

姜黄素介导的光动力杀菌对产气荚膜梭菌的作用机制

郑宇航, 麦栩滔, 王文卓, 刘芳, 张新笑, 孙芝兰

Mechanism of Curcumin Mediated Photodynamic Sterilization on *Clostridium perfringens*

ZHENG Yuhang, MAI Xutao, WANG Wenzhuo, LIU Fang, ZHANG Xinxiao, and SUN Zhilan

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023070251>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

姜黄素介导的光动力技术对鲜切马铃薯的杀菌效果

Effects of Curcumin-mediated Photodynamic Technology on Bactericidal Efficacy of Fresh-cut Potatoes

食品工业科技. 2021, 42(4): 259-263,270 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020060050>

姜黄素光动力对牡蛎脂质氧化水解酶的影响

Effect of Curcumin-Mediated Photodynamic Treatment(PDT) on Lipid Degradation-related Enzymes in Oysters

食品工业科技. 2020, 41(24): 1-6,12 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020030061>

几种香辛料精油对产气荚膜梭菌的体外抑菌效果

Bacteriostatic effects of different spices essential oils on *Clostridium perfringens* in vitro

食品工业科技. 2017(23): 10-13 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.23.003>

姜黄素对过度训练所致大鼠心肌细胞凋亡的保护作用

Protective Effect of Curcumin on Cardiomyocyte Apoptosis Induced by Overtraining in Rats

食品工业科技. 2019, 40(15): 304-310 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.15.050>

姜黄素对秀丽隐杆线虫降脂及抗氧化保护作用

Lipid-lowering and anti-oxidative effects of curcumin on *Caenorhabditis elegans*

食品工业科技. 2017(14): 289-293 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.14.057>

牡蛎中多组分多环芳烃的光动力降解研究

Degradation of Multi-Components Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Oyster by Photodynamic Technology

食品工业科技. 2021, 42(14): 40-48 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020110024>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

郑宇航, 麦栩滔, 王文卓, 等. 姜黄素介导的光动力杀菌对产气荚膜梭菌的作用机制 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(12): 121–128.
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023070251

ZHENG Yuhang, MAI Xutao, WANG Wenzhuo, et al. Mechanism of Curcumin Mediated Photodynamic Sterilization on *Clostridium perfringens* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(12): 121–128. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023070251

· 生物工程 ·

姜黄素介导的光动力杀菌对产气荚膜梭菌的作用机制

郑宇航^{1,2}, 麦栩滔², 王文卓², 刘芳², 张新笑², 孙芝兰^{1,*}

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212013;

2. 江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏南京 210014)

摘要: 为实现非热技术对食源性致病菌产气荚膜梭菌的控制, 本文以姜黄素为光敏剂, 探究姜黄素对产气荚膜梭菌的作用机制。首先研究了不同姜黄素浓度对产气荚膜梭菌的杀菌效果, 随后利用电子显微镜观察姜黄素处理后细胞形态, 利用激光共聚焦显微镜和胞外大分子的泄漏分析细胞膜的完整性, 通过测定细胞内 ROS 含量分析姜黄素对产气荚膜梭菌的氧化损伤。结果表明, 姜黄素介导的光动力杀菌对产气荚膜梭菌具有显著 ($P < 0.05$) 的杀菌效果, 当姜黄素浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$, 作用 10 min 时, 产气荚膜梭菌被完全杀死。姜黄素通过产生具有细胞毒性的活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 导致 DNA 和蛋白质等大分子受损, 最后细胞膜破裂, 内容物溶出进而导致细胞裂解死亡。本研究为低温肉制品中光动力杀菌技术的开发提供理论基础。

关键词: 姜黄素, 光动力杀菌, 产气荚膜梭菌, 抑菌机制, 氧化应激

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)12-0121-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023070251

本文网刊:



Mechanism of Curcumin Mediated Photodynamic Sterilization on *Clostridium perfringens*

ZHENG Yuhang^{1,2}, MAI Xutao², WANG Wenzhuo², LIU Fang², ZHANG Xinxiao², SUN Zhilan^{1,*}

(1. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;

2. Institute of Agricultural Products Processing, Agricultural Science, Nanjing 210014, China)

Abstract: To achieve the control of foodborne pathogenic bacteria *Clostridium perfringens* by non-thermal technology, curcumin was used as the photosensitizer to explore its inhibitory mechanism on *C. perfringens*. The bactericidal effect of different curcumin concentrations on *C. perfringens* was investigated. The cell morphology after curcumin treatment was investigated through scan electron microscopy. The integrity of the cell membrane was analyzed by confocal laser scanning microscope and leakage of extracellular macromolecules. The oxidative damage of *C. perfringens* was determined by ROS analysis. The results indicated that curcumin showed a significantly ($P < 0.05$) photodynamic inactivation against *C. perfringens*. *C. perfringens* was completely killed when curcumin was used at a concentration of 20 $\mu\text{mol/L}$ for 10 min. Cytotoxic ROS was generated in this process, which caused the damage of DNA and proteins, cell membrane rupture and leakage of cellular contents, ultimately leading to cell death. These findings gave support for the development of photodynamic sterilization technology in low-temperature meat products.

Key words: curcumin; photodynamic inactivation; *Clostridium perfringens*; antibacterial mechanism; oxidative stress

收稿日期: 2023-07-27

基金项目: 江苏省农业自主创新资金 (CX(22)3063); 国家自然科学基金面上项目 (31972140)。

作者简介: 郑宇航 (1999-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 畜禽产品质量安全, E-mail: 1073066568@qq.com。

* 通信作者: 孙芝兰 (1984-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 畜禽产品质量安全, E-mail: zhilan408@163.com。

近年来,随着生活水平的提高,消费者越来越关心食物品质和食品安全^[1]。低温肉制品是指肉制品加工过程中,其中心温度维持在 68~72 ℃,且在 0~4 ℃ 的条件下进行储藏、运输、销售的肉制品。与传统杀菌技术相比,低温杀菌能最大程度地保持肉的口感和营养成分,但其较低的杀菌温度会导致耐热菌的滋生,比如产生抗逆性强的芽孢^[2-3]。产气荚膜梭菌是一种革兰氏阳性产芽孢的厌氧菌,是低温肉制品中主要的致病菌,能够产生多种毒素,引起气性坏疽和肠道疾病^[4]。在美国,产气荚膜梭菌被称为第三大食源性致病菌,每年因产气荚膜梭菌引起的经济损失达到 3.43 亿美元^[5]。因此,如何控制产气荚膜梭菌的生长繁殖成为低温肉制品运输贮存中的难题^[3,6]。

