

网络出版时间:2018-09-06 17:30

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2019.03.016

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20180906.1723.032.html>

魔芋飞粉生物碱的抑菌活性及抑菌机理研究

周琦, 张宝善, 韦露莎, 赵育, 王颖, 裴亚利, 付军伟

(陕西师范大学 食品工程与营养科学学院, 陕西 西安 710119)

【摘要】【目的】探究魔芋飞粉生物碱(Alkaloid from konjac powder, AKP)的抑菌作用及其对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌机理,为新型天然抑菌剂和防腐剂的开发提供理论依据。【方法】采用液体倍比稀释法,确定 AKP 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、鼠伤寒沙门氏菌 4 株供试菌的最小抑菌质量浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC),并采用牛津杯法测定 AKP 对上述 4 株供试菌的抑菌圈大小;通过测定在 AKP 作用下,大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的生长曲线、菌体培养液电导率及观察细胞膜完整性、细胞形态等,对 AKP 的抑菌作用及其机理进行分析。【结果】AKP 对 4 株供试菌均有明显的抑制作用,对金黄色葡萄球菌的抑菌作用最强(MIC 为 10 mg/mL),大肠杆菌次之(MIC 为 20 mg/mL)。AKP 对供试菌的抑菌圈直径依次为金黄色葡萄球菌>大肠杆菌>枯草芽孢杆菌>鼠伤寒沙门氏菌。菌体生长曲线显示,AKP 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的生长有明显的抑制效果。AKP 作用后,大肠杆菌和金黄色葡萄球菌细胞膜受损,存活率显著降低,菌体培养液电导率显著上升。电镜观察发现,AKP 使菌体细胞膜出现破损,部分菌体出现空腔。【结论】AKP 具有抑菌作用,其可能通过破坏细菌细胞膜结构而导致内容物外泄,进而影响细胞的生长代谢或造成细胞死亡,从而抑制其生长。

【关键词】 魔芋飞粉;生物碱;抑菌活性;抑菌机理

【中图分类号】 TS201.3

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2019)03-0121-08

Antimicrobial activity and mechanism of alkaloid from konjac powder

ZHOU Qi, ZHANG Baoshan, WEI Lusha, ZHAO Yu,
WANG Ying, PEI Yali, FU Junwei

(College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi 710119, China)

Abstract:【Objective】In this study, the antibacterial effect of alkaloid extraction isolated from konjac powder (AKP) and its antibacterial mechanism against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were investigated to provide theoretical basis for production of new natural bacteriostatic and preservative agent. 【Method】The minimum inhibitory concentrations (MIC) of AKP to *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Salmonella typhimurium* were determined by liquid ratio dilution method, and the susceptibility tests of AKP to these four bacteria were studied by the Oxford Cup method. The growth curve, electrical conductivity of bacteria culture, cytomembrane integrity and morphologies of tested bacteria were investigated to understand the antibacterial mechanism of AKP. 【Result】AKP had the strongest antibacterial effect on all test strains. *Staphylococcus aureus* was the most inhibited strain (MIC 10 mg/mL), followed by *Escherichia coli* (MIC 20 mg/mL). The inhibition zone diameters were in the order of *Staphylococcus aureus* > *Escherichia coli* > *Bacillus subtilis* > *Salmonella typhimurium*. Growth curves showed

【收稿日期】 2018-01-11

【基金项目】 陕西师范大学中央高校基本科研业务费创新团队项目(GK201601007);陕西省科技统筹创新工程计划项目(2016KTCL02-33);陕西省农业科技创新与攻关项目(2015NY009)

【作者简介】 周琦(1994—),男,湖北宜昌人,在读硕士,主要从事食品科学研究。E-mail:zhouqi@snnu.edu.cn

【通信作者】 张宝善(1969—),男,甘肃张掖人,教授,博士,主要从事食品微生物及食品发酵研究。E-mail:baoshan2@snnu.edu.cn

that AKP had significant inhibitory effect on growth of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. When exposed to AKP, cell membrane was destroyed, bacteria survival was decreased and the conductivity of the bacteria culture was increased. Besides, cell morphology was changed, some cells even had cavities after exposure to AKP. 【Conclusion】AKP showed antibacterial activities by destroying cell membrane and causing cytoplasm leakage to inhibit cell growth and cause cell death.

Key words: konjac powder; alkaloid; antibacterial activity; antibacterial mechanism

魔芋 (Konjac) 是天南星科魔芋属 (*Amorphophallus* Blume) 多年生草本植物, 其地下球茎因富含特殊成分葡甘聚糖而广泛应用于食品加工业中。葡甘聚糖是一种品质很好的食用胶体物质, 可作为食品增稠剂和凝胶剂^[1-3]。加工魔芋时, 在风力作用下魔芋粉分离为两部分, 重的主要是葡甘聚糖粒子, 称为精粉; 轻的、细的能被风吹出去的粉质, 称为飞粉。飞粉中主要含有碳水化合物、蛋白质、氨基酸、矿物质元素以及少量葡甘露聚糖等成分^[4-6]。魔芋飞粉中含有大量的生物碱, 含量可达 5 g/kg^[7], 而生物碱类化合物有一定的抑菌作用^[8]。Mabhiza 等^[9]研究发现, 1.67 mg/mL 生物碱对金黄色葡萄球菌生长的效果与一个标准的氨苄青霉素相当。王关林等^[10]报道, 苦参碱粗提物可通过抑制鸡大肠杆菌的细胞分裂而抑制菌体的生长。当前, 有关魔芋飞粉的开发利用主要集中在生产酒精、提取生物活性物质、饲料生产等研究方面^[5, 11-13]。据报道, 魔芋生物碱在加工过程中被富集于飞粉中^[14], 但有关飞粉中生物碱的相关研究较少, 所以飞粉价值仍值得深入挖掘。本试验拟从最小抑菌质量浓度、抑菌圈、生长曲线、菌液电导率、荧光染色和超微形态结构等方面, 系统研究魔芋飞粉生物碱对大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 的抑菌规律, 分析讨论魔芋飞粉生物碱的抑菌规律和机理, 以期为开发和生产新型安全高效的植物源性天然抗菌剂和防腐剂及魔芋飞粉的深入利用与加工提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌种 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) CICC 10899、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) CICC 23656、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) CICC 10732、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) CICC 21483, 均由中国工业微生物菌种保藏中心提供。

