

基于代谢活性的 ϵ -聚赖氨酸杀菌动力学

刘振杰, 黄培豪, 陈述, 容顺, 彭飞艇, 陈玲, 郭伟鹏*

(广东省科学院微生物研究所, 广东省微生物分析检测中心, 华南应用微生物国家重点实验室, 广东省微生物安全与健康重点实验室, 国家卫健委微生物食品营养与安全科技创新平台, 广东广州 510070)

摘要: ϵ -聚赖氨酸是一种高安全性天然食品防腐剂, 具有抑菌谱广、抑菌活性强的特点。该研究以大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 为指标菌, 利用荧光探针 5-氰基-2,3-二甲苯基氯化四唑检测菌体细胞在 ϵ -聚赖氨酸处理前后的代谢活性, 计算相对活性, 考察 ϵ -聚赖氨酸的杀菌效果, 利用 Linear 和 Weibull 模型拟合杀菌动力学过程。结果表明: 液体体系条件下低质量分数 (0.005%) ϵ -聚赖氨酸与大肠杆菌作用 15 min, 活性下降至起始活性的 86.33%, 120 min 时为 73.44%; ϵ -聚赖氨酸作用质量分数为 0.025% 时, 处理 15 min 时活性为起始活性的 21.06%, 120 min 时仅为 3.61%。 ϵ -聚赖氨酸杀灭枯草芽孢杆菌的效果与大肠杆菌相近。动力学分析显示 ϵ -聚赖氨酸杀菌效果的 Linear 模型拟合度低, R^2 值低于 0.70, Weibull 模型在测试质量分数范围可精确拟合杀菌动力学过程, R^2 值大于 0.97。该研究表明基于细胞代谢活性指标, Weibull 模型可准确拟合 ϵ -聚赖氨酸杀菌动力学过程。

关键词: ϵ -聚赖氨酸; 天然食品防腐剂; 抑菌活性; 代谢活性; Weibull 模型

文章编号: 1673-9078(2023)11-94-100

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.11.1458

Bactericidal Kinetics of ϵ -Poly-L-Lysine Based on Metabolic Activity

LIU Zhenjie, HUANG Peihao, CHEN Shu, RONG Shun, PENG Feiting, CHEN Ling, GUO Weipeng*

(Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangdong Detection Center of Microbiology, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Safety and Health, National Health Commission Science and Technology Innovation Platform for Nutrition and Safety of Microbial Food, Guangzhou 510070, China)

Abstract: ϵ -Poly-L-lysine (ϵ -PL) is a natural and safe food preservative with a broad-spectrum and strong antimicrobial activity. In the present study, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* were used to investigate their metabolic activity before and after treatment with the fluorescent probe, 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride. The relative activity was calculated to investigate the bactericidal effect of ϵ -PL. Both the Linear and Weibull models were used to describe the bactericidal dynamics of ϵ -PL. For *E. coli* in liquid culture, a low-concentration of ϵ -PL (0.005%) applied for 15 and 120 min decreased metabolic activity of *E. coli* to 86.33% and 73.44% of its original activity, respectively. When a relative higher concentration of 0.025% was used, *E. coli* metabolic activity was only 21.06% after 15 min treatment and 3.61% at 120 min treatment. The bactericidal effect of ϵ -PL on *B. subtilis* was similar to that on *E. coli*. The kinetic analysis revealed that the fit of the Linear model was low, with an R^2 value <0.70 . By contrast, the Weibull model showed a better fit in all test concentrations of ϵ -PL against *E. coli* and *B. subtilis*, with an R^2 value >0.97 . The findings indicate that using metabolic activity as an index, the Weibull model can accurately fit the bactericidal kinetics of ϵ -PL.

Key words: ϵ -poly-L-lysine; natural food preservative; antimicrobial activity; metabolic activity; Weibull model

引文格式:

刘振杰, 黄培豪, 陈述, 等. 基于代谢活性的 ϵ -聚赖氨酸杀菌动力学[J]. 现代食品科技, 2023, 39(11): 94-100

LIU Zhenjie, HUANG Peihao, CHEN Shu, et al. Bactericidal kinetics of ϵ -poly-L-lysine based on metabolic activity [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(11): 94-100

收稿日期: 2022-11-16

基金项目: 广东省科技厅广东省微生物安全与健康重点实验室项目 (2020B121201009)

作者简介: 刘振杰 (1975-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 检测新技术研究开发, E-mail: lqh0828@126.com

