

紫甘薯花色苷色素的抑菌作用研究

韩永斌¹ 朱洪梅² 顾振新^{1*} 范龚健¹

(1. 南京农业大学农业部农畜产品加工与质量控制重点开放实验室 南京 210095)

(2. 山西师范大学生命科学学院 临汾 041004)

摘要: 本文研究了紫甘薯花色苷色素抑制大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、啤酒酵母和黑曲霉的作用及机理。结果表明: 紫甘薯花色苷色素对大肠杆菌及金黄色葡萄球菌均有抑制作用, 并与其浓度呈正相关, 而对啤酒酵母和黑曲霉无抑制作用。透射电镜观察和大肠杆菌生长曲线表明, 该色素的抑菌作用可能是通过增强细胞膜的通透性, 使细胞异常生长, 抑制对数生长期的细胞分裂, 使细胞质稀薄、细胞解体。SDS-PAGE 分析表明, 紫甘薯花色苷对大肠杆菌蛋白表达影响不明显, 未见特征性条带的消失, 仅对部分蛋白质合成量有影响。

关键词: 紫甘薯, 花色苷, 抑菌作用

Inhibitory Effect of Purple Sweet Potato Pigments on some Microorganisms

HAN Yong-Bin¹ ZHU Hong-Mei² GU Zhen-Xin^{1*} FAN Gong-Jian¹

(1. Key Laboratory of Food Processing and Quality Control, Ministry of Agriculture, NAU, Nanjing 210095)

(2. College of Life Sciences, Shanxi Normal University, Linfen 041004)

Abstract: Inhibitory effect of purple sweet potato pigments (PSPPs) on *E. coli*, *Staph. aureus*, *Sacc. cerevisiae* and *Asp. niger* was investigated in this paper. The results showed that *E. coli* and *Staph. aureus* could be inhibited strongly by PSPPs and dependent on the concentration of PSPPs, but no inhibitive effect of PSPPs on *Sacc.cerevisiae* and *Asp. niger* was observed. Observation under Transmission Electron Microscope was carried out and growth curve of *E. coli* was plotted out. It was indicated that PSPPs might change the permeability of cell membrane, make cell excrescent and inhibit cell division. As a result, cytoplasm could become thin, disassembled and even die. SDS-PAGE analysis suggested that PSPA have some influence on some proteins synthesis, but no disappearance of special protein lines be found.

Keywords: Purple sweet potato, Anthocyanins, Antibacterial effect

紫甘薯(*Ipomoea batatas* L.)系旋花科一年生草本植物, 块根肉质紫红色。紫甘薯花色苷的主要成分是矢车菊色素和芍药色素^[1-3], 且具有抗氧化和保健功能^[4,5]。花色苷作为抑菌物质使用有不产生耐药

性、不会导致环境的污染等特点。目前关于花色苷的抑菌功能报道较少, 程翠林^[6]等和岳静^[7]等分别用牛津杯法初步探讨了大花魁花色苷抑菌作用和紫甘薯红色素体外抑菌性, 但关于花色苷的抑菌作用

机制尚未研究。本文研究了紫甘薯花色苷抑菌谱及对致病菌抑制作用机理等,旨在为开发花色苷新的功能特性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 紫甘薯: 选用新鲜、无病虫害、无霉烂的紫甘薯块根作实验材料,品种为“川山紫”,由徐州甘薯研究所提供。紫甘薯清洗后切成 5 mm × 8 mm 薄片,50℃条件下烘干粉碎过 100 目筛后备用。

1.1.2 紫甘薯花色苷色素的制备: 紫甘薯粉用酸化乙醇溶液(95%乙醇:1 mol/L 盐酸=9:1, V/V)提取 3 h,于 10000 r/min 下离心 20 min,取上清液。用石油醚脱脂(浸提液:石油醚=1:2),减压浓缩后再上 AB-8 大孔树脂柱用酸化水(0.01% HCl)除去多糖等水溶性杂质,用 0.01% HCl 乙醇为洗脱剂洗脱花色苷,所得溶液减压浓缩(40)得紫甘薯色素浓缩液(花色苷含量为 189.62 mg/L)。