1.1.2 魔芋飞粉 于 2016-10-05 购自陕西省丹凤县凯农魔芋精粉有限公司。

1.1.3 LB 液体培养基 每 1 000 mL 含蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, 氯化钠 10 g, pH 7.2。

1.2 主要仪器

Multiskan Go 全波长酶标仪, 美国 Thermo Electron 公司; FV1200 激光共聚焦显微镜, 日本 Olympus 仪器有限提供; S-3400N 扫描电子显微镜, 日本 Hitachi 公司; HT-7700 透射电子显微镜, 日本 Hitachi 公司; SDDDSJ-308A 型电导率仪, 上海志幸科学仪器有限公司。

1.3 魔芋飞粉生物碱 (AKP) 的制备与鉴定

1.3.1 魔芋飞粉生物碱 (AKP) 的提取 参考梁引库等^[14]的魔芋飞粉生物碱提取方法, 用体积分数 90% 乙醇溶液磁力搅拌提取魔芋飞粉, 提取温度 70℃, 提取 2 次, 第 1 次提取的料液比为 1:8, 提取时间 2 h。真空抽滤收集滤液, 按照上述方法以料液比 1:4 进行第 2 次提取, 提取时间 2 h, 抽滤并回收滤液, 合并 2 次滤液再用微孔滤膜 (0.45 μm) 真空抽滤并旋转蒸发至浓稠状溶液, 冷冻干燥后制得粉状魔芋飞粉生物碱粗提物。

1.3.2 AKP 的化学鉴定与含量分析 按照生物碱的定性检出试验^[10]进行。取 160 mg/mL AKP 1 mL, 先加入 2 滴 10 g/mL 盐酸使其呈酸性, 然后依次使用 10 g/L 碘-碘化钾溶液、10 g/L 苦味酸饱和溶液、50 g/L 氯化汞饱和水溶液、5 g/L 碘化铋钾试剂进行鉴定, 有黄色或白色沉淀产生即判定结果为阳性。以盐酸小檗碱为标准溶液, 在 414 nm 处进行比色, 测定粗提物中生物碱的质量分数为 44.85%。

1.4 AKP 抑菌活性测定

1.4.1 最小抑菌质量浓度 (MIC) 的测定 采用液体倍比稀释法^[15]进行。在 LB 液体培养基中加入质量分数 44.85% 的生物碱粗提物, 调整生物碱质量浓度分别为 0, 5, 10, 20, 40, 80 和 160 mg/mL, 各取 5 mL 分装于无菌试管中。将 200 μL 含量为 10⁶~10⁷ CFU/mL 的各供试菌分别接于上述试管中, 塞上无菌塞。在 37℃、120 r/min 条件下连续振荡培

养 15 h 后,再将培养液划线接于 LB 固体平板培养基上,于 37 ℃ 恒温培养箱培养 24 h,观察细菌生长情况,每组试验设 3 个重复,确定 AKP 作用的最小抑菌质量浓度(MIC)。

1.4.2 抑菌圈的测定 采用牛津杯法^[10]进行。取含量为 10⁶~10⁷ CFU/mL 的各供试菌菌液 200 μL,均匀涂布于 LB 固体培养基表面,取 200 μL 不同质量浓度(0,10,20,40,80 和 160 mg/mL)的生物碱粗提物分别加入各培养皿的牛津杯中,每个皿中放置 3 个牛津杯作为重复。在 37 ℃ 恒温培养箱中培养 24 h 后,观察抑菌圈大小。

1.5 AKP 抑菌机理探究

1.5.1 AKP 对菌体生长曲线的影响 调整 LB 液体培养基中 AKP 的质量浓度为 MIC 和 1/2 MIC,然后分别接入含有 10⁶~10⁷ CFU/mL 大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的菌悬液各 200 μL,在 37 ℃、120 r/min 条件下连续培养 15 h,每隔 1 h 取样测定 OD₆₀₀,以不含 AKP 的 LB 液体培养基为对照,绘制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的生长曲线,每组设 3 个重复。

1.5.2 细菌核酸荧光染色观察 参考 Wu 等^[16]的荧光染色方法。在 20 mL LB 液体培养基中加入 AKP,调整使 AKP 的质量浓度分别为 20 和 10 mg/mL,以不含 AKP 的 LB 液体培养基为对照,在液体培养基中分别加入 200 μL 含有 10⁶~10⁷ CFU/mL 大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的菌悬液,在 37 ℃、120 r/min 条件下培养 3.5 h,5 000 r/min 室温条件下离心 10 min,收集菌体沉淀。用 PBS 缓冲液清洗菌体 3 次,50 μL 缓冲液悬浮,在黑暗条件下用荧光探针 SYTO9/PI 标记。吸取 10 μL 滴于载玻片上,在激光共聚焦显微镜下观察细菌核酸荧光染色。