通讯作者: 郭伟鹏 (1974-), 男, 教授级高级工程师, 研究方向: 微生物安全检测新技术, E-mail: guowp@yeah.net

ϵ -聚赖氨酸(ϵ -Poly-L-Lysine)是放线菌合成的一种L-赖氨酸聚合物,最先由日本科学家于1977年发现^[1]。 ϵ -聚赖氨酸的单体分子间通过 α -羧基与 ϵ -氨基连接,与蛋白质分子的肽键不同。 ϵ -聚赖氨酸抑菌谱广,对细菌、酵母菌、霉菌有抑菌作用^[2],对病毒也有抑制作用^[3]。 ϵ -聚赖氨酸易溶于水,耐热性能好^[4]。动物试验证实 ϵ -聚赖氨酸安全无毒、无体内残留、易生物降解以及无致畸变性^[5]。因此, ϵ -聚赖氨酸是一种理想的天然食品防腐剂。2013年美国FDA批准 ϵ -聚赖氨酸GRAS(Generally Recognized as Safe)地位,已用于米饭、软饮料、蛋类制品、沙拉、鱼、奶酪、调味品等食品的防腐保鲜^[4,6]。我国于2014年批准 ϵ -聚赖氨酸可用于果蔬汁类、焙烤食品和熟肉制品等食品的防腐。

目前,化学合成类防腐剂大量应用于食品防腐,以延长保质期,但另一方面,随着人们对其潜在危害的进一步认识,以及人们食品安全意识的提高,天然来源的防腐剂因其高安全性而受到人们的青睐,其替代化学防腐剂已成为必然趋势。 ϵ -聚赖氨酸作为一种微生物来源的天然食品防腐剂,市场需求大,商业开发价值高,因此, ϵ -聚赖氨酸研究一直受到研究人员的关注,包括生物合成机制^[7]、高效发酵工艺开发^[8,9]、及其在奶制品^[10]、水产品^[11]、水果^[12]等食品中的应用效果评价。

ϵ -聚赖氨酸主链含有多个-NH₂基团,pKa值约为9.0^[4],使得其在生理条件下呈多正电荷特性。已有研究报道均显示 ϵ -聚赖氨酸抑菌机制的研究较系统且深入^[13-16]。目前,研究人员认为 ϵ -聚赖氨酸可经静电相互作用吸附至带负电荷的微生物细胞膜,并破坏细胞膜,导致胞内细胞物质泄露,同时还可进入胞内与DNA结合,最终影响基因表达^[15,17]。抑菌机制的阐明为 ϵ -聚赖氨酸在食品工业中的实际应用提供了一定的科学依据,有利于设计与制定应用方案。

杀菌动力学的数学模型是研究杀菌技术的关键理论之一,对杀菌技术的实际应用具有理论指导意义。动力学模型在热杀菌技术如微波加热^[18]、射频加热^[19]、脉冲强光^[20],以及非热杀菌技术如超高压^[21]、高压均质^[22]、紫外线^[23]等的杀菌效果评价中得到应用,并在强杀菌剂如焦炭酸二甲酯^[24]、高浓度臭氧水^[25]等杀菌效果的拟合中得到成功应用。目前,尽管人们对 ϵ -聚赖氨酸抑菌机制的研究较深入,但作为一种强杀菌剂,其杀菌动力学研究迄今未见报道,因此,亟需对 ϵ -聚赖氨酸的杀菌动力学进行研究,将其在食品防腐中的应用以及为天然消毒剂开发提供极有价值的理论依据。

荧光探针 5-氰基-2,3-二甲苯基氯化四唑(5-Cyano-2,3-Ditoly Tetrazolium Chloride, CTC)是一

种无色水溶性唑盐,可被活性微生物细胞膜上的电子呼吸传递链中的脱氢酶还原为一种非水溶性的荧光物质,沉积于细胞,在一定波长激光激发下发射红色荧光,活性细胞呈红色,而死细胞无红色荧光,荧光强度与呼吸活性有密切关系^[26,27]。本研究以常见的食源性腐败微生物大肠杆菌(*Escherichia coli*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)作为指示菌,利用细胞代谢活性检测的荧光探针CTC检测细胞代谢活性,基于残活性率的对数值,利用Linear和Weibull模型拟合 ϵ -聚赖氨酸杀菌的动力学曲线。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 试剂与仪器

