

茶皂素对食源性腐败酵母的抑菌能力及作用机理

杜金婷^{1,2}, 张雁^{2*}, 李雁^{1*}, 王佳佳², 廖娜², 钟立煌², 骆碧群³, 林江³

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510640)(2. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所/农业农村部功能食品重点实验室/广东省农产品加工重点实验室, 广东广州 510610)

(3. 广东星汇生物科技有限公司, 广东龙川 517323)

摘要: 该研究通过测定抑菌圈直径、最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)和最低杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC), 评价茶皂素对酿酒酵母、鲁氏接合酵母及白色假丝酵母三种食源性腐败酵母的抑菌能力, 并筛选出机理研究指示菌; 进而通过考察时间-杀菌曲线、生物膜抑制率、菌体细胞形态、细胞膜通透性、细胞膜完整性、遗传物质以及蛋白泄露和胞内总蛋白等指标, 阐述茶皂素抑菌机理。抑菌能力试验结果显示茶皂素对三种腐败酵母均有抑菌作用, 其中酿酒酵母抑菌直径为 16.00 mm, MIC 和 MBC 分别为 0.05、0.10 mg/mL, 抑菌效果最为显著。以酿酒酵母为指示菌的抑菌机理研究结果表明: 茶皂素可使菌体直接进入衰竭期; 可显著抑制生物膜形成; 可致菌体细胞发生不可逆转的塌陷扭曲; 能破坏细胞膜完整性, 增大细胞膜通透性, 使胞内核酸和蛋白质大量泄露, 还可干扰 DNA 正常合成, 阻滞蛋白质合成表达。因此, 茶皂素有望成为食品加工中针对食源性腐败酵母的一种天然食品防腐剂, 该研究也可为拓展天然防腐剂在高渗食品中的应用提供理论依据。

关键词: 茶皂素; 抑菌能力; 食源性腐败酵母; 抑菌机理

文章编号: 1673-9078(2022)05-118-125

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.5.0926

Antibacterial Activity and Mechanism of Tea Saponin against Foodborne Spoilage Yeasts

DU Jinting^{1,2}, ZHANG Yan^{2*}, LI Yan^{1*}, WANG Jiajia², LIAO Na², ZHONG Lihuang², LUO Biquan³, LIN Jiang³

(1.College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China) (2.Sericultural & Agri-Food Research Institute Guangdong Academy of Agricultural Sciences/ Key Laboratory of Functional Foods, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/ Guangdong Key Laboratory of Agricultural Products Processing, Guangzhou 510610, China) (3.Guangdong Xinghui Biological Technology Co. Ltd., Longchuan 517323, China)

Abstract: In this paper, the bacteriostatic ability of tea saponin against three foodborn spoilage yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rousteri* and *Candida albicans*, was evaluated by measuring the inhibition zone, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). Furthermore, the antibacterial mechanism was explored by using the time sterilization curve, biofilm inhibition rate, cell morphology, cell membrane permeability, cell membrane integrity, genetic material, protein leakage and total intracellular protein. The results of bacteriostatic ability test showed that tea saponin had bacteriostatic effect on three kinds of foodborne spoilage yeast. The inhibition zone of tea saponin on *S. cerevisiae* which had the most significant bacteriostatic effect was 16.00 mm, MIC and MBC were 0.05 mg/mL and 0.10 mg/mL respectively. The bacteriostatic mechanism of *S. cerevisiae* as indicator bacteria indicated that tea

引文格式:

杜金婷,张雁,李雁,等.茶皂素对食源性腐败酵母的抑菌能力及作用机理[J].现代食品科技,2022,38(5):118-125,+327

DU Jinting, ZHANG Yan, LI Yan, et al. Antibacterial activity and mechanism of tea saponin against foodborne spoilage yeasts [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(5): 118-125, +327

收稿日期: 2021-08-20

基金项目: 广东省本土创新创业团队项目(2019BT02N112); 广东省现代农业产业技术体系创新团队建设专项资金(2020KJ117); 广东省农业科学院农业优势产业学科团队建设项目(202108TD)

作者简介: 杜金婷(1996-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 油茶资源利用、食品化学, E-mail: 3046023329@qq.com

通讯作者: 张雁(1967-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 食品生物化学与农产品加工, E-mail: zhang_yan_@126.com; 共同通讯作者: 李雁(1963-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品科学与工程, E-mail: yanli@scau.edu.cn

saponin could make the bacteria directly enter the depletion period, significantly inhibit the formation of biofilm and cause irreversible collapse and distortion of bacterial cells. Furthermore, it can not only destroy the integrity of cell membrane, increase the permeability of cell membrane, and leak a large number of intracellular nucleic acids and proteins, but also interfere with the normal synthesis of DNA and block the synthesis and expression of proteins. Therefore, tea saponin is expected to become a natural food preservative for foodborne spoilage yeast in food processing, and this study can also provide a theoretical basis for expanding the application of natural preservative in hypertonic food.