1.5.3 AKP 对菌液电导率的影响 加入 AKP 使其在液体培养基中的质量浓度为 MIC 和 1/2 MIC,然后分别接入含有 10⁶~10⁷ CFU/mL 大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的菌悬液各 200 μL,在 37 ℃、120 r/min 条件下连续培养 10 h,参考 Li 等^[17]的方法测定菌液电导率,每小时测定 1 次,以不含 AKP 的液体培养基为对照,绘制相对电导率-时间曲线。

1.5.4 扫描电镜观察 参考扫描电镜样品制备方法^[18]。按照 1.5.1 节试验,将 AKP 处理和未经 AKP 处理的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌连续培养 15 h 后,4 000 r/min 室温离心 10 min,收集菌体,用 PBS 缓冲液洗涤 3 次,再用体积分数 2.5% 戊二醛

溶液固定 2 h,PBS 缓冲液洗去戊二醛溶液;然后依次用体积分数 30%,50%,70%,90%,100% 乙醇梯度脱水,梯度脱水后用无水乙醇悬浮,每次悬浮后静置 10 min。吸取 10 μL 滴于载玻片上,自然晾干,喷金,在扫描电镜下观察样品的超微形态。

1.5.5 透射电镜观察 参考透射电镜样品制备方法^[19],在用体积分数 2.5% 戊二醛溶液固定和 PBS 缓冲液清洗前的试验操作与 1.5.4 节相同。之后,先用体积分数 1% 锇酸溶液 4 ℃ 固定 2 h,双蒸水冲洗 3 次,每次 10 min,再用体积分数 30%,50%,70%,90%,100% 的乙醇溶液梯度脱水,每次悬浮后静置 10 min,用环氧丙烷置换乙醇 2 次,每次 10 min。最后用纯树脂包埋、切片,在透射电镜下观察样品的超微结构。

1.6 数据分析

利用 Microsoft Excel 2010 和 Origin 8.0 软件进行数据处理、绘图,差异显著性水平为 $P<0.05$ 。

2 结果与分析

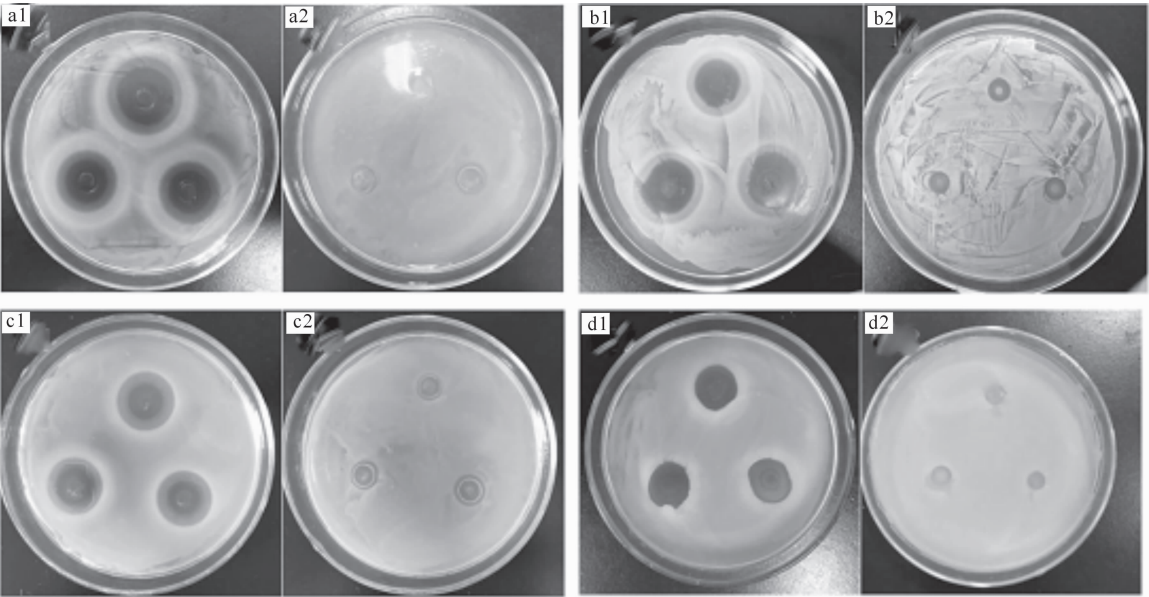
2.1 AKP 的抑菌活性

2.1.1 最小抑菌质量浓度(MIC) 由表 1 可见,AKP 对 4 种供试菌的 MIC 不尽相同,对金黄色葡萄球菌所需的抑菌质量浓度最低,其次是大肠杆菌,对枯草芽孢杆菌和鼠伤寒沙门氏菌的抑菌质量浓度较高,均为 40 mg/mL。

表 1 AKP 对 4 种供试细菌的 MIC
Table 1 MIC of test strains treated with AKP

试验菌种 Test strain	MIC/(mg·mL ⁻¹)
大肠杆菌 CICC 10899 <i>Escherichia coli</i> CICC 10899	20
金黄色葡萄球菌 CICC 23656 <i>Staphylococcus aureus</i> CICC 23656	10
枯草芽孢杆菌 CICC 10732 <i>Bacillus subtilis</i> CICC 10732	40
鼠伤寒沙门氏菌 CICC 21483 <i>Salmonella typhimurium</i> CICC 21483	40