BS02 CTC快速染色试剂盒,日本同仁化学研究所; ϵ -聚赖氨酸,浙江银象生物工程有限公司,分子量约3 500~4 000;二甲基亚砷为化学纯,国药集团产品;Ultrospec 6300 pro紫外可见分光光度计,美国Amersham Biosciences;5417台式高速冷冻离心机,德国Eppendorf公司。

1.1.2 菌株

大肠杆菌(*E. coli*) ATCC 8099和枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*) ATCC 9372,本实验室保藏。

1.1.3 培养基和试剂

营养肉汤:蛋白胨10 g,牛肉膏3 g,NaCl 5 g,1 000 mL去离子水;营养琼脂:营养肉汤按每升添加18~20 g琼脂,即为营养琼脂。

1.2 菌液制备

活化后的大肠杆菌和枯草芽孢杆菌接种至装有30 mL营养肉汤的150 mL三角瓶,37℃、200 r/min培养18 h,生长至对数生长期后期。基于营养琼脂培养基,倾注平板计数法测试菌体浓度。

吸取20 mL菌液,8 000 r/min离心10 min,收集菌体,弃上清,用0.85%(m/m)无菌生理盐水洗涤2次,最后重悬至无菌生理盐水,并调节菌体浓度约 1×10^9 CFU/mL。

1.3 杀菌处理

吸取5 mL菌液至10 mL离心管,加入质量分数0.5% ϵ -聚赖氨酸溶液(去离子水配制),使其质量分数为0.005%~0.025%,立即混匀,并开始计时120 min,每隔15 min或30 min取样0.1 mL,取样后即无菌去离子水10倍稀释至1 mL,立即测试细胞活性。每

个质量分数 3 个重复, 未 ϵ -聚赖氨酸处理的为对照。

1.4 代谢活性测定

染色步骤参照 BacStain 快速染色试剂盒 (BS02) 操作说明。1 mL 样品中依次加入 20 μ L 50 mmol/L CTC 溶液和 5 μ L 增强剂, 混匀, 30 $^{\circ}$ C 染色 30 min。CTC 还原产物的提取参照文献^[25]。染色后的样品 8 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加入 1 mL 二甲基亚砜, 枪头吸打将细胞打散, 以充分抽提还原产物, 抽提时间 10 min, 期间吸打 1~2 次。8 000 r/min 离心 10 min, 上清 470 nm 处测吸光度值, 二甲基亚砜为空白调零。处理前的样品, 假设菌体细胞的活性为 100%, 其余样品依据吸光度值计算相对活性, 以百分率表示。

1.5 数学模型

1.5.1 一级动力学模型

该模型假设同一种群细菌具有相同的抗逆性, 致死动力学可用 Linear 模型来描述^[20], 即细菌下降的对数值随时间的变化呈线性变化, 用式 (1) 表示。

$$\lg \frac{N}{N_0} = -\frac{t}{D} \quad (1)$$

式中:

N_0 ——杀菌处理前样品含有的菌落总数;

N ——处理后样品含有的菌落总数;

t ——处理时间, min;

D ——指数递减时间, 即杀灭 90% 的微生物所用的时间, min。

本实验对式 (1) 略作修改。

$$\lg \frac{A}{A_0} = -\frac{t}{D} \quad (2)$$

式中:

A_0 ——起始样品的 CTC 还原产物的吸光度值;

A ——杀菌处理后的吸光度值,

t 和 D ——同式 (1)。

1.5.2 Weibull 模型

该模型广泛应用于非热加工过程的微生物失活动力学分析, 假设同一种群中的细菌具有不同的抗逆性^[22], 其模型方程用式 (3) 表示。

$$\lg \frac{N}{N_0} = -bt^n \quad (3)$$

式中:

N_0 、 N 、 t ——同式 (1);

b ——比例因子, 即动力学模型中时间 t 对杀菌动力反应所占比例大小;

n ——形状因子, n 的大小决定了曲线形状, $n>1$ 时曲线向

上凸, $n=1$ 时曲线为一直线, $n<1$ 时曲线向下凹。

本实验采用改进的方程式。

$$\lg \frac{A}{A_0} = -bt^n \quad (4)$$

式中:

A_0 、 A ——同式 (2);

b 、 n ——同式 (3)。

1.6 模型的验证和评价

采用均方根误差 RMSE、决定系数 R^2 、精确因子 A_f 和偏差因子 B_f 4 个参数评判 Weibull 模型拟合度的优劣^[25,28,29]。计算公式如下:

$$C = \sqrt{\frac{\sum(p-a)^2}{n}} \quad (5)$$

$$A_f = 10^{\frac{\sum|\lg(p/a)|}{n}} \quad (6)$$

$$B_f = 10^{\frac{\sum\lg(p/a)}{n}} \quad (7)$$

式中:

