

安石榴苷对金黄色葡萄球菌毒力因子表达的抑制作用

Inhibition of punicalagin on the expression of virulence factors of *Staphylococcus aureus*

徐云凤^{1,2} 吴倩³ 樊秋霞² 王新² 夏效东²

XU Yun-feng^{1,2} WU Qian³ FAN Qiu-xia² WANG Xin² XIA Xiao-dong²

(1. 河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471023; 2. 西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100; 3. 绵阳师范学院生命科学与技术学院, 四川 绵阳 621000)

(1. College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471023, China; 2. College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 3. College of Life Science and Biotechnology, Mianyang Teachers' College, Mianyang, Sichuan 621000, China)

摘要:分别采用溶血试验法、凝固酶效价法和酶联免疫反应法检测了安石榴苷处理后金黄色葡萄球菌溶血素、血浆凝固酶和总肠毒素的表达变化,并通过反转录实时荧光定量 PCR 技术检测毒力相关基因的表达情况。结果表明,安石榴苷能显著减少 α -溶血素的产生,但对溶血素的抑制作用未呈现浓度依赖性;在高于 1/4 MIC 浓度下安石榴苷能降低血浆凝固酶的表达;在高于 1/2 MIC 浓度下,安石榴苷显著降低总肠毒素的产生;安石榴苷对肠毒素基因 *sea*、溶血素基因 *hla* 和调节基因 *agrA* 的转录产生显著抑制作用,在 1/8 MIC 浓度下 3 个基因的相对表达量分别为对照组的 3%, 5%, 5%。

关键词:安石榴苷;金黄色葡萄球菌;毒力因子;抑制作用

Abstract: Hemolysis test, coagulase titer assay, and enzyme-linked immunoreaction method were used to detect the expression changes of hemolysin, plasma coagulase, and total enterotoxins after treating with punicalagin. Reverse transcription real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect the expression of virulence-related genes. The results showed that punicalagin could significantly reduce the production of α -hemolysin, but the inhibition effect was not concentration-dependent. At the concentrations of higher than 1/4 MIC, punicalagin could decrease the expression of plasma coagulase. At the concentrations of higher

than 1/2 MIC, punicalagin significantly reduced the production of total enterotoxins. Punicalagin also significantly reduced the transcription of enterotoxin gene *sea*, hemolysin gene *hla*, and regulatory gene *agrA*. The relative expression levels of the three genes were 3%, 5% and 5% of the control group at 1/8 MIC of punicalagin, respectively.

Keywords: punicalagin; *Staphylococcus aureus*; virulence factors; inhibition

金黄色葡萄球菌是一类革兰氏阳性兼性厌氧菌,在自然界中广泛存在,对生长环境要求低、环境耐受性强^[1],可污染从农田到餐桌的任何一个环节,给人类健康带来严重的安全隐患。据报道^[2],2011~2016 年,在中国由金黄色葡萄球菌导致的食源性疾病爆发案例 314 起,患病人数 5 196 人,死亡 1 人,仅次于副溶血性弧菌和沙门氏菌,位居第 3 位。在美国,金黄色葡萄球菌和大肠杆菌 O157:H7、沙门氏菌、单核细胞增生李斯特菌、弯曲杆菌被认为是污染新鲜农产品的最重要的食源性致病菌^[3]。金黄色葡萄球菌能够产生多种毒力因子,例如溶血素、肠毒素、血浆凝固酶、毒性休克综合征毒素等^[4-5]。这些毒力因子主要为外毒素和侵袭性酶,或作为胞外蛋白分泌到环境中(包括食品基质),或作为菌体表面蛋白在细菌侵染宿主的过程中发挥作用^[6]。金黄色葡萄球菌致病性的强弱在很大程度上取决于其产生的毒力因子^[7],因此研究如何抑制和降低其毒力因子的表达是一个重要的课题。

近年来,由于抗生素的滥用,导致金黄色葡萄球菌出现了不同程度的耐药性,此外,消费者对合成防腐剂的安

基金项目:河南科技大学博士科研启动基金项目(编号:13480067)