1.1.3 供试菌种: 大肠杆菌(*E. coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staph. aureus*)、黑曲霉(*Asp. niger*)和啤酒酵母(*Sacc. cerevisiae*),由南京中医药大学病原与免疫学实验室提供。

1.2 实验方法

1.2.1 敏感性实验: 在培养皿中倾倒 20 mL 培养基,待培养基冷却后,将 0.10 mL 菌液(10^5 CFU/mL)均匀涂布于培养基上,灭菌的牛津杯置于培养皿中。再将 0.05 mL 花色苷溶液加入牛津杯中,同时设空白对照^[8]。大肠杆菌和金黄色葡萄球菌置于恒温培养箱中 37℃ 培养 72 h,啤酒酵母、霉菌置于恒温培养箱中 28℃ 培养 36 h。

1.2.2 最低抑菌浓度实验: 取紫甘薯花色苷用一定量灭菌水溶解后采用二倍稀释法^[9]加入培养基中,然后将稀释后的大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、黑曲霉和酵母(10^5 CFU/mL)接种于各试管中,分别于 37℃ 和 28℃ 培养箱内恒温培养 24 h 后,以完全无菌生长的最高稀释度的最低抑菌浓度(MIC)考察紫甘薯花色苷的抑菌作用。

1.2.3 抑制大肠杆菌实验: 大肠杆菌培养至对数生长期时,按 5% 接种量分别接种于 100 mL LB 液体培养基(培养基配方为:牛肉膏 0.5%,蛋白胨 1%,NaCl 0.5%,pH 7.2)中,于 37℃ 150 r/min 培养,分别于

0 h、2 h、4 h、6 h、8 h、10 h、12 h、24 h、36 h、48 h 取样,测样品 OD_{640} 值,绘制花色苷作用后的 *E. coli* 生长曲线。分组情况如下:CK:对照组,于培养的同时加入 1 mL 无菌水,A 组和 B 组:于培养的同时加入花色苷使其终浓度为 1/2 MIC、1 MIC;C 组和 D 组:于培养 4 h 后加入花色苷分别使其终浓度为 1/2 MIC、1 MIC;E 组和 F 组:于培养 8 h 后加入花色苷分别使其终浓度为 1/2 MIC、1 MIC。

菌体蛋白 SDS-PAGE 电泳分析: 大肠杆菌培养至对数生长期时,按 5% 接种量分别接种于 100 mL LB 液体培养基中,分为对照组和处理组,对照组加入 1 mL 无菌水、实验组加入花色苷使其终浓度为 1 MIC,继续于 37℃、110 r/min 培养,分别于 4 h、8 h 取样,稀释成相同吸光值取样 25 mL 于 5000 r/min 离心 10 min,然后用生理盐水洗涤 2 次,加入上样缓冲液 100 μ L,沸水浴 5 min~10 min,5000 r/min 离心 10 min,取上清进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。结果利用凝胶成像系统定量分析 *E. coli* 胞内可溶性蛋白含量的变化。实验所选用浓缩胶浓度为 5.0%,分离胶浓度为 12% 的 SDS-PAGE 凝胶系统,染色液为 0.1% 的考马斯亮兰。

透射电子显微镜观察实验: 按电镜样品制备及超薄切片技术^[10]操作,用吸管沿管壁缓慢加入 0.3% 戊二醛固定液,4℃ 静置 15 min~30 min。再用 10000 r/min~13000 r/min 离心 10 min,弃去上清液。用吸管沿管壁缓慢加入 3% 戊二醛,再用 1% 四氧化锇固定,丙酮逐级脱水,Epon812 树脂包埋,超薄切片,醋酸铀及枸橼酸铅双重染色,H2600 型透射电镜观察。

