑制效果,耿一鸣等^[12]评价了松油烯-4-醇对荧光假单胞菌的抑制效果。

酚类香料化合物广泛存在于自然界植物中,如丁香酚存在于丁香叶油(含量在 80%左右^[13]),锡兰肉桂油(含量在 60%左右^[14])中,百里香酚存在于百里香油(含量在 30%~50%^[15]),墨西哥牛至

油(含量在 37%^[16])中。虽然酚类食用香料化合物的数量不多,但是它们大多具有防腐抑菌活性;如孙洁雯等^[17]对 23 种酚类香料化合物的抑菌活性进行了评价,结果表明它们具有一定的抑菌活性,且抑菌活性与酚的苯环上所连取代基有一定的关系。王江来等^[18]评价了香芹酚和丁香酚对腐皮镰刀菌的抑菌活性,并对它们的抑菌机理进行研究,结果表明它们能抑制菌丝生长和孢子萌发,破坏细胞膜的完整性和通透性。通过文献调研发现对酚类香料的防腐抑菌活性的研究主要集中在百里香酚、丁香酚及它们与其它香料化合物联用的效果评价^[18-19]。

在研究防腐剂的抑菌机理时多数是针对一种提取物^[3]、单一抑菌剂^[5]、一种或两种香料化合物^[11,18-19]。常采用的方法是通过测定防腐剂对供试菌生长曲线、细胞膜通透性、细胞膜完整性、形态等产生的影响^[3,5,10,20],进而判断防腐剂的抑菌机理。目前尚未见研究系列酚类香料化合物的抑菌机理的文献报道。本文通过测定受试菌经酚类香料处理前后生长曲线、细胞膜的通透性和微观结构的变化,研究我国允许使用的 8 种单烷基酚类香料的抑菌机理,为利用单烷基酚类香料化合物开发新的防腐剂提供参考。

收稿日期: 2022-11-01

基金项目: 北京市自然科学基金项目(6153021)

第一作者: 韩帅,女,硕士

通信作者: 刘玉平 E-mail: liuyup@th.btbu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 供试菌与试剂

大肠杆菌(*Escherichia coli*),中国科学院普通微生物菌种保藏中心。

3 个甲基酚(邻、间、对甲酚)、1,2-丙二醇、无水乙醇、叔丁醇、氯化钠,北京伊诺凯科技有限公司;2 个乙基酚(2-乙基酚和 4-乙基酚)、3 个丙基酚(2-丙基酚、2-异丙基酚、4-丙基酚)、4-苯基苯酚、乙萘酚,北京百灵威科技有限公司;戊二醛,SPI 试剂有限公司;PBS 缓冲液,赛默飞世尔生物制品有限公司;牛肉膏、蛋白胨(用于制备培养基),北京澳博星生物技术有限公司。

1.2 主要仪器与设备

ALPHA1-4LD plus 型真空冷冻干燥机,Christ 仪器有限公司;DDS-307 型电导率仪,上海精密科学仪器有限公司;DL-CJ-1ND-Ⅱ型无菌超净工作台,东联哈尔滨仪器制造有限公司;R9A 型高速离心机,HITACHI 仪器有限公司;S-4800 型场发射扫描电子显微镜,日本日立公司;T-403 型电子分析天平,赛多力斯仪器有限公司;YX-280D 型手提蒸汽压力灭菌锅,合肥市华泰医疗设备有限公司;ZWY-100H 型恒温摇床,上海智城分析仪器有限公司;752 型紫外分光光度计,上海恒平科学仪器有限公司。