Key words: tea saponin; bacteriostatic ability; foodborne spoilage yeast; antibacterial mechanism

食品是微生物生长的理想基质,在制造、分销和储存阶段食品易受多种微生物污染,导致外观、质地、味道和香气成分的改变,甚至会产生过量发酵气体以及真菌毒素,引起食品包装炸裂、损害人体健康。食品工业多采用高温灭菌和添加防腐剂的方式控制腐败微生物生长,然而少数食源性腐败酵母因其耐酸^[1]、耐高渗^[2]、耐弱酸抑菌剂^[3]和适应高温等特性,处理后仍可能对食品品质造成严重影响。

研究表明,引起食品中酵母污染的菌种多为假丝酵母、酿酒酵母、毕赤氏酵母等^[4],现已有报道从浓缩苹果汁(糖度 70 °Brix, pH 值 3.5)中分离出导致胀罐、果汁营养价值降低和外观恶化等质量问题的鲁氏接合酵母^[5],因此对腐败酵母进行污染控制就显得尤为重要。为延长食品储藏期限,添加防腐剂抑制腐败酵母生长,是一种方便高效的控制措施。目前常见的防腐剂包括化学合成防腐剂和天然防腐剂,化学合成防腐剂是食品工业中使用剂量最大,应用范围最广泛的一类防腐剂,其拥有广谱、高效和稳定的抑菌效果。然而,已有研究表明有机酸类化学合成防腐剂需在高剂量下才可有效控制酵母菌生长^[6],但这会影响产品味道和质量。此外,有相关报道表明可有效抑制腐败酵母生长的苯甲酸钠在人体肠道酸环境下可转化为毒性较强的苯甲酸,进而导致体重下降、腹泻、出血、瘫痪甚至死亡^[7]。随着食品安全问题受重视程度的提高,人们逐步将目光转向可替代合成防腐剂的天然安全食品防腐剂。

油茶是中国特有的木本油料作物,被誉为“东方油橄榄”,其加工副产物油茶粕中富含天然抑菌活性成分茶皂素^[8],然而目前综合利用程度仍然较低。茶皂素是一类齐墩果烷型五环三萜类皂苷混合物,是一种广谱天然抑菌剂, Ju 等^[6]发现在酱油酿造中,茶皂素提取物比食品工业常用化学合成防腐剂苯甲酸钠有更强的抗腐败酵母活性,有望作为一种比苯甲酸钠更安全的食品防腐剂运用于食品加工,但天然抑菌剂活性成分复杂,抑菌机制尚不明确,特别是对食源性腐败酵母的研究尚处于起步阶段。本文测定茶皂素对酿酒酵母、鲁氏接合酵母和白色假丝酵母等三种腐败酵母的抑菌圈直径、MIC 和 MBC 以评价其抑菌能力,并

通过考察茶皂素对菌体时间-杀伤曲线、生物膜抑制率、菌体细胞形态,细胞膜通透性、细胞膜完整性、遗传物质和蛋白质泄露与合成干扰的影响对抑菌机理进行研究,旨在探明油茶皂素的抑菌作用,为其更好运用于食品产业和提升油茶副产物高值化利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

酿酒酵母 ATCC 9080(*Saccharomyces cerevisiae*)、鲁氏接合酵母 CDMCC 2.173 (*Zygosaccharomyces rouxii* (Saito) Lodd)、白色假丝酵母 ATCC 10231 (*Candida albicans*)由广东省微生物菌种保藏中心提供菌种。

茶皂素(自制);戊二醛、无水乙醇,国药集团化学试剂有限公司;Bicinchoninic acid (BCA)蛋白定量测定试剂盒、真菌基因组(DNA)提取试剂盒、DNA marker、琼脂糖,上海源叶生物科技有限公司;马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基、磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline, PBS),北京索莱宝生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

S-3400N-II 扫描电子显微镜,日立高新技术公司; Synergy 2 多功能酶标仪,美国博腾仪器有限公司; Zeiss LSM710 激光共聚焦扫描显微镜, Zeiss 光学仪器(上海)国际贸易有限公司; MIQ-23L-B 全自动高压灭菌锅,杭州诺丁科学器材有限公司; JY99-IIDN 超声破碎仪,上海希言科学仪器有限公司; UV-1800 紫外分光光度计,日本岛津科技有限公司; ICTHI-250 恒温恒湿培养箱,施都凯仪器设备(上海)有限公司; ZF-288 全自动凝胶成像仪,上海嘉鹏科技有限公司; SW-CJ-2FD 超净工作台,华威科创(武汉)科技有限公司; Beckman 冷冻高速离心机,美国贝克曼库尔特有限公司。

1.3 方法

1.3.1 茶皂素的制备

茶皂素提取物^[9]经 AB-8 大孔树脂纯化得到纯度为 92.07% 茶皂素。

1.3.2 抑菌能力评价

1.3.2.1 测定抑菌直径

采用牛津杯(内径 6 mm, 外径 8 mm, 高度 10 mm)测定抑菌直径大小。向培养皿(90 mm)中倒入 20 mL 已灭菌 PDA 培养基, 待其凝聚后, 加入 100 μ L 菌液(浓度约为 10^6 cfu/mL), 均匀涂布, 静置 5 min。放置相应数量的牛津杯于培养皿中, 加入 100 μ L 不同浓度的茶皂素溶液, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱静置 3 h 后, 将培养皿于 27 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后用游标卡尺测量抑菌直径, 无菌水作为对照组^[10]。

1.3.2.2 测定 MIC 和 MBC

吸取马铃薯葡萄糖液体培养基 100 μ L, 于 96 孔细胞培养板中。再将 100 μ L 200 mg/mL 茶皂素溶液加到孔内, 对 200 mg/mL 茶皂素溶液进行二倍稀释, 依次取 100 μ L 加入孔中, 稀释至最低浓度为 0.05 mg/mL; 随后向上述各孔加入 100 μ L 培养至对数生长期的菌液。以仅加液体培养基不加菌液为阴性对照, 加菌液不加茶皂素溶液为阳性对照, 将 96 孔细胞板放置于 27 $^{\circ}$ C 恒温培养箱 24 h, 孔板中肉眼不可见浑浊的浓度即为 MIC。取 50 μ L 混合菌液于 PDA 培养皿上, 均匀涂布, 于 27 $^{\circ}$ C 培养 48 h, 无菌体生长的最低浓度即为 MBC。

