

代博仁, 申光辉, 刘海娜, 等. 大蒜有机硫化物对解淀粉芽孢杆菌的抑菌作用及机理 [J]. 华南农业大学学报, 2020, 41(4): 95-103.
DAI Boren, SHEN Guanghui, LIU Haina, et al. Antibacterial activity and mechanism of garlic organic sulfide against *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. Journal of South China Agricultural University, 2020, 41(4): 95-103.

大蒜有机硫化物对解淀粉芽孢杆菌的 抑菌作用及机理

代博仁, 申光辉, 刘海娜, 张丽丹, 何春桥, 葛润邱
(四川农业大学 食品学院, 四川 雅安 625014)

摘要:【目的】明确大蒜有机硫化物 (GOS) 对豆制品优势腐败解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* 的抑菌活性及作用机理。【方法】通过抑菌圈法和二倍稀释法测定 GOS 对菌株的抑菌活性、最低抑菌浓度 (MIC) 和最低杀菌浓度 (MBC), 并分析其对细菌生长曲线及胞外蛋白酶活性的影响; 分析 GOS 处理后解淀粉芽孢杆菌代谢活性、碱性磷酸酶活性、 β -半乳糖苷酶活性及胞外溶液电导率的变化, 并结合扫描电镜观察菌体形态变化, 探讨 GOS 对解淀粉芽孢杆菌的抑菌机理。【结果】3 g/mL 的 GOS 对解淀粉芽孢杆菌 DY1a 和 DY1b 的抑菌圈直径分别为 31.7 和 25.7 mm, MIC 均为 30 mg/mL, MBC 分别为 240 和 480 mg/mL。30 mg/mL GOS 对菌株 DY1a 和 DY1b 胞外蛋白酶活性的抑制率分别为 47.3% 和 15.6%, 使细菌细胞代谢活性 ($D_{490\text{ nm}}$) 分别下降了 2.771 和 4.091, 胞外碱性磷酸酶活性分别提高了 0.029 和 0.036 U/mL, 胞外 β -半乳糖苷酶活性 ($D_{420\text{ nm}}$) 分别提高了 0.047 与 0.016, 胞外溶液电导率分别提高了 0.060 和 0.031 mS/cm。扫描电镜结果显示, GOS 处理后的菌株细胞表面出现皱缩、孔洞式塌陷和破裂。【结论】大蒜有机硫化物对解淀粉芽孢杆菌抑制作用明显, 其抑菌机理与影响细菌细胞壁、细胞膜的通透性和完整性, 干扰细菌生理代谢活动有关。

关键词: 解淀粉芽孢杆菌; 大蒜有机硫化物; 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:** 1001-411X(2020)04-0095-09

Antibacterial activity and mechanism of garlic organic sulfide against *Bacillus amyloliquefaciens*

DAI Boren, SHEN Guanghui, LIU Haina, ZHANG Lidan, HE Chunqiao, GE Runqiu
(College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: 【Objective】To explore antibacterial activity and mechanism of garlic organic sulfide (GOS) against *Bacillus amyloliquefaciens*. 【Method】The antimicrobial activity, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of GOS against *B. amyloliquefaciens* strain were determined using the inhibition zone method and the double dilution method, and its inhibitory effects on bacterial growth curve and extracellular protease activity were evaluated. Metabolic activity, alkaline phosphatase activity, β -galactosidase activity, extracellular conductivity and thallus morphological changes observed through scanning electron microscope of *B. amyloliquefaciens* treated with GOS were investigated for elucidating antibacterial mechanism of GOS against *B. amyloliquefaciens*. 【Result】Diameter of inhibitory zone of GOS against *B. amyloliquefaciens* DY1a and DY1b were 31.7 and 25.7 mm respectively, MIC of both strains were 30 mg/mL,

MBC were 240 and 480 mg/mL, respectively. The inhibition rate of 30 mg/mL GOS on DY1a and DY1b extracellular protease activity were 47.3% and 15.6% respectively. After treatment with 30 mg/mL GOS, metabolic activity ($D_{490\text{ nm}}$) decreased by 2.771 and 4.091 respectively, extracellular alkaline phosphatase activity increased by 0.029 and 0.036 U/mL, extracellular β -galactosidase activity ($D_{420\text{ nm}}$) increased by 0.047 and 0.016 respectively and the extracellular electrical conductivity increased by 0.060 and 0.031 mS/cm respectively. The results of SEM showed that the surface of bacteria cells treated with GOS had shrinkage, cavity collapse and rupture. 【Conclusion】The excellent antibacterial effect of GOS against *B. amyloliquefaciens* may be attributed to irreversible damage to cell wall and cell membrane and alterations of cell physiological metabolism.

Key words: *Bacillus amyloliquefaciens*; garlic organic sulfide; antibacterial activity; antibacterial mechanism

豆杆, 又称豆筋、豆棒, 是川渝地区的一种非发酵腐竹类豆制品^[1]。预浸泡豆杆食用方便, 营养丰富, 口感独特, 深受市场欢迎。但预浸泡豆杆水分活度高, 易腐败变质。郑丽君等^[2]研究表明, 解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* 是真空包装预浸泡豆杆的优势腐败菌, 具有很强的耐高温能力和较强的胞外蛋白酶产生能力, 在腐败过程中, 通过降解蛋白质产生大量挥发性盐基氮和生物胺等有害物质, 严重影响产品质量安全^[3]。夏硕等^[4]采用传统热杀菌方法对预浸泡豆杆进行处理, 结果表明 110 ℃ 条件下能够有效杀灭芽孢细菌, 但对产品硬度、弹性等质构品质造成了较为严重的破坏。唐桂宇等^[5]复配了 Nisin、 ϵ -聚赖氨酸和山梨酸钾, 结合 100 ℃、20 min 热杀菌处理, 豆杆货架期仅延长了 4 d, 与实际应用尚存在一定差距。因此, 寻求既安全有效, 又能保持良好质构特性的预浸泡豆杆腐败芽孢杆菌的控制措施, 对于保证产品品质与安全具有重要意义。