C ——均方根误差 (RMSE);

p ——预测值;

a ——实际值;

n ——实验次数;

A_f ——精确因子;

B_f ——偏差因子。

A_f 反映了预测值与实际值偏离的程度, 其值越接近 1, 表明模型的预测值与实际值相差越小, 模型越精确。 B_f 为偏差因子, $B_f>1$ 时表示模型预测值高于实测值, $B_f<1$ 时表示模型预测值低于实测值, B_f 越接近 1, 模型拟合度越高。决定系数 R^2 和 RMSE 表示模型的精确度、可靠度, R^2 越接近 1, RMSE 越小, 模型拟合度越高。

1.7 数据统计与分析

本文所有实验均平行 3 次, 结果以平均值 $\pm$ 标准差表示。Excel 2003 和 Origin 8.0 软件用于数据绘图和模型拟合。

2 结果和讨论

2.1 不同 ϵ -聚赖氨酸质量分数对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌活性的影响

CTC 是一种常规的细菌活性检测探针, 广泛应用于土壤、水体等样品的微生物检测^[30-32]。 ϵ -聚赖氨酸

(质量分数 0.01%) 与大肠杆菌作用 30 min, CTC 染色结果如图 1 所示。 ϵ -聚赖氨酸处理后的大肠杆菌 CTC 染色呈微弱红色,表明其代谢活性低,而未处理的对照,细胞发射出强烈红色荧光,由此可见, ϵ -聚赖氨酸对微生物细胞的破坏作用极为迅速,原因在于其经静电相互作用迅速吸附至大肠杆菌细胞表面并破坏细胞膜。进一步提高 ϵ -聚赖氨酸的作用质量分数,菌体细胞红色则变得更为微弱。 ϵ -聚赖氨酸对枯草芽孢杆菌的作用与大肠杆菌相近。

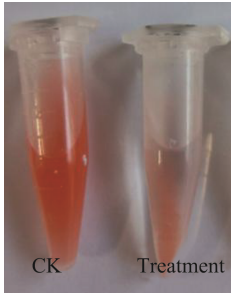


图 1 大肠杆菌在质量分数 0.01% ϵ -聚赖氨酸处理前后的 CTC 染色结果

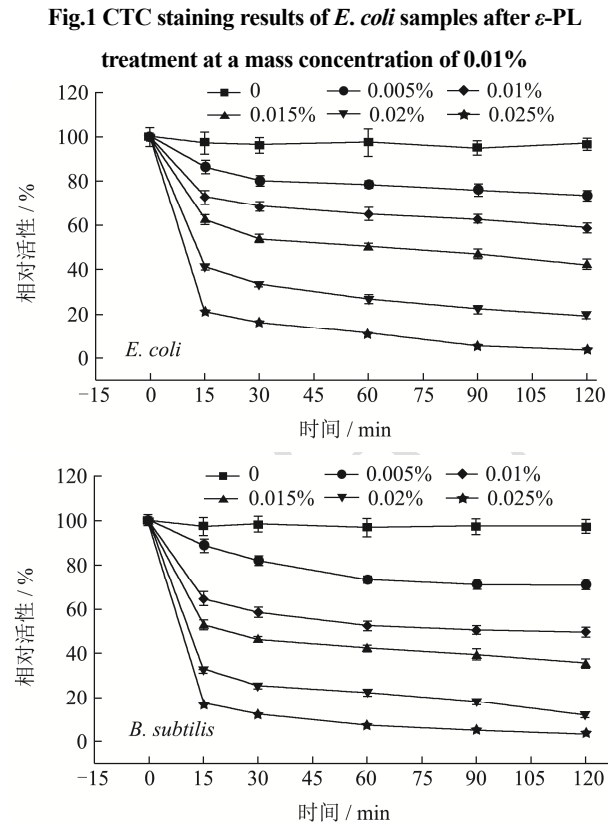


图 2 不同 ϵ -聚赖氨酸质量分数处理大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的活性变化

Fig.2 Change curves of metabolic activity of *E. coli* and *B. subtilis* exposed to various concentrations of ϵ -PL