1.3.3 抑菌机理

1.3.3.1 茶皂素对酿酒酵母的时间-杀伤曲线

吸取培养至对数生长期的酿酒酵母菌液 100 μ L 于 96 孔细胞培养板中, 再将溶于无菌水的茶皂素加到上述孔中, 使茶皂素的终浓度分别为 0、1/4、1/2、1 和 2 MIC, 以等体积的无菌水为阴性对照。将 96 孔细胞板放置于 27 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养, 每小时测定 600 nm 波长下吸光值, 对照组吸光度为 OD_0 , 实验组吸光度为 OD_1 , 以 OD_1/OD_0 为指标绘制茶皂素对酿酒酵母抑制作用的时间-杀伤曲线^[11]。

1.3.3.2 茶皂素对酿酒酵母生物膜的抑制率

参照 1.3.3.1 方法在 96 孔板内接种对数生长期酿酒酵母菌液后, 将其放置于 27 $^{\circ}$ C 下培养 24 h, 0.1% 结晶紫染色 30 min, 用 PBS 洗掉多余染色剂后, 加入含有 0.1% 乙酸的 95% 乙醇溶液将粘附的染色剂重新溶解, 使用酶标仪在 595 nm 波长下测定吸光度^[12]。

生物膜抑制率计算公式如下:

$$\text{抑制率}/\% = \frac{A_1 - A_0}{A_0} \times 100\%$$

式中:

A_0 ——对照组吸光度;

A_1 ——实验组吸光度。

1.3.3.3 茶皂素对酿酒酵母细胞形态的影响

吸取培养至对数生长期的 50 mL 菌液加入锥形瓶, 再加入茶皂素使茶皂素终浓度为 0、1、2 和 4 MIC, 将锥形瓶放置于 27 $^{\circ}$ C 培养 6 h, 取出用 PBS 冲洗 2 次, 加入戊二醛溶液 4 $^{\circ}$ C 过夜固定。使用浓度梯度的酒精溶液(30%、50%、70%、90%、100%、100%)逐级脱水, 烘箱 45 $^{\circ}$ C 烘 12 h, 镀膜后用扫描电子显微镜观察细胞形态。

1.3.3.4 茶皂素对酿酒酵母细胞膜通透性的影响

吸取培养至对数生长期的菌液 50 mL, 平均分装在 2 个离心管, 离心收集菌体, 用 PBS 洗涤 2 次, 加入茶皂素使茶皂素终浓度为 0 MIC 和 1 MIC, 离心管放置于 27 $^{\circ}$ C 摇床培养, 分别在 0、2、4、6、8 h 后取出 2 mL 菌液, 6000 r/min 离心 5 min, 用紫外可见分光光度计分别检测其上清液在 260 nm、280 nm 处的吸光度并绘制曲线^[13]。

1.3.3.5 茶皂素对酿酒酵母细胞膜完整性的影响

吸取培养至对数生长期的 50 mL 菌液加入锥形瓶, 再加入茶皂素使茶皂素终浓度为 0、1/4、1/2 和 1 MIC, 将锥形瓶放置于 27 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后, 10000 r/min 离心 5 min, 用无菌生理盐水清洗 2 次后重悬于 PBS。用吖啶橙(Acridine Orange, AO)和溴乙锭(Ethidium Bromide, EB)染色剂染色 10 min, 采用激光共聚焦显微镜观察酵母细胞情况^[14]。

1.3.3.6 茶皂素对酿酒酵母基因组 DNA 的影响

吸取培养至对数生长期的 50 mL 菌液加入离心管, 10000 r/min 离心 5 min, 弃去培养基, 用无菌生理盐水清洗 2 次, 加入 50 mL 浓度为 0、1、2 和 4 MIC 的茶皂素溶液, 并将其放置于 27 $^{\circ}$ C 培养 8 h。10000 r/min 离心 10 min 去除上清液, 保留菌体沉淀, 按照 DNA 提取试剂盒步骤提取 DNA, 将提取的 3 μ L DNA 样品分别于 1 μ L Loading buffer 混合后进行凝胶阻滞电泳, 电泳完成后, 将凝胶放置于全自动凝胶成像装置, 拍照并分析结果。

1.3.3.7 茶皂素对酿酒酵母蛋白泄露及合成的影响

吸取培养至对数生长期的 50 mL 菌液加入离心管, 10000 r/min 离心 5 min, 弃去培养基, 用无菌生理盐水清洗 2 次, 加入 50 mL 浓度为 1 MIC 的茶皂素溶液, 27 $^{\circ}$ C 下培养 8 h, 以无菌去离子水作为阴性对照组, 茶皂素处理 0 h 作为阳性对照组。每 2 h 吸取 5 mL 菌悬液, 在 5000 r/min 离心 10 min, 收集上清液使用 BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白含量, 即为胞外蛋白质含量。茶皂素处理后酵母细胞蛋白质泄露量计

算公式为:

$$\text{蛋白质泄露量} = \lambda_1 - \lambda_0$$

式中:

λ_0 ——阳性对照组蛋白质含量, $\mu\text{g/mL}$;

λ_1 ——胞外蛋白质含量, $\mu\text{g/mL}$ 。

取5 mL处理8 h的菌液,以10000 r/min离心10 min获取沉淀物,将沉淀物悬浮在无菌水中,然后用超声破碎仪在功率800 W,间隔3 s的条件下破坏细胞30 min,最后收集上清液,使用BCA蛋白定量测定试剂盒测定细胞总蛋白含量,为胞内总蛋白质含量^[15]。

1.4 数据统计与分析

采用SPSS 22.0分析处理数据,Origin 2018绘制图表,所有实验均重复3次取其平均值, $p < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 抑菌能力评价