植物源天然防腐剂具有种类丰富、广谱抑菌等特点, 是筛选安全有效的防腐剂的重要来源之一, 受到国内外研究者的广泛关注^[6-7]。大蒜 *Allium sativum* 是百合科 Liliaceae 葱属 *Allium* 植物的地下鳞茎, 富含有机硫化物、黄酮类化合物、皂苷类化合物和多糖等活性成分^[8], 具有良好的抑菌、杀菌活性^[9]。目前已证明, 大蒜中的蒜氨酸在受到蒜氨酸酶作用后会生成二烯丙基二硫醚、阿霍烯等具有抑菌作用的硫化物^[8-10]。其中二烯丙基二硫醚与阿霍烯能够干扰细菌正常生理代谢^[11-12], 具有广谱抑菌的特点, 能够有效抑制德式乳杆菌 *Lactobacillus delbruckii*^[13]、阪崎克罗诺杆菌 *Cronobacterium sakazakii*^[12] 和蜡样芽孢杆菌 *Bacillus cereus*^[14] 等细菌。而目前关于大蒜活性成分对解淀粉芽孢杆菌的抑菌作用及其机理研究鲜见报道。彭光华等^[15]采

用乙醇萃取大蒜有机硫化物 (Garlic organic sulfide, GOS), 通过气相色谱-质谱法分析发现大蒜有机硫化物中含量最高的组分为大蒜素热分解衍生得到的噻烯类化合物 (相对含量为 55.8%) 及丙烯基硫醚类化合物 (相对含量为 6.04%)。在前期对多种香辛料抑菌活性筛选试验中发现, 用 ϕ 为 75% 乙醇溶液提取获得的大蒜有机硫化物对 2 株致腐解淀粉芽孢杆菌具有较强的抑菌活性。

因此, 本文主要通过测定大蒜有机硫化物对 2 株优势腐败菌的抑制作用、杀灭性能及对胞外蛋白酶抑制活性, 并通过考察大蒜有机硫化物处理对细菌的代谢活性、细胞壁和细胞膜通透性的影响, 扫描电镜观察处理后的细胞形态变化, 明确其对解淀粉芽孢杆菌的抑菌作用机理, 为利用大蒜有机硫化物控制预浸泡豆杆腐败芽孢杆菌提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 解淀粉芽孢杆菌菌株 DY1a、DY1b, 分离自腐败豆杆样品, 保存于四川农业大学食品学院。

1.1.2 材料与试剂 新鲜瓣蒜 (产地: 四川成都) 购于四川雅安吉选超市。

邻硝基苯- β -D-半乳糖苷 (ONPG) 购于碧云天生物技术有限公司; 2, 3, 5-三苯基氯化四氮唑 (TTC) 购于北京索莱宝科技有限公司; 碱性磷酸酶试剂盒购于南京建成生物工程研究所; 其余试剂 (分析纯) 购于成都市科龙化工试剂厂。

1.1.3 培养基和试剂的配制 LB 液体培养基: 胰蛋白胨 10.0 g/L, 酵母浸出粉 5.0 g/L, NaCl 10.0 g/L, pH 自然。

营养琼脂培养基: 蛋白胨 10.0 g/L, 牛肉膏 3.0 g/L, NaCl 5.0 g/L, 琼脂 20.0 g/L, pH 自然。

PCA 培养基: 胰蛋白胨 5.0 g/L, 酵母浸粉 2.5 g/L, 葡萄糖 1.0 g/L, 琼脂 15.0 g/L, pH 自然。

牛奶琼脂培养基: A 液, 脱脂奶粉 50.0 g/L, 溶解于 1/2 最终体积的培养基中; B 液, 琼脂 20.0 g/L, 溶解于 1/2 最终体积的培养基中。灭菌后将 A 液与 B 液混合。

M9 乳糖诱导培养基: Na_2HPO_4 12.8 g/L, KH_2PO_4 3.0 g/L, NaCl 0.5 g/L, NH_4Cl 1.0 g/L, MgSO_4 0.5 g/L, CaCl_2 0.01 g/L, 乳糖 5.0 g/L, pH 自然。

灭菌条件: 121 °C 15 min(牛奶琼脂培养基 A 液的灭菌条件为 115 °C 20 min)。

β -半乳糖苷酶反应缓冲液: NaCl 8.0 g/L, KCl 0.2 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9 g/L, KH_2PO_4 0.24 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g/L, β -巯基乙醇 3.9 g/L。

1.2 主要仪器

CPA225D 型电子天平, 德国赛多利斯公司; YXQ-LS-50S II 立式压力蒸汽灭菌器, 上海博讯实业有限公司; SW-CJ-2FD 洁净工作台, 苏净集团苏州安泰空气技术有限公司; ZWY-211B 恒温培养振荡器, 上海智城分析仪器制造有限公司; KH-300DE 型数控超声波清洗器, 昆山禾创超声仪器有限公司; RE-2000B 型旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; UV-3100PC 紫外分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; Thermo BR4i 型冷冻离心机, 美国赛默飞世尔科技; Varioskan Flash 型荧光酶标仪, 美国赛默飞世尔科技; ZEISS Sigma 500 场发射扫描电镜, 德国卡尔蔡司公司。

1.3 试验方法

1.3.1 大蒜有机硫化物的制备 参照彭光华等^[15]的方法提取大蒜有机硫化物, 稍作修改。取 45 g 新鲜瓣蒜, 剥皮去蒂, 加入 ϕ 为 75% 的乙醇溶液 180 mL, 打浆机破壁, 300 W 超声辅助提取 90 min, 提取液 4 °C 条件下 4 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 50 °C 条件下减压浓缩脱除乙醇, 蒸馏水定容至 15 mL, 获得 3 g/mL 的大蒜有机硫化物, 冷冻保存备用。

1.3.2 大蒜有机硫化物抑菌活性测定 将解淀粉芽孢杆菌涂布于营养琼脂培养基中, 均匀放置 3 个牛津杯(直径 7 mm)。用 0.22 μm 水系滤膜过滤大蒜有机硫化物, 再用无菌蒸馏水进行 10 倍梯度稀释。分别取 150 μL 大蒜有机硫化物原液及 10 倍、100 倍稀释液于牛津杯中, 将平板正置, 37 °C 条件下培养 24 h, 测定抑菌圈直径。

1.3.3 大蒜有机硫化物对解淀粉芽孢杆菌的最低抑菌浓度 (Minimum inhibitory concentration, MIC) 与最低杀菌浓度 (Minimum bactericidal concentration, MBC) 采用试管二倍稀释法制备添