作者简介:徐云凤,女,河南科技大学讲师,博士。

通信作者:夏效东(1981—),男,西北农林科技大学教授,博士。

E-mail: foodscxiaodong@yahoo.com

收稿日期:2019-04-09

全性也存在质疑,很多研究者^[8]把目光转移到天然产物,尤其是植物源天然活性物质上。许多植物化合物,如多酚类、萜类以及生物碱等,在体外研究中均被发现具有一定的抑制微生物生长或毒力因子表达的作用^[9-10]。因而从植物中探索安全有效的天然产物用于预防和控制食源性致病菌(如金黄色葡萄球菌)具有十分重要的意义。

安石榴苷是石榴皮中重要的生物活性物质。据报道,安石榴苷具有抑菌^[11]、抗病毒^[12]、抗氧化^[13]、抗炎症^[14]、抗癌^[15]等多种生物活性作用。前期研究^[16]表明,安石榴苷对金黄色葡萄球菌表现出良好的抑菌效果,最小抑菌浓度(MIC)为 0.25 mg/mL,然而安石榴苷对金黄色葡萄球菌毒力因子的表达影响尚不清楚。试验拟对安石榴苷处理后的金黄色葡萄球菌的溶血活性、凝固酶活性和产肠毒素情况进行测定,并采用反转录实时荧光定量 PCR 技术检测相关毒力基因的表达情况,以期对金黄色葡萄球菌的控制和安石榴苷的开发利用提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

安石榴苷:纯度 $\geq 98\%$,成都曼思特生物科技有限公司;

金黄色葡萄球菌:ATCC 29213,美国模式培养物集存库,保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱;

胰蛋白胨大豆琼脂培养基、脑心浸液培养基、新鲜无菌脱纤维羊血、冻干兔血浆:北京陆桥技术股份有限公司;

无菌滤膜:0.22 μm 孔径,美国 Millipore 公司;

总肠毒素检测试剂盒:德国 R-Biopharm 公司;

引物:上海捷瑞生物工程有限公司;

石英砂(二氧化硅):分析纯,成都市科龙化工试剂厂;

溶菌酶:20 000 U/mg,美国 Amresco 公司;

溶葡萄球菌素、琼脂糖:美国 Sigma 公司;

EasyTaq[®] DNA 聚合酶:北京全式金生物技术有限公司;

细菌总 RNA 提取试剂盒:天根生化科技(北京)有限公司;

反转录试剂盒、SYBR 试剂盒:宝生物工程(大连)有限公司。

1.1.2 仪器与设备

恒温培养箱:DPX-9082 B-2 型,上海福玛实验设备有限公司;

超净工作台:YT-CJ-IND 型,北京亚泰科隆仪器技术有限公司;

冷冻离心机:5804R 型,德国 Eppendorf 公司;

PCR 仪:9600 型,珠海黑马医学仪器有限公司;

电泳仪:1645050 型,美国 Bio-Rad 公司;

实时荧光定量 PCR 仪:iQ5 型,美国 Bio-Rad 公司;

台式恒温振荡器:TH2-312 型,上海精宏实验设备有限公司;

酶标仪:680 型,美国 Bio-Rad 公司;

超微量核酸分析仪:Nano-200 型,杭州奥盛仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌种活化及菌悬液制备 从冰箱取出金黄色葡萄球菌,于胰蛋白胨大豆琼脂平板上活化培养。挑取单菌落于装有脑心浸液培养基的试管中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 12 h。然后用新鲜无菌的脑心浸液培养基将菌悬液的吸光度调至 $OD_{600\text{ nm}}=0.5$ (含菌量约为 10^8 CFU/mL)。

1.2.2 菌落计数 采用梯度稀释法将安石榴苷母液在无菌的 10 mL 离心管中进行稀释,使其浓度分别为 0, 1/8 MIC, 1/4 MIC, 1/2 MIC, 1 MIC, 2 MIC。加入等体积 2 倍浓度的脑心浸液培养基,使安石榴苷最终浓度为 0, 1/16 MIC, 1/8 MIC, 1/4 MIC, 1/2 MIC, 1 MIC, 此时培养基的浓度变为 1 倍正常浓度。将上述菌悬液按照 1%(体积分数)的接菌量接入到培养液中,混合均匀, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 130 r/min 条件下震荡培养 24 h 后,进行系列 10 倍稀释,涂板计数。

