

五色彩叶草叶片色素的稳定性及抑菌性研究

杨晓玲¹, 郭金耀¹, 黄玲²

(1.淮海工学院海洋学院, 江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏连云港 222005; 2.长治医学院, 山西长治 046000)

摘要: 研究五色彩叶草(*Coleus blumei* var. *verschaffel*)叶片色素对温度、光照、pH值、酸味剂和糖类物质的稳定性, 同时对色素抑菌性进行研究。结果表明: 彩叶草叶片色素具耐光性, 在自然光照射下仍可以保持红色, 60℃以下的温度加热2h后色素颜色无变化, 60℃以上彩叶草色素的热稳定性降低。该色素受pH值影响较大, pH2.0以下时该色素呈稳定红色。酸味剂、糖类物质对彩叶草叶片色素均有增色、护色作用。酸味剂比糖类效果好, 持续时间长。酸味剂中乳酸的增色效果明显; 糖类物质中葡萄糖的增色效果较好, 但随着时间的延长, 糖类物质对彩叶草色素的增色、护色效果会逐渐降低直至消失。抑菌实验表明: 彩叶草叶片色素对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌均有抑制作用, 其中对枯草芽孢杆菌的抑制作用最为明显。本研究结果可为天然色素的研究及开发利用提供理论依据。

关键词: 五色彩叶草; 色素; 稳定性; 抑菌性

Stability and Antibacterial Activity of Pigment from *Brassica oleracea* var. *acephala* D.C.

YANG Xiao-ling¹, GUO Jin-yao¹, HUANG Ling²

(1. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China;

2. Changzhi Medical College, Changzhi 046000, China)

Abstract: Pigment in *Brassica oleracea* var. *acephala* D.C was extracted and purified to study the effects of temperature, sunlight, pH, acid agents and sugars on its stability and its antibacterial activities against *E. coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. The pigment had some light resistance and its red color could be maintained when exposed to sunlight, which had little change after 2 h heating at temperatures below 60 °C, but became light and even disappeared when heating temperature was above 60 °C. pH displayed a great effect on the pigment, which showed a stable red color below pH 2. Acid agents and sugars both had hyperchromic and protective effects on the pigment, and in terms of effectiveness and lasting time, the former was superior to the latter. Of three acid agents tested, lactic acid exhibited the best hyperchromic effect. The hyperchromic effect of glucose was better than that of other two sugars tested. The hyperchromic and protective effects of sugars, however, would progressively decline and even disappear with the storage time prolonging. The pigment had distinct antibacterial activities against *E. coli*, and *Staphylococcus aureus*, especially against *Bacillus subtilis*. The results above benefit the development and utilization of the pigment as helpful references.

Key words: *Brassica oleracea* var. *acephala*; pigment; stability; antibacterial activity

中图分类号: TS264.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)19-0035-05

在“绿色运动”呼声越来越高的今天, 天然食用色素的发展前景更加看好, 并且世界各国相继制定法规, 淘汰大部分有毒的化学合成色素。目前, “天然、营养、多功能”已成为天然食用色素的发展方向。天然色素以其低毒、色泽自然等优点, 越来越受到人们的关注和喜爱。但天然色素受外界因素影响较大, 容易变色、褪色, 因此使天然色素的实际应用受到限制。为此, 也引起广大科技工作者的重视, 目前对天然色

素稳定性的研究已见不少报道^[1]。

彩叶草(*Coleus blumei*)是唇形科鞘蕊花属植物, 彩叶草变种、品种极多, 五色彩叶草(*Coleus blumei* var. *verschaffel*)叶片有淡黄、桃红、朱红、暗红等色斑纹。彩叶草在花卉装饰中占有重要地位^[2]。五色彩叶草叶片含有红色素, 资源丰富易得, 而有关彩叶草研究多是绿化方面, 对五色彩叶草色素的研究报道较少, 特别是关于其抑菌性研究尚未有报道^[2-3]。许多研究证明, 花

收稿日期: 2009-05-21

基金项目: 淮海工学院自然科学基金项目(Z2007036)