报道显示, ϵ -聚赖氨酸对细菌的抑菌活性强,对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌的最小抑菌质量浓度分别为 1~12.5、1 和 4~12.5 $\mu\text{g/mL}$ ^[2,14]。不

同 ϵ -聚赖氨酸质量分数和处理时间对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌活性的影响见图 2。未处理的对照,菌体细胞在测试时间内的活性基本保持不变,而 ϵ -聚赖氨酸处理大肠杆菌和枯草芽孢杆菌 15 min,活性发生显著下降,提高处理质量分数活性下降也更明显,作用时间超过 15 min 后代谢活性呈缓慢下降,由此可知,液体体系下 ϵ -聚赖氨酸对微生物细胞的破坏作用迅速。

大肠杆菌与质量分数 0.005% ϵ -聚赖氨酸作用 15 min,活性下降较少,为起始活性的 86.33%,作用 120 min 时下降至 73.44%;高质量分数 ϵ -聚赖氨酸 (0.025%) 作用 15 min,活性仅为起始的 21.06%,作用时间 120 min 时活性下降至仅 3.61%。 ϵ -聚赖氨酸处理枯草芽孢杆菌,0.005% ϵ -聚赖氨酸作用 15 min 时,菌体细胞活性仍较高,为起始活性的 88.54%,作用 120 min 时为 70.84%;提高 ϵ -聚赖氨酸质量分数至 0.025%,处理 15 min 时活性仅为起始活性的 16.45%,作用 120 min 仅为 2.58%。基于 ϵ -聚赖氨酸作用质量分数和时间对代谢活性的影响程度,可知 ϵ -聚赖氨酸对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌的杀菌效果相近,与文献报道相近^[16]。

2.2 ϵ -聚赖氨酸对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌杀菌效果的 Linear 模型拟合

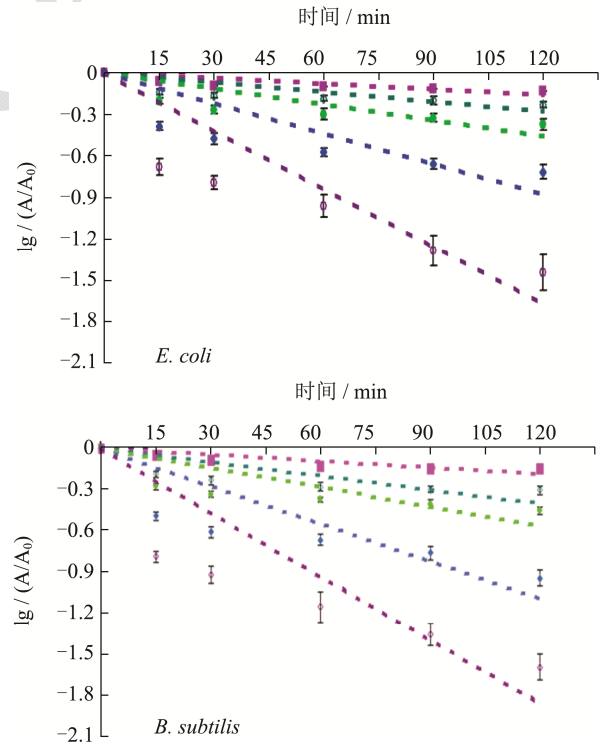


图 3 不同 ϵ -聚赖氨酸质量分数 (0.005%~0.025%) 处理下大肠杆菌及枯草芽孢杆菌线性模型拟合曲线

Fig.3 Fitting curves of linear model for *E. coli* and *B. subtilis* under different ϵ -PL concentrations (0.005%~0.025%)

杀菌动力学的研究是通过数学模型来描述杀菌技术对微生物的杀灭过程，是评价灭菌技术杀菌效果的重要方法，对杀菌技术的实际应用提供理论指导。目前，常见的杀菌动力学模型有 Log-logistic 模型、Weibull 模型、Dose-response 模型及一级动力学模型 Linear 模型^[25,29,33]。

不同质量分数 ϵ -聚赖氨酸杀菌效果的 Linear 模型拟合结果见图 3。不同质量分数 ϵ -聚赖氨酸处理大肠杆菌和枯草芽孢杆菌时，部分实际值与拟合曲线有较大偏离，尤其是 ϵ -聚赖氨酸作用质量分数较高时，即 0.02% 和 0.025%，作用 15 min 与 30 min 时的实测值与拟合曲线的偏离程度较大，由此可见在 ϵ -聚赖氨酸作用质量分数较高的条件下，Linear 模型拟合效果差。