过去的近十年,针对肉类中产气荚膜梭菌的控制方式主要为加热与化学消毒防腐剂杀菌,为满足消费者对更天然和更健康的食品需求,对肉类中微生物控制的技术重点逐渐转向新型非热保存技术^[3,7]。光动力杀菌是一种新型非热杀菌技术,具有高效、低成本、不破坏产品原有风味品质、可食用等优点,在食品保鲜领域有广阔的前景^[8]。光动力杀菌是通过光、光敏剂、氧气之间的互相作用产生具有细胞毒性的活性氧物质,进而使有害微生物的细胞损伤、死亡以抑制细菌生长的技术^[9-10]。有研究表明,光动力杀菌能有效杀死金黄色葡萄球菌、大肠杆菌等细菌,同时对黑曲霉、白色念珠菌等真菌也有抑制作用^[11-12]。

姜黄素是一种天然多酚化合物,具有低毒性、抗氧化、光敏性,是一种优秀的天然光敏剂,在 400~500 nm 波长的光照下能增强抗菌活性并产生具有细胞毒性的活性氧^[8]。Bhavaya 等^[13]发现姜黄素介导的光动力杀菌对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等食源性病菌有抑制作用。林以琳等^[14]研究发现姜黄素介导的光动力杀菌能抑制南美对虾中微生物的生长。Dong 等^[15]研究发现姜黄素介导的光动力杀菌对抑制枯草芽孢杆菌生长繁殖有明显的效果。但目前关于姜黄素介导的光动力杀菌对低温肉制品中产气荚膜梭菌的控制还鲜有报道。本研究将姜黄素介导的光动力杀菌应用于产气荚膜梭菌的控制,系统地探究其对产气荚膜梭菌的杀菌效果及杀菌机理,为光动力杀菌应用于食品保鲜领域提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

姜黄素 纯度>95%,上海麦克林生化科技股份有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒 北京天根生化科技有限公司;增强型 ATP 检测试剂盒 碧云天生物科技有限公司;胰胨-亚硫酸盐-环丝氨酸琼脂基础培养基(TSC)、液体硫乙醇酸盐培养基(FTG) 山东海博生物科技有限公司;8-苯胺-1-萘磺酸(ANS) 上海源叶生物科技有限公司;2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(DCFDA) 上海麦克林生化科技股份有限公司;LIVE/DEAD™Baclight™ 试剂盒 Invi-

trogen 公司。

带有蓝色 LED 的光源灯板(波长 465~475 nm)

爱佳电子科技有限公司;EVO-LS10 型扫描电子显微镜 德国 ZEISSE Oberkochen 公司;Cary Eclipse 型荧光分光光度计 安捷伦科技有限公司;Cytation5 型多功能酶标仪 美国伯腾仪器有限公司;Ultra View VOX 型激光扫描电子显微镜 美国 PE 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细菌菌株培养条件 产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)由本课题组分离自低温肉制品,保藏于-80 ℃ 冰箱中。接种 200 μL 到 FTG 培养基中,37 ℃ 厌氧培养 12 h,转接 1 mL 菌液到 FTG 中 37 ℃ 厌氧培养 4 h。培养的菌液用于后续试验。

1.2.2 姜黄素的最小杀菌浓度 0.1% 乙酸溶解姜黄素至 5、10、20、40、80、160 μmol/L,将 *C. perfringens* 菌液 8000 r/min 离心 3 min 保留菌泥,用姜黄素溶液悬起并加入 96 孔板中,以 PBS 悬起的菌泥为对照组,蓝光 LED 照射 10 min。将处理过的菌液点 10 μL 在 TSC 平板上观察生长情况。

1.2.3 细胞形态的变化 将 *C. perfringens* 菌液在 4 ℃ 条件下以 8000 r/min 离心 3 min,去掉上清液,用 PBS 溶液洗涤两次保留菌泥,分别用 0、5、10、20 μL 姜黄素溶液悬起并加入 24 孔板中,蓝光 LED 照射 10 min,以用 PBS 悬起未经光照的菌泥为对照组,处理过的菌液 8000 r/min 离心 3 min 去掉上清液,用 PBS 溶液洗涤两次,将所得菌泥与 2.5% 戊二醛混合,4 ℃ 下放置 24 h 固定,将固定好的菌液酒精梯度脱水后,利用扫描电子显微镜观察。

1.2.4 细胞膜完整性变化

1.2.4.1 胞外 ATP 浓度的测定 将处理过的 *C. perfringens* 菌液在 4 ℃ 条件下以 8000 r/min 离心 3 min,取上清液保存在冰沙上,根据增强型 ATP 检测试剂盒的说明书,测定上清液中 ATP 浓度。

1.2.4.2 胞外大分子物质检测 将处理过的 *C. perfringens* 菌液在 4 ℃、8000 r/min 离心 3 min,吸取上清液,利用 0.22 μmol/L 滤膜过滤,使用多功能酶标仪测定其在 260、280 nm 下的吸光度(OD₂₆₀、OD₂₈₀)。

1.2.4.3 激光扫描共聚焦显微镜检测 将处理过的 *C. perfringens* 菌液在 4 ℃ 下 8000 r/min 离心 3 min 保留底部的菌体沉淀,用 PBS 洗涤两次。将洗涤好的菌体悬浮于 1 mL 的 PBS 缓冲液中,加入 LIVE/DEAD™Baclight™ 试剂盒中 SYTO-9 和 PI 混合液 3 μL,在 37 ℃ 下避光反应 30 min,染色完成后在 4 ℃、8000 r/min 离心 3 min 保留菌体沉淀,用 PBS 洗涤 2 次,最终使菌体悬浮于 1 mL 的 PBS 缓冲液中。使用激光扫描电子显微镜观察菌体。

1.2.5 细胞膜流动性变化

1.2.5.1 细胞膜表面疏水性变化 向 3 mL 处理过的 *C. perfringens* 菌液中加入 3 mL 的三氯甲烷,涡旋振荡 15 s 充分混匀,置于室温下 12 min 使两相完全分离。随后使用无菌针头抽取离心管下方的水相,使用多功能酶标仪测量水相在 600 nm 下的吸光度 (OD_{600}) 根据以下公式计算细胞吸附率 ($OD\%$), OD_0 为原始吸光度, OD_1 为处理后的吸光度。

$$OD\% = (OD_0 - OD_1) / OD_0 \times 100$$

1.2.5.2 8-苯胺-1-萘磺酸 (ANS) 荧光检测 向处理过的 *C. perfringens* 菌液加入 ANS 使终浓度为 8 mmol/L 并置于暗处反应 30 min, 将反应液置于荧光分光光度计中测量荧光值, 激发波长为 385 nm, 发射波长为 473 nm。