1.2.3 溶血活性的测定 参照 Worlitzsch 等^[17]的方法测定溶血活性,修改如下:将上述菌悬液按 1%的接菌量接入到含有安石榴苷的脑心浸液培养基中,使安石榴苷的终浓度分别为 0, 1/16 MIC, 1/8 MIC, 1/4 MIC, 1/2 MIC, 1 MIC, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 130 r/min 条件下震荡培养 24 h, 12 000 r/min 离心 5 min,将上清液用 0.22 μm 孔径的无菌滤膜过滤。取 475 μL 过滤后的样品上清液于 1.5 mL 离心管中,加入 25 μL 无菌脱纤维羊血,轻摇混匀, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。3 000 r/min 离心 1 min,吸取 200 μL 上清液,转移到 96 孔板中,450 nm 下测定其吸光值。以不含安石榴苷的菌悬液上清作为阳性对照,以无菌脑心浸液培养基经过同样处理后作为空白对照。

1.2.4 凝固酶效价的测定 吸取 0.5 mL 无菌生理盐水加入到冻干血浆西林瓶中,摇匀使之充分溶解,再加入上述不同浓度安石榴苷处理的金黄色葡萄球菌培养液 0.3 mL,混合均匀后于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱内静置。在 6 h 以内,每间隔 1 h 观察 1 次结果,若出现凝固现象,即认为待测菌液的血浆凝固酶为阳性,否则为阴性^[18]。

1.2.5 总肠毒素的检测 采用三明治(夹心)酶联免疫反应法^[19]检测安石榴苷对金黄色葡萄球菌总肠毒素表达量的影响。样品处理方式同 1.2.3,取无菌滤液稀释 5 倍后进行检测。将酶联免疫试剂盒中所有试剂温度恢复至室

温,然后于室温下按照试剂盒说明书进行操作。

将所需数量的微孔条插入到框架中,向每个微量滴定孔中加 100 μL 样品或阳性对照,轻摇混匀,包上封口膜,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h;将液体全部倒掉,在吸水纸上轻轻拍打至倾倒完全,加入 300 μL 洗涤缓冲液,重复操作 5 次;加入 100 μL 酶连接物 1 溶液,用手轻轻摇动使其混匀,封口,37 $^{\circ}\text{C}$ 再孵育 1 h;重复洗涤步骤;加入 100 μL 酶连接物 2 溶液,轻摇混匀,封口,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min;再次重复洗涤步骤;加入 100 μL 底物/发色剂,轻摇混匀,封口,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下避光孵育 15 min;加入 100 μL 反应终止液,在 30 min 内用酶标仪在 450 nm 处测量每个孔的吸光值。

1.2.6 qRT-PCR 法检测毒力基因的表达

(1) 引物序列及特异性检测:引物序列参照 Qiu 等^[20]所使用的序列。取 1 mL 在脑心浸液培养基中过夜培养的金黄色葡萄球菌菌液,离心(12 000 r/min, 2 min),弃上清液,加入 1 mL 无菌水后于干浴器中 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热煮沸 20 min;4 $^{\circ}\text{C}$,12 000 r/min 条件下离心 5 min,并取上清液作为 PCR 反应的模板。反应体系如表 1 所示,反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,52 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min。取 5 μL PCR 产物在 1 g/100 mL 的琼脂糖凝胶中进行电泳,缓冲溶液为 0.5 $\times$ TBE。EB 染色后在凝胶成像系统下观察在目标位置有无条带出现,且有无杂带。

表 1 PCR 反应体系

Table 1 PCR reaction system μL	
试剂	体积
模板	4
上游引物	1
下游引物	1
EasyTaq DNA 聚合酶	1
10 $\times$ EasyTaq 缓冲液	5
2.5 mmol/L dNTPs	4
灭菌蒸馏水	34
总计	50

(2) RNA 的提取:按天根细菌/细胞 RNA 提取试剂盒说明进行细菌 RNA 的提取,由于金黄色葡萄球菌细胞壁比较厚,破碎困难,在操作中加入溶葡萄球菌素处理和石英砂震荡破碎的步骤。