表 1 不同 ϵ -聚赖氨酸质量分数处理下大肠杆菌及枯草芽孢杆菌的线性模型的拟合参数

Table 1 Fitting parameters of linear model for *E. coli* and *B. subtilis* under different ϵ -PL concentrations

ϵ -聚赖氨酸 质量分数/%	大肠杆菌		枯草芽孢杆菌	
	<i>D</i>	<i>R</i> ²	<i>D</i>	<i>R</i> ²
0.005	714.29	0.46	625.00	0.68
0.010	416.67	0.27	303.03	0.20
0.015	263.16	0.35	212.77	0.22
0.02	137.00	0.44	109.89	0.46
0.025	71.43	0.67	64.52	0.59

Linear 模型的拟合参数见表 1。不论是大肠杆菌还是枯草芽孢杆菌，*D* 值 ϵ -聚赖氨酸质量分数的增加而降低，显示 ϵ -聚赖氨酸的杀菌效果随质量分数增加而增强。 ϵ -聚赖氨酸作用质量分数 0.005% 时，决定系数 *R*² 值略高，即大肠杆菌 *R*²=0.46 和枯草芽孢杆菌 *R*²=0.68，作用质量分数提高至 0.01% 和 0.015% 时变

小，后又呈变大趋势。由此可见在 ϵ -聚赖氨酸测试质量分数范围内，Linear 模型拟合度低。实验中发现 ϵ -聚赖氨酸质量分数较高时，短时间内就可导致菌体细胞的活性显著下降；在较低作用质量分数下，活性变化则较为缓慢。推测 ϵ -聚赖氨酸质量分数较低时(< 0.005%)，Linear 模型或可取得较高拟合程度的曲线，作用质量分数较高时，为获得理想的拟合效果，应增加检测点和缩短作用时间。

2.3 ϵ -聚赖氨酸对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌杀菌效果的 Weibull 模型拟合

Weibull 是一种广泛应用于杀菌动力学模拟的数学模型^[28,29,33]。图 4 为不同质量分数 ϵ -聚赖氨酸杀灭大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的 Weibull 模型拟合曲线。不同质量分数 ϵ -聚赖氨酸处理对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的杀菌效果，Weibull 模型的拟合程度高，只有少数实测点与拟合曲线发生一定偏离，因此，Weibull 模型可准确拟合 ϵ -聚赖氨酸的杀菌动力学过程。

不同质量分数 ϵ -聚赖氨酸杀灭大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的 Weibull 模型参数见表 2。测试质量分数范围内，无论作用于大肠杆菌还是枯草芽孢杆菌，模型的决定系数 *R*² 均大于 0.97，*A_f* 和 *B_f* 因子均接近 1，*RMSE* 值极低，因此，Weibull 模型可以精确拟合 ϵ -聚赖氨酸杀菌动力学过程，可用于 ϵ -聚赖氨酸的杀菌效果拟合。

杀菌动力学研究中，研究人员大都基于培养法的平板计数法分析杀菌处理前后的活菌数，基于残活率的对数值 lg(*N/N*₀) 进行拟合^[18,19,22]。因此，本研究基于代谢活性进行杀菌动力学曲线的拟合，有一定创新性。

表 2 不同 ϵ -聚赖氨酸质量分数处理大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的 Weibull 模型参数

Table 2 Fitting parameters of Weibull model for *E. coli* and *B. subtilis* under different ϵ -PL concentrations

菌种	ϵ -聚赖氨酸质量分数/%	<i>b</i>	<i>n</i>	<i>A_f</i>	<i>B_f</i>	<i>RMSE</i>	<i>R</i> ²
大肠杆菌	0.005	0.03	0.31	1.01	1.00	0.03	0.99
	0.01	0.07	0.23	1.00	1.00	0.02	0.99
	0.015	0.10	0.26	1.00	1.00	0.02	0.99
	0.02	0.17	0.29	1.00	1.00	0.02	0.99
	0.025	0.21	0.40	1.01	1.00	0.03	0.98
枯草芽孢杆菌	0.005	0.02	0.44	1.01	1.00	0.03	0.98
	0.01	0.11	0.22	1.01	1.00	0.02	0.99
	0.015	0.16	0.22	1.04	1.00	0.07	0.97
	0.02	0.21	0.30	1.00	1.00	0.02	0.99
	0.025	0.28	0.36	1.00	1.00	0.02	0.99

