

马铃薯胰蛋白酶抑制剂的抑菌活性

李琪孟¹, 罗志刚¹, 李小林²

(1. 华南理工大学食品科学工程学院, 广东广州 510641) (2. 广州海莎生物科技有限公司, 广东广州 510530)

摘要: 本研究探讨了马铃薯胰蛋白酶抑制剂 (PTI) 抑菌活性及其抑菌机理。采用滤纸片扩散法测定抑菌圈直径, 微量二倍稀释法测定最低抑菌浓度 (MIC)、最低杀菌浓度 (MBC), 以此评价 PTI 的抑菌性。通过扫描电镜观察并测定胞膜通透性、胞膜完整性、胞内活性氧含量及对细菌蛋白酶的抑制率等实验, 探讨了 PTI 的抑菌机理。结果表明: PTI 对枯草芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌和铜绿假单胞菌有较明显的抑制作用, 其抑菌圈直径分别为 12.56 mm、12.35 mm 和 11.76 mm, MIC 为 1.88~3.75 mg/mL, MBC 均为 3.75 mg/mL。PTI 破坏了菌体细胞的形态, 导致菌悬液中相对电导率升高和核酸的泄漏, 影响了细菌的膜通透性; 通过荧光显微镜观察, 1 MIC 的 PTI 使菌体胞膜的完整性遭到破坏并促进胞内 ROS 的产生, 造成了菌体氧化损伤; PTI 对菌体蛋白酶的活性表现出一定的抑制作用。通过实验得出 PTI 可能通过这种多靶点协同增效作用达到其抑菌效果。

关键词: 马铃薯胰蛋白酶抑制剂; 抑菌; 细胞膜; 抑菌机理

文章编号: 1673-9078(2020)12-43-51

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.12.0098

Antibacterial Activity of Trypsin Inhibitor from Potato

LI Qi-meng¹, LUO Zhi-gang¹, LI Xiao-lin²

(1. College of Food Science and Technology, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Guangzhou Hisoya Biological Science & Technology Co. Ltd., Guangzhou 510530, China)

Abstract: In this study, the antibacterial activity and underlying mechanism of the potato trypsin inhibitor (PTI) was investigated. To evaluate the antibacterial activity of PTI, the inhibition zone diameter (DIZ) was determined through the filter paper diffusion method, and the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined by the double microdilution method. The antibacterial mechanism of PTI was explored through observations by scanning electron microscopy, and measurements of cell membrane's permeability and integrity, intracellular reactive oxygen content as well as inhibition rate of bacterial protease. The results showed that PTI exhibited significant inhibitory effects against *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* and *Pseudomonas aerimonas* with the corresponding diameters of bacteriostatic zone as 12.56 mm, 12.35 mm and 11.76 mm, respectively, MIC ranging from 1.88 to 3.75 mg/mL, and MBC being the same for the three bacteria (3.75 mg/mL). PTI destroyed the morphology of bacterial cells and led to the increases of relative conductivity and leakage of nucleic acid in the bacterial suspension, which affected the membrane permeability of bacteria. Fluorescence microscopic images showed that PTI at the concentration of MIC destroyed the integrity of the bacterial cell membrane, promoted the production of intracellular ROS, causing oxidative damage to the bacterial cells. PTI showed a certain inhibitory effect on the activity of bacterial protease. Based on the experimental results, it is concluded that PTI probably exerts its antibacterial activity through such a multi-target synergistic effect.

Key words: potato trypsin inhibitor; bacteriostatic; cell membrane; antibacterial mechanism

引文格式:

李琪孟, 罗志刚, 李小林. 马铃薯胰蛋白酶抑制剂的抑菌活性[J]. 现代食品科技, 2020, 36(12): 43-51

LI Qi-meng, LUO Zhi-gang, LI Xiao-lin. Antibacterial activity of trypsin inhibitor from potato [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(12): 43-51

收稿日期: 2020-02-03

基金项目: 广东省国际合作项目 (2019A050510005; 2018A050506016); 广州市经济技术开发区国际合作项目 (2018GH21); 广州市科学研究项目 (201904010240); 中央高校基本科研业务费项目 (2018KZ08; 2019MS099)

作者简介: 李琪孟 (1995-), 女, 硕士, 研究方向: 功能性蛋白

通讯作者: 罗志刚 (1975-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品营养、活性成分的包埋

植物体在长期的进化中为抵御病原微生物侵袭会合成一系列抗菌化合物, 这些化合物包括皂角苷、酚类化合物、黄酮类植保素、单糖以及多种抗菌蛋白等物质^[1]。抗菌蛋白又主要分为蛋白硫堇、植物防御素、脂转移蛋白、蛋白酶抑制剂、核糖体失活蛋白等^[2]。

近年来, 随着化学防腐剂的滥用和超量使用以及微生物对抗生素耐药性的产生, 天然抗菌蛋白的分离

和作用方式引起了人们极大的兴趣。胰蛋白酶抑制剂作为其中重要的一类,普遍存在于块茎和植物种子中,它们通常被认为是植物体内的贮藏蛋白,并通过抑制消化蛋白酶的活性发挥抵御病原体的作用^[3]。大豆、玉米、花生等多种植物来源的胰蛋白酶抑制剂均具有抵抗黄曲霉侵染的作用^[4-6]。Satheesh^[7]从常青藤葫芦(*Coccinagrandsis*)分离得到的胰蛋白酶抑制剂对多种致病细菌和真菌都表现出显著的抑制作用。而 Silva Bezerra 等^[8]从印加维拉种子(*Inga vera*)中提取的胰蛋白酶抑制剂仅对布氏念珠菌、大肠杆菌有抑制作用,对肺炎链球菌和金黄色葡萄球菌等并无抑制作用。Dabhade 等^[9]从 *Albiziaamara Boiv* 种子中得到的胰蛋白酶抑制剂可以抑制铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌,而对炭疽病菌、银叶菌、葡萄孢菌无抑制性。此外,许多学者对胰蛋白酶抑制剂的抗菌机制也进行了深入研究^[10,11]。Silva 等^[12]通过研究甜椒种子(*Capsicum Annuum*)胰蛋白酶抑制剂对炭疽杆菌的抑制作用发现胰蛋白酶抑制剂能够破坏菌体细胞膜结构并诱导胞内活性氧的产生,从而达到抑菌效果。另有研究表明,胰蛋白酶抑制剂具有抑制细菌体内蛋白酶活性的作用^[13,14]。胰蛋白酶抑制剂作为植物源抗菌蛋白的一种,可以有效抑制多种病原菌和真菌的生长,是开发新型抗菌药物的先导化合物。