加不同浓度大蒜有机硫化物的 LB 培养基 1.5 mL, 接种菌液至终浓度 10^5 CFU/mL, 吸取 200 μL 菌液于 96 孔板中, 测定 $D_{600\text{ nm}}$, 记为初始值; 37 °C 条件下 160 r/min 振荡培养 24 h, 吸取各管菌液 200 μL 于 96 孔板中, 测定样品 $D_{600\text{ nm}}$, 记为终止值。不同浓度样品重复 3 次, 比较各样品终止值与初始值的差值 $\Delta D_{600\text{ nm}}$, $\Delta D_{600\text{ nm}} < 0.01$ 的最低浓度即为 MIC。从 MIC 及以上浓度的试管中取 10 μL 培养液涂布于 PCA 平板中, 37 °C 条件下培养 24 h, 无细菌生长的最低浓度即为 MBC。

1.3.4 细菌生长曲线测定 向 LB 液体培养基中接种培养 24 h 的细菌菌悬液, 调节菌液浓度至 10^5 CFU/mL 并分装, 加入大蒜有机硫化物, 使其质量浓度为 15 和 30 mg/mL, 37 °C 条件下 160 r/min 振荡培养, 定时取样, 测定 $D_{600\text{ nm}}$, 并绘制生长曲线。以未添加大蒜有机硫化物的 LB 液体培养基为空白对照。

1.3.5 细菌胞外蛋白酶活性测定 向 LB 培养基中分别加入 15、30 和 45 mg/mL 大蒜有机硫化物, 接种菌悬液, 调节浓度至 10^6 CFU/mL, 37 °C 条件下 160 r/min 振荡培养 24 h, 以未添加大蒜有机硫化物为对照。各培养液 10 000 r/min 离心 10 min, 上清液使用 0.22 μm 滤膜过滤, 获得无菌胞外溶液。在牛奶琼脂平板上放置 4 个牛津杯, 分别向牛津杯内加入 150 μL 的无菌胞外溶液, 置于 37 °C 恒温培养箱, 24 h 后观察并测定水解圈直径, 并计算大蒜有机硫化物对胞外蛋白酶活性的抑制率:

蛋白酶活性抑制率=(对照的水解圈面积-处理的水解圈面积)/对照的水解圈面积 $\times$ 100%。

1.3.6 细胞代谢活性测定 将培养 24 h 的腐败菌菌悬液在 4 °C 条件下 4 000 r/min 离心 10 min, 用无菌生理盐水洗涤菌体沉淀 3 次, 加入生理盐水重悬菌体, 调节细胞浓度至 10^6 CFU/mL 并分装, 再按浓度分别加入 0、30 和 120 mg/mL 大蒜有机硫化物。取上述添加不同浓度大蒜有机硫化物的腐败菌菌悬液 1 mL, 加入 0.05 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH=8.6) 2 mL、2 mol/L 的葡萄糖溶液 2 mL、1 mg/mL 的 TTC 溶液 2 mL, 37 °C 条件下恒温静置孵育 5 h 后, 加入 2 滴浓硫酸终止反应, 再加入 5 mL 甲苯震荡萃取, 以甲苯为空白对照参比测定有机相的 $D_{490\text{ nm}}$ 。

1.3.7 胞外碱性磷酸酶活性测定 定时取 “1.3.6” 中添加不同浓度大蒜有机硫化物的腐败菌菌悬液, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 使用碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, AKP) 试剂盒测定碱性磷

酸酶活性, AKP 定义: 以 1 mL 培养液在 37 ℃ 条件下与基质作用 15 min 产生 1 mg 酚为 1 个酶活性单位 (U), 测定并计算胞外溶液的碱性磷酸酶活性 (U/mL) 随时间的变化情况。

1.3.8 胞外 β -半乳糖苷酶活性测定 向“1.3.6”中的菌体沉淀中加入 M9 乳糖诱导培养基重悬菌体, 调节菌浓度至 10^6 CFU/mL, 分装, 分别加入 0、15 和 30 mg/mL 大蒜有机硫化物, 置于 37 ℃ 条件下 160 r/min 振荡孵育 5 h。定时取样, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 50 μ L 于 96 孔板中, 加入 β -半乳糖苷酶反应缓冲液 100 μ L, 邻硝基苯 β -D-半乳糖吡喃糖苷 (ONPG, 10 mg/mL) 50 μ L, 摇匀后置于 37 ℃ 条件下孵育 2 h, 加入 1 mol/L 的 Na_2CO_3 溶液 50 μ L 终止反应, 用酶标仪测定 $D_{420\text{ nm}}$ 随时间的变化情况。

1.3.9 胞外溶液电导率测定 参照陶文卿^[16]的方法测定胞外溶液电导率。用 0.278 mol/L 的葡萄糖溶液洗涤菌体沉淀, 直至菌悬液电导率与等渗溶液电导率相等。调节菌体浓度至 10^6 CFU/mL。随后, 加入 30 mg/mL 大蒜有机硫化物, 置于 37 ℃ 条件下 160 r/min 振荡孵育 24 h。定时取样, 测定菌悬液的电导率随时间的变化情况。以不加提取物的菌悬液为对照。

1.3.10 细胞形态结构扫描电镜观察 向 10^8 CFU/mL 的菌悬液中加入大蒜有机硫化物, 使其质量浓度分别为 30 和 480 mg/mL, 以不加提取物的菌悬液为对照。37 ℃ 条件下振荡孵育 12 h 后, 4 ℃ 条件下 4 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液得到菌体沉淀。参照 Guo 等^[17]的方法进行扫描电镜样品制备, 向菌体沉淀加入 φ 为 25% 的戊二醛溶液 10 mL, 4 ℃ 条件下固定 12 h, 先后使用 φ 为 30%、50%、70% 和

90% 的乙醇溶液脱水 15 min, 最后使用无水乙醇脱水 2 次, 每次 15 min, 挑取适量脱水菌体于无菌盖玻片上, 冷冻干燥后喷金, 场发射扫描电子显微镜观察、拍照。

1.3.11 数据统计分析 采用 SPSS 22.0 软件对试验结果进行差异显著性分析, Duncan's 法进行多重比较; 采用 OriginPro 9.0 软件作图。