2.1.2 抑菌圈 AKP 对供试菌抑菌圈的测定结果见图 1 和表 2。由图 1 可知,AKP 具有广谱的抑菌活性,对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和鼠伤寒沙门氏菌均有明显的抑菌效果。由表 2 可知,在相同质量浓度下,AKP 对供试菌的抑菌圈直径大小顺序为:金黄色葡萄球菌>大肠杆菌>枯草芽孢杆菌>鼠伤寒沙门氏菌。由表 2 还可知,随着 AKP 质量浓度的提高,其抑菌圈直径增大,抑菌效果有一定程度加强,说明 AKP 质量浓度与抑菌效果呈正相关。



a. 大肠杆菌 CICC 10899;b. 金黄色葡萄球菌 CICC 23656;c. 枯草芽孢杆菌 CICC 10732;
d. 鼠伤寒沙门氏菌 CICC 21483;a1,b1,c1,d1 为 AKP 质量浓度 160 mg/mL;a2,b2,c2,d2 为对照
a. *Escherichia coli* CICC 10899;b. *Staphylococcus aureus* CICC 23656;c. *Bacillus subtilis* CICC 10732;
d. *Salmonella typhimurium* CICC 21483;a1,b1,c1,d1 were uncentrations of alkaloid 160 mg/mL;a2,b2,c2,d2 were CK

图 1 AKP 对供试细菌的抑制作用

Fig. 1 Bacteriostatic effect of AKP to tested strains

表 2 AKP 对供试细菌抑菌圈的影响

Table 2 Effect of AKP on inhibition zone tested strains

供试菌种 Test strain	AKP 质量浓度/(mg·mL ⁻¹) Concentrations of alkaloid					
	0	10	20	40	80	160
大肠杆菌 CICC 10899 <i>Escherichia coli</i> CICC 10899	—	—	7.50±0.26 d	11.13±0.25 c	16.37±0.15 b	20.67±0.32 a
金黄色葡萄球菌 CICC 23656 <i>Staphylococcus aureus</i> CICC 23656	—	—	7.90±0.45 d	13.26±0.30 b	17.50±0.15 b	21.97±0.21 a
枯草芽孢杆菌 CICC 10732 <i>Bacillus subtilis</i> CICC 10732	—	—	5.22±0.15 d	8.67±0.29 c	12.20±0.35 b	16.33±0.15 a
鼠伤寒沙门氏菌 CICC 21483 <i>Salmonella typhimurium</i> CICC 21483	—	—	4.03±0.17 d	7.89±0.44 c	11.89±0.26 b	16.25±0.19 a

注：“—”：抑菌圈直径过小，无法测量；同行数据后不同小写字母表示不同质量浓度之间的显著性差异(P<0.05)。
Note: “—” the zone of inhibition is too small to measure. Different lowercase letters indicate significant differences between different mass concentrations (P<0.05).

2.2 AKP 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌机理

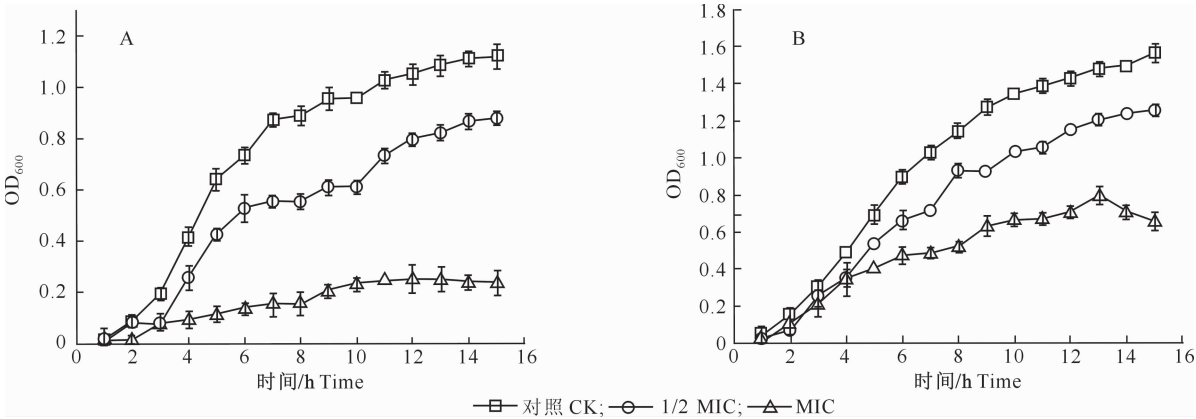
2.2.1 生长曲线 将 AKP 按 MIC 和 1/2 MIC 的添加量加入到菌悬液中,大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的生长曲线如图 2 所示。由图 2-A 和图 2-B 可知,AKP 作用后的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌与对照组相比生长显著减缓,且随着 AKP 质量浓度的升高,其对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制效果更为明显。在两种菌培养初期(0~3 h),加样组与对照组相比,生长速度基本相同;在培养 3~12 h,对照组生长速度加快,而加样组仍处于较低水平,菌体未出现明显的对数生长期,说明 AKP 使大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的生长周期延长,抑制了细菌在

对数期的生长速度;在培养 12~15 h,两种菌的对照组仍持续生长,但加样组细菌已进入衰亡期。由此可见,AKP 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的生长有明显的抑制效果。