1.2.6 氧化损伤检测 使用荧光探针 2', 7'-二氯荧光素二乙酸酯 (DCFDA) 分析细胞内的氧化应激。将处理过的 *C. perfringens* 菌液 8000 r/min 离心 3 min 保留菌体沉淀, 用 PBS 洗涤三次, 重新悬浮于含有 10 μ mol/L DCFDA 的 PBS 中, 在 37 $^{\circ}$ C 置于暗处反应 30 min, 反应液用 PBS 洗涤两次以除去多余染料, 将沉淀重新悬浮于 PBS 中, 使用激光共聚焦电子显微镜对细胞进行成像, 激发波长 485 nm, 发射波长 520 nm。

1.2.7 DNA 损伤检测 DNA 损伤的检测通过参考 Huang 等^[16]的方法确定。将处理过的 *C. perfringens* 菌液 4 $^{\circ}$ C 下 10000 r/min 离心 2 min, 按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒的要求提取基因组 DNA, 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳分离产物, 用溴化乙锭染色, 使用凝胶成像系统进行可视化观察。

1.3 数据处理

实验设置三个重复, 实验结果以平均值 $\pm$ 标准差表示。采用 Graphpad Prism 9 作图并对数据进行单因素方差分析 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 姜黄素介导的光动力杀菌技术对 *C. perfringens* 的抗菌效果

为了确定姜黄素的最小杀菌浓度, 用不同浓度的姜黄素溶液将菌泥悬起, 对样品蓝光光照 10 min, 姜黄素降解程度较低且能被 LED 充分激发^[17-18], 在 TSC 平板上培养, 确定姜黄素的最小杀菌浓度。如图 1A 所示, 0.1% 乙酸没有明显的杀菌作用, 随着姜黄素含量的增加, *C. perfringens* 的活菌数明显降低。可知 20 μ mol/L 为姜黄素对 *C. perfringens* 最小杀菌浓度, 后续实验采用 5、10、20 μ mol/L 浓度的姜黄素对 *C. perfringens* 进行处理并分析。将 5、10、20 μ mol/L 浓度姜黄素处理的 *C. perfringens* 进行涂板计数, 结果如图 1B 所示, 生长至对数期的 *C. perfringens* 菌落总数为 8.32 lg CFU/mL, 经 5 μ mol/L 姜

黄素处理后菌落总数为 6.25 lg CFU/mL, 经 10 μ mol/L 姜黄素处理后的菌落总数为 3.92 lg CFU/mL, 经 20 μ mol/L 姜黄素处理后, 平板上没有检出活菌, 此结果与图 1A 结果一致。因此, 姜黄素对 *C. perfringens* 的最小杀菌浓度为 20 μ mol/L。与 Gao 等^[19]的研究相比, 姜黄素介导的光动力杀菌对 *C. perfringens* 的杀菌效果优于大肠杆菌和金黄色葡萄球菌, 因此姜黄素介导的光动力杀菌具有较强的抑制 *C. perfringens* 的潜力。

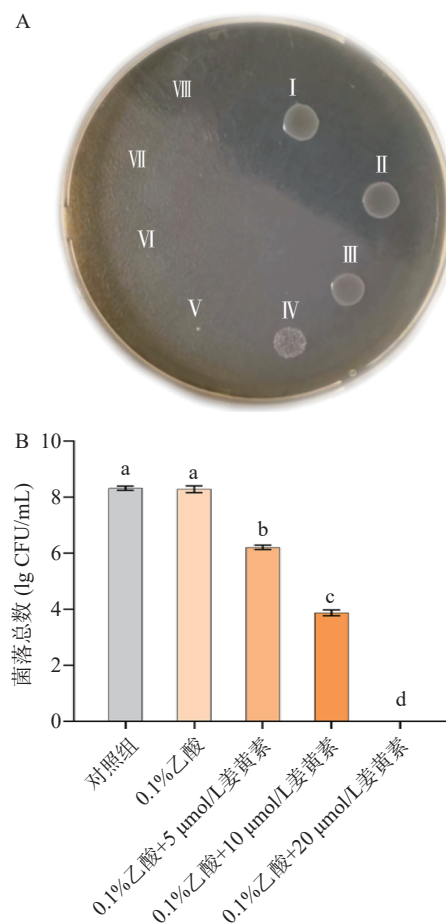


图 1 姜黄素介导的光动力杀菌对 *C. perfringens* 的抗菌效果
Fig.1 Antibacterial effects of curcumin mediated photodynamic sterilization on *C. perfringens*

注: A.平板培养; B.菌落计数; I.对照组, II.0.1% 乙酸, III.0.1% 乙酸+5 μ mol/L 姜黄素, IV. 0.1% 乙酸+10 μ mol/L 姜黄素, V. 0.1% 乙酸+20 μ mol/L 姜黄素, VI. 0.1% 乙酸+40 μ mol/L 姜黄素, VII. 0.1% 乙酸+80 μ mol/L 姜黄素, VIII. 0.1% 乙酸+160 μ mol/L 姜黄素; 不同小写字母代表数据存在显著性差异, $P < 0.05$, 图 3、图 5-图 6 同。

2.2 姜黄素介导的光动力杀菌技术对 *C. perfringens* 形态的影响

通过扫描电子显微镜观察姜黄素处理后 *C. perfringens* 菌体的形态变化^[20]。从图 2 可以看出, 空白对照组菌体呈梭状, 表面光滑菌体结构完整。0.1% 乙酸对 *C. perfringens* 形态没有明显影响, 经 5 μ mol/L 姜黄素处理后, *C. perfringens* 菌体表面有少量蛋白质溶出, 部分菌体黏连、抱团。经 10 μ mol/L