2 结果与分析

2.1 大蒜有机硫化物的抑菌效果

由图 1 可知, 3 g/mL 的大蒜有机硫化物产生的抑菌圈直径最大, 对菌株 DY1a 的抑菌圈直径为 (31.7 $\pm$ 3.2) mm, 对菌株 DY1b 的抑菌圈直径为 (25.7 $\pm$ 1.5) mm; 300 mg/mL 的大蒜有机硫化物产生的抑菌圈直径次之, 对 DY1a 的抑菌圈直径为 (21.0 $\pm$ 4.6) mm, 对 DY1b 抑菌圈直径为 (15.0 $\pm$ 1.5) mm; 30 mg/mL 的大蒜有机硫化物没有产生抑菌圈。由图 2 可知, 大蒜有机硫化物对 2 株腐败细菌的最小抑菌浓度 (MIC) 均为 30 mg/mL (即稀释倍数为 1/32)。低于 MIC 的大蒜有机硫化物对 2 株腐败菌具有一定的生长促进作用。由表 1 可知, 大蒜有机硫化物对于 2 株细菌的最小杀菌浓度 (MBC) 不同, 对菌株 DY1a 的 MBC 为 240 mg/mL, 对菌株 DY1b 的 MBC 为 480 mg/mL。

2.2 解淀粉芽孢杆菌的生长曲线

由图 3A 可知, 空白组的菌株 DY1a 在 0~4 h 内处于延滞期, 在 4 h 后进入对数生长期, 在 12 h 后进入稳定期。15 mg/mL 大蒜有机硫化物处理组的菌株 DY1a 在 0~28 h 内 $D_{600\text{ nm}}$ 没有变化, 然而在 28 h 后, $D_{600\text{ nm}}$ 急速升高。30 mg/mL 大蒜有机硫化物处理组的菌株 DY1a 在 48 h 内 $D_{600\text{ nm}}$ 均无变化。由图 3B

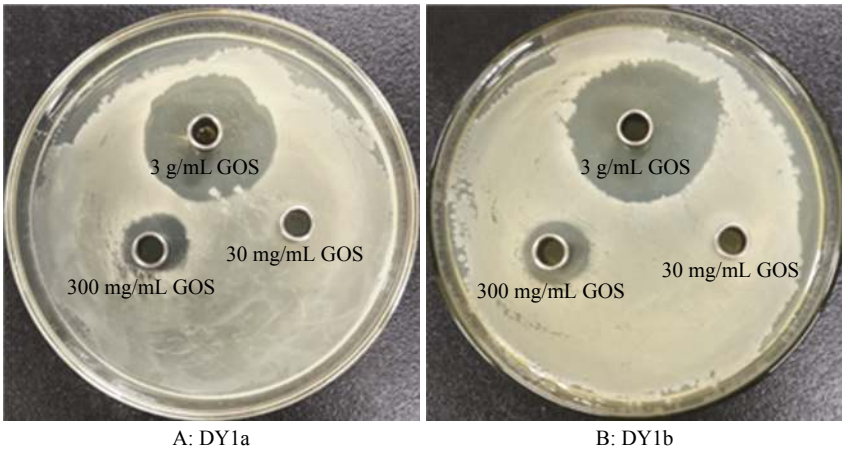


图 1 不同浓度大蒜有机硫化物 (GOS) 对 2 株解淀粉芽孢杆菌的抑菌作用
Fig. 1 Antibacterial effects of different concentrations of garlic organic sulfide (GOS) on two strains of *Bacillus amyloliquefaciens*

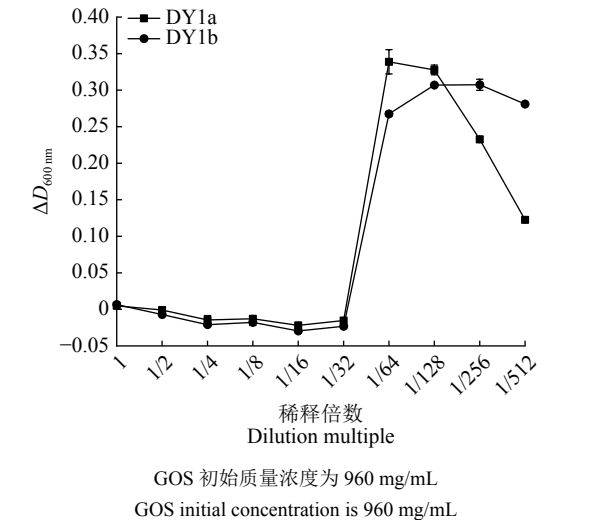


图 2 不同浓度大蒜有机硫化物 (GOS) 对 2 株解淀粉芽孢杆菌生长的影响

Fig. 2 Effects of different concentrations of garlic organic sulfide (GOS) on the growth of two strains of *Bacillus amyloliquefaciens*

可知, 空白组的菌株 DY1b 在 0~8 h 内处于延滞期, 在 8 h 后进入对数生长期, 在 33 h 后进入稳定期。

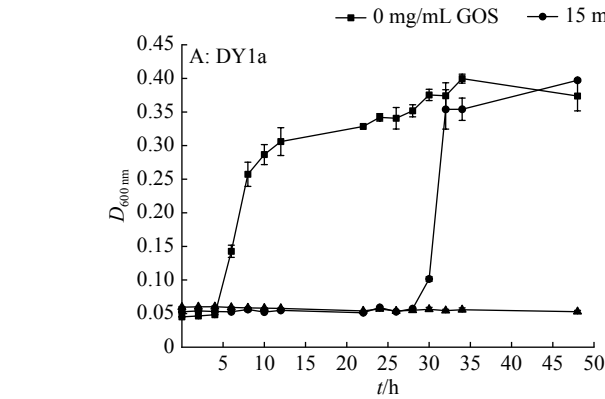


图 3 不同浓度大蒜有机硫化物 (GOS) 对 2 株解淀粉芽孢杆菌生长曲线的影响

Fig. 3 Effects of different concentrations of garlic organic sulfide (GOS) on the growth curves of two strains of *Bacillus amyloliquefaciens*

表 2 不同浓度大蒜有机硫化物 (GOS) 对 2 株解淀粉芽孢杆菌胞外蛋白酶活性的影响¹⁾

Table 2 Effects of different concentrations of garlic organic sulfide (GOS) on extracellular protease activities of two strains of *Bacillus amyloliquefaciens*