按上述方法进行给药处理,24 h 后,取 1 mL 菌悬液于 1.5 mL 无 RNA 酶离心管中(离心管预先装有 20~30 mg 石英砂,并高压灭菌处理),12 000 r/min,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 2 min,弃上清,用无菌水洗涤 1 次;用含 3 mg/mL 溶菌酶的 100 μL TE 缓冲液重悬菌体,室温孵育 15 min;加入 10 $\mu\text{g/mL}$ 溶葡萄球菌素 3 μL ,继续孵育 5 min;加

入 350 μL 裂解液,涡旋振荡 1 min,冰浴 2 min,重复 5 次,12 000 r/min 离心 2 min,将上清液转移至另一离心管中;加入 250 μL 无水乙醇,混匀,转入吸附柱中,余下操作按试剂盒说明书进行,最终得到 RNA 溶液。用微量核酸蛋白测定仪测定 RNA 的浓度和纯度,将 RNA 的浓度调为一致。

(3) 反转录反应:按照试剂盒说明书进行操作。

(4) RT-PCR:按照试剂盒说明书进行操作。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,1 个循环;95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,40 个循环(荧光定量);95 $^{\circ}\text{C}$ 、15 s,1 个循环;60~90 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,71 个循环(溶解曲线)。

毒力相关基因相对定量结果以 16S rRNA 作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法表示。 $\Delta\Delta Ct$ 按式(1)计算。

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_4 - Ct_3) - (Ct_2 - Ct_1), \quad (1)$$

式中:

$\Delta\Delta Ct$ ——处理组和对照组之间校正过的循环数变化;

Ct_4 ——安石榴苷处理组目的基因的平均 Ct 值;

Ct_3 ——安石榴苷处理组内参基因的平均 Ct 值;

Ct_2 ——对照组目的基因的平均 Ct 值;

Ct_1 ——对照组内参基因的平均 Ct 值。

1.3 数据处理

所有试验重复 3 次,试验结果以(平均数 $\pm$ 标准偏差)表示,使用 SPSS 19.0 统计软件分析和处理数据,采用 Tukey 法进行差异显著性检验, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 安石榴苷对细菌生长的影响

通过菌落计数得知,起始接种量为 $(3.45 \pm 0.17) \times 10^6$ CFU/mL。培养 24 h 后,每个管内的菌落数如表 2 所示,随着安石榴苷浓度的增加,金黄色葡萄球菌的数量减少,安石榴苷以浓度依赖的方式抑制金黄色葡萄球菌的生长,在低于 1/8 MIC 浓度下,安石榴苷对细菌生长的影响较小。

2.2 安石榴苷对金黄色葡萄球菌溶血活性的影响

如图 1 所示,安石榴苷能够抑制金黄色葡萄球菌溶血素的产生。安石榴苷处理组的溶血活性与阳性对照组

表 2 菌落计数

Table 2 Cell enumeration CFU/mL	
组别	菌数
对照	$(8.17 \pm 0.04) \times 10^8$
1/16 MIC	$(7.92 \pm 0.58) \times 10^8$
1/8 MIC	$(5.04 \pm 0.34) \times 10^8$
1/4 MIC	$(1.83 \pm 0.57) \times 10^8$
1/2 MIC	$(4.55 \pm 0.37) \times 10^7$
1 MIC	$(8.43 \pm 1.55) \times 10^6$

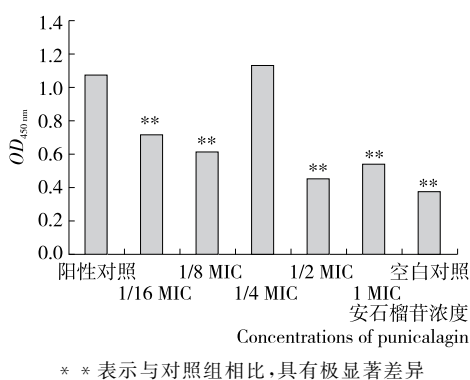


图1 溶血素活性试验

Figure 1 Hemolysin assay

相比显著降低,且具有极显著差异,只有在 1/4 MIC 浓度下与对照组无显著性差异,该浓度下所表现出的特异性的原因尚不清楚。总之,安石榴苷对金黄色葡萄球菌的溶血活性有抑制作用,但抑制作用未呈现明显的剂量依赖性。溶血素作为一种外毒素是造成金黄色葡萄球菌感染的重要的毒力因子^[21],安石榴苷能够降低溶血素的表达,具有潜在的抗感染作用。