2 结果与分析

2.1 紫甘薯花色苷抑菌活性

由图 1 和表 1 可知,紫甘薯花色苷对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制作用,而对啤酒酵母和黑曲霉无抑制作用。并且,花色苷存在时,黑曲霉反而生长状况良好,表明花色苷不但不能抑制霉菌而且对霉菌生长还有一定促进作用,这可能因为霉菌具有分解糖苷键的酶,使紫甘薯花色苷的糖苷分解,并作为碳源使用。

2.2 紫甘薯花色苷最小抑菌浓度

紫甘薯花色苷最小抑菌浓度实验结果(表 2)表明,紫甘薯花色苷对细菌的抑制效果明显,对大肠杆菌和

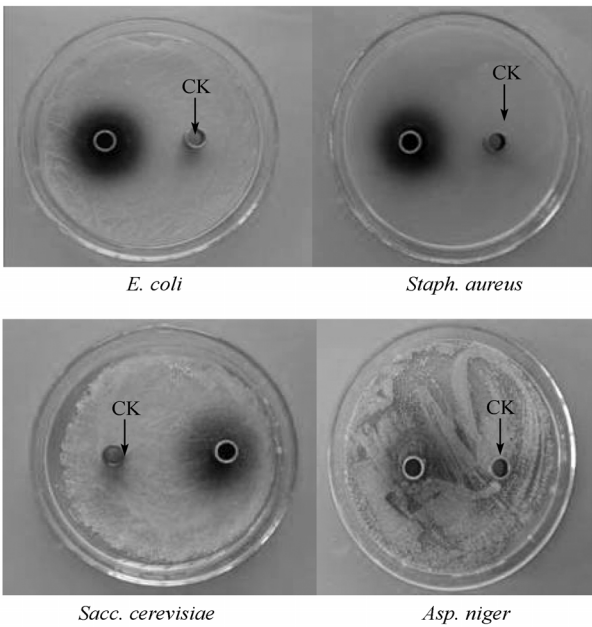


图1 紫甘薯花色苷抑菌效果
Fig. 1 Antibacterial effect of anthocyanins from purple sweet potato

表1 紫甘薯花色苷对菌种抑菌活性 Table1 Antimicrobial activity of purple sweet potato anthocyanins on different microorganisms				
指标 Index	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>Staph. aureus</i>	啤酒酵母 <i>Sacc. cerevisiae</i>	黑曲霉 <i>Asp. niger</i>
抑菌圈直径 Antimicrobial circle diameter (mm)	11.13±0.02	13.93±1.93	0	0

金黄色葡萄球菌的最低抑制浓度分别为 800 $\mu\text{g/mL}$ 和 200 $\mu\text{g/mL}$ 。但对霉菌和酵母菌无抑制效果。大肠杆菌与金黄色葡萄球菌分属革兰氏阴性菌和阳性菌,说明紫甘薯花色苷对细菌有广泛的抑制作用。

2.3 紫甘薯花色苷对大肠杆菌生长的影响

紫甘薯花色苷对大肠杆菌生长的影响见图 2。由生长曲线可以看出,对照组随着培养时间的延长其菌体浓度逐渐增加,实验组在接入菌体的同时加入紫甘薯花色苷可以较好地抑制大肠杆菌的生长。

表2 紫甘薯花色苷最小抑菌浓度(MIC)的测定结果 Table 2 MIC of anthocyanins from purple sweet potato on different microorganisms									
供试菌种	花色苷浓度 Anthocyanin concentration ($\mu\text{g/mL}$)								
	800	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125
大肠杆菌 (<i>E. coli</i>)	-	+	+	+	+	+	+	+	+
金黄色葡萄球菌 (<i>Staph. aureus</i>)	-	-	-	+	+	+	+	+	+
啤酒酵母 (<i>Sacc. cerevisiae</i>)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
黑曲霉 (<i>Asp. niger</i>)	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注: -: 表示无菌种生长; +: 表示有菌生长
Note: -: No microbe growth; +: Microbe growth