$\rho(\text{GOS})/$ ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	DY1a		DY1b	
	水解圈直径/mm	蛋白酶活性抑制率/%	水解圈直径/mm	蛋白酶活性抑制率/%
	Diameter of hydrolysis zone	Inhibitory rate of protease activity	Diameter of hydrolysis zone	Inhibitory rate of protease activity
0	17.41±0.85a	0	16.37±0.04a	0
15	16.17±1.36a	13.7	16.68±0.43a	0
30	12.64±0.71b	47.3	15.04±0.42a	15.6
45	7.00±0.00c	83.8	10.98±0.46b	55.0

1) 同列数据后的不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$, Duncan's 法)

1) Different lowercase letters in the same column indicate significant difference ($P<0.05$, Duncan's test)

表 1 不同浓度大蒜有机硫化物 (GOS) 对 2 株解淀粉芽孢杆菌的杀菌作用

Table 1 Bactericidal effect of different concentrations of garlic organic sulfide (GOS) against two strains of *Bacillus amyloliquefaciens*

$\rho(\text{GOS})/$ ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	菌落数/(CFU·mL ⁻¹) Colony count	
	DY1a	DY1b
480	0	0
240	0	50
120	20	290
60	300	>300

15 mg/mL 大蒜有机硫化物处理组的菌株 DY1b 在 0~22 h 内 $D_{600\text{ nm}}$ 没有变化, 之后 $D_{600\text{ nm}}$ 迅速升高。30 mg/mL 大蒜有机硫化物处理组的菌株 DY1b 在 48 h 内 $D_{600\text{ nm}}$ 无变化。

2.3 解淀粉芽孢杆菌胞外蛋白酶活性

腐败菌胞外蛋白酶是高蛋白食品重要的致腐因子。由表 2 可知, 不同浓度大蒜有机硫化物对解

淀粉芽孢杆菌 DY1a 与 DY1b 胞外蛋白酶活性具有不同程度的抑制作用,随着大蒜有机硫化物添加浓度的提高,蛋白水解圈直径逐渐减小。当大蒜有机硫化物添加质量浓度为 15 mg/mL 时,对 2 株腐败菌胞外蛋白酶的活性无显著影响 ($P>0.05$);添加 30 和 45 mg/mL 大蒜有机硫化物对解淀粉芽孢杆菌 DY1a 的蛋白酶活性具有显著抑制效果,抑制率分别为 47.3% 和 83.8%。添加 30 和 45 mg/mL 大蒜有机硫化物对菌株 DY1b 胞外蛋白酶活性也具有抑制作用,抑制率分别为 15.6% 和 55.0%,且后者差异显著。

2.4 解淀粉芽孢杆菌细胞代谢活性

2,3,5-三苯基氯化四氮唑 (TTC) 能够与活细胞线粒体内的呼吸链脱氢酶发生反应,生成红色的甲臜,可用来反映细胞的代谢活性^[18]。通过对大蒜有机硫化物处理后解淀粉芽孢杆菌培养液 TTC 染色,测定细菌代谢活性,可间接反映菌株细胞的活性情况。由图 4 可知,空白对照组的细胞代谢活性显著高于大蒜有机硫化物组 ($P<0.05$),大蒜有机硫化物质量浓度为 30 mg/mL 时,菌株 DY1a 与 DY1b 的代谢活性显著降低, $D_{490\text{ nm}}$ 与对照组相比分别下降了 2.771 和 4.091,且随着大蒜有机硫化物浓度的进一步升高而继续减小。此外,在相同大蒜有机硫化物浓度下,菌株 DY1b 的细胞代谢活性高于菌株 DY1a。

2.5 解淀粉芽孢杆菌细胞壁的完整性

碱性磷酸酶 (AKP) 是存在于细菌细胞壁和细胞膜之间的酶,在正常情况下,AKP 不会泄露到胞外,但当细胞壁结构受到破坏后,会泄露至胞外溶液中^[19]。因此通过检测胞外溶液中 AKP 活性的变化,可以间接反映大蒜有机硫化物对解淀粉芽孢杆菌细胞壁完整性的影响。由图 5 可知,解淀粉芽孢

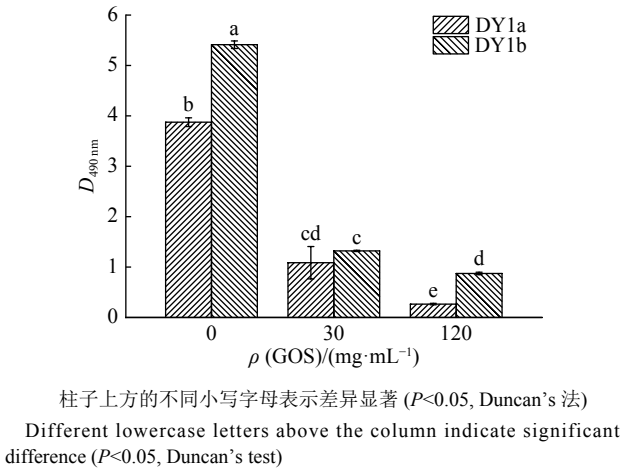


图 4 不同浓度大蒜有机硫化物 (GOS) 对 2 株解淀粉芽孢杆菌细胞代谢活性的影响

Fig. 4 Effects of different concentrations of garlic organic sulfide (GOS) on metabolic activities of two strains of *Bacillus amyloliquefaciens*

杆菌 DY1a 与 DY1b 的空白对照的胞外溶液 AKP 活性在 0~5.0 h 内无明显变化,而添加 15 和 30 mg/mL 大蒜有机硫化物的菌株胞外溶液 AKP 活性在 1.0 h 内迅速升高,且大蒜有机硫化物添加浓度越高,胞外溶液 AKP 活性越高;添加 30 mg/mL 大蒜有机硫化物组的胞外溶液在 5.0 h 时,菌株 DY1a 和 DY1b 的胞外 AKP 活性分别提高了 0.029 和 0.036 U/mL,均显著高于 15 mg/mL 组与空白对照。由此可以发现,大蒜有机硫化物对腐败解淀粉芽孢杆菌细胞壁的完整性具有较强的破坏作用,且浓度越高,破坏作用越强。