1.3 培养基、菌悬液和酚类食用香料溶液的制备

参照文献[17]的方法制备液体培养基和菌悬液,配置 8 种酚类食用香料溶液,测定酚类香料的最小抑菌浓度(MIC)。

1.4 方法

1.4.1 8 种单烷基酚类食用香料对大肠杆菌生长曲线的影响 将受试菌进行活化,接入液体培养基,在恒温条件下振荡培养,使受试菌处于对数期,用该时期的菌液作为试验中的原菌液。用经过无菌处理的生理盐水把 1 mL 的原菌液稀释成 $10^4\sim 10^5$ CFU/mL 的菌悬液备用。首先把菌悬液加入到营养肉汤液体培养基中,然后再加入单烷基酚类香料稀释液,使其质量浓度达到 MIC,在 37 °C、168~172 r/min 的恒温振荡培养箱中振荡培养,间隔 1 h 取样品,用紫外分光光度计在波长 600 nm 处测其 OD 值,绘制生长曲线,另设以含菌液体培养基中添加 GB 2760-2014《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》中允许使用的酚类香料

防腐剂稀释液(乙萘酚、4-苯基苯酚)为对比组,不添加酚类香料的含菌培养基为对照组,研究单烷基酚类香料对受试菌生长曲线的影响程度。

1.4.2 8 种单烷基酚类食用香料对大肠杆菌细胞膜的影响

1.4.2.1 8 种单烷基酚类食用香料对大肠杆菌胞内离子外泄的影响 将活化后的供试菌接入到 100 mL 的营养肉汤培养基中,振荡培养至对数期,离心后弃上清液,收集菌体,用无菌生理盐水进行清洗,重复 3 次。将收集到的菌体重悬于 100 mL 0.1 mol/L 的 PBS 缓冲液中,稀释成 $10^4\sim 10^5$ CFU/mL 的菌悬液。向菌悬液中加入单烷基酚类香料使其质量浓度达到 MIC,混匀后立即取 3 mL 离心,用电导率仪测定上清液的电导率。剩余菌悬液继续培养 14 h,期间每隔 2 h 取样、离心、测定上清液电导率。同时设不加入单烷基酚类香料的对照组,测定其电导率,考察受试菌内部金属离子渗出情况随单烷基酚类香料处理时间的变化趋势。

1.4.2.2 细胞溶出物的测定 将活化后的菌种接入到 100 mL 的营养肉汤培养基中,振荡培养至对数期,离心后弃上清液,收集菌体,用无菌生理盐水重复清洗 3 次。将收集的菌体重悬于 100 mL 0.1 mol/L 的 PBS 缓冲液中,稀释成浓度为 $10^4\sim 10^5$ CFU/mL 的菌悬液。向菌悬液中加入单烷基酚类食用香料至不同的质量浓度(0, MIC, 2MIC),37 °C 下振荡培养 8 h 后取样 5 mL,在 9 000 r/min 下离心 8 min,取 4 mL 上清液在波长 260 nm 处测定吸收值,另设 2 组平行试验组,所得结果为 3 次平均值。分别用含有相同质量浓度单烷基酚类香料的 0.1 mol/L PBS 缓冲液接触菌体 2 min,离心取上清液测定 OD_{260nm} 校正试验组;同时用 0.1 mol/L PBS 缓冲液接触菌体 2 min,离心取上清液测定 OD_{260nm} 校正对照组。

1.4.3 大肠杆菌经单烷基酚类食用香料处理前、后菌体超微结构的变化 采用扫描电镜,对大肠杆菌经过酚类香料处理前后的超微结构进行对比,具体方法如下:

1) 取样 将大肠杆菌培养至对数期,用营养肉汤液体培养基稀释成 $10^4\sim 10^5$ CFU/mL 的菌悬液。向培养基中加入酚类食用香料至 MIC,制成含药培养基。继续培养 7~8 h 后,取 200 mL 样品 4

℃下 6 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,用 PBS 缓冲液重复清洗 3 次。取等量菌悬液添加到不含药的营养肉汤液体培养基中作为对照组。

2) 固定 加入 2.5%的戊二醛固定液,在 0~4℃的条件下静置固定 6 h,离心后弃上清液,用 PBS 缓冲液清洗 2 次,再用高纯水清洗 3 次,每次 15 min。