2.3 安石榴苷对金黄色葡萄球菌凝固酶表达的影响

向血浆中加入金黄色葡萄球菌培养液后,每隔 1 h 轻轻倾斜西林瓶,观察是否有凝固现象。结果发现,1 h 后,对照组已完全凝固,1 MIC 的安石榴苷处理组未发生凝固,1/2 MIC,1/4 MIC 处理组呈半凝固状态,而 1/8 MIC 和 1/16 MIC 处理组则完全凝固。连续观察至 6 h,仍为上述结果。可见,安石榴苷能够以剂量依赖的形式抑制金黄色葡萄球菌凝固酶的表达。血浆凝固酶是一种侵袭性酶,其作用是使血浆中的纤维蛋白在菌体表面沉积和凝固以阻碍吞噬细胞的吞噬^[22]。安石榴苷能够降低血浆凝固酶的表达,从而降低金黄色葡萄球菌的侵袭力。

2.4 安石榴苷对金黄色葡萄球菌总肠毒素表达的影响

由图 2 可知,在 1/4 MIC,1/8 MIC,1/16 MIC 浓度下

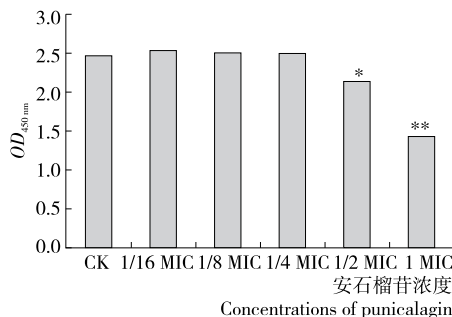


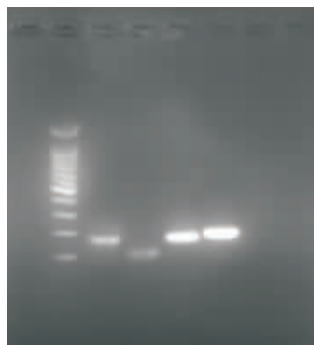
图2 安石榴苷对金黄色葡萄球菌肠毒素表达的影响

Figure 2 Effect of punicalagin on the expression of *S. aureus* enterotoxins

总肠毒素表达量与对照组无显著性差异,经 1/2 MIC 的安石榴苷处理后肠毒素的表达量显著降低,1 MIC 的安石榴苷处理后肠毒素的表达量极显著降低。肠毒素是引起金黄色葡萄球菌食物中毒的主要原因^[23],安石榴苷能够抑制金黄色葡萄球菌肠毒素的产生,具有预防金黄色葡萄球菌食物中毒的潜力。

2.5 安石榴苷对金黄色葡萄球菌毒力基因表达的影响

经琼脂糖凝胶电泳对 PCR 扩增产物检测后,可见凝胶中均为单一条带,未发现非特异性条带(图 3),说明每对引物的特异性良好,可用于后续的 RT-PCR 反应。由图 4 可知,每个基因的溶解曲线均为单个峰,再次说明 4 个基因的引物的特异性较强,扩增产物单一。



自左向右依次为 100 bp DNA 分子量标准、*sea*、*hla*、*agrA*、16S rRNA

图3 待测基因 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

Figure 3 Agarose gel electrophoresis result of PCR products from genes to be tested

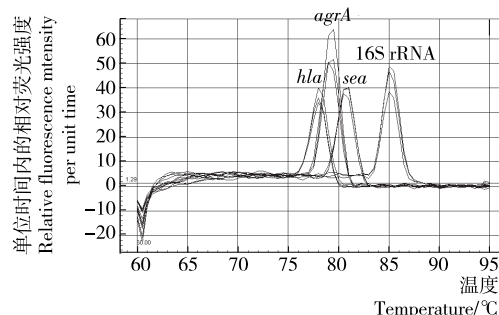


图4 qRT-PCR 溶解曲线

Figure 4 qRT-PCR dissociation curves

由图 5 可知,当安石榴苷的浓度为 1/8 MIC 时,所检测基因的相对表达量均有不同程度的下降,肠毒素基因 *sea* 和溶血素基因 *hla* 的相对表达水平分别是对照组的 3%,5%,调节基因 *agrA* 的相对表达量为对照组的 5%,且均与对照组具有极显著性差异($P < 0.01$);在 1/16 MIC 浓度下,*hla* 的表达量为对照组的 68%,差异极显著,*sea* 与 *agrA* 的表达量与对照组无显著性差异。安石榴苷对肠毒素表达的抑制作用在 mRNA 水平与蛋白水平上无