表1 茶皂素对食源性腐败酵母的抑菌直径

茶皂素浓度/ (mg/mL)	抑菌直径/mm		
	酿酒酵母	鲁氏接合酵母	白色假丝酵母
0	0	0	0
0.10	0	0	0
0.20	16.00±0.71 ^c	0	9.25±0.25 ^c
0.40	19.00±0.71 ^d	0	14.90±0.66 ^d
0.80	21.50±0.79 ^c	14.17±0.85 ^c	16.17±0.69 ^c
1.60	24.25±0.83 ^b	15.50±0.82 ^b	18.08±0.73 ^b
3.20	27.75±0.83 ^a	18.00±0.94 ^a	21.08±0.73 ^a

注: 同列平均数标注不同小写字母表示差异显著($p < 0.05$)。

表2 茶皂素对食源性腐败酵母的MIC和MBC

菌种	MIC/(mg/mL)	MBC/(mg/mL)
酿酒酵母	0.05	0.10
白色假丝酵母	0.05	0.10
鲁氏接合酵母	0.19	0.39

由表1和表2的抑菌直径、MIC和MBC结果可以看出,茶皂素对不同食源性腐败酵母均有良好的抑菌效果,茶皂素浓度为0.20 mg/mL时,对酿酒酵母和白色假丝酵母有较强的抑菌作用,而酿酒酵母的抑菌直径约为白色假丝酵母2.5倍,然而茶皂素浓度增加

到0.40 mg/mL时,对鲁氏接合酵母仍未出现抑菌圈,继续增加到0.80 mg/mL时,出现抑制效果,由此可知茶皂素对食源性腐败酵母抑菌效果为酿酒酵母>白色假丝酵母>鲁氏接合酵母。并且,茶皂素抑菌效果与浓度呈现依赖性,抑菌直径随茶皂素浓度的升高而增大,当浓度达到3.20 mg/mL时,酿酒酵母抑菌直径达到27.75 mm,具有较强的抑菌作用。另外,茶皂素对酿酒酵母和白色假丝酵母的最低抑菌浓度皆为0.05 mg/mL,对鲁氏接合酵母的最低抑菌浓度则为0.19 mg/mL。由此可见,茶皂素对食源性腐败酵母具有广谱抑菌作用,但对酿酒酵母抑菌效果最为显著。因此,选取酿酒酵母为研究茶皂素对食源性腐败酵母抑菌机理的指示菌。

2.2 抑菌机理

2.2.1 茶皂素对酿酒酵母的时间-杀伤曲线

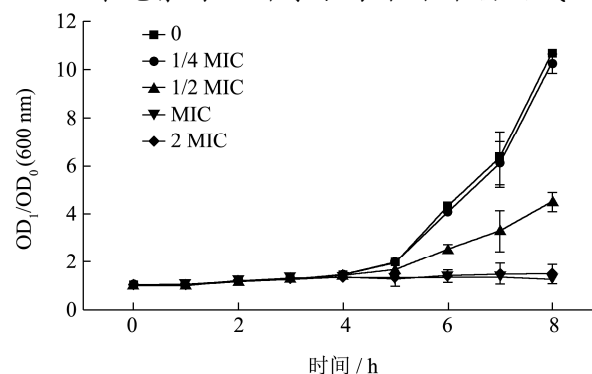


图1 茶皂素浓度对酿酒酵母时间-杀伤曲线的影响

Fig.1 Effect of tea saponin concentration on time sterilization curve of *Saccharomyces cerevisiae*

天然活性物质对菌体的抑制作用在菌体进入对数生长期才可显现出来^[16],由图1可知,培养4 h后,酿酒酵母进入对数生长期,未经茶皂素处理的酿酒酵母 OD_1/OD_0 迅速上升,呈现正常的增殖和生长状态,而经过茶皂素处理的酿酒酵母 OD_1/OD_0 增长缓慢。抑菌作用多与天然活性物质的浓度有关,酿酒酵母菌体细胞经茶皂素处理后生长受到不同程度抑制,且抑制作用呈现剂量依赖性,茶皂素浓度在1/4 MIC~1 MIC范围内,抑菌作用随浓度升高而增大,浓度超过MIC后 OD_1/OD_0 基本无变化,这与郭丽丽等^[17]研究黄芪茎叶皂苷提取物对大肠杆菌的抗菌机理的结果类似,两者研究结果皆表明高浓度抑菌活性成分可完全抑制菌体生长,使其无形成正常生长周期,直接进入衰竭期。

2.2.2 茶皂素对酿酒酵母生物膜抑制率

生物膜是一种包裹在菌体自身周围的聚集膜,由多种自产基质形成^[12],临床上认为生物膜的形成可以显著降低真菌对抗真菌药物的敏感性^[18,19],也因此抑

制真菌生物膜的形成被认为是控制食源性腐败酵母的重要措施。通过结晶紫染色试验表明,茶皂素对酿酒酵母生物膜形成的抑制作用呈剂量依赖性, Li 等^[20]研究也证实生物膜抑制率与抑菌物质浓度呈正相关。如图 2 所示,茶皂素在 1/2 MIC~2 MIC 测试浓度下可有效抑制酿酒酵母的生物膜形成 ($p < 0.05$),且随着浓度升高,茶皂素的生物膜抑制率也相应提高,当茶皂素浓度达到 2 MIC 时,可有效抑制 84.69%的生物膜形成。