3) 梯度脱水 配制质量分数梯度为 30%,50%,70%,80%,90%和 95%的乙醇水溶液,对菌体进行梯度脱水,每个梯度脱水 1 次,每次 15 min,再用 100%乙醇脱水 2 次,每次 15 min;再用乙醇和叔丁醇体积比为 1:1 的混合液对样品进行脱水 15 min;最后用叔丁醇对样品脱水 2 次,每次 15 min。在整个过程中,每进行一步后均需 7 000 r/min 离心 8 min,弃上清液后收集菌体再加入下一种试剂。

4) 冷冻干燥 将处理好的样品放在-80℃的冰箱中预冻 30 min,之后再放入真空冷冻干燥机中继续进行冷冻干燥 3 h。

5) 喷金 用离子溅射镀膜机对已经处理好的干燥测试样品喷金,使用场发射扫描电镜进行观察。

1.5 数据分析

采用 Microsoft Excel 2010 数据处理系统,对所得数据进行处理。

2 结果与分析

2.1 单烷基酚类食用香料对大肠杆菌生长曲线的影响

参照文献[17]的方法,测得 8 种单烷基酚类香料的 MIC 分别为邻甲酚和间甲酚的 MIC 是 0.781 mg/mL,对甲酚、2-乙基酚和 4-乙基酚的 MIC 是 0.391 mg/mL,2-丙基酚、2-异丙基酚和 4-丙基酚的 MIC 是 0.195 mg/mL,4-苯基苯酚、乙萘酚的 MIC 是 0.391 mg/mL。将 8 种单烷基酚类食用香料分别配制成质量浓度为 MIC 的培养基,加入菌悬液后进行培养,考察单烷基酚类香料对受试菌生长曲线的影响,结果如图 1 所示。

从图 1 可知,在 1~3 h 时,经单烷基酚类香料处理后的受试菌生长曲线与对照组相比虽有细微变化,但无明显差异,表明此段时间,单烷基酚类

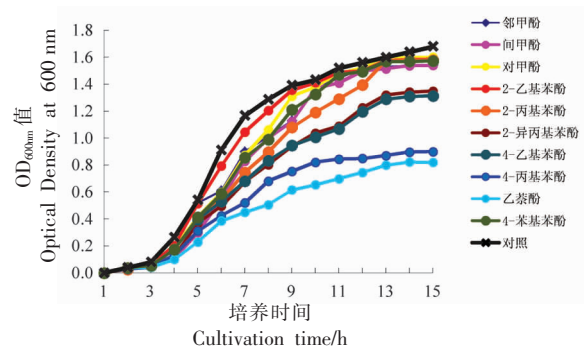


图 1 单烷基酚类食用香料对受试菌生长曲线的影响
Fig.1 The effects of monoalkylphenol edible flavor on growth curves of *Escherichia coli*

香料对受试菌的生长无明显影响。3~5 h 后,可以看出经不同单烷基酚类香料处理过的受试菌的生长曲线有了明显的变化:其中经 4-丙基苯酚、4-乙基苯酚、2-异丙基苯酚、间甲酚处理的试验组 OD_{600nm} 吸收值与对照组相比明显减小,且 4-丙基苯酚对大肠杆菌的影响程度最大。进入 6~9 h,之前抑菌效果较好的间甲酚对大肠杆菌生长曲线的影响减弱,而 4-丙基苯酚、2-异丙基苯酚、4-乙基苯酚对大肠杆菌生长曲线的影响作用仍较大。9 h 以后,与对照组相比试验组进入稳定期的时间均有不同程度的缩短。此外,4-丙基苯酚试验组 OD_{600nm} 最大吸收值大约为对照组的一半(与乙萘酚的接近),说明 4-丙基苯酚对其生长曲线的影响显著。从整图来看,GB 2760-2014《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》中允许适用的防腐剂乙萘酚对大肠杆菌生长曲线影响优于单烷基酚,而 4-苯基苯酚则对大肠杆菌生长曲线影响较弱。

对比所得结果还可以发现单烷基酚类香料对受试菌生长曲线的影响与单烷基酚类食用香料的结构有一定的关系;3 种甲酚对大肠杆菌生长曲线的影响接近;而乙基酚和丙基酚中乙基和丙基在 4 位时对大肠杆菌生长曲线的影响要大于乙基和丙基在 2 位时的影响;烷基的位置相同时,丙基的效果要大于乙基的效果。