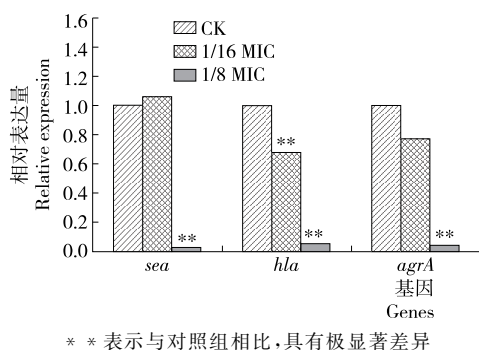


图 5 安石榴苷对金黄色葡萄球菌毒力相关基因表达的影响

Figure 5 Effect of punicalagin on the expression of *S. aureus* virulence related genes

很好的相关性,可能是由于 mRNA 水平代表的是上游转录因子的激活,而转录后的修饰、翻译等一系列过程对肠毒素的表达量也有直接影响。金黄色葡萄球菌在对数中后期合成的细胞膜表面蛋白和胞外蛋白受到由多个元件组成的复杂调控网络的控制,本研究中,通过 qRT-PCR 技术检测到安石榴苷对 *agrA* 的转录有抑制作用,故安石榴苷降低毒力因子的表达部分依赖于 *agr* 二元调控系统。

3 结论

安石榴苷以浓度依赖的方式抑制金黄色葡萄球菌的生长,且对溶血素、血浆凝固酶和肠毒素的表达发挥明显的抑制作用。安石榴苷能够显著减少 α -溶血素的产生,但对溶血素的抑制作用未呈现浓度依赖性;在高于 1/4 MIC 浓度下安石榴苷能够降低血浆凝固酶的表达,使血浆未发生明显凝固;通过酶联免疫反应法检测到在高于 1/2 MIC 浓度下,安石榴苷能显著降低总肠毒素的产生量;安石榴苷能显著抑制肠毒素基因 *sea*、溶血素基因 *hla* 和调节基因 *agrA* 的转录。然而,安石榴苷在食品介质中的抑菌和抗毒力因子表达的效果尚不清楚,有待进一步研究。

参考文献

- [1] 李毅. 金黄色葡萄球菌及其肠毒素研究进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2004, 14(4): 392-395.
- [2] LIU Ji-kai, BAI Li, LI Wei-wei, et al. Trends of foodborne diseases in China: Lessons from laboratory-based surveillance since 2011[J]. Frontiers of Medicine, 2018, 12(1): 48-57.
- [3] WADAMORI Y, GOONERATNE R, HUSSAIN M A. Outbreaks and factors influencing microbiological contamination of fresh produce[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2017, 97(5): 1396-1403.
- [4] KONG C, NEOH H M, NATHAN S. Targeting *Staphylo-*

