

水杨酸的抑酶与抑菌作用

郑国兴,张春乐,黄浩,张丽娟,林敏,陈清西*

(厦门大学生命科学学院 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室,福建 厦门 361005)

摘要:以水杨酸为效应物,研究其酶学效应和微生物效应.实验结果表明:水杨酸对马铃薯多酚氧化酶有明显的抑制作用,半抑制率(IC_{50})为 2.05 mmol/L,抑制作用表现为非竞争性的可逆过程,其抑制常数为 2.00 mmol/L.水杨酸对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌 3 种细菌和白色假丝酵母、黑曲霉两种真菌均有明显的抑制作用,其最小抑菌浓度(MIC)分别为 0.75、0.5、0.5、0.25 和 0.75 mg/mL,最小杀菌浓度(MBC)分别为 0.75、1.0、0.5、0.25 和 0.75 mg/mL.本研究为水杨酸在果蔬保鲜中的应用提供实验理论依据.

关键词:水杨酸;马铃薯多酚氧化酶;细菌;真菌;抑制作用

中图分类号:Q 356.1

文献标识码:A

文章编号:0438-0479(2006)S-0019-04

我国水果、蔬菜资源丰富,产量均居世界第一位.然而,因采后处理技术落后,我国果蔬腐烂损失也高居全球榜首,每年因贮藏、运输过程中引起变质的果蔬占总产量的 1/7,造成巨大的经济损失.导致果蔬腐烂变质主要有微生物感染和酶促褐变两种.其中,引起果蔬腐败的微生物主要有细菌、杆菌、霉菌和酵母菌等,有报道表明,黑曲霉侵害洋葱后会形成水浸状软腐病斑导致葱头腐烂^[1], Alvarez 发现阴沟肠杆菌引起了番木瓜采后果实的腐烂^[2].褐变则是果蔬保鲜中的另一难题,不仅影响果蔬的外观与风味,也降低了果蔬的营养及市场价值.果蔬中的褐变主要是酶促褐变,是由多酚氧化酶催化果蔬中酚类物质而产生的.多酚氧化酶(PPO)广泛存在于自然界中,是一种含铜的氧化还原酶,能催化植物体内的酚类物质氧化为相应的醌,醌在果蔬中经过一系列的聚合反应而产生黑斑^[3].因此,目前防止腐烂和褐变已经成为果蔬保鲜的两个重要内容.

本文研究了水杨酸对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌 3 种细菌及白色假丝酵母、黑曲霉两种真菌的抑制作用,同时对水杨酸抑制马铃薯多酚氧化酶的作用机理进行了探讨.以为水杨酸作为一种既能防止果蔬褐变又能抑制果蔬腐烂的新型保鲜剂提供理论依据.

1 材料与方 法

收稿日期:2005-12-22

基金项目:国家自然科学基金(30570408)和福建省科技攻关项目(2004N002)资助

作者简介:郑国兴(1978-),男,硕士研究生.

通讯作者:chenqx@jingxian.xmu.edu.cn

1.1 材 料

水杨酸、 K_2CrO_4 、庆大霉素均为国产分析纯试剂.马铃薯多酚氧化酶由本实验室制备.L-3,4-二羟基苯氨酸(L-DOPA)为 Aldrich 化学公司产品.大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色假丝酵母、黑曲霉均由厦门大学生命科学学院微生物教研室提供.

1.2 方 法

(1) PPO 活力测定

参考文献[4]方法,在 50 mmol/L 磷酸缓冲溶液(pH 6.8)中,以 0.5 mmol/L L-DOPA 为底物,30℃下测定波长为 475 nm 的光密度值(OD_{475})随时间的增长直线,从斜率计算酶的活力,产物的消光系数按 3 700 L/(mol·cm)计算^[5].蛋白质浓度测定采用 Folin 酚法.效应物对酶活力的影响:将效应物溶于二甲亚砜(DMSO)溶液中,取 0.1 mL 含不同浓度的抑制剂于测活体系中,检测酶的剩余活力,对照组加入相同量的 DMSO 以排除其影响.抑制作用的机理通过 Lineweaver-Burk 双倒数作图,比较酶催化反应的动力学参数,包括表观米氏常数(K_m)和最大反应速度(V_m)的变化来判断.