马铃薯,茄科一年生草本植物,作为全球第四大重要的粮食作物,其含有丰富的蛋白质,有文献报道以马铃薯蛋白代替抗生素在饲料中的使用能有效减少大肠杆菌的数量,这种抑菌作用主要源于马铃薯蛋白中含有胰蛋白酶抑制剂^[15]。目前关于马铃薯胰蛋白酶抑制剂(PTI)功能的研究主要集中在抗癌,抗虫,饱腹感等方面,虽然有部分文献报道了其抑菌性^[16,17],但关于 PTI 抑菌机理的研究还未见报道。本实验以 PTI 为原料测定其对不同菌种的抑菌圈直径、最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC),并在此基础上探究了 PTI 对细菌生长的影响及抑菌机理,以期对 PTI 在抑菌性质方面的应用提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

供试菌株:大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)以及白色念珠菌(*Candida albicans*)购自于上海鲁微科技有限公司,菌种存于琼脂斜面,4℃保存。

培养基:LB 琼脂和 LB 液体培养基用于细菌培养,酵母膏葡萄糖(YPD)琼脂培养基和 YPD 液体培养基用于真菌培养。

试验材料:新鲜马铃薯,购于当地超市。

1.2 主要仪器设备

倒置荧光显微镜(IX73),日本 OLYMPUS 公司;扫描电镜(EM-30AX Plus),韩国 COXEM 公司;酶标仪(CYTATION15),美国 BioTek 公司;分光光度计(722SP),美国 Spectrumlab 公司;电导率仪(DDS-307A),上海雷磁公司;Zeta 电位粒度仪(Malvern Zetasizer Nano ZS),英国 Malvern 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 PTI 的制备

根据实验室前期优化的提取工艺制备 PTI,称取 1000 g 马铃薯块茎,清洗后削成丝并按料液比为 2.5:1.0 的比例浸泡在亚硫酸氢钠溶液中,于室温下榨汁,再离心过滤收集滤液;调节 pH 值至 3,静置 20 min 后离心后收集上清液;向上清液中缓慢加入 25%浓度的 NaCl 并不断搅拌直至 NaCl 全部溶解,放入 4℃冰箱静置过夜,离心取沉淀用蒸馏水重悬;最后经中空纤维超滤膜分离浓缩,截留分子量为 10 ku,将浓缩后的溶液冷冻干燥,得到的固体粉末即为 PTI 样品,其抑制剂含量为 81.81%,含糖量为 2.80%,抑制活力为 3275 U/mg,将其保藏于干燥皿中备用。

1.3.2 受试菌的活化及菌悬液的制备

取斜面保存的供试细菌于 LB 固体培养基上划线培养,37℃倒置培养 24 h 后,挑取单菌落接种于新鲜灭菌的 LB 液体培养基中,37℃、200 r/min 摇床扩大培养 24 h。以 1%的接种量转接至另一新鲜的 LB 液体培养基中,37℃摇床过夜培养,此时菌株生长达到对数期,采用平板计数法确定菌液浓度,待用。其中,白色念珠菌采用 YPD 培养基,且培养温度和培养时间为 28℃和 48 h。

1.3.3 抑菌圈直径的测定

通过滤纸片扩散法测定抑菌圈直径^[18]。以壳聚糖做阳性对照,无菌水做阴性对照,每皿重复三个。细菌置于 37℃培养箱中倒置培养 24 h,白色念珠菌置于 28℃培养箱中倒置培养 48 h。采用十字交叉法测量每个滤纸片周围的抑菌圈直径。

1.3.4 MIC 和 MBC 的测定

分别采用微量二倍稀释法和琼脂平板传代法测定 MIC 和 MBC^[19]。采用 96 孔板对供试菌进行培养,通过二倍稀释法(图 1)调整各孔的样品终浓度至 7.5

mg/mL~0.015 mg/mL, 以壳聚糖作为阳性对照, 空白对照组为等体积不含抑菌剂的菌悬液, 仅含 LB 液体

培养基的孔为参比进行测定, 每个样品重复三次。

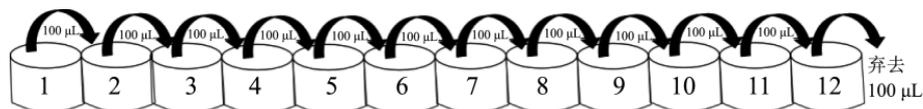


图 1 96 孔板中二倍稀释法示意图

Fig.1 Schematic diagram of double dilution method in 96-well plate

1.3.5 PTI 对供试菌生长曲线的影响

取过夜培养至对数期的菌悬液稀释浓度至 1×10^6 cfu/mL, 吸取 100 μ L 菌液至 24 孔板的各个孔中, 加入 PTI 溶液使其在菌悬液中终浓度分别为 0 MIC、1/4 MIC、1/2 MIC 和 1 MIC, 密封好孔板置于 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 分别在 0、2、4、6、8、10、12、24 h 时测定 OD₆₀₀ 值监测细菌生长, 以培养时间为横坐标, OD₆₀₀ 值为纵坐标作抑菌曲线, 0 MIC 的曲线为细菌正常生长曲线。

1.3.6 扫描电子显微镜 (SEM)

收集培养至对数期的菌悬液, 4500 r/min 离心 5 min, 0.067 M 磷酸缓冲液 (PBS, pH=7.2) 洗涤沉淀 3 次并用 LB 液体培养基重悬, 加入终浓度为 1 MIC 的 PTI, 置于 37 $^{\circ}$ C 摇床振荡培养 4 h。收集菌液用 PBS 洗涤 3 次后用预冷的 2.5% 戊二醛溶液重悬, 4 $^{\circ}$ C 冰箱中固定 12 h, 然后 4500 r/min 下离心 5 min, 弃去上清液, 使用不同浓度的乙醇溶液 (30%、50%、70%、80%、90%、100%) 进行梯度脱水, 每次都各静置 10 min, 离心收集菌体, 后用无水乙醇重悬, 稀释菌液至适宜浓度后滴于锡箔纸上, 用导电胶贴于电镜载物台上, 喷金后观察。以加无菌水的菌悬液为空白对照。