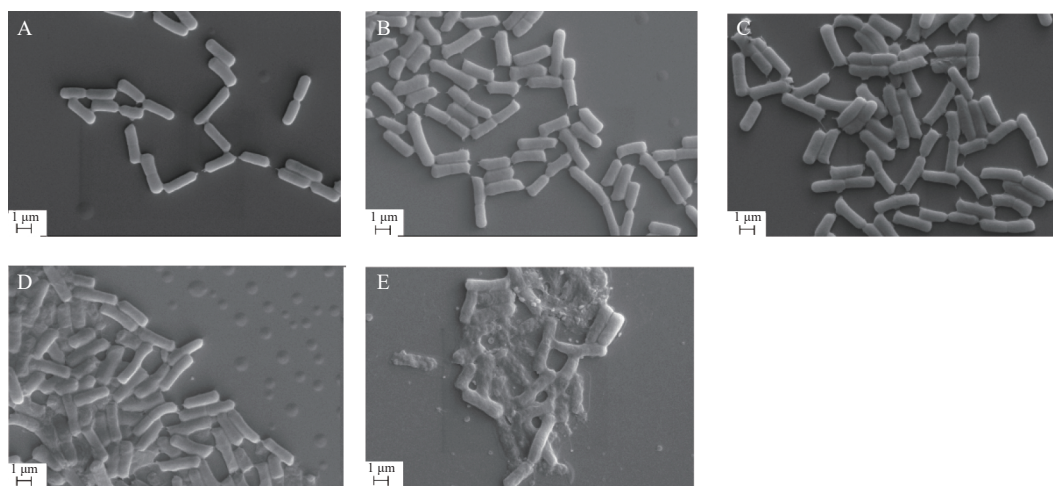


图2 姜黄素介导的光动力杀菌对 *C. perfringens* 菌体形态的影响

Fig.2 Effects of curcumin mediated photodynamic sterilization on the morphology of *C. perfringens*

注: A.对照组; B.0.1% 乙酸; C.0.1% 乙酸+5 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素; D.0.1% 乙酸+10 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素; E.1% 乙酸+20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素。

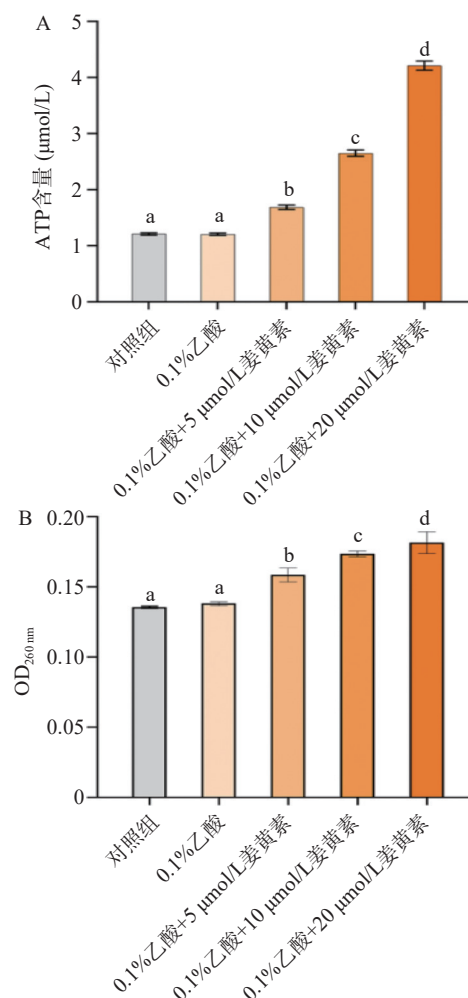
姜黄素处理后, *C. perfringens* 菌体大量黏连在一起, 有明显的内容物溶出, 菌体表面明显粗糙, 部分菌体初步溶解。经 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理后, 菌体出现明显黏连, 菌体出现明显溶解, 细胞内容物溶出, *C. perfringens* 已无法维持细胞结构, 细胞膜和细胞壁受到严重破坏。由此可以推测姜黄素介导的光动力杀菌破坏了 *C. perfringens* 的细胞膜结构, 导致内容物溶出, 使细胞死亡。

2.3 姜黄素介导的光动力杀菌技术对 *C. perfringens* 细胞膜完整性的影响

2.3.1 胞外 ATP 含量 ATP 是能够为细胞供能、维持细胞正常生命活动重要物质, 一般不会被大量检出, 当细胞膜被破坏, 细胞膜的通透性发生改变, 细胞外 ATP 检出量增加^[16]。如图 3A 所示, 0.1% 乙酸对胞外 ATP 浓度无明显影响, 经过 5 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理, 胞外 ATP 的浓度增加了 0.43 $\mu\text{mol/L}$, 经过 10 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理后, 胞外 ATP 的浓度增加了 1.52 $\mu\text{mol/L}$, 经 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理, 胞外 ATP 的浓度增加了 2.95 $\mu\text{mol/L}$ 。可以看出经过姜黄素介导的光动力杀菌, *C. perfringens* 细胞膜不再完整, 导致细胞内 ATP 泄漏。这可能是由于姜黄素破坏了膜相关蛋白的定位和细菌细胞膜的通透性^[21]。

2.3.2 胞外大分子物质 细胞膜的完整性是 *C. perfringens* 菌体能够正常生长代谢的重要影响因素, 当细胞膜完整性受到破坏时, 细胞内的大分子物质泄漏, 进而被检测到, 这些大分子物质是维持细胞生命活动的基础^[22]。细胞内的大分子物质 DNA 和蛋白质的最大紫外吸收峰在 260 nm 和 280 nm, 因此 OD_{260} 与 OD_{280} 可以作为评估细胞膜完整性的重要指标^[23]。如图 3B、C 所示, 经过姜黄素介导的光动力杀菌处理后, *C. perfringens* 菌液中的 OD_{260} 与 OD_{280} 值都有明显的升高, 说明姜黄素的处理确实会

使 *C. perfringens* 内的大分子物质泄漏, 且大分子物质的泄漏量与姜黄素的含量呈正相关。可以看出经过姜黄素介导的光动力杀菌, *C. perfringens* 细胞膜不再完整, 细胞内大分子物质泄漏。徐令清等^[24]探究大黄对金黄色葡萄球菌细胞壁膜的影响, 经大黄处理的细菌显著提高胞内大分子物质外泄, 与本研究结果类似。