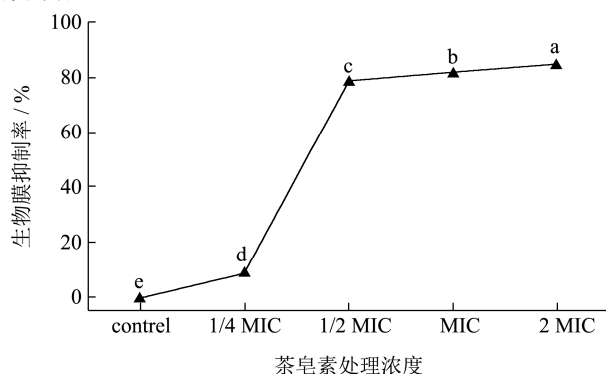


图 2 茶皂素浓度对酿酒酵母生物膜形成抑制率的影响

Fig.2 Effect of tea saponin concentration on inhibition rate of *Saccharomyces cerevisiae* biofilm formation

注: 图中不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。图 4、5、8 同。

2.2.3 茶皂素对酿酒酵母形态的改变

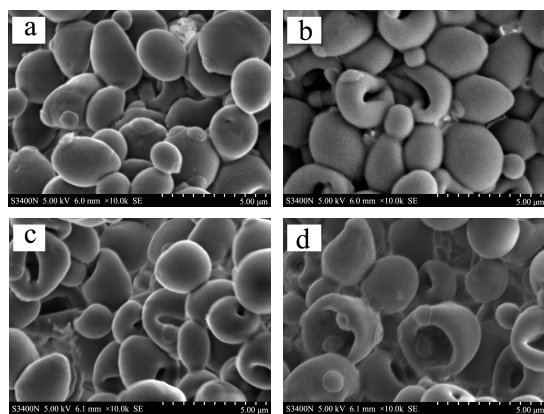


图 3 不同处理浓度对酿酒酵母影响的扫描电镜图

Fig.3 SEM images of the effects of different treatment concentrations on *Saccharomyces cerevisiae*

注: (a)对照组; (b) 1 MIC 茶皂素浓度处理组; (c) 2 MIC 茶皂素浓度处理组; (d) 4 MIC 茶皂素浓度处理组。

酿酒酵母的扫描电镜图如图 3 所示,可较为直观地看出茶皂素对菌体形态的影响。对照组中酵母菌体细胞平滑完整(图 3a),加入 1MIC 浓度的茶皂素(图 3b)后酿酒酵母菌体细胞出现少量塌陷,细胞膜表面不平整。然而当更大浓度(2 MIC 和 4 MIC)的茶皂素作用于酿酒酵母时(图 3c、3d),菌体出现大量塌

陷、形态扭曲和细胞膜褶皱,形态遭到严重破坏,这种情况可能是由于茶皂素破坏或损伤了酿酒酵母细胞壁和细胞膜,导致胞内物质大量溢出,使其失去原有能够维持细胞正常生命活动的功能和细胞内容的支撑和保护作用,从而导致菌体的细胞形态改变^[21]。

2.2.4 茶皂素对酿酒酵母细胞膜通透性的影响

核酸和蛋白质在细胞的生命活动中有着不可缺少的重要作用,蛋白质是细胞重要的结构组成成分,而核酸具有编码合成蛋白质的功能,因此核酸和蛋白质生理功能对于酿酒酵母生长繁殖有着不可或缺的作用。核酸和蛋白质在 260 nm 和 280 nm 有最大吸收峰,因此可通过 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 来表征细胞外的核酸和蛋白质的泄露情况^[13]。

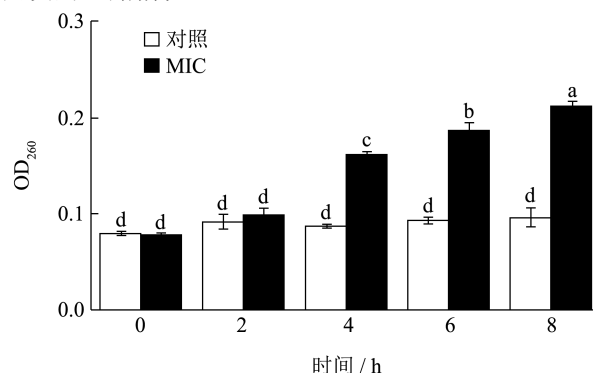


图 4 茶皂素对酿酒酵母 OD₂₆₀ 的影响

Fig.4 Effect of tea saponin on OD₂₆₀ of *Saccharomyces cerevisiae*

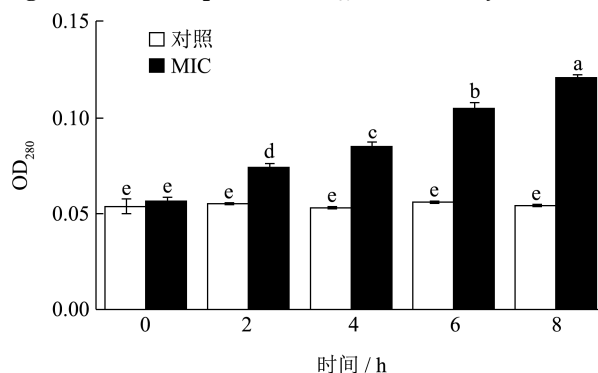


图 5 茶皂素对酿酒酵母 OD₂₈₀ 的影响

Fig.5 Effect of tea saponin on OD₂₈₀ of *Saccharomyces cerevisiae*

细胞膜是外界环境刺激对细胞不可渗透的屏障,而细胞通透性是菌体正常生长代谢的重要指标^[22],通透性可通过菌体核酸、蛋白质等内容物的释放表征,菌体内内容物释放量增大可表明细胞膜通透性遭到破坏,内容物释放量越大,细胞膜通透性破坏程度越大。如图 4、5 所示,茶皂素可诱导胞内蛋白质和核酸物质大量泄露,经 1 MIC 浓度茶皂素处理 8 h 后,处理组 OD₂₆₀ 由 0.08 增加至 0.21, OD₂₈₀ 由 0.06 增加至 0.12,而对照组 260 nm 和 280 nm 波长下吸光度均无显著差异 ($p > 0.05$)。此外, Zhao 等^[12]也利用 OD₂₆₀ 和胞外蛋