1.3.7 PTI 对供试菌细胞膜通透性的影响

1.3.7.1 对电导率的影响

参照 Zhang 等^[20]的方法, 取对数期菌液离心, 用 5% 葡萄糖溶液洗至菌液的电导率与 5% 葡萄糖溶液的电导率相当, 此菌液作为等渗液。向 5% 葡萄糖溶液中分别加入 0 MIC、1/2 MIC 和 1 MIC 的 PTI, 混均测其电导率记为 L_1 。取等渗菌液分别加入 0 MIC、1/2 MIC 和 1 MIC 的 PTI, 37 $^{\circ}$ C 下振荡培养 3 h, 每 1 h 取样离心测其上清液电导率, 记为 L_2 。将培养 3 h 后的菌悬液沸水浴 30 min, 冷却后离心, 测定电导率记为 L_0 。菌液的相对电导率可通过计算得到:

$$\text{相对电导率} (\%) = \frac{L_2 - L_1}{L_0} \times 100\%$$

1.3.7.2 对核酸物质含量的影响

将对数期菌悬液离心, PBS 洗涤沉淀 3 次, LB 液体培养基重悬调至菌液浓度为 1×10^8 cfu/mL。分别加入 0 MIC、1/2 MIC 和 1 MIC 的 PTI, 37 $^{\circ}$ C 摇床培

养 3 h, 每 1 h 取样离心测定其上清液在 260 nm 处的吸光度。

1.3.8 PTI 对细胞膜完整性的影响

取对数期菌悬液离心, 收集沉淀, PBS 洗涤 3 次, 重悬调至菌液浓度为 1×10^8 cfu/mL。再向菌悬液中添加 PTI 溶液, 使其终浓度为 1 MIC。37 $^{\circ}$ C 摇床中培养 4 h 后吸取 200 μ L 的细胞悬液于微量离心管中, 加入 100 μ L 碘化丙啶 (PI) 染液, 保证 PI 最终浓度为 1.5 mM, 常温下避光染色 30 min, PBS 洗涤 2 次去除细胞外多余的染液, 菌液制片后在倒置荧光显微镜明场和荧光中分别观察细菌生长和染色情况, 荧光的最大激发波长和发射波长分别为 535 nm 和 615 nm, 以加无菌水的菌液为空白对照。

1.3.9 PTI 对活性氧的影响

菌液处理方法同上。取 200 μ L 菌液与 H₂DCFDA (终浓度为 20 μ M) 混合并孵育 1 h, PBS 洗涤 2 次去除细胞外多余的染液, 菌液制片后在倒置荧光显微镜明场和荧光中分别观察细菌生长和染色情况, 荧光的最大激发波长和发射波长分别为 495 nm 和 525 nm, 以加无菌水的菌液为空白对照。

1.3.10 PTI 对细菌蛋白酶的体外抑制作用

根据 Lim^[13]的方法提取细菌蛋白酶。具体操作是将细菌培养至对数期离心, 收集沉淀重悬于提取液中 (HCl 0.1%, Tris 5 mM, CaCl 25 mM, Triton X-100 0.1%, pH 7.5), 冰浴孵化 15 min。然后在 4500 r/min, 4 $^{\circ}$ C 条件下离心 5 min, 收集的上清液即为细菌蛋白酶提取液。参照闵杰^[21]的方法并稍以改进测其抑制率: 以 Tris-HCl (50 mM, pH 8.0) 缓冲液为溶剂配制 2% 的偶氮酪蛋白作为酶解底物, 向试管中加入 0.2 mL 酶液和 0.5 mL 上述底物以及 0.3 mL 的 PTI (2 mg/mL), 混匀并于 40 $^{\circ}$ C 反应 30 min, 加入 4.0 mL 三氯乙酸 (5.0%) 终止反应, 4 $^{\circ}$ C 静置 10 min 后离心, 取 1 mL 上清液加入 3 mL NaOH (0.5 M) 显色, 以不加酶液的样品作为空白测定 OD₄₄₀ 值 (OD₁)。同时, 以 Tris-HCl (50 mM, pH 8.0) 缓冲液代替 PTI 测得 OD₄₄₀ 值 (OD₀)。

$$\text{抑制性} / \% = \frac{OD_0 - OD_1}{OD_0} \times 100\%$$

1.3.11 数据分析

以上实验均重复三次，数据以平均值±标准差(x±sd)来表示，用 origin 9.1 软件作图和 SPSS 24.0 软件进行方差和组间差异分析，以 p<0.05 作为显著性差异标准。

2 结果与讨论

2.1 PTI 的抑菌活性

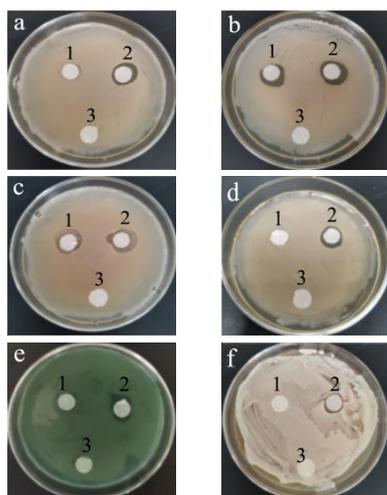


图2 PTI 对不同微生物的抑制作用

Fig.2 Inhibitory activity of potato trypsin inhibitor against different microorganisms

注：a: 金黄色葡萄球菌；b: 枯草芽孢杆菌；c: 蜡样芽孢杆菌；d: 大肠杆菌；e: 铜绿假单胞菌；f: 白色念珠菌。位置 1: PTI；位置 2: 壳聚糖；位置 3: 无菌水。

表 1 PTI 的抑菌圈直径

Table 1 Diameter of bacteriostatic zone of potato trypsin inhibitor

菌株	抑菌圈直径/mm	
	PTI	壳聚糖
金黄色葡萄球菌	8.04±0.13	12.69±0.42
枯草芽孢杆菌	12.56±0.57	13.51±0.74
蜡样芽孢杆菌	12.35±0.84	14.51±0.45
大肠杆菌	7.93±0.25	12.43±0.63
铜绿假单胞菌	11.76±0.33	12.89±0.81
白色念珠菌	7.00±0.00	10.88±0.67