2.6 解淀粉芽孢杆菌细胞膜的通透性与完整性

正常生长条件下,细菌细胞膜内的物质不会泄露到胞外,但当细胞膜通透性和完整性遭受破坏后,细胞膜内的电解质和胞内酶将出现不同程度的

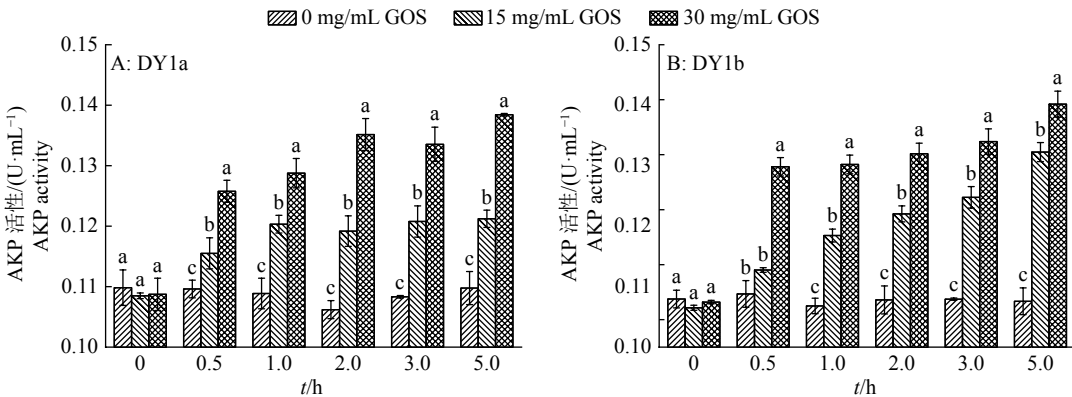
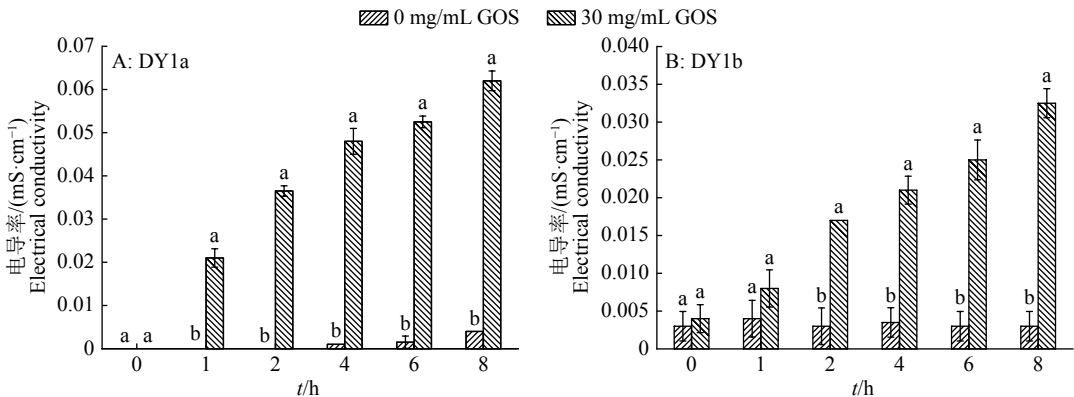


图 5 不同浓度大蒜有机硫化物 (GOS) 处理 2 株解淀粉芽孢杆菌的胞外碱性磷酸酶 (AKP) 活性的变化

Fig. 5 Changes of extracellular AKP activity in two strains of *Bacillus amyloliquefaciens* treated with different concentrations of garlic organic sulfide (GOS)

泄露, 导致胞外溶液电导率的增加。 β -半乳糖苷酶位于细菌细胞膜内, 正常生理状态下在胞外检测不到其活性。因此可以通过胞外溶液电导率及 β -半乳糖苷酶活性变化反映细菌细胞膜的通透性和完整性^[20]。由图 6 可知, 未添加大蒜有机硫化物的腐败解淀粉芽孢杆菌培养液电导率变化较为平缓, 而添加大蒜有机硫化物的腐败菌培养液电导率随着培养时间的增加而逐渐提高, 浓度为 30 mg/mL 的 GOS 处理细菌 8 h 后, 菌株 DY1a 和 DY1b 的培养液电导率分别升了 0.060 和 0.031 mS/cm, 显著高于对照。由图 7 可知, 在 0 h 时, 培养液中 β -半乳糖苷

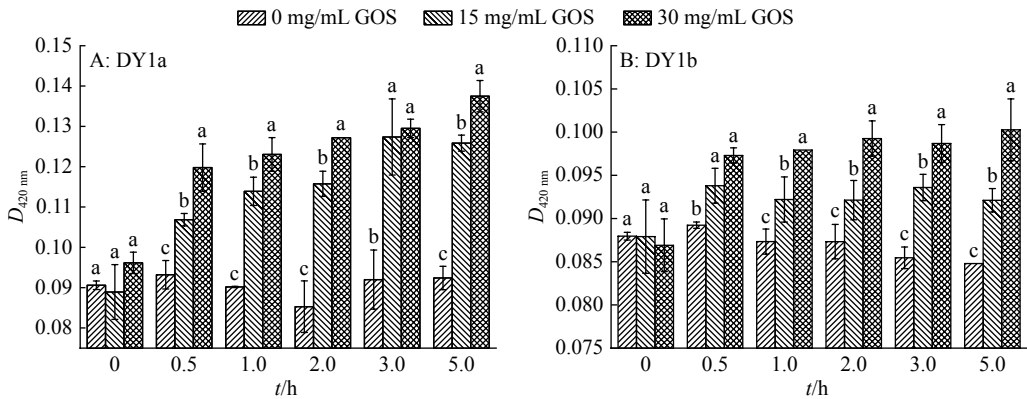
酶活性大小几乎相同, 添加大蒜有机硫化物 30 min 后, 2 株解淀粉芽孢杆菌培养液中的酶活性快速增加, 30 mg/mL 大蒜有机硫化物处理 DY1a 与 DY1b 菌株 5.0 h 后, 胞外 β -半乳糖苷酶活性提高, $D_{420\text{ nm}}$ 分别提高了 0.047 与 0.016, 显著高于对照; 且培养液 β -半乳糖苷酶活性高低与大蒜有机硫化物添加浓度呈正相关。此外, 解淀粉芽孢杆菌 DY1b 的培养液电导率和 β -半乳糖苷酶活性的上升幅度小于菌株 DY1a, 这也与前述胞外蛋白酶和代谢活性的试验结果一致, 表明菌株 DY1a 的菌体代谢和细胞结构对大蒜有机硫化物更敏感。



各图中相同时间柱子上的不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$, Duncan's 法)
Different lowercase letters above columns of the same time in each graph indicate significant difference ($P<0.05$, Duncan's test)