白质浓度的试验结果证实了胞内大分子物质的释放是由抑菌活性成分对菌体细胞膜造成不可修复损伤引起的。由此可见，茶皂素是通过增加细胞膜通透性，致使核酸和蛋白质等大分子物质大量泄露，进而影响细胞正常生长，达到抑菌的目的。

2.2.5 茶皂素对酿酒酵母细胞膜完整性的影响

采用 AO 和 EB 标记细胞，通过激光共聚焦显微镜考察茶皂素对酿酒酵母细胞膜完整性的影响如图 6 所示，其中，AO 核酸染料可标记正常细胞并显示绿色或黄绿色荧光，EB 核酸染料仅能标记细胞膜受损菌体使其显示红色荧光。在激光共聚焦显微镜下观察到未做任何处理的酿酒酵母细胞多呈绿色荧光反应，

仅有极少数呈红色的细胞；1 MIC 茶皂素浓度处理酿酒酵母 8 h 后，发现大部分细胞都发出红色荧光，表明茶皂素对酿酒酵母的细胞膜损伤率较高；此外，当茶皂素浓度在 1/4 MIC~1 MIC 范围内时，激光共聚焦显微镜可明显观察到呈现绿色荧光的无损伤细胞数量随着茶皂素浓度的增大而减少，相反的发红色荧光的损伤细胞数量逐渐增多。Sung 等^[23]研究表明，天然活性物质的抗真菌作用可能是通过增加真菌细胞膜通透性来破坏细胞膜完整性，进而渗透到细胞内部发挥抑菌效果，同时激光共聚焦显微镜观察结果也表明茶皂素可能通过破坏细胞膜完整性的方式抑制食源性腐败酵母正常生长。

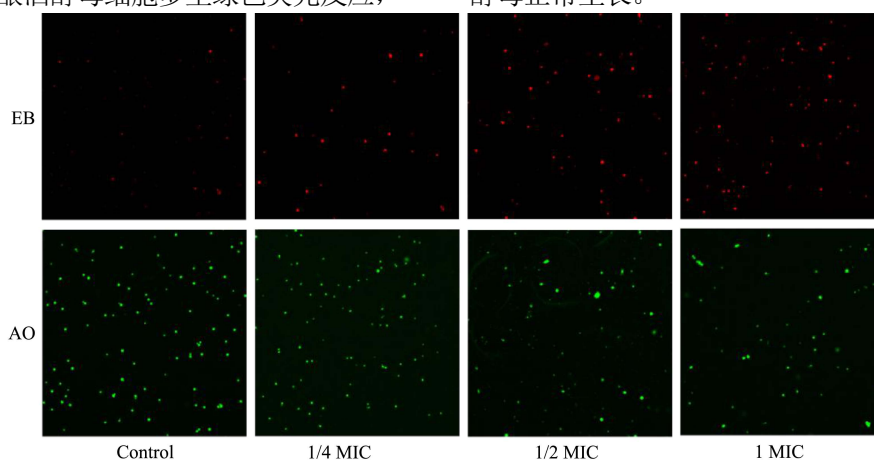


图 6 茶皂素对酿酒酵母细胞膜完整性的影响

Fig.6 Effect of tea saponin on cell membrane integrity of *Saccharomyces cerevisiae*

2.2.6 茶皂素对酿酒酵母基因组 DNA 的影响

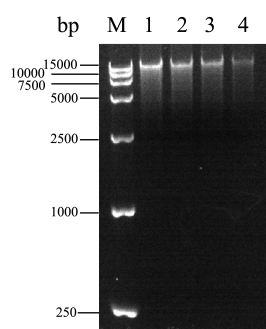


图 7 茶皂素处理酿酒酵母的凝胶阻滞电泳图谱

Fig.7 Gel retardation electrophoresis of tea saponin in *Saccharomyces cerevisiae*

注：泳道 M、1、2、3、4 分别为 DNA 标准品、对照、1/2 MIC、1 MIC 和 2 MIC 处理的样品。

DNA 是生物体内重要的遗传物质，DNA 的损伤会影响遗传信息的表达，导致代谢合成过程的紊乱，最终使细胞死亡^[24]。采用凝胶阻滞电泳考察茶皂素对酿酒酵母 DNA 的影响，从图 7 可以看出在分子质量 15000 bp 处，泳道 3~5 相对与泳道 2 发生条带减弱消失的现象，说明经过茶皂素处理后酿酒酵母 DNA 含

量减少，且随着质量浓度的增加，胞内 DNA 含量降低程度加大，这在其他抗菌化合物中也观察到类似现象，如 Sieniawska 等^[22]利用荧光染色法对丹参油处理后大肠杆菌 DNA 进行精准定量，荧光染色 DNA 定量结果与荧光显微图都显示丹参油处理后可显著降低 DNA 含量。结合文献与图 4 结果可推测，茶皂素使酿酒酵母 DNA 含量降低的原因，可能有两点：(1) 茶皂素可引起胞内大分子物质核酸的泄露，从而减低内部 DNA 含量；(2) 其可能干扰了 DNA 的正常合成代谢，进而影响复制、转录和表达等过程，导致代谢合成过程紊乱，从而达到抑菌的目的^[25]。

2.2.7 茶皂素对酿酒酵母蛋白泄露及合成的影响

采用 1 MIC 浓度茶皂素处理酿酒酵母以观察茶皂素对细胞蛋白质泄露的影响，结果如图 8 所示，茶皂素处理 2 h 后胞外蛋白质含量即达到 55.11 $\mu\text{g/mL}$ ，且胞外蛋白质含量随着茶皂素处理时间的增加迅速增大，当经过 8 h 处理后蛋白含量为 68.21 $\mu\text{g/mL}$ ，胞外蛋白质含量显著增加 ($p < 0.05$)，是阴性对照组胞外蛋白质含量的 3.4 倍，而阴性对照组胞外蛋白质含量随