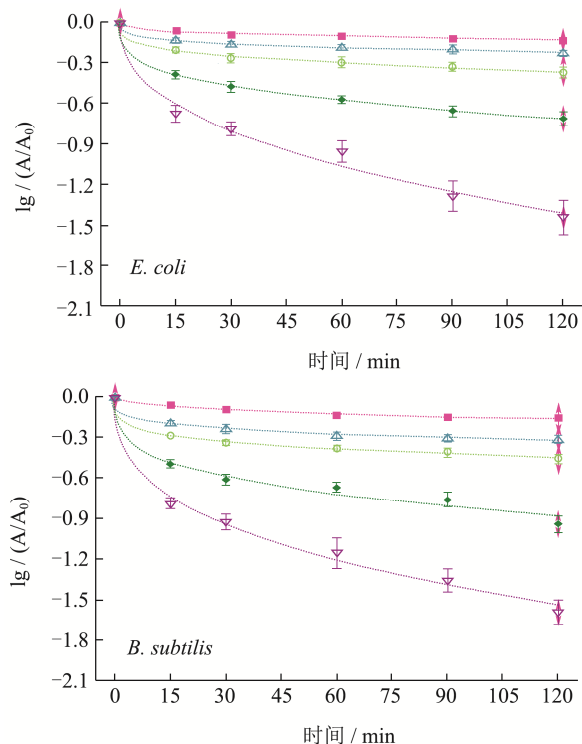


图4 不同 ϵ -聚赖氨酸质量分数(0.005%~0.025%)杀灭大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的Weibull模型拟合曲线

Fig.4 Fitting curves of Weibull model for *E. coli* and *B. subtilis* under different ϵ -PL concentrations (0.005%~0.025%)

3 结论

杀菌动力学研究是科学评价灭菌技术的一种重要手段。本文采用细胞代谢活性作为杀菌效果评价指标,残代谢活性百分率的对数值代替基于菌落数残活率的对数值用于 ϵ -聚赖氨酸杀菌效果的拟合。 ϵ -聚赖氨酸作用质量分数0.005%时,对大肠杆菌及枯草杆菌代谢活性有一定影响,随质量分数增大,活性显著下降,0.025% ϵ -聚赖氨酸作用15 min后,菌体细胞仅显示微弱活性。动力学分析显示Linear模型拟合度较低, R^2 值小于0.7,Weibull模型拟合度高, R^2 值大于0.97。基于代谢活性的指标,Weibull数学模型可用于 ϵ -聚赖氨酸杀菌效果的准确拟合。

参考文献

- [1] Shima S, Sakai H. Polylysine produced by *Streptomyces* [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1977, 41: 1907-1909.
- [2] Shima S, Matsuoka H, Iwamoto T, et al. Antimicrobial action of ϵ -poly-L-lysine [J]. Journal of Antibiotics, 1984, 37: 1449-1455.
- [3] Shima S, Fukuhara Y, Sakai H. Inactivation of bacteriophages by ϵ -poly-L-lysine produced by *Streptomyces* [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1982, 46: 1917-1919.
- [4] Hiraki J. Basic and applied studies on ϵ -polylysine [J]. Journal of Antibacterial Antifungal Agents, 1995, 23: 349-354.
- [5] Hiraki J, Ichikawa T, Ninomiya S, et al. Use of ADME studies to confirm the safety of ϵ -polylysine as a preservative in food [J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2003, 37: 328-340.
- [6] Shih I L, Shen M H, Van Y T. Microbial synthesis of poly(ϵ -lysine) and its various applications [J]. Bioresource Technology, 2006, 97(9): 1148-1159.
- [7] Yamanaka K, Maruyama C, Takagi H, et al. ϵ -Poly-L-lysine dispersity is controlled by a highly unusual nonribosomal peptide synthetase [J]. Nature Chemical Biology, 2008, 4: 766-772.
- [8] Kahar P, Iwata T, Hiraki J, et al. Enhancement of ϵ -polylysine production by *Streptomyces albulus* strain 410 using pH control [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2001, 91: 190-194.
- [9] Liu S R, Wu Q P, Zhang J M, et al. Efficient production of ϵ -poly-L-lysine by *Streptomyces alhygroscopicus* using one-stage pH control fed-batch fermentation coupled with nutrient feeding [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015, 25(3): 358-365.
- [10] Lin L, Gu Y, Li C, et al. Antibacterial mechanism of ϵ -poly-lysine against *Listeria monocytogenes* and its application on cheese [J]. Food Control, 2018, 91: 76-84.
- [11] Lan W, Sun Y, Zhang N, et al. Effects of ϵ -polylysine and rosemary extract on quality attributes and microbial communities in vacuum-packaged large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) during ice storage [J]. Food Science and Biotechnology, 2021, 30(3): 465-474.
- [12] Dou Y, Routledge M N, Gong Y, et al. Efficacy of epsilon-poly-lysine inhibition of postharvest blue mold in apples and potential mechanisms [J]. Postharvest Biology and Technology, 2021, 171: 111346.
- [13] Hyldgaard M, Mygind T, Vad B S, et al. The antimicrobial mechanism of action of ϵ -poly-L-lysine [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80: 7758-7770.
- [14] Li Y Q, Han Q, Feng J L, et al. Antibacterial characteristics and mechanisms of ϵ -poly-L-lysine against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [J]. Food Control, 2014, 43: 22-27.
- [15] Tan Z, Shi Y, Xing B, et al. The antimicrobial effects and mechanism of ϵ -poly-lysine against *Staphylococcus aureus* [J]. Bioresources and Bioprocessing, 2019, 6: 11.