图 6 大蒜有机硫化物 (GOS) 处理 2 株解淀粉芽孢杆菌的胞外电导率变化

Fig. 6 Changes of extracellular electrical conductivity in two strains of *Bacillus amyloliquefaciens* treated with garlic organic sulfide (GOS)



各图中相同时间柱子上的不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$, Duncan's 法)
Different lowercase letters above columns of the same time in each graph indicate significant difference ($P<0.05$, Duncan's test)

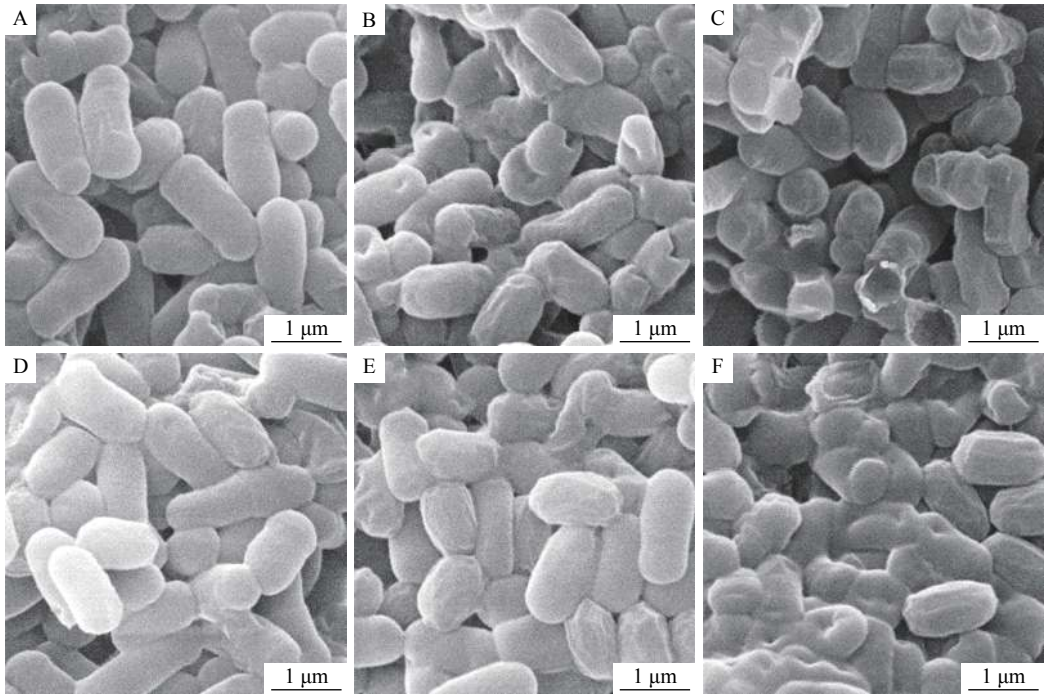
图 7 不同浓度大蒜有机硫化物 (GOS) 处理 2 株解淀粉芽孢杆菌的胞外 β -半乳糖苷酶活性变化

Fig. 7 Changes of extracellular β -galactosidase activity in two strains of *Bacillus amyloliquefaciens* treated with different concentrations of garlic organic sulfide (GOS)

2.7 解淀粉芽孢杆菌的形态结构变化

从图 8 可以看出, 未经大蒜有机硫化物处理的解淀粉芽孢杆菌菌体细胞没有异常变化, 形态饱满, 表面光滑, 细胞与细胞之间分界清晰 (图 8A、8D), 质量浓度为 30 mg/mL 的大蒜有机硫化物处

理 5.0h 后的菌体细胞变形, 表面出现皱缩, 孔洞式塌陷 (图 8B、8E), 质量浓度为 480 mg/mL 的大蒜有机硫化物处理后, 菌体细胞与细胞之间出现黏聚、破裂现象 (图 8C、8F)。细胞表面皱缩和孔洞现象进一步证明了大蒜有机硫化物处理可破坏细胞壁、细胞膜



A: 未处理菌株 DY1a; B: 30 mg/mL GOS 处理菌株 DY1a; C: 480 mg/mL GOS 处理菌株 DY1a; D: 未处理菌株 DY1b; E: 30 mg/mL GOS 处理菌株 DY1b; F: 480 mg/mL GOS 处理菌株 DY1b

A: Strain DY1a untreated; B: Strain DY1a treated with GOS at 30 mg/mL; C: Strain DY1a treated with GOS at 480 mg/mL; D: Strain DY1b untreated; E: Strain DY1b treated with GOS at 30 mg/mL; F: Strain DY1b treated with GOS at 480 mg/mL

图 8 不同浓度大蒜有机硫化物 (GOS) 处理 2 株解淀粉芽孢杆菌细胞表面形态

Fig. 8 Cell surface morphology of two strains of *Bacillus amyloliquefaciens* treated by different concentrations of garlic organic sulfide (GOS)

的通透性和完整性,导致胞内物质泄漏至胞外,甚至最终使细胞死亡。

3 讨论与结论

解淀粉芽孢杆菌是预浸泡豆杆制品的优势腐败菌,具有耐高温、产蛋白酶能力强的特点。大蒜作为重要的香辛料,具有抑菌谱广、杀菌能力强的优势,在食品绿色抑菌保鲜领域具有重要的应用潜力。已有研究发现,大蒜提取物对蜡样芽孢杆菌 *Bacillus cereus*^[14]、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*^[21-22] 等芽孢细菌具有良好的抑制作用。目前国内外关于大蒜提取物对豆制品腐败菌——解淀粉芽孢杆菌的抑菌研究鲜见报道。本研究结果表明,大蒜有机硫化物对导致豆杆腐败的解淀粉芽孢杆菌菌株 DY1a、DY1b 具有良好的抑菌杀菌作用,最小抑菌浓度均为 30 mg/mL,最小杀菌浓度分别为 240 和 480 mg/mL。同时,大蒜有机硫化物对解淀粉芽孢杆菌胞外蛋白酶这一重要腐败因子具有很强的抑菌活性。这些结果显示大蒜有机硫化物在预浸泡豆杆腐败菌杀菌控制方面具有很大的应用潜力和价值。