注：实验中所用的滤纸片直径为 7.0 mm。

以具有广谱杀菌效果的壳聚糖为阳性对照^[22]，PTI 对不同微生物的抑菌圈效果如图 2 所示，PTI 对枯草芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌和铜绿假单胞菌具有较明显的抑制作用。结合表 1 可知对这三种细菌的抑菌圈直径分别为 12.56 mm、12.35 mm 和 11.76 mm。而对

大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制性较弱，抑菌圈直径分别为 7.93 mm 和 8.04 mm，且对白色念珠菌并未表现出抑制作用。因此，本文选择枯草芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌和铜绿假单胞菌作为供试菌进行后续研究。

2.2 PTI 对供试菌 MIC 和 MBC 的测定

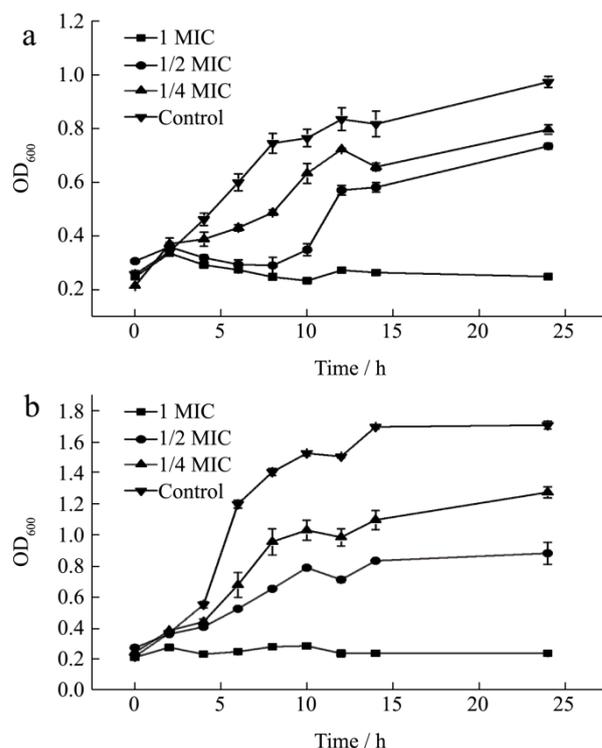
滤纸片扩散法能很好的比较出在同一浓度下活性物质抑菌能力的强弱，而 MIC 可以直接反应抑制微生物生长所需的最低浓度。以壳聚糖为阳性对照，测定了 PTI 对不同供试菌 MIC 和 MBC 的影响。由表 2 知，PTI 对枯草芽孢杆菌的抑菌性最强，MIC 为 1.88 mg/mL，蜡样芽孢杆菌和铜绿假单胞菌的 MIC 均为 3.75 mg/mL。Kumaresan 等^[23]研究结果也表明鱼中提取的胰蛋白酶抑制剂在众多供试菌株中对枯草芽孢杆菌的抑制性最强，其 MIC₅₀ 值最低达到 15 μM。另外，PTI 对三种细菌的 MBC 均为 3.75 mg/mL。

表 2 PTI 对供试菌的 MIC 和 MBC

Table 2 MIC and MBC of potato trypsin inhibitor against the tested bacteria

菌株	MIC/(mg/mL)		MBC/(mg/mL)	
	TI	壳聚糖	TI	壳聚糖
枯草芽孢杆菌	1.88	0.12	3.75	0.26
蜡样芽孢杆菌	3.75	0.47	3.75	0.94
铜绿假单胞菌	3.75	1.88	3.75	3.75

2.3 PTI 对供试菌生长曲线的影响



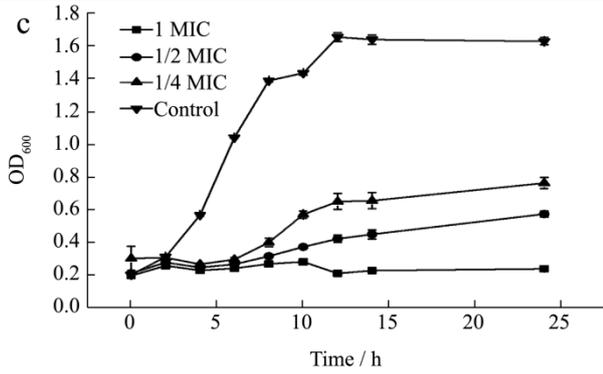


图3 不同浓度 PTI 下细菌的生长曲线

Fig.3 Bacterial growth curves under different concentrations of potato trypsin inhibitor

注: a: 枯草芽孢杆菌; b: 蜡样芽孢杆菌; c: 铜绿假单胞菌。

生长曲线通常被分为滞后期、对数期、稳定期和衰亡期,可以反映 PTI 对菌体生长周期的影响。从图 3 可以看出,在前 4 h 内未添加 PTI 的三种菌液浊度增加较慢,属于菌体生长的滞后阶段,4 h 后菌体生长速率加快进入对数生长期,12 h 后进入稳定期,这符合细菌生长曲线的典型特征。与对照组相比,当 LB 培养基中 PTI 添加浓度为 1/4 MIC 时,细菌生长滞后时间延长,表明细菌的正常生长受到一定程度的抑制,但整体上仍保持典型的生长规律。当添加浓度为 1/2 MIC 时,细菌的生长受到更显著的抑制,铜绿假单胞菌甚至未出现明显的对数生长期,最终枯草芽孢杆菌,蜡样芽孢杆菌和铜绿假单胞菌三种细菌的菌体量分别为对照的 75.46%, 51.67%和 35.08%;当添加浓度为 1 MIC 时,细菌生长被完全抑制,三种细菌都未出现菌体大量生长的对数期,菌体浓度几乎无变化。

2.4 PTI 对供试菌微观形貌的影响

枯草芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌和铜绿假单胞菌经 PTI 处理前后的微观形貌变化情况见图 4,可以看出,对照组的三种菌体细胞外观饱满,表面较为光滑平整,无缺损,且枯草芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌呈典型的杆状结构,表明菌体结构完整,生长状态良好。当加入 1 MIC 的 PTI 时,枯草芽孢杆菌菌体细胞表面出现褶皱,细胞膜变得粗糙不平整;蜡样芽孢杆菌细胞出现形态扭曲皱缩的现象;铜绿假单胞菌菌体表面外壁不全导致边缘不清晰,多个菌体细胞粘成一团甚至出现大量塌陷,有消融迹象,细菌原有形态遭到破坏。