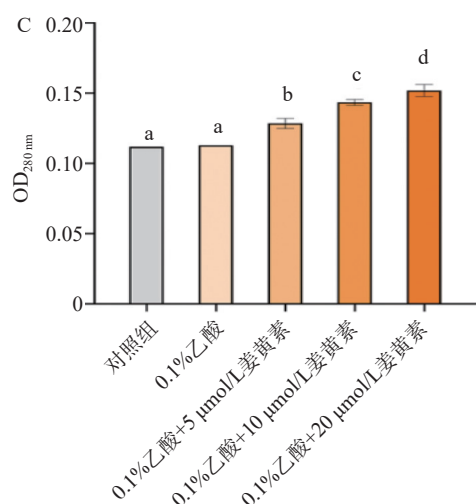


图 3 姜黄素介导的光动力杀菌对 *C. perfringens* 细胞膜完整性的影响

Fig.3 Effects of curcumin mediated photodynamic sterilization on the integrity of *C. perfringens* cell membrane

2.3.3 激光共聚焦观察 荧光探针法是使荧光探针与细胞内的物质结合产生特殊的荧光,通过荧光的数量和强度反应被测物质的含量。PI 是一种无法通过细胞膜的 DNA 荧光探针,只有当细胞膜被破坏时,PI 可以进入细胞内与 DNA 结合发出红色荧光,当细胞膜完整时,PI 无法进入细胞而使细胞发出绿色荧光^[25]。如图 4A~图 4B 所示,空白对照组与 0.1% 乙酸处理组中, *C. perfringens* 仅有少许的红色荧光,大多数都发出绿色荧光,说明细胞有完好的完整性。如图 4C~图 4E 所示,当经过姜黄素介导光动力杀菌后,随着姜黄素浓度的增加,细胞中红色荧光的比例明显增加,红色荧光的强度也有明显的增强,绿色荧

光减少,结果与 2.2 相对应,进一步证明姜黄素破坏了 *C. perfringens* 的细胞膜完整性导致细胞的快速死亡。与 Dong 等^[15]的研究相比,姜黄素介导的光动力杀菌对 *C. perfringens* 细胞膜破坏程度更强于枯草芽孢杆菌。

2.4 姜黄素介导的光动力杀菌技术对 *C. perfringens* 细胞膜流动性的影响

2.4.1 疏水性变化 菌体的表面疏水性是影响菌体稳定生长的重要因素,尤其是在液体培养基环境下,表面疏水性越高,菌体越容易聚集沉降,影响菌体的正常生长繁殖^[26]。如图 5A 所示,与空白对照组相比,0.1% 乙酸处理对细胞吸附率无明显影响,经过不同浓度姜黄素介导的光动力杀菌处理后, *C. perfringens* 细胞的表面疏水性显著上升 ($P<0.05$),且疏水性上升幅度与姜黄素的含量呈正相关。这一现象的出现可能是因为经过处理使菌体表面的非极性集团增加,导致菌体的表面疏水性升高。

2.4.2 荧光探针检测 细胞膜流动性起着维持细胞的物质运输与因袭交换的重要作用,是细胞的一种重要性质。当细胞膜的流动性发生异常,会影响细胞膜蛋白的活性和细胞膜的通透性^[27]。ANS 是一种疏水性荧光探针,可以与细胞膜上的疏水区域结合,细胞膜的流动性越强越不利于 ANS 与细胞膜结合荧光强度越低,流动性越弱 ANS 越容易与细胞膜结合而使荧光强度越强^[28]。如图 5B 所示, *C. perfringens* 经过不同浓度姜黄素介导的光动力杀菌处理后,ANS 在 473 nm 处的荧光强度呈现出上升趋势,说明姜黄素介导的光动力杀菌降低了 *C. perfringens* 细胞膜的流动性。王梓源等^[29]探究 ϵ -PL 对大肠杆菌细胞膜

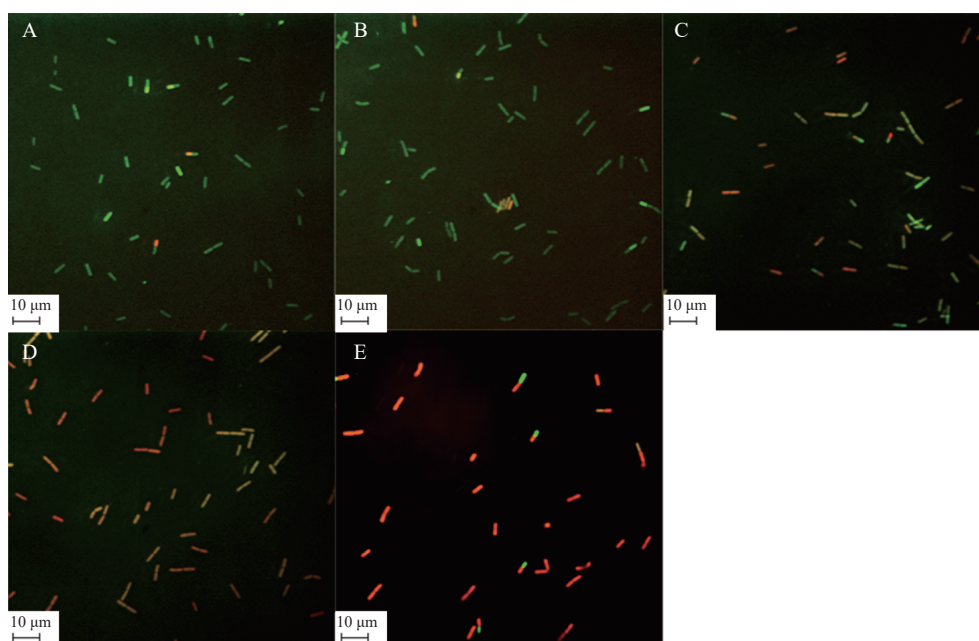


图 4 激光共聚焦观察细胞膜损伤

Fig.4 Laser confocal observation of cell membrane damage

注: A: 对照组; B: 0.1% 乙酸; C: 0.1% 乙酸+5 μmol/L 姜黄素; D: 0.1% 乙酸+10 μmol/L 姜黄素; E: 1% 乙酸+20 μmol/L 姜黄素。