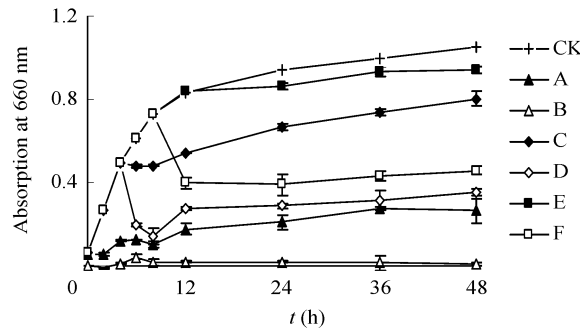


图2 紫甘薯花色苷对大肠杆菌生长曲线的影响
Fig. 2 Effect of anthocyanin from purple sweet potato on *E. coli* growth curve

注: CK: 对照组; A、C、E: 分别为 0 h、4 h、8 h 加入 1/2 倍 MIC 的花色苷溶液; B、D、F: 分别为 0 h、4 h、8 h 加入 1 倍 MIC 的花色苷溶液
Note: CK: Control; A, C, E: 1/2 MIC anthocyanin from purple sweet potato was added at 0 h, 4 h and 8 h, respectively; B, D, F: 1 MIC anthocyanin from purple sweet potato was added at 0 h, 4 h and 8 h, respectively

随着花色苷加入时间的延迟其抗菌效果越显著,并在短时间内使其菌体浓度下降到较低水平,抑菌效果随着花色苷浓度的增加变得更加明显,但在对数生长期末期及稳定生长初期,花色苷对菌体抑菌作用开始变弱,并且出现杀菌起效时间的延迟。紫甘薯花色苷可能主要抑制了 *E. coli* 对数生长期的菌体分裂。随着花色苷作用时间的延长,花色苷抑菌作用变弱,菌体浓度有所回升,可能是部分花色苷在碱性的 LB 培养基环境中被破坏而失去抑菌作用。

2.4 紫甘薯花色苷对大肠杆菌抑菌率的影响

由图 3 可知,花色苷的抑菌率均随作用时间的延长呈先迅速上升然后缓慢下降的趋势。随着菌体浓度的升高,花色苷在相同的作用时间内抑菌率减小;在相同的菌体浓度条件下,抑菌效果随着花色苷浓度的增加而升高,并且在菌体对数生长期杀菌

率变化较大,可能是对数生长期的大肠杆菌对花色苷较为敏感,这是否和菌体的生长代谢过程或者某些物质的合成有关需要进一步研究。

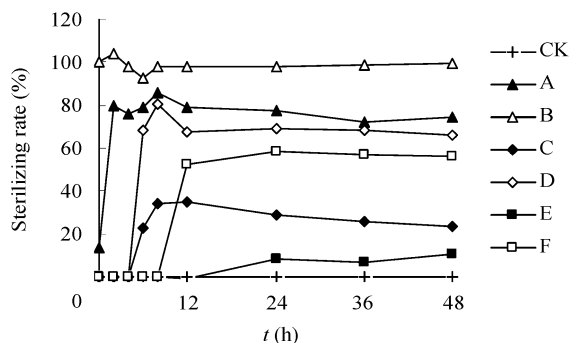


图3 紫甘薯花色苷对大肠杆菌抑菌率的影响

Fig. 3 Inhibitory effect of anthocyanin from purple sweet potato on *E. coli*

注: CK: 对照组; A、C、E: 分别为 0 h、4 h、8 h 加入 1/2 倍 MIC 的花色苷溶液; B、D、F: 分别为 0 h、4 h、8 h 加入 1 倍 MIC 的花色苷溶液

Note: CK: Control; A, C, E: 1/2 MIC anthocyanin from purple sweet potato was added at 0 h, 4 h and 8 h, respectively; B, D, F: 1 MIC anthocyanin from purple sweet potato was added at 0 h, 4 h and 8 h, respectively