2.2 单烷基酚类食用香料对大肠杆菌细胞膜的影响

2.2.1 单烷基酚类食用香料对大肠杆菌胞内离子外泄的影响 通过电导率仪测定 8 种单烷基酚类食用香料处理大肠杆菌后其菌悬液上清液的电导

率,来确定大肠杆菌胞内离子外泄的程度,所得结果如图 2 所示。

由图 2 可知,受试菌经过单烷基酚类香料处理后胞内离子外泄程度均高于对照组,且电导率虽均成上升趋势,但也有不同程度的差异:邻甲酚和间甲酚作用后的大肠杆菌上清液的电导率上升趋势较其它单烷基酚类缓慢,与对照组无明显差异;对甲酚和 2-乙基苯酚电导率变化数值和变化趋势均相近,且高于邻甲酚和间甲酚;试验所考查的时间范围内的前期,2-异丙基苯酚处理后的大肠杆菌胞内离子外泄略高于 4-乙基苯酚和 4-丙基苯酚,而 4-乙基苯酚和 4-丙基苯酚的增长速度快于 2-异丙基苯酚,使得后期,两者处理后的菌种上清液的电导率高于 2-异丙基苯酚,且其中的 4-乙基苯酚在 8 种单烷基酚类食用香料中,作用大肠杆菌后的上清液电导率最大;而经比较组乙萘酚和 4-苯基苯酚处理后的大肠杆菌上清液的电导率处于中间位置,其菌种上清液电导率最终数值低于 4-乙基苯酚、4-丙基苯酚和 2-异丙基苯酚。从整体上来看,随着单烷基酚类化合物作用时间延长,与对照组电导率间的差异也愈大。

单烷基酚类食用香料对大肠杆菌的最小抑菌浓度不同,所以试验中添加的量不同;如果将这个因素考虑进去就会发现,添加单烷基苯酚后大肠杆菌的菌悬液上清液电导率的大小顺序与单烷基苯酚的结构有关,其中丙基苯酚>乙基苯酚>甲基苯酚。在烷基相同的条件下,4-烷基苯酚>2-烷基苯酚。

2.2.2 细胞溶出物的测定 如果细胞膜受到防腐剂的破坏后,Na⁺、K⁺等离子会泄漏出来,RNA 和 DNA 等大分子物质也会泄漏出来,采用紫外分光光度计测定时大分子物质在波长 260 nm 处有吸收,因此可利用测定 OD_{260nm} 吸收值得方来判断细胞内大分子物质的外泄程度,进一步确定细胞膜受防腐剂的损坏程度。采用不同质量浓度的单烷基酚类香料分别处理大肠杆菌,然后测定菌体培养基上清液在波长 260 nm 处的吸收值,进而判断细胞内容物的泄漏程度,所的结果见表 1。

由表 1 可知,随着单烷基酚类香料质量浓度增大,细胞溶出物的释放量虽都呈现上升趋势,但上升幅度有所差别。细胞溶出物的释放量依次为

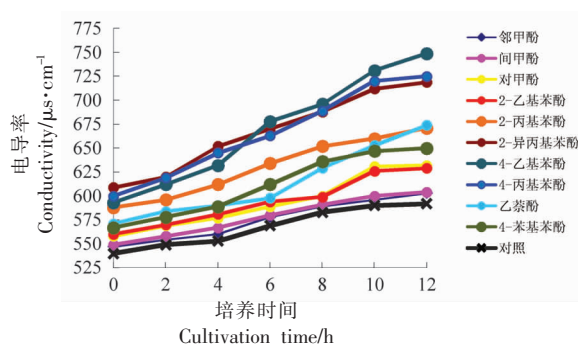


图 2 单烷基酚类食用香料对大肠杆菌胞内离子外泄的影响

Fig.2 The effects of monoalkylphenol edible flavors on intracellular ion leakage of *Escherichia coli*