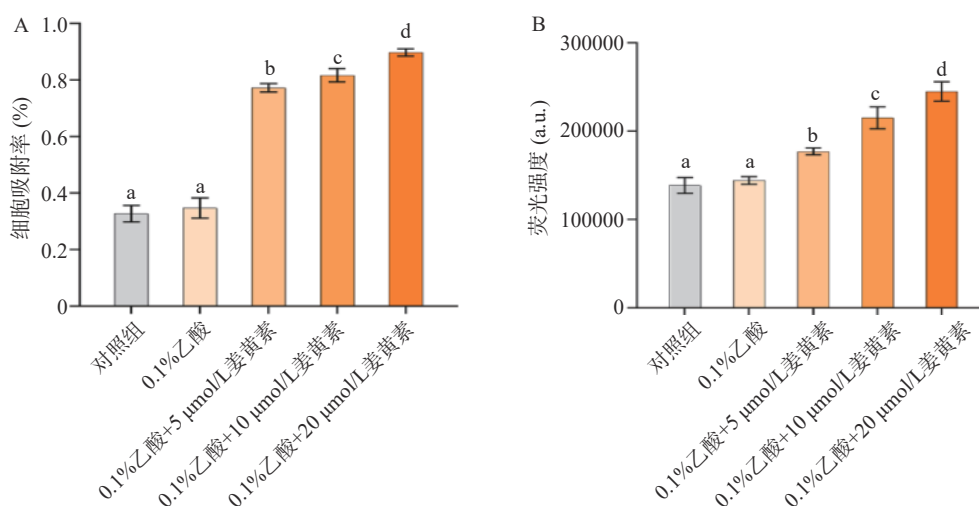


图5 姜黄素介导的光动力杀菌对 *C. perfringens* 细胞膜流动性的影响

Fig.5 Effects of curcumin mediated photodynamic sterilization on the fluidity of *C. perfringens* cell membrane

流动性的影响,经 ϵ -PL 处理后荧光强度显著提高,与本研究结果类似。这可能是光动力杀菌对细胞整体结构造成的负面影响,显著降低了生物膜的粘附能力^[30]。

2.5 姜黄素介导的光动力杀菌技术对 *C. perfringens* 氧化值的影响

DCFDA 荧光探针具有细胞膜透过性和非荧光

性,但可以被 ROS 氧化产生绿色荧光物质,这种物质能稳定地存在于细胞中,因此可以通过绿色荧光的强度来判断细胞中 ROS 含量的变化^[31]。在正常的生理条件下,生物体内的氧化和抗氧化系统保持动态平衡,然而当细胞受刺激时生物体内的 ROS 增加,可能导致氧化应激^[32]。如图 6 所示, *C. perfringens* 经过 0.1% 乙酸处理没有明显变化,而经过姜黄素介

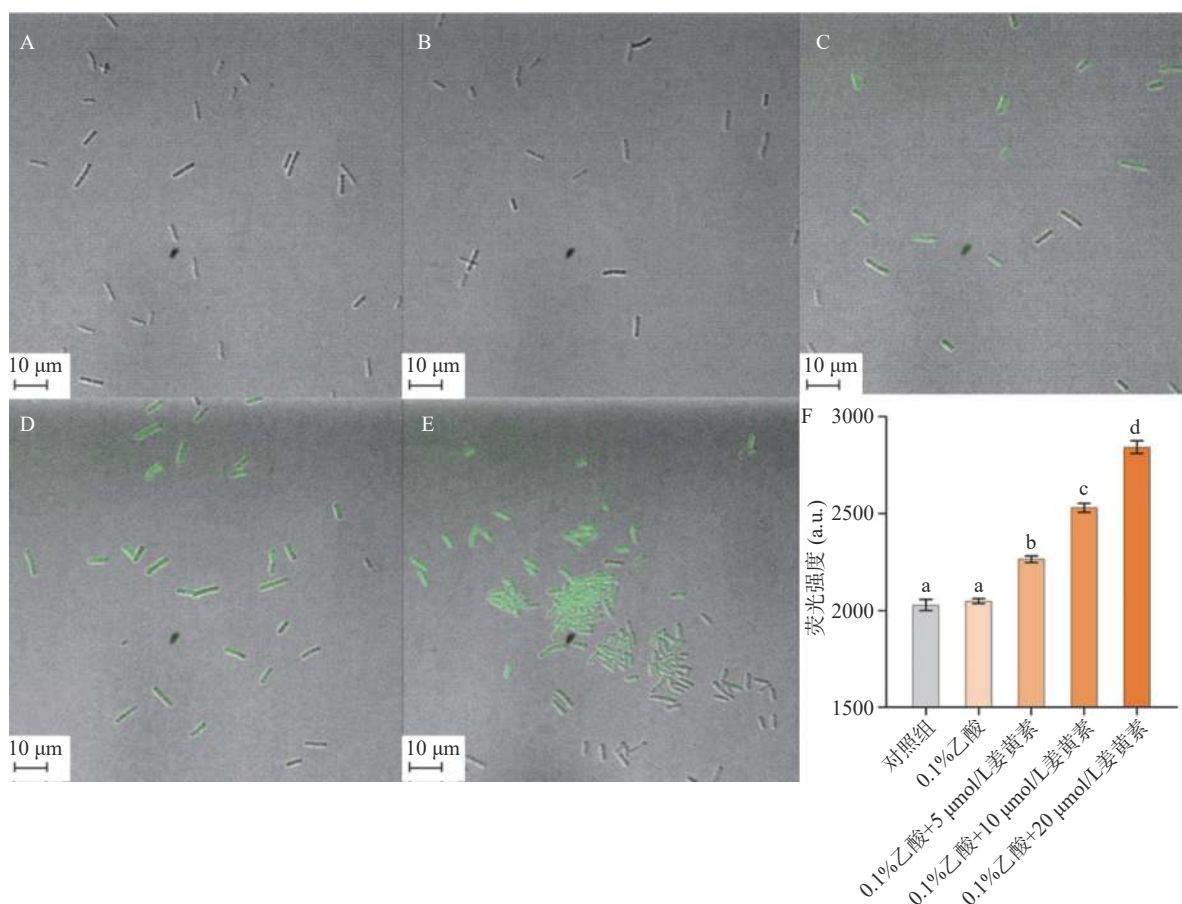


图6 姜黄素介导的光动力杀菌对 *C. perfringens* 氧化值的影响

Fig.6 Effects of Curcumin mediated photodynamic sterilization on *C. perfringens* oxidation value

注: A: 对照组, B: 0.1% 乙酸, C: 0.1% 乙酸+5 μmol/L 姜黄素, D: 0.1% 乙酸+10 μmol/L 姜黄素, E: 1% 乙酸+20 μmol/L 姜黄素, F: 荧光强度。