(2) 微生物实验

抑菌实验:采用琼脂渗透法,在已经培养好的斜面培养物中分别加无菌生理盐水 5 mL,用接种环刮下菌苔制成菌悬液,分别取菌悬液 1 mL 加到已融化又冷却至适当温度的 100 mL 普通 LB 琼脂培养基(真菌用马铃薯糖 PDA 琼脂培养基)中,摇匀,即刻倒入无菌培养皿中,待充分冷凝后制成混菌培养基平板备用.实验药物(水杨酸)配于 DMSO 溶液中.实验采用 80 U/mL 的

庆大霉素为细菌标样参照,采用 1 mg/mL 的重铬酸钾水溶液为真菌标样参照.用适当一次性无菌打孔器在平皿内均匀打孔若干,直径约 6 mm,间距不少于 24 mm,孔中距平皿边缘不少于 15 mm,每孔内加入 40 μL 药液.细菌 37 培养 24 h(真菌 28 培养 48 h),量抑菌圈直径的大小^[6].抑制率的计算如下:

$$v = \frac{A - 6}{B - 6} \times 100\%$$

式中, v 为抑制率; A 为水杨酸的抑菌圈直径; B 为标样参照的抑菌圈直径.

最低抑菌浓度 (MIC) 和最低杀菌浓度 (MBC) 的测定:采用微量液体稀释法^[7],用无菌环取 2~3 个生长良好的菌落加入到 10 mL LB 培养基 (真菌用马铃薯糖 PDA 培养基) 中备用.取紫外线灭菌后的 96 孔板一块,每孔加 150 μL LB 液体培养基 (真菌用马铃薯糖 PDA 培养基),再加 40 μL 菌液,然后每孔加 10 μL 药液,每一浓度作 3 复孔,对照组 3 复孔各加 50 μL 菌液.细菌 37 培养 24 h(真菌 28 培养 48 h),以浑浊度为标准肉眼观察无菌生长的药液浓度即为最低抑菌浓度 (MIC),继续培养 24 h 无菌生长的药液浓度即为最低杀菌浓度 (MBC).

2 实验结果

2.1 水杨酸对马铃薯 PPO 抑制作用

以水杨酸为效应物,研究它对马铃薯 PPO 催化 L-DOPA 氧化活力的影响. PPO 催化 L-DOPA 氧化不存在迟滞过程.在反应体系中加入水杨酸后,酶作用的进行曲线为直线关系,其直线的斜率随着加入的水杨酸浓度增大而下降.水杨酸对该酶的抑制效应见图 1,测定导致酶活力下降 50% 所需的抑制剂浓度 (IC_{50}) 为 2.05 mmol/L.

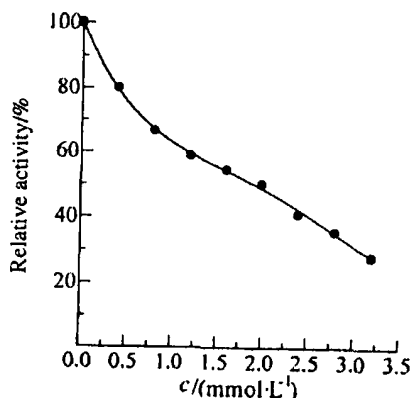


图 1 水杨酸对马铃薯 PPO 活力的影响

Fig 1 Effects of salicylic acid on potato PPO

2.2 水杨酸对马铃薯 PPO 抑制效应

研究水杨酸对马铃薯 PPO 抑制作用类型,在测活

体系中,固定酶的浓度,改变底物 L-DOPA 浓度,测定不同浓度抑制剂对酶的活力的影响.由 Lineweaver-Burk 双倒数作图得到一组横轴截距不变的直线,说明这一组抑制剂不影响米氏常数 (K_m),只影响最大反应速度 (V_m),其抑制机理表现为非竞争性类型,以不同浓度抑制剂下测定的 $1/V_m$ 对抑制剂浓度作图 (图 2 内插图) 为一条直线,从直线的斜率可以求得抑制常数 ($K_i = K_s$) 为 2.00 mmol/L.

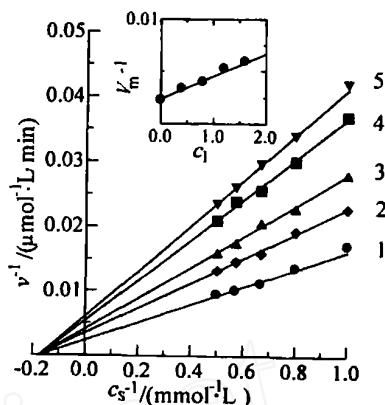


图 2 水杨酸对马铃薯 PPO 抑制效应

线 1~5 水杨酸的浓度为 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 mmol/L

Fig 2 Lineweaver-Burk plots of potato PPO inhibited by salicylic acid

2.3 水杨酸的抑菌作用

实验以 DMSO 为负对照,细菌实验是以 80 U/mL 的庆大霉素作为正参比,对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径分别为 22、20 和 25 mm;真菌实验是以 1 mg/mL 的重铬酸钾为正参比,对白色假丝酵母、黑曲霉的抑菌圈直径分别为 14 和 16 mm.相同实验条件下,40 mg/mL 的水杨酸对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、白色假丝酵母、黑曲霉的抑菌圈直径分别为 18、15、22、12 和 12 mm.实验结果表明,水杨酸对上述实验的 3 种细菌和两种真菌均有显著的抑制作用,见图 3.抑制强度分别可达 75%、64.3%、84.4%、75% 和 60%.在细菌中水杨酸对金黄色葡萄球菌的抑制作用最强,其次为大肠杆菌,再次为枯草芽孢杆菌.在真菌中水杨酸对白色假丝酵母抑制作用较强,对黑曲霉抑制作用较弱.