表 1 单烷基酚类香料对大肠杆菌细胞溶出物释放量的影响

Table 1 The effects of monoalkylphenol edible flavors on cell constituents' release of *Escherichia coli*

化合物	酚类香料质量浓度/mg·mL ⁻¹	细胞溶出物释放量(OD _{260nm}) ^a
空白	0.000	0.046 ± 0.001
邻甲酚	0.781	0.072 ± 0.001
	1.563	0.128 ± 0.003
间甲酚	0.781	0.078 ± 0.003
	1.563	0.134 ± 0.002
对甲酚	0.391	0.098 ± 0.001
	0.781	0.176 ± 0.002
2-乙基苯酚	0.391	0.094 ± 0.005
	0.781	0.170 ± 0.002
4-乙基苯酚	0.391	0.105 ± 0.002
	0.781	0.191 ± 0.002
2-丙基苯酚	0.195	0.117 ± 0.001
	0.391	0.209 ± 0.003
4-丙基苯酚	0.195	0.134 ± 0.001
	0.391	0.255 ± 0.003
2-异丙基苯酚	0.195	0.139 ± 0.001
	0.391	0.256 ± 0.004
乙萘酚	0.391	0.131 ± 0.003
	0.781	0.248 ± 0.001
4-苯基苯酚	0.391	0.081 ± 0.004
	0.781	0.159 ± 0.001

注:a. 结果为 3 次试验所得结果表示为平均值±标准偏差。

甲基酚<乙基苯酚<丙基苯酚,而甲基酚中,经对甲酚处理后细胞溶出物释放量大于邻甲酚和间甲

酚。乙基苯酚中,经4-乙基苯酚处理的细胞溶出物释放量大于2-乙基苯酚。经丙基苯酚处理后的细胞溶出物释放量依次为2-丙基苯酚<4-丙基苯酚<2-异丙基苯酚,且大肠杆菌经2-异丙基苯酚处理后细胞溶出物释放量大于作为对比参照的乙萘酚。大肠杆菌经另一作为参照的4-苯基苯酚处理后,细胞溶出物释放量小于大多数单烷基酚类香料处理后的释放量。

对比以上结果可知,单烷基酚类食用香料使大肠杆菌内溶物外泄量的多少与酚的结构有关

系,即丙基苯酚的作用后外泄量大于乙基苯酚的效果,乙基苯酚的效果优于甲基苯酚的效果;在烷基相同的条件下,烷基在酚羟基对位的效果优于在间位的效果,烷基在间位的效果优于在邻位的效果。