2.5 细菌细胞膜通透性分析

目前发现的绝大多数抗菌蛋白和抗菌肽的抗菌机制

基本都是菌体细胞膜作为靶点,当细胞膜受到破坏时细胞内容物会如磷酸盐、碳酸盐、DNA 与 RNA 等会被释放出来导致菌液电导率上升,核酸大分子物质在 260 nm 处有很强的紫外吸收。因此,菌悬液相对电导率和紫外吸收值可反映细菌细胞膜通透性的变化。

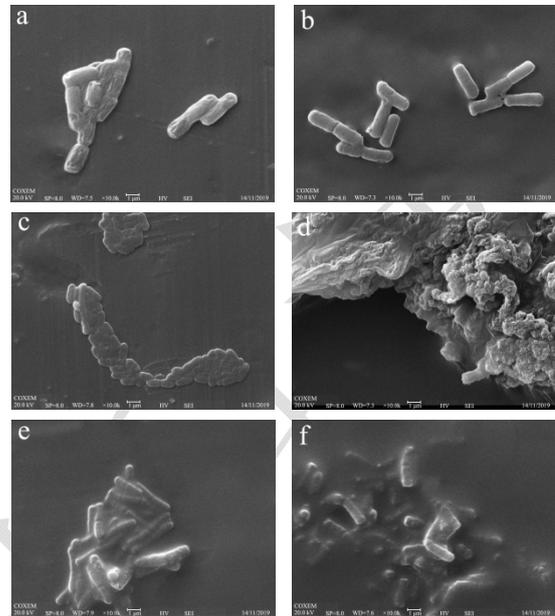


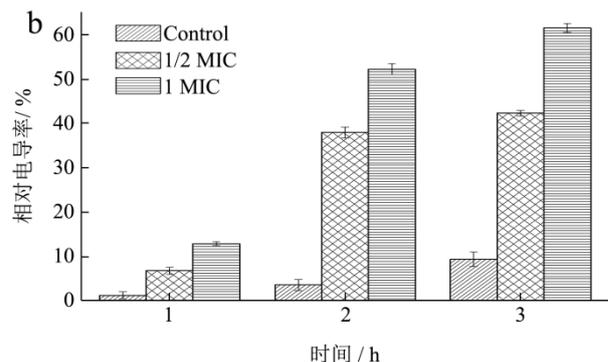
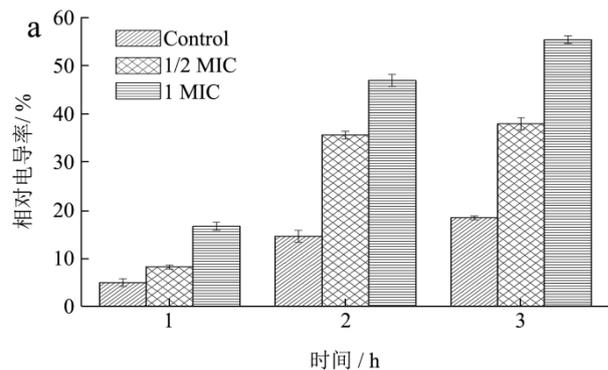
图4 PTI 对供试菌形态结构的影响

Fig.4 Effect of potato trypsin inhibitor on morphological structure of the tested bacteria

注: a, b: *B. subtilis*, c, d: *B. cereus*, e, f: *P. aeruginosa*;

a, c, e: 未处理, b, d, f: 加胰蛋白酶抑制剂。

2.5.1 电导率测定



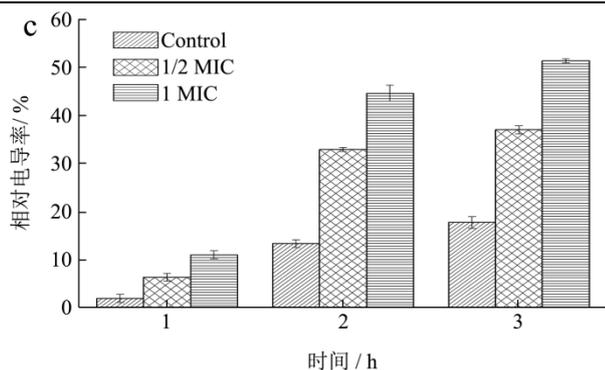


图5 PTI 对供试菌对细菌菌液电导率的影响

Fig.5 Effect of potato trypsin inhibitor on conductivity of the tested bacteria

注: a: 枯草芽孢杆菌; b: 蜡样芽孢杆菌; c: 铜绿假单胞菌。

PTI 对菌液相对电导率的影响如图 5 所示。对照组中 3 种菌液的相对电导率随培养时间的延长略有上升, 3 h 后枯草芽孢杆菌, 蜡样芽孢杆菌和铜绿假单胞菌细胞膜的相对电导率达到 18.37%、9.32%、17.78%。而经 1/2 MIC 和 1 MIC 胰蛋白酶抑制剂处理后菌悬液的相对电导率有显著提高, 其中添加 1 MIC 浓度胰蛋白酶抑制剂的菌悬液相对电导率也明显高于 1/2 MIC 浓度的一组。PTI 处理破坏了枯草芽孢杆菌, 蜡样芽孢杆菌和铜绿假单胞菌细胞膜的通透性, 使胞内电解质渗出, 从而导致菌液中的相对电导率升高^[24], 并且随着胰蛋白酶抑制剂浓度的增大, 细胞膜的通透性也增大。值得注意的是, 枯草芽孢杆菌, 蜡样芽孢杆菌菌悬液相对电导率的增加趋势较铜绿假单胞菌更为显著, 这可能是由于革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的结构区别所致^[25]。

2.5.2 紫外吸收测定

如图 6 所示, 与对照组相比, 处理组中 3 种菌悬液的 OD₂₆₀ 值均显著增大, 进一步说明经胰蛋白酶抑制剂处理增加了菌体细胞膜的通透性, 导致正常状态下不能透过细胞膜的核酸大分子物质泄漏到胞外, 与 PTI 作用于菌体时电导率结果变化趋势相同。