水杨酸对实验的细菌和真菌的抑制作用呈现浓度效应,结果见表 1,随着水杨酸浓度的增大,抑菌效果越来越明显,抑菌圈的直径呈现浓度梯度效应的线性增大.结果表明,水杨酸对实验细菌中的金黄色葡萄球菌抑制最明显,对实验真菌中白色假丝酵母抑制最明显.

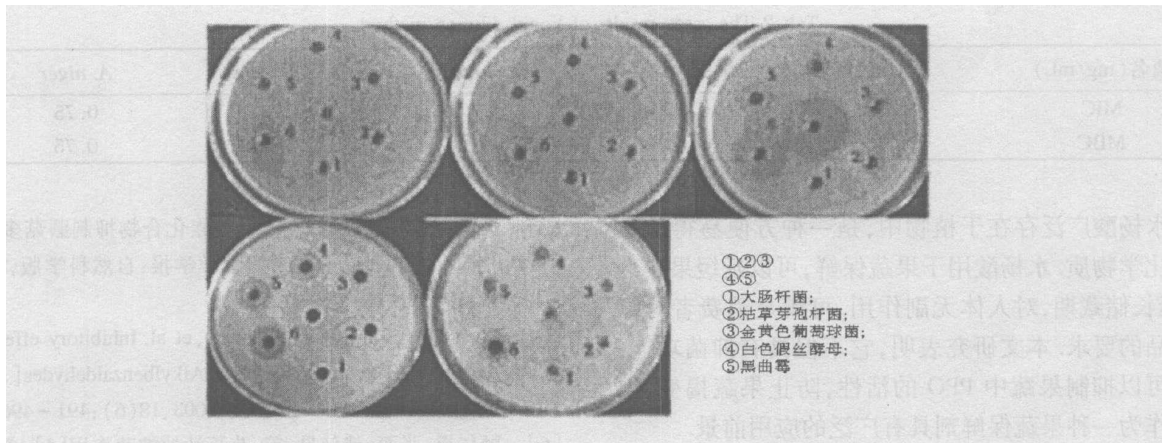


图 3 琼脂渗透法的效果

Fig 3 The result of the agar diffusion method

表 1 琼脂渗透法测定结果

Tab 1 The assay result of the agar diffusion method

效应物	浓度	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>St aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
DMSO	99.0%	-	-	-	-	-
庆大霉素	80 U/mL	22	20 (±)	25	-	-
KClO ₄	1 mg/mL	-	-	-	14 (±)	16 (±)
水杨酸 (mg/mL)	40	18	15	22	12	12
	20	14	12	15	11	10
	10	10	9	11	8	9
	5	9	8	8	7	8

注：“ ± ”表示抑菌圈模糊，“ - ”表示无抑菌圈。

2.4 水杨酸抑菌的剂量效应

实验结果表明,3种细菌中,水杨酸对金黄色葡萄球菌的抑制作用最强,其最低抑菌浓度和最低杀菌浓度都为 0.5 mg/mL,其次为大肠杆菌和枯草芽孢杆菌;两种真菌中,水杨酸对白色假丝酵母的抑制作用较强,其最低抑菌浓度和最低杀菌浓度都为 0.25 mg/mL,对黑曲霉的抑制较弱(表 2)。

3 讨论

据报道水杨酸对于芒果、番茄、苹果、梨、久保桃等果蔬都有较好的保鲜效果^[8,9]。水杨酸可明显降低果蔬在储藏期间的呼吸速率;对采后果蔬的成熟有调节作用,能抑制果蔬成熟中乙烯的产生^[10],降低细胞膜透性和过氧化物酶活性,而且能诱导采后果蔬对病毒、真菌及细菌的抗病性。但水杨酸是否对果蔬褐变产生影响尚未有研究报道。

通过抑菌实验表明,水杨酸对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌 3种细菌和白色假丝酵母、黑曲