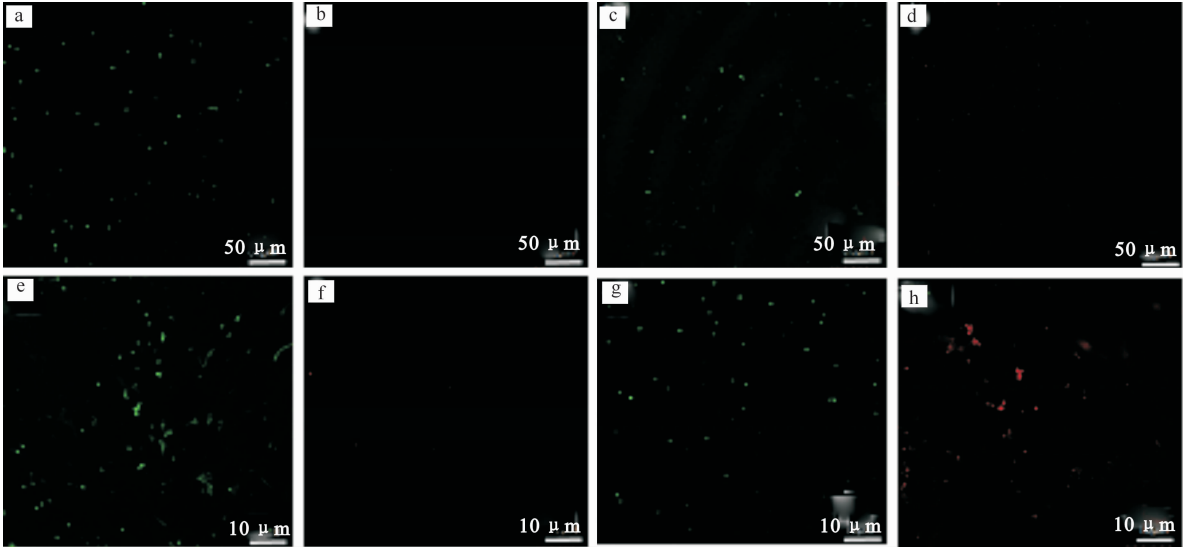
2.2.2 细胞膜完整性 用 AKP 处理大肠杆菌和金黄色葡萄球菌,AKP 用量分别为 20 和 10 mg/mL,经细菌核酸荧光染色观察,结果见图 3。SYTO9 荧光探针可与活菌 DNA 结合呈现亮绿色,PI 荧光探针可通过受损的细胞膜,与死菌 DNA 结合呈现亮红色。由图 3 可见,对照组的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌用激光共聚焦显微镜观察到的绝大多数为绿色信号,几乎无红色信号(图 3-a,b,e,f);经 AKP 处理的两种菌只呈现出少量的绿色信号,

多为红色信号(图 3-c,d,g,h)。值得注意的是,加样组中金黄色葡萄球菌的红色信号明显多于绿色信号(图 3-g 和图 3-h),说明在 AKP 的存在下,金黄色葡

萄球菌的细胞膜受损更严重,死亡率更高。进一步说明 AKP 对金黄色葡萄球菌抑菌效果更好。



A. 大肠杆菌 CICC 10899;B. 金黄色葡萄球菌 CICC 23656
A. *Escherichia coli* CICC 10899;B. *Staphylococcus aureus* CICC 23656
图 2 AKP 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌生长曲线的影响
Fig. 2 Effect of AKP on growth curve of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*



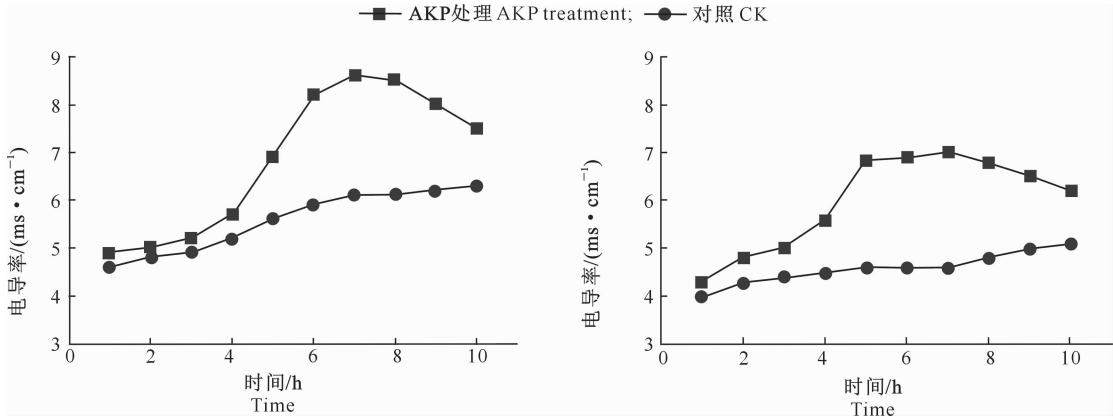
a,b. 未经 AKP 处理的大肠杆菌;c,d. 经 AKP 处理的大肠杆菌;e,f. 未经 AKP 处理的金黄色葡萄球菌;g,h. 经 AKP 处理的金黄色葡萄球菌
a,b. Untreated with AKP of *Escherichia coli*;c,d. Treated with AKP of *Escherichia coli*;
e,f. Untreated with AKP of *Staphylococcus aureus*;g,h. Treated with AKP of *Staphylococcus aureus*
图 3 AKP 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌细胞膜完整性的影响
Fig. 3 Effects of AKP on cytomembrane of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