2.3 大肠杆菌经单烷基酚类香料处理前、后菌体超微结构的变化情况

大肠杆菌经单烷基酚类香料处理前、后菌体形态和结构如图3所示。

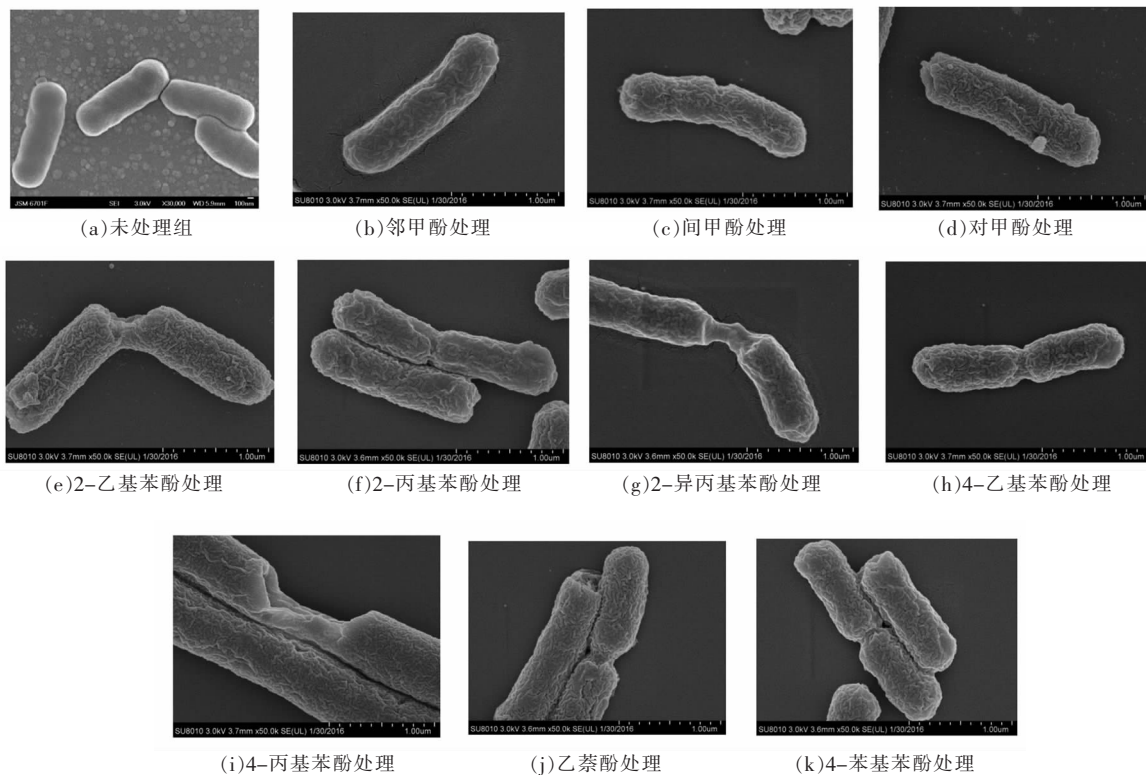


图3 大肠杆菌扫描电镜图

Fig.3 Scanning electron micrographs of *Escherichia coli* cell

由图3可见,未经香料处理的大肠杆菌菌体形态饱满、未变形。而经香料处理后的大肠杆菌菌体形态发生了不同程度的改变,如菌体发生萎缩、表面有裂痕、且杆状两端位置出现明显凹陷等。由图可看出,甲基酚中,邻甲酚处理后的菌体端处有轻微凹陷,间甲酚处理后的菌体中部有较为明显的凹陷,而对甲酚处理后的菌体端处凹陷程度较大。乙基苯酚中,4-乙基苯酚处理后的菌体中部已萎缩变形,2-乙基苯酚处理后的菌体中部有较为

明显的断裂凹陷。丙基苯酚中,2-丙基苯酚处理后的菌体有较为明显的萎缩、凹陷,菌体失去饱满形态,而2-异丙基苯酚和4-丙基苯酚处理后的大肠杆菌菌体萎缩、凹陷最为严重。作为对比物的乙萘酚和4-苯基苯酚处理后的菌体也出现端处凹陷、萎缩等现象,与4-乙基苯酚和4-丙基苯酚处理后的菌体形态相比,作用相对较弱。

对比所得扫描电镜结果可知,经过单烷基酚类食用香料处理后大肠杆菌变形大小程度依次为

丙基苯酚>乙基苯酚>甲基苯酚。

通过对单烷基酚类食用香料对大肠杆菌抑制机理进行研究,发现单烷基酚类的结构与其抑菌效果有一定的关系,为充分利用酚类食用香料开发新的防腐剂提供理论依据,也对研究其它食用香料的防腐抑菌具有一定指导意义。

3 结论

1) 单烷基酚类食用香料对大肠杆菌的生长曲线均有不同程度的影响,整体上看,丙基苯酚>乙基苯酚>甲基酚;其中,4-丙基苯酚、4-乙基苯酚和 2-异丙基苯酚对大肠杆菌生长曲线影响较大。单烷基酚类香料可以有效抑制大肠杆菌生长繁殖,缩短对数期,提前进入稳定期,达到抑菌作用。