本试验对最小抑菌浓度下 2 株解淀粉芽孢杆菌的代谢活性与胞外蛋白酶活性变化进行了研究,

结果发现,在最小抑菌浓度下,2 株解淀粉芽孢杆菌仍然保持一定的活性,可见,低浓度下大蒜有机硫化物对解淀粉芽孢杆菌的作用方式并非直接杀死细菌,而是抑制细菌的生理活动,这与宋卫国^[23] 的研究结论一致。大蒜有机硫化物处理后,细菌胞外碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶活性及胞外溶液电导率升高,因而可推断细菌细胞壁、细胞膜的通透性和完整性受到不同程度的影响,导致胞内电解质与内容物外泄渗出。进一步通过扫描电镜观察发现,此时细菌细胞表面形态出现皱缩、坍塌和破裂现象,这进一步印证了大蒜有机硫化物的抑菌机理与破坏细菌细胞壁和细胞膜的完整性有关,这与胡蕾^[24] 和 Feng 等^[25] 的研究结论一致。

生长曲线试验结果显示 15 mg/mL 大蒜有机硫化物处理的菌株 DY1b 的对数生长期早于同处理下的菌株 DY1a;胞外蛋白酶试验结果显示,在相同处理下,大蒜有机硫化物对菌株 DY1b 的蛋白酶抑制率低于 DY1a;此外,细菌代谢活性、胞外电导率及 β -半乳糖苷酶试验结果表明,解淀粉芽孢杆菌 DY1b 对大蒜有机硫化物胁迫更具有耐受性。

大蒜有机硫化物对解淀粉芽孢杆菌 DY1a 和 DY1b 具有良好的抑菌、杀菌作用,并能抑制胞外蛋白酶活性,其抑菌机理与破坏细菌细胞壁、细胞膜

的通透性和完整性, 干扰细菌生理代谢活动有关。大蒜有机硫化物在控制预浸泡豆杆优势腐败菌中具有较强的应用潜力。

参考文献:

[1] 李永吉, 曾茂茂, 何志勇, 等. 腐竹加工技术及品质影响因素的研究进展[J]. 食品科学, 2013, 34(23): 333-337.

[2] 郑丽君, 申光辉, 张志清, 等. 真空包装免泡豆杆优势腐败细菌分离鉴定及其致腐能力分析[J]. 食品科学, 2018, 39(2): 177-184.

[3] 郑丽君, 申光辉, 张志清, 等. 免泡豆杆优势腐败菌腐败能力及产生生物胺特性分析[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(10): 56-62.

[4] 夏硕, 郑丽君, 申光辉, 等. 高温杀菌对预浸泡豆杆的杀菌效果及品质影响[J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(5): 2086-2093.

[5] 唐桂宇, 唐怡淋, 代博仁, 等. 免泡豆杆腐败菌复配抑菌剂的优化及其保鲜效果[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(4): 110-116.

[6] 周建新. 植物源天然食品防腐剂的研究现状、存在问题及前景[J]. 食品科学, 2006, 27(1): 263-268.

[7] LEE Y S, LEE Y J, PARK S N. Synergistic antimicrobial effect of *Lonicera japonica* and *Magnolia obovata* extracts and potential as a plant-derived natural preservative[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2018, 28(11): 1814-1822.

[8] 陈宁. 蒜氨酸降解产物的成分分析和抑菌机理研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2016: 1-7.

[9] ANKRI S, MIRELMAN D. Antimicrobial properties of allicin from garlic[J]. *Microbes Infect*, 1999, 1(2): 125-129.

[10] XUE R, FENG J S, MA L N, et al. Whole transcriptome sequencing analysis of the synergistic antimicrobial effect of metal oxide nanoparticles and ajoene on *Campylobacter jejuni*[J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 2074.

[11] REITER J, HUBBERS A M, ALBRECHT F, et al. Alliin, a natural antimicrobial defence substance from garlic, inhibits DNA gyrase activity in bacteria[J/OL]. *Int J Med Microbiol*, 2020, 310(1).[2019-10-11]. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2019.151359>.

[12] 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: 26-47.

[13] 黄笠原, 毛顺, 李蕊婷, 等. 大蒜精油对熏马肠中德氏乳杆菌产腐胺的影响机制[J]. 食品科学, 2019, 40(5): 17-23.

[14] 穆可云. 大蒜提取物对蜡样芽孢杆菌的抑制研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2013: 36-47.

[15] 彭光华, 韩月峰, 马荣池. 大蒜有机硫化物提取条件的优化及其成分的分析[J]. 食品科学, 2008, 29(7): 226-230.

[16] 陶文卿. 10-HDA 对大肠杆菌抑制机理的研究[D]. 济南: 山东轻工业学院, 2012: 25-61.

[17] GUO J J, GAO Z P, LI G Y, et al. Antimicrobial and antibiofilm efficacy and mechanism of essential oil from *Citrus Changshan* - Huyou Y. B. Chang against *Listeria monocytogenes*[J]. *Food Control*, 2019, 105: 256-264.

[18] 杨天佑, 田静, 黄新, 等. TTC-脱氢酶测定法表征低温真空环境对细菌呼吸活性的影响[J]. 食品与机械, 2008, 24(6): 32-35.

[19] 刘梦茵, 刘芳, 周涛, 等. 乌梅提取物对蜡状芽孢杆菌的抑菌机理研究[J]. 食品科学, 2012, 33(1): 103-105.

[20] 李婷, 杨舒然, 陈敏, 等. 姜厚朴水提物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌机理研究[J]. 现代食品科技, 2016, 32(2): 84-92.

[21] 牛贞福, 国淑梅, 徐金强, 等. 大蒜提取液对平菇竞争性杂菌的抑制及对平菇生长的促进作用[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(1): 73-77.

[22] 张宝善, 王君, 陈锦屏, 等. 大蒜汁对枯草芽孢杆菌抑制作用的研究[J]. 西北植物学报, 2009, 29(6): 1269-1275.

[23] 宋卫国. 大蒜提取液有效成分抑菌活性及其作用机理研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2004: 51-61.

[24] 胡蕾. 蒜氨酸降解产物结构鉴定及抑菌机理研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2017: 28-51.

[25] FENG S L, EUCKER T P, HOLLY M K, et al. Investigating the responses of *Cronobacter sakazakii* to garlic-driven organosulfur compounds: A systematic study of pathogenic-bacterium injury by use of high-throughput whole-transcriptome sequencing and confocal micro-Raman spectroscopy[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80(3): 959-971.

【责任编辑 李晓卉】