2.2.3 电导率 菌液电导率可以反映细胞膜通透性的变化。由图 4-A 和图 4-B 可以看出,将 AKP 加入大肠杆菌和金黄色葡萄球菌菌悬液中进行培养,在培养开始后的 0~3 h,大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的电导率与对照差异并不明显,3~7 h 大肠杆菌和金黄色葡萄球菌 AKP 处理的电导率均高于对照组,电导率的升高说明 AKP 可能影响了大肠杆菌和金黄色葡萄球菌细胞膜的通透性,培养 7 h 后两

种菌 AKP 处理组的电导率均发生下降,但金黄色葡萄球菌菌悬液的电导率下降较为缓慢。
2.2.4 细胞形态 通过扫描电镜观察 AKP 处理前后大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的细胞表面形态变化,结果见图 5。由图 5 可知,正常的大肠杆菌细胞呈长杆状(图 5-a1),金黄葡萄球菌呈葡萄状(图 5-b1),菌体完整饱满,形态有规则,细胞完整无破损,无内容物溢出;经过 AKP 作用后,大肠杆菌和金黄

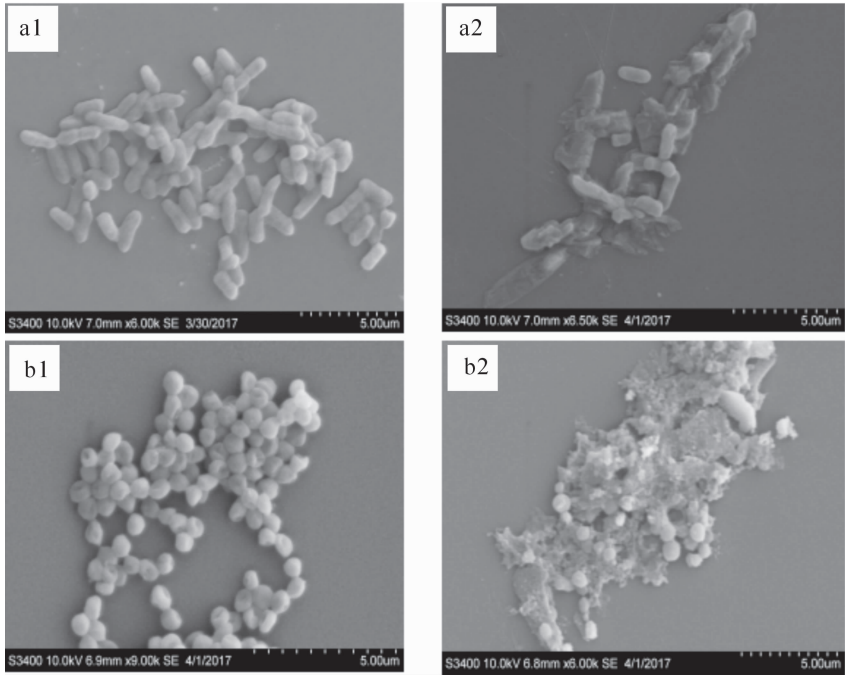
色葡萄球菌形态发生了明显的改变,大肠杆菌失去了饱满的长杆状(图 5-a2),金黄色葡萄球菌的细胞表面严重破坏(图 5-b2),菌体之间互相粘连,细胞

大量塌陷,有大量原生质内容物溢出,原生质的黏稠性致使细胞相互粘连、聚团。



A. 大肠杆菌 CICC 10899;B. 金黄色葡萄球菌 CICC 23656
A. *Escherichia coli* CICC 10899;B. *Staphylococcus aureus* CICC 23656
图 4 AKP 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌菌液电导率的影响

Fig. 4 Effect of AKP on electrical conductivity of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

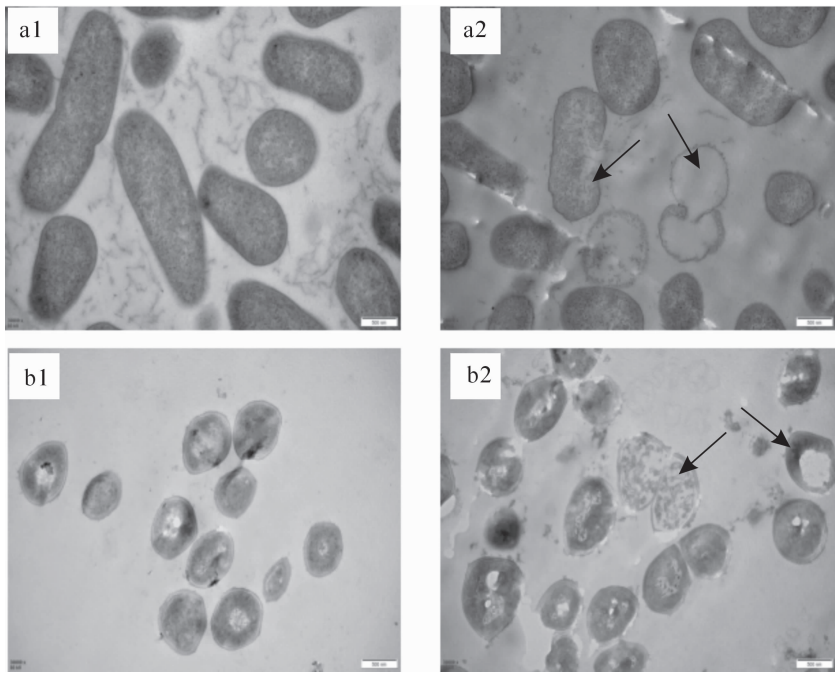


a1. 大肠杆菌对照;a2. 大肠杆菌 AKP 处理;b1. 金黄色葡萄球菌对照;b2. 金黄色葡萄球菌 AKP 处理
a1. *Escherichia coli* control;a2. *Escherichia coli* treated with AKP;b1. *Staphylococcus aureus* control;
b2. *Staphylococcus aureus* treated with AKP