2) 经单烷基酚类食用香料处理后的菌悬液上清液的电导率均成上升趋势;且随着酚类食用香料质量浓度增大,细胞内溶物释放量也随之增大。这表明经单烷基酚类食用香料处理后的大肠杆菌细胞膜的选择透过性增大,导致原生质外渗。上清液电导率的大小和细胞溶出物释放量与单烷基苯酚的结构有一定关系,其中丙基苯酚>乙基苯酚>甲基苯酚。

3) 经单烷基酚类食用香料处理后大肠杆菌的形态和结构均发生了不同程度变化,主要表现为菌体发生萎缩、干瘪,表面有裂痕,且杆状两端位置出现凹陷。

4) 单烷基酚类食用香料中取代基不同,对大肠杆菌的抑制作用强弱也有明显差异,抑制效果大小顺序为丙基苯酚>乙基苯酚>甲基苯酚;并且烷基相同时,烷基在 4 位时的抑菌效果更佳。

参 考 文 献

- [1] 宋爽,王兴娜,高志红. 青梅组分抗食源性致病菌活性分析[J]. 中国食品学报, 2020, 20(2): 307-314.
SONG S, WANG X N, GAO Z H. Antibacterial activity of components of *Prunus mume* against food-borne pathogens[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(2): 307-314.
- [2] HE F, WANG W, WE M C, et al. Antioxidant and antibacterial activities of essential oil from *Atractylodes lancea* rhizomes[J]. Industrial Crops and Products, 2020, 153: 112552.
- [3] 刘权伟,李婷婷,励建荣. 新型鲶鱼体表黏液抗菌肽抑菌活性验证及抑菌机理[J]. 中国食品学报, 2020, 20(8): 84-91.
LIU Q W, LI T T, LI J R. Validation of antimicrobial activity of antibacterial peptides from new type catfish epidermal mucus and its antimicrobial mechanism[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(8): 84-91.
- [4] BO J, YANG Y, ZHENG R H, et al. Antimicrobial activity and mechanisms of multiple antimicrobial peptides, isolated from rockfish *Sebastes marmoratus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 93: 1007-1017.
- [5] 高娟娟,贾丽艳,畅盼盼,等. 枯草芽孢杆菌细菌素 A32 的抑菌机理研究[J]. 中国食品学报, 2021, 21(10): 56-64.
GAO J J, JIA L Y, CHANG P P, et al. Studies on the inhibition mechanism of bacteriocin A32 producing by *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(10): 56-64.
- [6] ZANGENEH M, KHORRAMI S, KHALEGHI M. Bacteriostatic activity and partial characterization of the bacteriocin produced by *L. plantarum* sp. isolated from traditional sourdough[J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(11): 6023-6030.
- [7] TAJKARIMIA M M, IBRAHIM S A, CLIVER D O. Antimicrobial herb and spice compounds in food[J]. Food Control, 2010, 21(9): 1199-1218.
- [8] 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.
China's National Health and Family Planning Commission. National food safety standard for uses of food additives; GB2760-2014[S]. Beijing: Standards Press of China, 2014.
- [9] 许宇航,王岩,毕景然,等. 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[J]. 中国食品学报, 2022, 22(5): 62-69.
XU Y H, WANG Y, BI J R, et al. Inhibitory effect of sulfide flavors on *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22