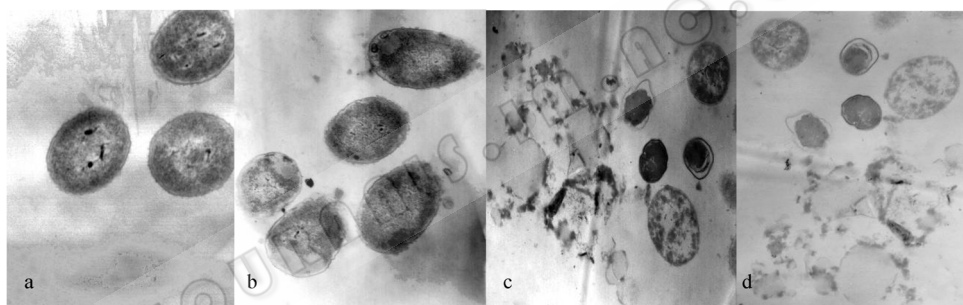


图4 透射电镜观察花色苷对 *E. coli* 形态影响

Fig. 4 Effect of anthocyanin on morphology of *E. coli* by TEM

注: a: 对照组细胞 ($\times 39000$); b: 1 MIC 的花色苷作用 4 h ($\times 33000$); c, d: 1 MIC 作用 8 h ($\times 20000$)

Note: *E. coli* cell were incubated in the absence of anthocyanins or in the presence of anthocyanins (1 MIC) for 4 h or 8 h, respectively. And the specimens were then prepared for transmission electron microscopy. a: Intact cell ($\times 39000$); b: Cell treated for 4 h with 1 MIC anthocyanin ($\times 33000$); c, d: Cell treated for 8 h with 1 MIC anthocyanin ($\times 20000$)

3 讨论

紫甘薯花色苷加入菌液后,短时间抑制大肠杆菌作用较明显。但随着作用时间的延长,抑菌作用逐渐减弱。随着溶液pH进一步升高,醌型碱可逆转变为假碱与查耳酮,此时花色苷的溶液呈无色^[11]。LB培养基pH在 7.0 左右,花色苷刚加入以二苯基苯丙吡喃阳离子形式存在,此时抑菌活性最强;随着加入时间延长花色苷互逆转变成其它三种形式,抑菌作用减弱。表明二苯基苯丙吡喃阳离子形式花色苷抑菌活力最强。同时生长曲线中观察到花色苷作

2.5 紫甘薯花色苷对大肠杆菌显微特征的影响

由透射电镜图(图4)可以看出,对照组 *E. coli* 菌体呈棒状,细胞壁完整、边缘清晰、平整、无缺陷,无裂痕,无质壁分离现象,细胞质、核致密均匀。经紫甘薯花色苷作用 4 h 后的处理组则可以明显的看到菌体变形,细胞质稀薄,出现明显的质壁分离。随其作用时间延长,出现第二种状态,细胞质解体,形成小空泡,并连接成大空泡,成为空腔,细胞死亡。

2.6 紫甘薯花色苷对大肠杆菌蛋白质合成的影响

由大肠杆菌 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱(图5)可以看出,花色苷对大肠杆菌蛋白表达没有明显影响,未见特征性条带的消失。凝胶成像系统定量分析表明,仅在 60 kD 附近的蛋白质合成量有影响。这表明花色苷可以抑制菌体细胞内某种蛋白质的合成。

用主要发生在对数生长期。

经花色苷作用后, *E. coli*和 *Staph. aureus* 菌体出现质壁分离,细胞质稀薄,菌体解体成空泡、菌体细胞溶解死亡,这表明花色苷能够影响细胞壁的通透性。黄卫文等^[12]对中药抑菌研究中曾报道,皂甙类化合物与细胞蛋白结合成复合物的作用。花色苷属苷类物质可能有同样的作用机理。SDS-PAGE分析表明,花色苷作用菌体后部分蛋白的谱带的量明显减少,直至消失。对花色苷化学结构分析可知,花色苷属类黄酮类化合物,其分子结构上有较多的酚羟基,这些官能团与蛋白质或酶通过氢键方式结合,