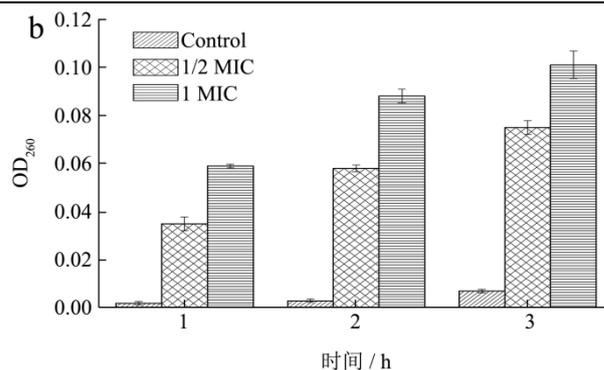
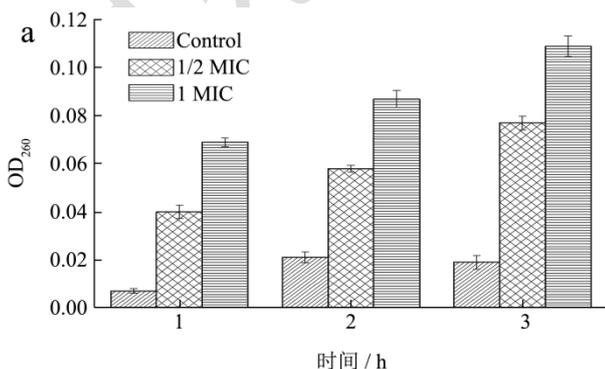


图6 PTI 对供试菌对细菌菌液核酸大分子泄漏的影响

Fig.6 Effect of potato trypsin inhibitor on nucleic acid leakage of the tested bacteria

注: a: 枯草芽孢杆菌; b: 蜡样芽孢杆菌; c: 铜绿假单胞菌。

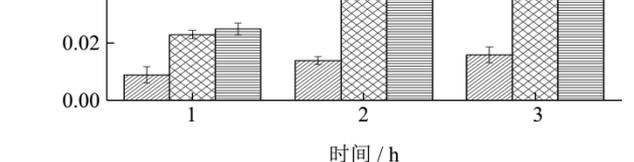


图6 PTI 对供试菌对细菌菌液核酸大分子泄漏的影响

Fig.6 Effect of potato trypsin inhibitor on nucleic acid leakage of the tested bacteria

注: a: 枯草芽孢杆菌; b: 蜡样芽孢杆菌; c: 铜绿假单胞菌。

据报道^[11]从玉米种子中提取的具有抑制 α -淀粉酶和胰蛋白酶活性的 Zeamatin 蛋白也是能使植物的病原性真菌细胞膜的通透性发生改变, OD₂₆₀ 值随蛋白添加量的增加而增大, 这与本试验所得结果一致。

2.6 PTI 对供试菌细胞膜的完整性的影响

PI 作为一种核酸荧光探针只能穿过受损的细胞膜与胞内 DNA 结合染色使细胞核呈红色^[10]。因此, 检测 PI 对细菌细胞的染色情况可以反映胰蛋白酶抑制剂对细菌细胞膜完整性的影响。从图 7 光学显微镜观察可以看出对照组细菌长势良好, 细胞个体丰富, 数量较多, 在荧光显微镜下进一步观察可以发现对照组细菌细胞核染红色较少, 几乎无红色, 表明受损坏死细胞均很少。经胰蛋白酶抑制剂处理后, 光学显微镜下枯草芽孢杆菌, 蜡样芽孢杆菌和铜绿假单胞菌都趋向团聚, 荧光显微镜下细菌细胞核染红色较多, 表明细菌细胞膜完整性被破坏, 细胞的正常生长受到抑制, 凋亡严重。

该结果类似于甜椒胰蛋白酶抑制剂对炭疽杆菌细胞膜的影响, 研究显示当细胞经过胰蛋白酶抑制剂处理 24 h 后可以观察到显著的 Sytox 绿色荧光, 证明甜

椒胰蛋白酶抑制剂作用于炭疽杆菌的质膜，破坏了膜的完整性，导致标记染料的渗透^[12]。Martins 等^[10]在黑木耳中纯化的 Bowman-Birk 型蛋白酶抑制剂对金黄色葡萄球菌细胞膜完整性影响的研究中同样观察到，经胰蛋白酶抑制剂处理后的菌体可观察到显著的 PI 红色荧光。因此，植物胰蛋白酶抑制剂抑菌活性的发挥可能与其对菌体细胞膜完整性的影响有关。

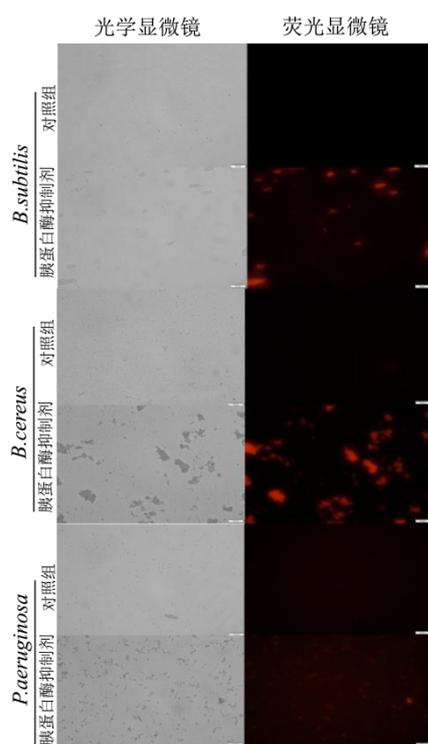


图 7 荧光显微镜观察 PTI 作用供试菌细胞

Fig.7 The tested bacteria treated with potato trypsin inhibitor were observed by fluorescence microscope

2.7 PTI 作用下细菌的氧化损伤

H₂DCFDA 可以透过细胞膜被胞内酯酶水解成 DCFH，细胞中的活性氧（ROS）可以进一步将其氧化成带有荧光的 DCF，因此观察 DCF 的荧光可以判定菌体内 ROS 的水平^[26]。如图 8 所示，对照组中枯草芽孢杆菌细胞的几乎不显示荧光，蜡样芽孢杆菌和铜绿假单胞菌显示了较弱的荧光，而经 1 MIC 的 PTI 处理的细胞显示较强的 DCF 荧光，表明胰蛋白酶抑制剂的处理促进了胞内 ROS 的产生。宁厚齐等^[27]研究表明较低浓度的大豆蛋白抗菌多肽诱导金黄色葡萄球菌产生较低浓度的 ROS，这有助于细胞内代谢的正常进行，然而当产生的 ROS 浓度过高超过菌体抗氧化能力阈值时会破坏细菌结构和其在细胞内介导的功能，从而导致细胞死亡，表明活性氧的积累可以作为抗菌蛋白发挥抑菌作用引发细胞凋亡的第二个指标。在本研究中，1 MIC 胰蛋白酶抑制剂明显超过细菌抗氧化