时间增加无显著变化 ($p>0.05$)。此外, 如表 3 所示, 茶皂素处理 8 h 后酿酒酵母胞内蛋白质含量为 901.66 $\mu\text{g/mL}$, 与阴性对照组 (1677.22 $\mu\text{g/mL}$) 相比, 胞内蛋白质含量降低了 46.24%, 胞外蛋白质含量的增加以及胞内蛋白质含量的降低说明 1 MIC 浓度茶皂素处理引起了酿酒酵母细胞蛋白质的泄露, 原因可能是其破坏了细胞膜对菌体的支撑保护功能^[26]。

另一方面, 图 8 和表 3 的实验结果也表明, 8 h 茶皂素处理后酿酒酵母胞外蛋白质泄露量 48.06 $\mu\text{g/mL}$ 远小于细胞中蛋白质减少量 775.56 $\mu\text{g/mL}$ 。同时, Zhao 等^[12]研究发现从黑加仑果皮中提取的多酚提取物 C3G 也可使金黄色葡萄球菌胞内蛋白质和 DNA 发生显著泄露, 且胞内蛋白质减少量远小于胞外蛋白质泄露量, 这与本文结论一致。因此, 推断造成这种现象的原因可能是茶皂素通过增大细胞膜通透性进入细胞, 在胞内干扰细菌 DNA 合成以及相关基因的表达, 进而干扰蛋白质合成^[27,28], 直接导致蛋白含量降低。

综上所述, 茶皂素对酿酒酵母的抑制作用可能是一方面通过增大细胞膜通透性, 导致胞内蛋白质等大分子物质泄露到胞外, 另一方面直接进入胞内干扰蛋白质合成, 进而扰乱细胞正常生长代谢, 通过上述两方面协同作用, 达到抑制酿酒酵母的效果。

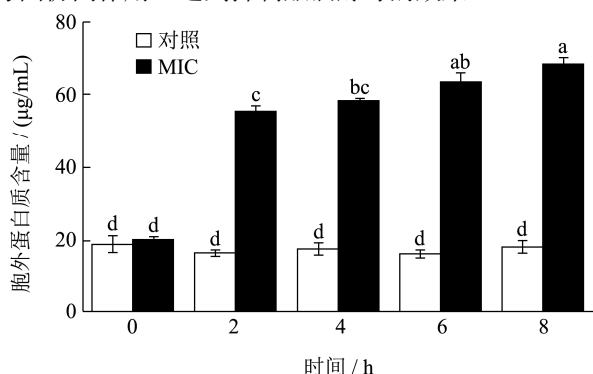


图 8 茶皂素对酿酒酵母蛋白泄露的影响

Fig.8 Effect of tea saponin on protein leakage in *Saccharomyces cerevisiae*

表 3 酿酒酵母胞内总蛋白含量

Table 3 Total intracellular protein content of *Saccharomyces*

<i>cerevisiae</i>	
茶皂素浓度	胞内总蛋白/($\mu\text{g/mL}$)
对照	1677.22 \pm 7.91 ^a
1 MIC	901.66 \pm 3.96 ^b

注: 表中不同字母表示差异显著 ($p<0.05$)。

3 结论

茶皂素对酿酒酵母、鲁氏接合酵母及白色假丝酵

母三种食源性腐败酵母均有抑菌作用, 其中对酿酒酵母的抑菌效果最为显著。以酿酒酵母为指示菌的抑菌机理表明, 茶皂素可阻滞菌体细胞正常生长增殖, 且能显著抑制生物膜形成, 避免了茶皂素对酿酒酵母的抑菌作用的降低; 同时, 茶皂素可使腐败酵母表面塌陷和皱缩, 失去原有形状, 进而破坏细胞膜完整性, 增大细胞膜通透性, 导致胞内核酸、蛋白质等大分子物质泄露, 影响菌体正常物质代谢; 此外, 茶皂素可通过细胞膜渗透进入细胞内, 干扰 DNA 和蛋白质合成, 使细胞无法正常进行遗传信息表达, 扰乱代谢合成进程, 导致细胞死亡, 从而达到抑菌的目的。研究结果表明茶皂素是一种极具潜力的针对食源性腐败酵母的天然防腐剂, 尤其在食品防腐方面具有良好的应用前景。

参考文献

- [1] Betts G D, Linton P, Betteridge R J. Food spoilage yeasts: effects of pH, NaCl and temperature on growth [J]. Food Control, 1999, 10(1): 27-33
- [2] 李国良. 浓缩苹果汁中耐高渗酵母的检测与控制技术[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2012
LI Guoliang. Detection and control technology of hypertonic yeast in concentrated apple juice [D]. Xianyang: Northwest A & F University, 2012
- [3] Stratford M, Steels H, Nebe-von-Caron G, et al. Extreme resistance to weak-acid preservatives in the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 166(1): 126-134
- [4] Deak T. The 11th International Congress on Yeasts (ICY 2004), Rio de Janeiro, Brazil, 15-20 August 2004 [J]. FEMS Yeast Research, 2005, 5(4-5): 485-489
- [5] 王虎玄, 岳田利, 胡仲秋, 等. 陕西浓缩苹果汁中高渗酵母的分离鉴定[J]. 农业机械学报, 2015, 46(4): 246-251
WANG Huxuan, YUE Tianli, HU Zhongqiu, et al. Isolation and identification of hyperosmotic yeast in Shanxi apple juice concentrate [J]. Transactions of the Chinese society for Agricultural Machinery, 2015, 46(4): 246-251
- [6] Choi J H, Kim J, Jeong E T, et al. Preservative effect of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze seed extract in soy sauce and its mutagenicity [J]. Food Research International, 2018, 105: 982-988
- [7] 吕娜. 食品防腐剂苯甲酸钠的毒理学研究[D]. 吉林: 吉林农业大学, 2006
LYU Na. Toxicological study of food preservative sodium benzoate [D]. Jilin: Jilin Agricultural University, 2006