导的光动力杀菌处理后, ROS 的水平显著提高 ($P<0.05$), ROS 的产生量与姜黄素的浓度呈正相关。表明经姜黄素介导的光动力杀菌处理后, *C. perfringens* 因氧化而受到严重的损害, 其氧化应激的强度取决于姜黄素的浓度。值得注意的是, 细胞内 ROS 的水平与细胞的死亡率变化一致, 这意味着二者具有一定的相关性。Dlas 等^[33]研究表明, 姜黄素在特定波长的光激发下将 O_2 活化形成 ROS, 这与本研究结果相同。Baltazar 等^[34]研究发现, 当添加 ROS 清除剂时, 杀菌效果会明显降低, 这表明 ROS 对杀菌至关重要。

2.6 姜黄素介导的光动力杀菌技术对 *C. perfringens* 的 DNA 损伤影响

DNA 是细菌进行正常生理活动和生长繁殖的基础, 一旦 DNA 受损, 细菌将无法继续正常生长^[16]。在此基础上, 测量了姜黄素介导的光动力杀菌对 *C. perfringens* 基因组 DNA 损伤的影响。如图 7 所示, 对照组提取的 DNA 条带没有任何损伤。然而经过姜黄素介导的光动力杀菌, 所提取的 DNA 条带有明显的损伤, 并且损伤强度与姜黄素的浓度呈正相关。*C. perfringens* 的 DNA 受到破坏后从细胞膜泄漏, 这与上文的结论一致。结果表明, 姜黄素介导的光动力杀菌会使 *C. perfringens* 的 DNA 受到严重的损伤, 影响其正常的生命活动。Kim 等^[35]探究 LED 在制冷温度下对沙门氏菌 DNA 的影响, 经处理后 DNA 受到损伤, 与本研究结果相同, 这可能是由于 DNA 中的核苷被 ROS 所氧化导致的。

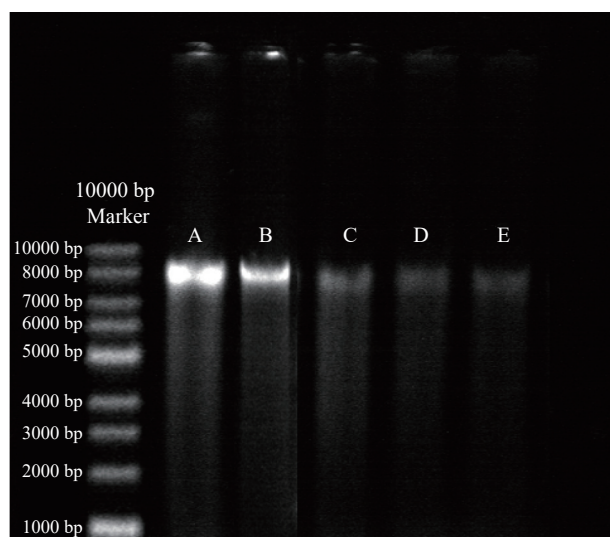


图 7 姜黄素介导的光动力杀菌技术对 *C. perfringens* 的 DNA 损伤的影响

Fig.7 Effects of curcumin mediated photodynamic sterilization on DNA damage of *C. perfringens*

注: A: 对照组; B: 0.1% 乙酸; C: 0.1% 乙酸+5 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素; D: 0.1% 乙酸+10 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素; E: 1% 乙酸+20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素。

3 结论

本研究通过测试了蓝光 LED 激发条件下不同姜黄素浓度的杀菌性能, 并探究了姜黄素介导的光动

力杀菌的机制。结果表明, 姜黄素的最小杀菌浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$, 该技术对 *C. perfringens* 的灭活能力主要取决于姜黄素浓度。通过形态观察、胞外大分子泄漏及氧化损伤检测, 结果表明姜黄素介导的光动力杀菌诱导细胞内产生大量 ROS 使细菌氧化应激, 这个过程导致细胞出现菌体黏连、溶解、胞膜破裂, 致使胞内核酸、电解质、蛋白质等生物大分子物质大量泄漏; 同时胞内遗传物质 DNA 等受到损伤, 影响细菌细胞的正常生命活动、能量代谢, 使细菌死亡。总之, 与现有的化学杀菌相比, 姜黄素介导的光动力杀菌技术具有非热和环保的优点, 并对 *C. perfringens* 有较强的抗菌作用, 具有成为先进食品保鲜材料的潜力, 为肉制品保鲜材料的制备提供理论支撑。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] LI Y R, MAN S L, YE S Y, et al. CRISPR-Cas-based detection for food safety problems: Current status, challenges, and opportunities[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2022, 21(4): 3770–3398.
- [2] 杨丽. 低温肉制品研发生产现状及发展分析[J]. *食品安全导刊*, 2020(36): 7. [YANG L. Current situation and development analysis of research and production of low temperature meat products[J]. *China Food Safety*, 2020(36): 7.]
- [3] 孙晋跃, 孙芝兰, 吴海虹, 等. 非热杀菌技术在低温鸡肉制品致病菌控制中的应用研究进展[J]. *肉类研究*, 2020, 34(8): 84–90. [SUN J Y, SUN Z L, WU H H, et al. Advances in application of non-thermal sterilization technologies to control pathogens in low temperature chicken products[J]. *Meat Research*, 2020, 34(8): 84–90.]
- [4] 李璐, 赵宝华. 产气荚膜梭菌主要致死性毒素的研究进展[J]. *畜牧与饲料科学*, 2011, 32(4): 94–98. [LI L, ZHAO B H. Research progress of major lethal toxins of clostridium perfringens[J]. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2011, 32(4): 94–98.]
- [5] 崔肖爽, 梁栋, 李苗云, 等. 产气荚膜梭菌芽孢萌发剂筛选及其萌发特性研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(2): 191–197. [CUI X S, LIANG D, LI M Y, et al. Screening of germinant for inducing the germination of *Clostridium perfringens* spores and study on its germination characteristics[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2023, 14(2): 191–197.]
- [6] OHTANI K, SHIMIZU T. Regulation of toxin production in *Clostridium perfringens*[J]. *Toxins*, 2016, 8(7): 207.
- [7] LUKSIENE Z, BROVKO L. Antibacterial photosensitization-based treatment for food safety[J]. *Food Engineering Reviews*, 2013, 5(4): 185–199.
- [8] SEIDI D M, MEREDDY R, NETZEL M E, et al. An insight into curcumin-based photosensitization as a promising and green food preservation technology[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2020, 19(4): 1727–1759.
- [9] MEEROVICH G A, AKHLYUSTINA E V, DENISOV D S, et al. Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* bacteria by cationic photosensitizers[J]. *Laser Physics Letters*, 2021, 18(11): 115601.
- [10] ZUHLKE M, MEILING T T, RÖDER P, et al. Photodynam-