能力阈值，促进 ROS 的产生，损害细胞，这种氧化应激会促进细胞死亡。Oliveira^[28]指出胰蛋白酶抑制剂诱导菌体细胞内 ROS 的生成可能是为了增加结构的能量代谢，从而维持膜电位。

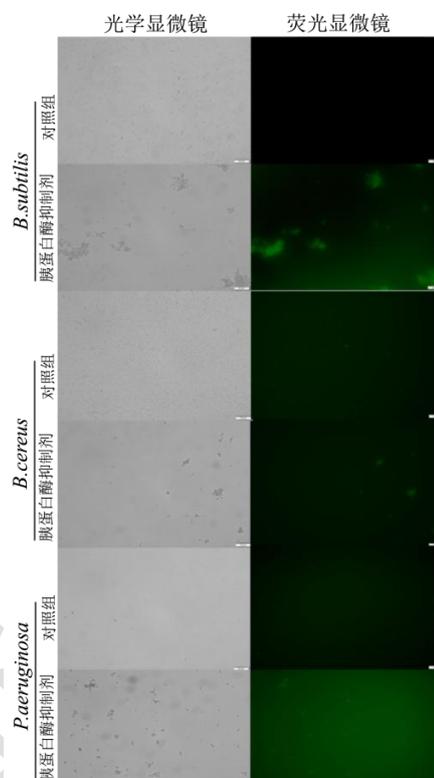


图 8 荧光显微镜观察 PTI 作用细菌细胞的氧化应激结果

Fig.8 The oxidative stress of the bacteria treated with potato trypsin inhibitor were observed by fluorescence microscopy

2.8 PTI 对细菌蛋白酶的抑制作用

胰蛋白酶抑制剂作为一类重要的抗菌蛋白，它的抑菌作用被认为与其对微生物蛋白酶的抑制性有关^[29]。图 9 显示的是 PTI 对牛胰蛋白酶和不同细菌中提取的蛋白酶的抑制率。以未添加 PTI 的蛋白酶活性为 100%，在加入等剂量的 PTI 后，胰蛋白酶的活性被抑制 84.67%，枯草芽孢杆菌，蜡样芽孢杆菌和铜绿假单胞菌蛋白酶的活性分别被抑制了 76.44%，75.19%和 45.87%。因此，可以得出本文提取的胰蛋白酶抑制剂对枯草芽孢杆菌，蜡样芽孢杆菌和铜绿假单胞菌三种菌分泌的蛋白酶均有一定的抑制作用。

在麻疯树籽饼胰蛋白酶抑制剂对金黄色葡萄球菌和肠沙门氏菌的抑制性研究中发现了类似的现象^[14]，结果表明胰蛋白酶抑制剂对两种细菌中提取的蛋白酶的抑制率分别为 84.6%和 100%。李游山^[30]阐明了家蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂能够以多聚体形式与枯草杆菌蛋白酶结合，从而具有很强的抗微生物蛋白酶活性，并推测它们可能是昆虫免疫反应的一个重要组成部分，

参与应答潜在的病原微生物。综上表明胰蛋白酶抑制剂作用于微生物时可能会与菌体蛋白酶结合,影响蛋白酶的正常功能,从而抑制细胞的生长,甚至导致细胞死亡。

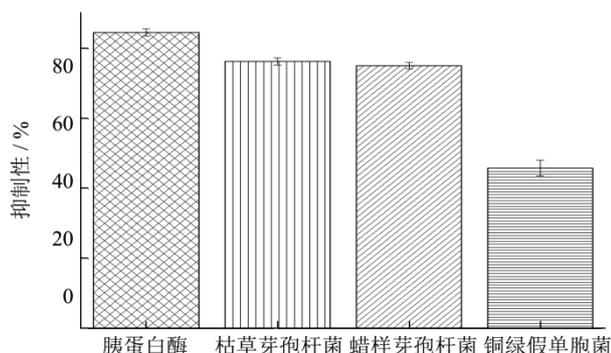


图9 PTI对细菌蛋白酶的抑制作用

Fig.9 Inhibition assays of potato trypsin inhibitor against bovine and the bacteria serine proteinases

3 结论

本实验对PTI的抑菌效果进行了研究,发现PTI对枯草芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌和铜绿假单胞菌具有较明显的抑制作用。另外,本文从多方面探讨了PTI的抑菌机理:PTI首先作用于菌体细胞膜表面,通过破坏菌体细胞膜的通透性和完整性,使小分子物质泄漏导致相对电导率增加,核酸等大分子物质被释放,菌体生长繁殖受阻;PTI促进菌体内ROS的产生,损害细胞,这种氧化应激加速细菌凋亡;PTI可抑制菌体蛋白酶的活性,影响了蛋白酶的正常功能,从而抑制细菌的生长,最终导致细胞死亡。本研究结果表明PTI可作用于菌体的多个靶点,形成一种多效协同的作用机制,最终达到抑菌的效果。因此,PTI在天然产物抑菌剂开发方面具有一定的前景。