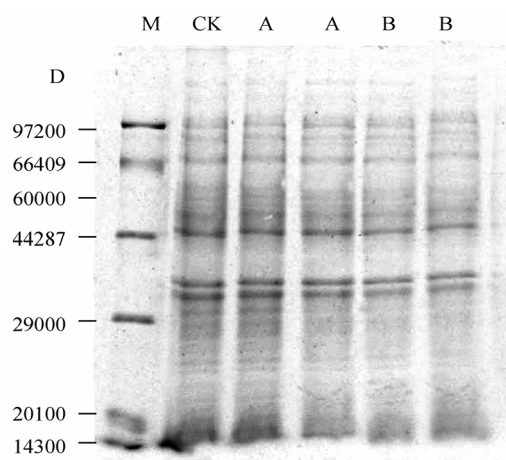


图5 *E. coli* SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 5 SDS-PAGE electrophoresis map of *E. coli*

注: CK: 对照; A、B: 1 MIC 处理 4 h 和 8 h; M: 标准分子量蛋白

Note: CK: Control; A, B: 1 MIC anthocyanin treated for 4 h and 8 h respectively; M: Marker molecule protein

影响部分膜蛋白质合成或失去活性, 导致细胞质的流失和解体。

紫甘薯花色苷对大肠杆菌有较强的抑制作用, 因此紫甘薯花色苷有可拓展的应用价值, 如可用作防腐保鲜剂、抗氧化剂等, 在食品和医药领域开发前景广阔, 以达到防腐抑菌、抗氧化双重功效。

参 考 文 献

- [1] Goda Y, Shimizu T, Kato Y. Two acylated anthocyanins from purple sweet potato. *Phytochemistry*, 1997, **44**: 183-186.
- [2] Odake K, Terahara N, Saito N, *et al.* Chemical structures of two anthocyanins from purple sweet potato, *Ipomoea batatas*. *Phytochemistry*, 1992, **31**: 2127-2130.
- [3] Teranara N, Kato Y, Nakamura M, *et al.* Six diacylated anthocyanins from storage roots of purple sweet potato, *Ipomoea batatas*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1999, **63**: 1420-1424.
- [4] Furuta S, Suda I, Nishiba Y, *et al.* High tert-buthylperoxyl radical scavenging activities of potato cultivars with purple flesh. *Food Sci Technol Int Tokyo*, 1998, **4**:33-35.
- [5] Suda I, Furuta S, Nishiba Y, *et al.* Reduction of liver induced by carbon tetrachloride in rats administered purple-colored sweet potato juice. *Nippon Shokuhin Kagaku Kagaku Kaishi (in Japanese with English abstract)*, 1997, **44**: 315-318.
- [6] Cheng CL, Wang ZY. Bacteriostatic activity of Anthocyanin of *Malva sylvestris*. *Journal of Forestry Research*, 2006, **17**(1): 83-85.
- [7] 岳 静, 方宏筠. 紫甘薯红色素体外抑菌性初探. *辽宁农业科学*, 2005, **2**: 47.
- [8] 范秀容, 沈 萍. 微生物学实验方法. 北京: 高等教育出版社, 1980, pp.58-76.
- [9] 徐叔云, 卞如廉, 陈 修. 药理实验方法. 北京: 人民卫生出版社, 1982, pp.1063-1114.
- [10] 朱丽霞. 生物学中的电子显微镜技术. 北京: 北京大学出版社, 1983, pp.11-72.
- [11] Shi ZL, Bassa IA, Gabriel SL, *et al.* Anthocyanin pigments of sweet potato. *Food Science*, 1992, **57**(3): 755-757.
- [12] 王关林, 蒋 丹, 方红筠. 天南星抑菌作用及其机理研究. *畜牧兽医学报*, 2004, **35**(3): 280-285.