- [16] Tuersuntuoheti T, Wang Z, Wang Z, et al. Review of the application of ϵ -poly-L-lysine in improving food quality and preservation [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2019, 43: e14153.
- [17] Zhang L, Li R, Dong F, et al. Physical mechanical and antimicrobial properties of starch films incorporated with ϵ -poly-L-lysine [J]. Food Chemistry, 2015, 166: 107-114.
- [18] 杭锋,陈卫,陈帅,等.食品微波加热杀菌动力学描述模型的选择[J].农业工程学报,2008,24(6):49-52.
- [19] 雷玉洁,周良付,李宇坤,等.大肠杆菌射频加热杀菌效果及动力学模型拟合[J].中国食品学报,2018,18(4):132-138.
- [20] 王蓓,洪晨,Ragab Khir,等.脉冲强光对黄曲霉菌孢子的杀菌效果、微观结构及动力学的影响[J].中国食品学报,2020,20(4):10-17.
- [21] 李珊,陈芹芹,李淑燕,等.超高压对鲜榨苹果汁的杀菌效果及动力学分析[J].食品科学,2011,32(7):43-46.
- [22] 关云静,周林燕,毕金峰,等.高压均质对芒果汁中大肠杆菌的杀菌动力学[J].食品科学,2017,38(10):222-228.
- [23] 相启森,董闪闪,范刘敏,等.紫外发光极管对食品接触材料的杀菌动力学及影响因素[J].食品科学,2022,43(5):17-25.
- [24] 王威利,吴继军,余元善,等.焦炭酸二甲酯对荔枝汁中大肠杆菌杀菌效果及动力学模型研究[J].中国食品学报,2013,13(10):97-101.
- [25] 陈悦,崔政伟.高浓度臭氧水对巨大芽孢杆菌的杀菌效果及动力学模型[J].包装与食品机械,2020,38(1):1-7.
- [26] Smith J J, McFeters G A. Mechanisms of INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride), and CTC (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride) reduction in *Escherichia coli* K-12 [J]. Journal of Microbiological Methods, 1997, 29(3): 161-175.
- [27] Créach V, Baudoux A C, Bertru G, et al. Direct estimate of active bacteria: CTC use and limitations [J]. Journal of Microbiological Methods, 2003, 52(1): 19-28.
- [28] Ross T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology [J]. Journal of Applied Bacteriology, 1996, 81: 501-508.
- [29] Chen H. Use of linear, Weibull, and log-logistic functions to model pressure inactivation of seven foodborne pathogens in milk [J]. Food Microbiology, 2007, 24(3): 197-204.
- [30] Yu W, Doods W K, Banks M K, et al. Optimal staining and sample storage time for direct microscopic enumeration of total and active bacteria in soil with two fluorescent dyes [J]. Applied Environmental and Microbiology, 1995, 61: 3367-3372.
- [31] Boulos L, Prévost M, Barbeau B, et al. Live/Dead bacLight: Application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water [J]. Journal of Microbiological Methods, 1999, 37: 77-86.
- [32] Joux F, Lebaron P. Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level [J]. Microbes and Infection, 2000, 2(12): 1523-1535.
- [33] Van Boekel M A J S. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells [J]. International Journal of Food Microbiology, 2002, 74(1-2): 139-159.