- coccus aureus* toxins: A potential form of anti-virulence therapy[J]. Toxins, 2016, 8(3): 1-21.
- [5] 张丽琴, 张金科. 正确认识金黄色葡萄球菌[J]. 内蒙古医学杂志, 2012, 44(17): 13-15.
- [6] OLIVEIRA D, BORGES A, SIMOES M. *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases[J]. Toxins, 2018, 10(6): 1-19.
- [7] 赵丽萍. 金黄色葡萄球菌 *AI-2* 群体感应系统的调控[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2010: 19.
- [8] CHIBANE L B, DEGRAEVE P, FERHOUT H, et al. Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2019, 99(4): 1457-1474.
- [9] SILVA L N, ZIMMER K R, MACEDO A J, et al. Plant natural products targeting bacterial virulence factors [J]. Chemical Reviews, 2016, 116(16): 9162-9236.
- [10] BORGES A, SAAVEDRA M J, SIMOES M. Insights on antimicrobial resistance, biofilms and the use of phytochemicals as new antimicrobial agents [J]. Current Medicinal Chemistry, 2015, 22(21): 2590-2614.
- [11] TAGURI T, TANAKA T, KOUNO I. Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2004, 27(12): 1965-1969.
- [12] LIN Liang-tzung, CHEN Ting-ying, LIN Song-chow, et al. Broad-spectrum antiviral activity of chebulagic acid and punicalagin against viruses that use glycosaminoglycans for entry[J]. BMC Microbiology, 2013, 13(187): 1-15.
- [13] KULKARNI A P, ARADHYA S M, DIVAKAR S. Isolation and identification of a radical scavenging antioxidant-punicalagin from pith and carpellary membrane of pomegranate fruit[J]. Food Chemistry, 2004, 87(4): 551-557.
- [14] XU Xiao-long, YIN Peng, WAN Chang-rong, et al. Punicalagin inhibits inflammation in LPS-induced RAW264.7 macrophages via the suppression of TLR4-mediated MAPKs and NF- κ B activation[J]. Inflammation, 2014, 37(3): 956-965.
- [15] AQIL F, MUNAGALA R, VADHANAM M V, et al. Anti-proliferative activity and protection against oxidative DNA damage by punicalagin isolated from pomegranate husk[J]. Food Research International, 2012, 49(1): 345-353.
- [16] XU Yun-feng, SHI Chao, WU Qian, et al. Antimicrobial activity of punicalagin against *Staphylococcus aureus* and its effect on biofilm formation[J]. Foodborne Pathogens & Disease, 2017, 14(5): 282-287.
- [17] WORLITZSCH D, KAYGIN H, STEINHUBER A, et al. Effects of amoxicillin, gentamicin, and moxifloxacin on the hemolytic activity of *Staphylococcus aureus* *in vitro* and *in vivo*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001, 45(1): 196-202.

(下转第 54 页)

3 结论

研究表明,黄精多糖可减小样品失水过程的 k 值和解吸速率,将黄精多糖作为烟丝保润剂时,其保润效果显著优于丙二醇及其他多糖保润剂;黄精多糖可增加烟丝的化学结合水含量,进而提高烟丝的长效保润能力。因此,黄精多糖可替代丙二醇作为烟草保润剂,防止烟丝在低湿条件下水分的散失。同时,多糖的保润性能也与其结构和链长有关,通过适当的工艺(如酶解、酸降解)改变多糖的链长,可进一步提高其保润性能,改善烟丝中的水分稳定性。