- [8] 杜金婷,李雁,张雁,等.茶皂素提取纯化技术及生物活性研究进展[J].广东农业科学,2021,48(3):167-176
DU Jinting, LI Yan, ZHANG Yan, et al. Research progress on extraction and purification technology and biological activity of tea saponin [J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2021, 48(3): 167-176
- [9] 王佳佳,李国琰,张雁,等.油茶粕中茶皂素连续多级逆流水提工艺的建立[J].食品科学技术学报,2021,39(1):153-161
WANG Jiajia, LI Guoyan, ZHANG Yan, et al. Study on the extraction process of tea saponin from camellia meal [J]. Chinese Journal of Food Science and Technology, 2021, 39(1): 153-161
- [10] 余之蕴,黄宝莹,刘海卿,等.牛津杯法测定食品添加剂对五种益生菌的抑菌活力[J].食品工业,2016,37(1):171-174
SHE Zhiyun, HUANG Baoying, LIU Haiqing, et al. Determination of bacteriostatic activity of food additives to five kinds of probiotics by Oxford cup method [J]. Food Industry, 2016, 37(1): 171-174
- [11] Lan M, Weng M, Lin Z, et al. Metabolomic analysis of antimicrobial mechanism of polysaccharides from *Sparassis crispa* based on HPLC-Q-TOF/MS [J]. Carbohydrate Research, 2021, 503: 108299
- [12] Zhao M, Bai J, Bu X, et al. Microwave-assisted aqueous two-phase extraction of phenolic compounds from *Ribes nigrum* L. and its antibacterial effect on foodborne pathogens [J]. Food Control, 2021, 119: 107449
- [13] 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].山东:齐鲁工业大学,2019
NING Houqi. Antimicrobial peptides of soybean globulin inhibit *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* [D]. Shandong: Qilu University of Technology, 2019
- [14] 李璐.无患子皂苷体内外抗白色念珠菌及其生物膜活性研究[D].无锡:江南大学,2020
LI Lu. Study on the activity of saponins from saponins against *Candida albicans* and its biofilm *in vitro* and *in vivo* [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020
- [15] Hu W, Li C, Dai J, et al. Antibacterial activity and mechanism of *Litsea cubeba* essential oil against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [J]. Industrial Crops and Products, 2019, 130: 34-41
- [16] 刘世旺,徐艳霞,石宏武.虎耳草乙醇提取物对细菌生长曲线的影响[J].安徽农业科学,2007,4:943-944
LIU Shiwang, XU Yanxia, SHI Hongwu. Effect of ethanol extract of *Saxifrage stolonifera* Meerb on growth curve bacterium [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2007, 4: 943-944
- [17] 郭丽丽,王小敏,秦楠,等.黄芪茎叶总皂苷提取物的抑菌活性研究[J].现代食品科技, 2019,35(1):82-88
GUO Lili, WANG Xiaoming, QING Nan, et al. Study on the antibacterial activity of the total saponins extract from the stems and leaves of *Astragalus membranaceus* [J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(1): 82-88
- [18] Enfert C D. Hidden killers: persistence of opportunistic fungal pathogens in the human host [J]. Current Opinion in Microbiology, 2009, 12(4): 358-364
- [19] Chatterjee S, Ghosh R, Mandal N C. Inhibition of biofilm- and hyphal- development, two virulent features of *Candida albicans* by secondary metabolites of an endophytic fungus *Alternaria tenuissima* having broad spectrum antifungal potential [J]. Microbiological Research, 2020, 232: 126386
- [20] Li L, Qiu J, Wei M, et al. Inhibition of *Candida albicans* and induced vaginitis by sapindus water extract [J]. Natural Product Research, 2021, 35(17): 2987-2991
- [21] 何荣荣.海南产茶桔饼成分分析及茶皂素分离提取、抑菌机制与应用研究[D].海口:海南大学,2019
HE Rongrong. Analysis of components, separation and extraction of tea saponin, antibacterial mechanism and application of tea dried cake from Hainan province [D]. Haikou: Hainan University, 2019
- [22] Sieniawska E, Sawicki R, Marchev A S, et al. Tanshinones from *Salvia miltiorrhiza* inhibit *Mycobacterium tuberculosis* via disruption of the cell envelope surface and oxidative stress [J]. Food and Chemical Toxicology, 2021, 156: 112405
- [23] Sung W S, Lee D G. Antifungal action of chlorogenic acid against pathogenic fungi, mediated by membrane disruption [J]. Pure and Applied Chemistry, 2010, 82(1): 219-226
- [24] 宁亚维,付浴男,何建卓,等.苯乳酸和醋酸联用对大肠杆菌的抑菌机理[J].食品科学,2021,42(3):77-84
NING Yawei, FU Yunan, HE Jianzhuo, et al. Inhibition mechanism of phenyllactic acid and acetic acid on *Escherichia coli* [J]. Food Science, 2021, 42(3): 77-84
- [25] 侯晓艳.基于生物信息学与多肽组学的花椒籽抗菌肽筛选及抑菌机理研究[D].雅安:四川农业大学,2019
HOU Xiaoyan. Antimicrobial peptides from Chinese prickly ash seed and their antibacterial mechanism based on bioinformatics and peptide omics [J]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2019

(下转第 327 页)