- ic inactivation of *E. coli* bacteria via carbon nanodots[J]. *ACS Omega*, 2021, 6(37): 23742–23749.
- [11] PENHA C B, BONIN E, SILVA A F D, et al. Photodynamic inactivation of foodborne and food spoilage bacteria by curcumin[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2017, 76(8): 198–202.
- [12] FAHAD A, RAM M, YASMINA S. A novel photosensitization treatment for the inactivation of fungal spores and cells mediated by curcumin[J]. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 2017, 173: 301–306.
- [13] BHAVYA M L, HEBBAR U H. Efficacy of blue LED in microbial inactivation; Effect of photosensitization and process parameters[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2019, 290: 296–304.
- [14] 林以琳, 李璟, 张江玲, 等. 姜黄素介导的光动力技术对生鲜南美白对虾品质的影响[J]. *中国食品学报*, 2023, 23(5): 271–280.
- [15] LIN Y L, LI J, ZHANG J L, et al. The effect of curcumin mediated photodynamic technology on the quality of fresh south American white shrimp[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2023, 23(5): 271–280.
- [16] DONG L, QIN J R, TAI L Y, et al. Inactivation of bacillus subtilis by curcumin-mediated photodynamic technology through inducing oxidative stress response[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(4): 802.
- [17] HUANG J M, CHEN B W, LI H H, et al. Enhanced antibacterial and antibiofilm functions of the curcumin-mediated photodynamic inactivation against *Listeria monocytogenes*[J]. *Food Control*, 2020, 108: 106886.
- [18] TAO R, ZHANG F, TANG Q J, et al. Effects of curcumin-based photodynamic treatment on the storage quality of fresh-cut apples[J]. *Food Chemistry*, 2018, 274: 415–421.
- [19] WANG Y J, PAN M H, CHENG A L, et al. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1997, 15(12): 1867–1876.
- [20] GAO Y, WE J, LI Z J, et al. Curcumin-mediated photodynamic inactivation (PDI) against DH5 alpha contaminated in oysters and cellular toxicological evaluation of PDI-treated oysters[J]. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2019, 26: 244–251.
- [21] 李路, 李蔚, 车鑫鑫, 等. p-茴香醛抑制柑橘酸腐病菌的作用机制[J]. *食品科学*, 2020, 41(9): 133–138.
- [22] LI L, LI W, CHE J X, et al. Antifungal activity and mechanism of p-anisaldehyde against *Geotrichum citri-aurantii*[J]. *Food Science*, 2020, 41(9): 133–138.
- [23] DURACKA M, LUKAC N, KACANIOVA M, et al. Antibiotics versus natural biomolecules: The case of *in vitro* induced bacteriospermia by enterococcus faecalis in rabbit semen[J]. *Molecules*, 2019, 24(23): 4329.
- [24] 陈梦玲, 蓝蔚青, 李函笑, 等. 牛至精油对腐生葡萄球菌抑制作用机制[J]. *食品科学*, 2020, 41(7): 46–51.
- [25] CHEN M L, LAN W Q, LI H X, et al. Action mechanism of oregano essential oil against staphylococcus saprophyticus[J]. *Food Science*, 2020, 41(7): 46–51.
- [26] HU J M, LIN S L, TAN B K, et al. Photodynamic inactivation of *Burkholderia cepacia* by curcumin in combination with EDTA[J]. *Food Research International*, 2018, 111: 265–271.
- [27] 徐令清, 莫艳梅, 简永欢, 等. 大黄及单体对金黄色葡萄球菌的体外抑菌作用及作用机制研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2021, 42(16): 1929–1934.
- [28] XU L Q, MO Y M, JIAN Y H, et al. Study on the antibacterial effect and mechanism of rhubarb and monomer on Staphylococcus aureus[J]. *International Journal of Laboratory Medicine*, 2021, 42(16): 1929–1934.
- [29] LIU F, LIU Y N, SUN Z L, et al. Preparation and antibacterial properties of epsilon-polylysine-containing gelatin/chitosan nanofiber films[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 164: 3376–3387.
- [30] 吴晶晶. 酶响应型山苍子精油脂质体对产气荚膜梭菌的抑制作用及在肉丸中的应用研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2022.
- [31] WU J J. Inhibitory effect of enzyme-responsive litsea cubeba essential oil Liposomes on *Clostridium perfringens* and its application meatball[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2022.
- [32] LI S G, HUANG Y, AN F P, et al. Hydroxyl radical-induced early stage oxidation improves the foaming and emulsifying properties of ovalbumin[J]. *Poultry Science*, 2019, 98(2): 1047–1054.
- [33] 朱玉林. 罗勒精油对李斯特菌的抗菌机制及其纳米纤维在猪肉中的应用研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2021.
- [34] ZHU Y L. Study on antibacterial mechanism of basil essential oil against *Listeria monocytogenes* and application of its nanofibers in pork preservation[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2021.
- [35] 王梓源, 李欣颖, 吕俊阁, 等. ϵ -聚赖氨酸对大肠杆菌的抗菌机制[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(21): 34–41.
- [36] WANG Z Y, LI X Y, LÜ J G, et al. The antimicrobial mechanism of ϵ -poly-L-lysine against *Escherichia coli*[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(21): 34–41.
- [37] ZHENG D T, HUANG C X, HUANG H H, et al. Antibacterial mechanism of curcumin: A review[J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2020, 17(8): e2000171.
- [38] ZHANG J W, ZHENG P Y, LI J, et al. Curcumin-mediated sono-photodynamic treatment inactivates listeria monocytogenes via ros-induced physical disruption and oxidative damage[J]. *Foods*, 2022, 11(6): 808.
- [39] KAWANO A, YAMASAKI R, SAKAKURA T, et al. Reactive oxygen species penetrate persister cell membranes of *Escherichia coli* for effective cell killing[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2020, 10: 496.
- [40] DIAS L D, AGUIAR A S N, DE MELO N J, et al. Structural basis of antibacterial photodynamic action of curcumin against[J]. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2023, 43: 103645.
- [41] BALTAZAR L D M, SOARES B M, CARNEIRO H C S, et al. Photodynamic inhibition of *Trichophyton rubrum*: *In vitro* activity and the role of oxidative and nitrosative bursts in fungal death[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2013, 68(2): 354–361.
- [42] KIM M J, YUK H G. Antibacterial mechanism of 405-nanometer light-emitting diode against salmonella at refrigeration temperature[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(5): e02582.