图 5 AKP 处理前后大肠杆菌和金黄色葡萄球菌形态结构的扫描电镜观察

Fig. 5 Cell morphologies of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* before and after AKP treatment observed by SEM

2.2.5 细胞结构 通过透射电镜观察 AKP 处理前后大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的细胞表面形态变化,结果见图 6。由图 6 可见,正常大肠杆菌细胞的横切面呈长杆状或圆形(图 6-a1);正常的金黄色葡萄球菌切面呈均匀的圆形(图 6-b1),细胞壁、细胞膜光滑并且完整。AKP 作用后,大肠杆菌(图 6-a2)和金黄色葡萄球菌(图 6-b2)菌体结构均遭到明显破坏,细胞膜出现破损,细胞膜的结构变得模糊,细胞外侧存在泄露的细胞内容物,部分菌体出现空腔,使得细胞不能进行正常能量代谢,从而达到抑制作用。



a1. 大肠杆菌对照;a2. 大肠杆菌 AKP 处理;b1. 金黄色葡萄球菌对照;b2. 金黄色葡萄球菌 AKP 处理;→. 细胞膜破损及内容物外泄的细胞
a1. *Escherichia coli* control;a2. *Escherichia coli* treated with AKP;b1. *Staphylococcus aureus* control;
b2. *Staphylococcus aureus* treated with AKP;→. Cells with damaged cell membranes and leaked contents

图 6 AKP 处理前后大肠杆菌和金黄色葡萄球菌细胞结构的透射电镜观察
Fig. 6 Cell structures of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* before and after AKP treatment observed by TEM

3 讨 论

本试验分别探究了 AKP 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和鼠伤寒沙门氏菌的抑制作用。抑菌活性试验表明,AKP 对 4 种供试菌均有良好的抑菌效果,说明 AKP 具有广谱、高效的抑菌活性,且对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有明显的抑制效果,且抑菌效果与 AKP 质量浓度呈正相关。因此,将 AKP 开发为天然绿色的抑菌剂具有可靠的理论基础。

AKP 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的生长曲线、菌体细胞膜的完整性、菌体培养液的电导率、菌体细胞的形态结构可产生明显的影响。通过测定菌体的生长曲线和菌体培养液的电导率,可以初步探究 AKP 对大肠杆菌及金黄色葡萄球菌的抑菌机制。有研究显示,细胞膜通透性的改变可能会导致细胞内蛋白质、核酸以及 K^{+} 、 Na^{+} 等电解质的不断渗出^[14,20-22]。本试验中,AKP 改变了大肠杆菌和金黄色葡萄球菌细胞膜的通透性,导致胞内电解质不断渗出,3~7 h 培养液电导率不断升高,7 h 后培养液电导率下降,可能是带电粒子发生了静电结合^[23]。通过激光共聚焦显微镜观察细菌核酸荧光

染色,结果表明 AKP 作用后的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌红色荧光信号明显高于对照组,进一步证实了 AKP 的抑菌活性。扫描电镜观察表明,大肠杆菌和金黄色葡萄球菌细胞大量塌陷,不再具有饱满的细胞形态,内容物大量外泄。透射电镜观察发现,大肠杆菌和金黄色葡萄球菌菌体细胞膜出现溶解,内容物外泄,菌体中央出现空腔,充分证实了魔芋飞粉生物碱可以破坏细菌细胞膜结构的完整性,使细胞内物质渗漏出胞外,从而达到抑菌的效果。

4 结 论

魔芋飞粉生物碱对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均具有明显的抑制作用,最小抑菌质量浓度(MIC)分别为 20 和 10 mg/mL。抑菌机理分析表明,AKP 使细菌细胞膜受损,影响了细胞膜的通透性,导致大肠杆菌和金黄色葡萄球菌体内电解质不断渗出,引起菌体固缩、塌陷并死亡。本研究显示 AKP 具有广谱、高效的抑菌特性,作为天然抗菌剂和食品防腐剂具有良好的开发潜能和市场前景。

[参考文献]