参考文献

- [1] 马晓静,刘新歌,徐志强,等. 槐糖脂的保润性能及其在卷烟中的应用[J]. 安徽农业大学学报, 2017, 44(2): 356-362.
- [2] 陈文,王楠,张民,等. 燕麦多糖的纤维素酶降解及理化性质分析[J]. 中国食品添加剂, 2014(2): 159-163.
- [3] 王笑月,刘效兰,薛燕,等. 黄精及其复配植物多糖提取工艺优化及人体保湿评价[J]. 食品与机械, 2018, 39(5): 221-225.
- [4] 陶陶,贺凡,姬小明,等. 响应面法优化闪式提取葫芦巴多糖及其保润性能研究[J]. 精细化工, 2016, 33(6): 666-673.
- [5] QI Jia, KIM S M. Characterization and immunomodulatory activities of polysaccharides extracted from green alga *Chlorella ellipsoidea*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 95: 106-114.
- [6] 陈芝飞,郝辉,孙志涛,等. 灵芝多糖、提取纯化方法及其作为烟草保润剂的应用: 中国, 103965369A[P]. 2014-08-06.
- [7] WANG Jing, JIN Wei-hua, HOU Yun, et al. Chemical composition and moisture-absorption/retention ability of polysaccharides extracted from five algae[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 57(6): 26-29.
- [8] YAN Heng, CAI Bing, CHENG Yan, et al. Mechanism of lowering water activity of konjac glucomannan and its derivatives[J]. Food Hydrocolloids, 2012, 26(2): 383-388.
- [9] 徐迎波,陈开波,徐志强,等. 卷烟烟丝食用蜡复配保润剂的保润性能及应用[J]. 食品与机械, 2017, 33(2): 179-182.
- [10] ERTEKIN C, YALDIZ O. Drying of eggplant and selection of a suitable thin layer drying model[J]. Journal of Food Engineering, 2004, 63(3): 349-359.
- [11] DOYMAZ Ibrahim. Drying behaviour of green beans[J]. Journal of Food Engineering, 2005, 69(2): 161-165.
- [12] 田大昕,冀小雄,毛海波,等. 几种天然多糖的吸湿和保湿性能的初步研究[J]. 化学与生物工程, 2007, 24(10): 46-48.
- [13] 艾绿叶,冯雪研,张昊,等. 羧甲基烟叶多糖的持水性及热解产物研究[J]. 食品工业科技.[2019-02-01]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1759.TS.20180918.1705.015.htm>.
- [14] SHAO Ping, CHEN Xiao-xiao, SUN Pei-long. Improvement of antioxidant and moisture-preserving activities of sargassum horneri polysaccharide enzymatic hydrolyzates[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 74: 420-427.
- [15] 韩聃. 卷烟吸湿规律及机制研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014: 10-26.
- [16] 殷春燕,徐志强,汪华,等. 贮藏过程中不同保润剂对烟丝保润效果及水分散失动力学的影响[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2014, 42(1): 96-101.
- [17] WEI Shuo, TIAN Bing-qiang, JIA Hong-fang, et al. Investigation on water distribution and state in tobacco leaves with stalks during curing by LF-NMR and MRI[J]. Drying Technology, 2018, 36(4): 1-8.
- [18] 钱静漪,王梦茹,张宁宁,等. 亚抑菌浓度茅苍术挥发油对金黄色葡萄球菌毒力因子表达的抑制作用初步研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2014, 9(5): 408-411.
- [19] OSTYN A, GUILLIER F, PRUFER A L, et al. Intra-laboratory validation of the Ridascreen® SET total kit for detecting staphylococcal enterotoxins SEA to SEE in cheese[J]. Letters in Applied Microbiology, 2011, 52(5): 468-474.
- [20] QIU Jia-zhang, FENG Hai-hua, LU Jing, et al. Eugenol reduces the expression of virulence-related exoproteins in *Staphylococcus aureus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(17): 5 846-5 851.
- [21] 徐晓,王欢,吕火焯. 金黄色葡萄球菌溶血素的研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2017, 29(6): 720-724, 730.
- [22] 刘宏巨. 关于影响葡萄球菌血浆凝固酶试验因素的探讨[J]. 临床医药实践, 2009, 18(24): 578-579.
- [23] 云盛,索晓敏,徐正挺,等. 金黄色葡萄球菌肠毒素检测的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(19): 3 756-3 758.
- [12] 王振中,林孔勋. Weibull 曲线拟合方法的研究: 优选法在拟合植物病害流行方程的应用[J]. 华南农业大学学报, 1986(1): 17-20.
- [13] 刘泽,李斌,于川芳. 复合传热对薄层烟丝干燥强化传质作用的动力学分析[J]. 烟草科技, 2009, 42(11): 5-10.
- [14] 徐德龙,戴永生,金殿明,等. 干燥脱水条件对片烟复水特性的影响[J]. 烟草科技, 2013, 46(4): 5-8, 15.
- [15] 孙志涛,崔凯,霍现宽,等. 盒包材料对烟支水分散失速率的影响[J]. 烟草科技, 2017, 50(7): 82-87.
- [16] 马骥,崔凯,陈芝飞,等. 滤嘴对卷烟物理保润性能的影响[J]. 烟草科技, 2016, 49(3): 68-76.
- [17] 白峻文,王吉亮,肖红伟,等. 基于 Weibull 分布函数的葡萄干干燥过程模拟及应用[J]. 农业工程学报, 2013, 29(16): 278-285.
- [18] 张峻松,李强,崔凯,等. 不同烟草原料物理保润性能影响因素研究[J]. 轻工学报, 2016, 31(2): 47-53.
- [19] 巨浩羽,肖红伟,郑霞,等. 干燥介质相对湿度对胡萝卜片热风干燥特性的影响[J]. 农业工程学报, 2015, 31(16): 296-304.

(上接第 14 页)

(上接第 48 页)