霉两种真菌均有明显的抑制作用。其中对细菌中的枯草芽孢杆菌的抑菌效果最好,最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)值均是最小的,分别为 0.5 mg/mL和 0.5 mg/mL。而对于真菌,其对白色假丝酵母抑菌效果更强,MIC和MBC值分别是 0.25 mg/mL和 0.25 mg/mL。说明水杨酸具有明显的抑制细菌和真菌的作用,而且抑菌谱较广,具有防止果蔬腐烂的功效。

本文研究结果表明,水杨酸对于马铃薯 PPO 具有明显的抑制作用,它对该酶的活力表现为可逆非竞争性抑制作用。这说明抑制剂与酶分子的结合及底物分子与酶的结合是相互独立的,抑制剂不改变酶对底物的亲和力;抑制剂可以同时与游离酶(E)和结合酶(ES)结合,且结合常数相同。这也说明了水杨酸在酶分子上的结合位点并不在活性中心,而是活性中心以外的区域。因此,水杨酸作为马铃薯 PPO 的强效抑制剂,可望成为除抑菌功效外,同时能够防止果蔬产生酶促褐变的保鲜剂。

表 2 微量液体稀释法的测定结果

Tab 2 The assay results of liquid dilution method

菌名 (mg/mL)	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>St aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
MIC	0.75	0.5	0.5	0.25	0.75
MBC	0.75	1.0	0.5	0.25	0.75

水杨酸广泛存在于植物中,是一种方便易得的小分子化学物质.水杨酸用于果蔬保鲜,可以延缓果实衰老,延长储藏期,对人体无副作用,可满足消费者对绿色食品的要求.本文研究表明,它不但具有抑菌功能,而且可以抑制果蔬中 PPO 的活性,防止果蔬褐变,因此它作为一种果蔬保鲜剂具有广泛的应用前景.

参考文献:

- [1] 王成云.葱头腐烂的原因及防治对策[J].北方园艺, 2002, 4: 68 - 69.
- [2] Alvarez A M. Postharvest diseases of papaya[J]. Plant Disease, 1987, 71: 681 - 686
- [3] 柯莉娜,王勤,陈清西.联苯基甲醛与联苯基甲酸对蘑菇多酚氧化酶的抑制作用[J].厦门大学学报:自然科学版, 2004, 43(2): 249 - 252
- [4] 黄璜,刘晓丹,陈清西.苯甲醛族化合物抑制蘑菇多酚氧化酶活力的研究[J].厦门大学学报:自然科学版, 2003, 42(1): 98 - 101.
- [5] Chen Q X, Song K K, Wang Q, et al. Inhibitory effects of mushroom Tyrosinase by some Alkylbenzaldehydes[J]. J. Enzym. Inhib. Med. Chem., 2003, 18(6): 491 - 496
- [6] 顾仁勇,张丽,傅伟昌,等.芭蕉汁的抑菌作用[J].食品与发酵工业, 2005, 31(3): 57 - 59.
- [7] 李明,潘小玲,王莉莉,等.人子宫颈黏液抗菌多肽的分离和鉴定[J].中华医学杂志, 2005, 85(16): 1109 - 1112
- [8] 阎田,沈全光,刘存德.水杨酸对果实成熟的影响[J].植物学通报, 1998, 15(3): 61 - 64.
- [9] 荣瑞芬,佟世生,冯双庆.水杨酸对采后芒果和番茄保鲜效果的初步研究[J].食品科学, 2001, 22(3): 79 - 81.
- [10] 李丽萍,韩涛.水杨酸保鲜大久保桃初探[J].食品科学, 1999, 7: 61 - 63

Effect of Salicylic Acid on Potato PPO and Some Microbe

ZHENG Guo-xing, ZHANG Chun-le, HUANG Hao, ZHANG Li-juan,
LI N M in, CHEN Qing-xi*

(Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering,
School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Used salicylic acid as the inhibitor, we studied its inhibitory effect on the activity of potato polyphenol oxidase (PPO) and some bacteria and fungi. Salicylic acid could obviously inhibit the PPO activity and the inhibitor concentration leading to 50% activity lost (IC_{50}) was determined to be 2.05 mmol/L. The inhibition mechanism of salicylic acid belonged to a reversible noncompetitive reaction, and the constant of inhibition (K_i) was 2.00 mmol/L. The inhibition of salicylic acid on some bacteria such as *E. coli*, *S. aureus* and *B. subtilis* and some fungi such as *C. albicans* and *A. niger* has been studied. The values of MIC were determined to be 0.75, 0.5, 0.5, 0.25 and 0.75 mg/mL, respectively, and the values of MBC were 0.75, 1.0, 0.5, 0.25 and 0.75 mg/mL, respectively. This study gave theoretical support for salicylic acid used as food preservative agent.

Key words: salicylic acid; potato PPO; bacterium; fungi; inhibition