[1] 游智能,朱于鹏,汪超.魔芋飞粉的研究进展[J].中国酿造,

- 2014, 33(4): 23-26.
- You Z N, Zhu Y P, Wang C. The research progress of konjac flying powder [J]. China Brewing, 2014, 33(4): 23-26.
- [2] Li Y L, Deng R H, Chen N, et al. Review of konjac glucomannan: isolation, structure, chain conformation and bioactivities [J]. Journal of Single Molecule Research, 2013, 1(1): 7-14.
- [3] Mikkelsen A, Maaheimo H, Hakala T K. Hydrolysis of konjac glucomannan by *Trichoderma reesei* mannanase and endoglucanases Cel7B and Cel5A for the production of glucomannooligosaccharides [J]. Carbohydrate Research, 2013, 372(1): 60-68.
- [4] Mao G N, Zhang K Y, Lü J. Konjac flying powder [J]. Application Status and Prospect of Food Industry, 2015(1): 244-247.
- [5] 贺楠, 徐怀德. 魔芋飞粉蛋白质提取及乳化性研究 [J]. 食品科学, 2013, 34(16): 120-124.
- He N, Xu H D. Konjac flying study on powder protein extraction and emulsification [J]. Journal of Food Science, 2013, 34(16): 120-124.
- [6] Xiong G, Wei C, Ye L, et al. Effects of konjac glucomannan on physicochemical properties of myofibrillar protein and surimi gels from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. Food Chemistry, 2009, 116(2): 413-418.
- [7] 王照利, 吴万兴, 张忠良. 魔芋中总生物碱提取试验 [J]. 食品工业科技, 2004(9): 101.
- Wang Z L, Wu W X, Zhang Z L. Konjac in total alkaloid extraction test [J]. Journal of Food Industry Science and Technology, 2004(9): 101.
- [8] Das K, Tiwari R K S, Shrivastava D K. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agents: current methods and future trends [J]. Journal of Medicinal Plant Research, 2010, 4(2): 104-111.
- [9] Mabhiza D, Chitemerere T, Mukanganyama S. Antibacterial properties of alkaloid extracts from callistemon citrinus and vernonia adoensis against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Int J Med Chem, 2016(1): 1-7.
- [10] 王关林, 唐金花, 蒋丹. 苦参对鸡大肠杆菌的抑菌作用及其机理研究 [J]. 中国农业科学, 2006, 39(5): 1018-1024.
- Wang G L, Tang J H, Jiang D. Bacteriostatic action and mechanism of *Sophora flavescens* Ait on *Escherichia coli* 01 C84010 [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2006, 39(5): 1018-1024.
- [11] 邱雪梅. 魔芋飞粉发酵特性及飞粉威士忌的研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2013.
- Qiu X M. Konjac flying powder fermentation characteristics and fly whisky research [D]. Chongqing: South West University, 2013.
- [12] 徐怀德, 王莉, 王兴. 酶解魔芋飞粉蛋白制备 ACE 抑制肽 [J]. 食品科学, 2010, 31(1): 157-160.
- Xu H D, Wang L, Wang X. Konjac flying powder protein enzyme solution preparation of ACE inhibitory peptides [J]. Journal of Food Science, 2010, 31(1): 157-160.
- [13] 姜莉, 徐怀德, 王莉. 碱性蛋白酶酶解魔芋飞粉制备抗氧化多肽 [J]. 中国食品学报, 2015, 15(5): 90-95.
- Jiang L, Xu H D, Wang L. Konjac flying powder protein enzyme solution preparation of ACE inhibitory peptides [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2015, 15(5): 90-95.
- [14] 梁引库, 张志健. 魔芋生物碱提取纯化工艺研究 [J]. 食品工业, 2013(2): 95-97.
- Liang Y K, Zhang Z J. Konjac alkaloid extraction and purification technology research [J]. Journal of Food Industry, 2013(2): 95-97.
- [15] Chao S, Yi S, Zhi W Z, et al. Antimicrobial activity of syringic acid against *Cronobacter sakazakii* and its effect on cell membrane [J]. Food Chemistry, 2016, 197: 100-106.
- [16] Wu C, Zhang G, Xia T, et al. Bioinspired synthesis of polydopamine/Ag nanocomposite particles with antibacterial activities [J]. Materials Science & Engineering, 2015, 55: 155-165.
- [17] Li Y Q, Han Q, Feng J L, et al. Antibacterial characteristics and mechanisms of ϵ -poly-lysine against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [J]. Food Control, 2014, 43: 22-27.
- [18] 谢家仪, 董光军, 刘振英. 扫描电镜的微生物样品制备方法 [J]. 电子显微学报, 2005, 24(4): 440.
- Xie J Y, Dong G J, Liu Z Y. The microorganism of the scanning electron microscopy (SEM) sample preparation method [J]. Journal of Chinese Electron Microscopy Society, 2005, 24(4): 440.
- [19] 王红, 范京川, 徐晨. 不同细菌浓度及离心条件对大肠杆菌透射电镜观察的影响 [J]. 重庆医科大学学报, 2010, 35(3): 393-395.
- Wang H, Fan J C, Xu C. The influence of different concentration and centrifugal parameters on TEM sample preparation of *Escherichia coli* [J]. Journal of Chongqing University of Medical Sciences, 2010, 35(3): 393-395.
- [20] He M, Wu T, Pan S, et al. Antimicrobial mechanism of flavonoids against *Escherichia coli* ATCC 25922 by model membrane study [J]. Applied Surface Science, 2014, 305: 515-521.
- [21] Rokitskaya T I, Kolodkin N I, Antonenko Y N. Indolicidin on the membrane permeability: carrier mechanism versus pore-formation [J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 2011, 1808(1): 91-97.
- [22] 张赞彬, 刘笑宇, 姜萍萍. 肉桂醛对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌作用及抑菌机理研究 [J]. 现代食品科技, 2015(5): 31-35.
- Zhang Y B, Liu X Y, Jiang P P. Mechanism and antibacterial activity of ainnamaldehyde against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Modern Food Science and Technology, 2015(5): 31-35.
- [23] 李璐, 胡欢欢, 张华峰. 淫羊藿生物碱对大肠杆菌的抑菌作用 [J]. 陕西师范大学学报(自然科学版), 2016, 44(6): 74-79.
- Li L, Hu H H, Zhang H F. Antibacterial activity of alkaloids from *Epimedium* against *Escherichia coli* [J]. Journal of Shaanxi Normal University (Natural Science Edition), 2016, 44(6): 74-79.