- (5): 62-69.
- [10] 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.
- [11] 梅佳林, 李婷婷, 张星晖, 等. 芳樟醇对三文鱼源莓实假单胞菌的抑菌机理[J]. 食品科学, 2022, 43(9): 199-206.
- MEI J L, LI T T, ZHANG X H, et al. Antibacterial mechanism of linalool against *Pseudomonas fragi* from salmon[J]. Food Science, 2022, 43(9): 199-206.
- [12] 耿一鸣, 李婷婷, 励建荣, 等. 松油烯-4-醇对荧光假单胞菌抑菌能力及作用机理[J]. 食品科学, 2022, 43(1): 30-36.
- GENG Y M, LI T T, LI J R, et al. Antibacterial activity and mechanism of terpinene-4-ol against *Pseudomonas fluorescens*[J]. Food Science, 2022, 43(1): 30-36.
- [13] JIROVETZ L, BUCHBAUER G, STOILOVA I, et al. Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(17): 6303-6307.
- [14] ROSELLO J, SEMPERE F, SANZ-BERZOSA I, et al. Antifungal activity and potential use of essential oils against *Fusarium culmorum* and *Fusarium verticillioides*[J]. Journal of Essential Oil-Bearing Plants, 2015, 18(2): 359-367.
- [15] CUTILLAS A, CARRASCO A, MARTINEZ-GUTIERREZ R, et al. Thyme essential oils from Spain: Aromatic profile ascertained by GC-MS, and their antioxidant, anti-lipoxygenase and antimicrobial activities[J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2018, 26(2): 529-544.
- [16] CID-PEREZ T S, TORRES-MUNOZ J V, NEVAREZ-MOORILLON G V, et al. Chemical characterization and antifungal activity of *Poliomintha longiflora* Mexican oregano[J]. Journal of Essential Oil Research, 2016, 28(2): 157-165.
- [17] 孙洁雯, 韩帅, 刘玉平, 等. 食用酚类香料的抑菌活性研究[J]. 中国食品学报, 2017, 17(12): 243-250.
- SUN J W, HAN S, LIU Y P, et al. Research on the antibacterial activity of phenol flavor compounds[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2017, 17(12): 243-250.
- [18] 王江来, 张锦锋, 马金秀. 等. 香芹酚和丁香酚对腐皮镰刀菌的抑菌活性及抑菌机理[J]. 微生物学通报, 2022, 49(5): 1638-1650.
- WANG J L, ZHANG J F, MA J X, et al. Antagonistic activity and defense mechanism of carvacrol and eugenol against *Fusarium solani*[J]. Microbiology China, 2022, 49(5): 1638-1650.
- [19] 胡心怡, 胡郁汉, 潘振辉, 等. 百里香酚和肉桂醛联用对沙门氏菌的协同抑菌效应及其应用[J]. 现代食品科技, 2021, 37(12): 112-119.
- HU X Y, HU Y H, PAN Z H, et al. Synergistic inhibitory effect of thymol and cinnamaldehyde against *Salmonella* and applications of the combination[J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(12): 112-119.
- [20] TIAN L, WANG X, LIU R, et al. Antibacterial mechanism of thymol against *Enterobacter sakazakii* [J]. Food Control, 2021, 123: 107716.

The Inhibition Mechanism of Eight Monoalkyl Phenol Flavor Compounds against *Escherichia coli*

Han Shuai, Sun Jiewen, Liu Yuping*, Sun Baoguo

(School of Light Industry Science and Technology, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048)

Abstract To investigate tentatively the inhibition mechanism of eight monoalkylphenol flavor compounds (EMFC), which were listed in the positive list of Chinese food additive use standard (GB2760-2014), against *Escherichia coli* (EC), and to determine the relation of the inhibition effect to the structure of EMFC, spectrophotometry, electrical conductivity and scanning electron microscope were used in this present study. The results showed all of the EMFC at the concentrations from 0.195 mg/mL to 0.781 mg/mL had effects on the production curve of EC in different degrees; EMFC enhanced

the permeability of cell membrane, resulting in the leakage of intracellular ions; with the increasing of EMFC concentrations, the release of cell constituents increased. The results of scanning electron microscope indicated all of the EMFC at their minimum inhibitory concentration could damage the cell membrane and cell wall of EC to a certain extent, and make EC not the normal cell morphology but bends, folds, and depressions. The inhibition effects of EMFC on EC were associated with the structure of EMFC; the efficiency of propylphenol was better than that of ethylphenol, ethylphenol better than methylphenol. When alkyl group attached to benzene ring was same, alkylphenol whose alkyl group was at the para-position of hydroxyl group had the best bacteriostatic activity. EMFC could inhibit the growth of EC by damaging the cell membrane and enhancing the cell membrane permeability. The result obtained lays a theoretical basis for developing food preservatives by using phenol flavor compounds.

Keywords monoalkylphenol; *Escherichia coli*; inhibition mechanism; structure-activity relationships