参考文献

- [1] 姜太玲.花椒籽蛋白抗菌肽的制备及其性质研究[D].成都:四川农业大学,2015
JIANG Tai-ling. Preparation and characterization of antimicrobial peptides from seed protein of prickly ash [D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2015
- [2] 王凤萍.苦荞抗菌肽的制备、应用及抑菌机理的研究[D].昆明:昆明理工大学,2015
WANG feng-ping. Preparation, application and antibacterial mechanism of antimicrobial peptides in Tartary buckwheat [D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2015
- [3] Kim J Y, Park S C, Hwang I, et al. Protease inhibitors from plants with antimicrobial activity [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2009, 10(6): 2860-2872
- [4] Chen Z Y, Brown R L, Russin J S, et al. A corn trypsin inhibitor with antifungal act inhibits *Aspergillus flavus* alpha-amylase [J]. Phytopathology, 1999, 89(10): 902-907
- [5] 梁炫强,潘瑞焱,周桂元.花生种子胰蛋白酶抑制剂与抗黄曲霉侵染的关系[J].作物学报,2003,2:136-140
LIANG Xuan-qiang, PAN Rui-chi, ZHOU Gui-yuan. Relationship between trypsin inhibitors in peanut seeds and resistance to aflatoxin infection [J]. Journal of Crops, 2003, 2: 136-140
- [6] Bin Zhang, Dong-Feng Wang, Hao Wu, et al. Inhibition of endogenous α -amylase and protease of *Aspergillus flavus* by trypsin inhibitor from cultivated and wild-type soybean [J]. Annals of Microbiology, 2010, 60(3): 405-414
- [7] Satheesh L S, Murugan K. Antimicrobial activity of protease inhibitor from leaves of *Coccinia grandis* (L.) Voigt [J]. Indian Journal of Experimental Biology, 2011, 49(5): 366-374
- [8] da Silva Bezerra C, de Oliveira C F R, Machado O L T, et al. Exploiting the biological roles of the trypsin inhibitor from *Inga vera* seeds: A multifunctional Kunitz inhibitor [J]. Process Biochemistry, 2016, 51(6): 792-803
- [9] Dabhade A R, Mokalhe N U, Patil U K. Purification, characterization, and antimicrobial activity of nontoxic trypsin inhibitor from *Albizia amara* Boiv [J]. Process Biochemistry, 2016, 51(5): 659-674
- [10] Martins T F, Vasconcelos I M, Silva R G G, et al. A Bowman-birk inhibitor from the seeds of *Luetzelburgia auriculata* inhibits *Staphylococcus aureus* growth by promoting severe cell membrane damage [J]. Journal of Natural Products, 2018, 81(7): 1497-1507
- [11] Roberts W K, Selitrennikoff C P. Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity [J]. Microbiology, 1990, 136(9): 1771-1778
- [12] Silva M S, Ribeiro S F F, Taveira G B, et al. Application and bioactive properties of CaTI, a trypsin inhibitor from *Capsicum annuum* seeds: membrane permeabilization, oxidative stress and intracellular target in phytopathogenic fungi cells [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2017, 97(11): 3790-3801
- [13] Lima T B, Silva O N, Migliolo L, et al. A Kunitz proteinase inhibitor from corms of *Xanthosoma blandum* with bactericidal activity [J]. Journal of Natural Products, 2011, 74(5): 969-975

- [14] Costa H P S, Oliveira J T A, Sousa D O B, et al. JcTI-I: a novel trypsin inhibitor from *Jatropha curcas* seed cake with potential for bacterial infection treatment [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 30(5): 5
- [15] 付建福.马铃薯蛋白作为一种新型的抗菌剂对断奶仔猪生产性能,营养物质消化率,肠道中微生物和免疫力的影响[J].饲料广角,2008,19:27-31
FU Jian-fu. Effects of potato protein as a new antibacterial agent on weaning piglets' performance, nutrient digestibility, intestinal microorganisms and immunity [J]. *Journal of Feed Wide-angle*, 2008, 19: 27-31
- [16] Kim J Y, Park S C, Kim M H, et al. Antimicrobial activity studies on a trypsin-chymotrypsin protease inhibitor obtained from potato [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 330(3): 921-927
- [17] Bártová V, Bárta J, Vlačihová A, et al. Proteomic characterization and antifungal activity of potato tuber proteins isolated from starch production waste under different temperature regimes [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(24): 10551-10560
- [18] Shao W, Liu X, Min H, et al. Preparation, characterization, and antibacterial activity of silver nanoparticle-decorated graphene oxide nanocomposite [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015, 7(12): 6966-6973
- [19] Hemati S, Azizi-Jalilian F, Pakzad I, et al. The correlation between the presence of quorum sensing, toxin-antitoxin system genes and MIC values with ability of biofilm formation in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Iranian Journal of Microbiology*, 2014, 6(3): 133
- [20] Zhang Y, Liu X, Wang Y, et al. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [J]. *Food Control*, 2016, 59: 282-289
- [21] 闵杰.金黄杆菌来源的角蛋白酶的分离纯化和酶学性质研究[D].杭州:浙江大学,2008
MIN Jie. Isolation, purification and enzymatic characterization of keratinase from *Bacillus aureus* [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2008
- [22] 吴刚.壳聚糖作为天然食品防腐剂的研究[D].无锡:江南大学,2005
WU Gang. Research on chitosan as a natural food preservative [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2005
- [23] Kumaresan V, Harikrishnan R, Arockiaraj J. A potential Kazal-type serine protease inhibitor involves in kinetics of protease inhibition and bacteriostatic activity [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 42(2): 430-438
- [24] Lv F, Liang H, Yuan Q, et al. *In vitro* antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms [J]. *Food Research International*, 2011, 44(9): 3057-3064
- [25] Chen C Z, Cooper S L. Interactions between dendrimer biocides and bacterial membranes [J]. *Biomaterials*, 2002, 23(16): 3359-3368
- [26] Liu H, Pei H, Han Z, et al. The antimicrobial effects and synergistic antibacterial mechanism of the combination of ϵ -Polylysine and nisin against *Bacillus subtilis* [J]. *Food Control*, 2015, 47: 444-450
- [27] 宁厚齐.大豆球蛋白抗菌多肽对单增李斯特氏菌及金黄色葡萄球菌的抑制作用[D].济南:齐鲁工业大学,2019
NING Hou-qi. The inhibitory effect of soybean globulin antibacterial polypeptide on *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* [D]. Ji'nan: Qilu University of Technology, 2019
- [28] Mello E O, Ribeiro S F F, Carvalho A O, et al. Antifungal activity of PvD1 defensin involves plasma membrane permeabilization, inhibition of medium acidification, and induction of ROS in fungi cells [J]. *Current Microbiology*, 2011, 62(4): 1209-1217
- [29] Bártová V, Bárta J, Jarošová M. Antifungal and antimicrobial proteins and peptides of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers and their applications [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103: 5533-5547
- [30] 李游山.家蚕蛋白酶抑制剂抵御昆虫致病性真菌入侵的分子机理研究[D].重庆:西南大学,2013
LI You-shan. Study on the molecular mechanism of protease inhibitors of silkworm against invasive insect pathogenic fungi [D]. Chongqing: Southwest University, 2013