作者简介: 杨晓玲(1955—), 女, 教授, 研究方向为植物资源。E-mail: gjyao6688@yahoo.com.cn

色苷类色素稳定性因来源植物的不同而有差异^[4], 同时其稳定性又受到加入的食品添加剂的影响。本研究对五色彩叶草(以下简称彩叶草)色素稳定性的影响因子、改善因子以及其抑菌活性, 旨在为开发利用五色彩叶草天然色素提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料、试剂与仪器

五色彩叶草(*Coleus blumei* var. *verschaffel*)叶片采于淮海工学院校园。

无水乙醇、乙醚、浓盐酸、醋酸铅、蔗糖、柠檬酸、苹果酸、酸乳牛肉膏、蛋白胨和琼脂。

UV-754 紫外可见分光光度计; SH2-82 回旋式水浴恒温振荡器; LD5-2A 低速离心机; 无菌工作台; 冰箱; 手提压力蒸汽灭菌器。

1.2 方 法

1.2.1 彩叶草叶片色素的提取纯化

参照杨晓玲^[5]、曾顺德^[6]的方法进行。

1.2.2 彩叶草叶片色素的光谱曲线测定

取 pH2 的彩叶草叶片色素提取液, 以 pH2 的蒸馏水为对照, 在 UV-754 型紫外可见分光光度计上, 测定 400~600nm 范围内的吸光度, 得到 λ_{\max} 。

1.2.3 pH 值对彩叶草叶片色素影响的测定

取彩叶草叶片色素提取液, 用 1mol/L HCl 和 1mol/L NaCl 调节, 同时用精密酸度计测试色素溶液的 pH 值, 获得 pH 分别为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 的 13 种溶液, 然后测定每一种 pH 值下彩叶草色素的最大吸收波长, 并观察对应的颜色。

1.2.4 自然光对彩叶草叶片色素的影响

将彩叶草叶片色素提取液稀释至 534nm 处的吸光度为 0.801, 取等量彩叶草色素的稀释液 14 份, 调 pH 2.0, 密封装于试管中, 在相同条件下每 7 份分别放置于实验台上自然光下和黑暗处, 分别放置 0、2、4、6、8、10、12d 后, 以 pH2.0 的水溶液为空白, 测定 480~580nm 的吸光度。

1.2.5 温度对彩叶草叶片色素的影响

将彩叶草叶片色素提取液稀释至 534nm 处的吸光度为 0.554, 取等量色素稀释液(pH2.0)4 份, 分别置于 20、40、60、80℃ 的恒温水浴锅中加热 2h, 冷却后目测颜色, 并测定在最大吸收波长处的吸光度。

1.2.6 酸味剂对彩叶草叶片色素的影响

用蒸馏水分别配制浓度为 0.0%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0% 的柠檬酸、苹果酸、乳酸溶液, 分别取 50ml 的上述不同浓度的溶液于 250ml 锥形瓶中, 再分别加入 3ml

的彩叶草色素提取液, 将锥形瓶密封放在实验台上分别放置 0、2、4、6、8、10、12 后目测溶液颜色, 并测定溶液在最大吸收波长处的吸光度, 以蒸馏水为对照。

1.2.7 糖类物质对彩叶草叶片色素的影响

配制 pH3.0 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液, 即按 0.2mol/L Na_2HPO_4 4.11ml 和 0.1mol/L 的柠檬酸 15.89ml 混合的比例来配制, 再用其配制 0.0%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0% 的乳糖溶液, 0.0%、1.0%、2.0%、3.0%、4.0% 的蔗糖和葡萄糖溶液, 分别取 50ml 的上述不同浓度的溶液于 250ml 锥形瓶中, 再分别加入 3ml 的彩叶草色素提取液, 将锥形瓶密封放在实验台上分别放置 0、2、4、6、8、10、12d 后目测溶液颜色, 并测定溶液在最大吸收波长处的吸光度, 以缓冲液为对照。

1.2.8 彩叶草叶片色素的抑菌活性

菌种的活化与菌悬液的制备^[7]: 选取菌种为大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金色葡萄球菌, 用无菌水将各种活化过的菌配制成菌悬液, 并在显微镜下用血球计数板对菌悬液进行计数, 最终配成菌悬液浓度约为 $10^6 \sim 10^7$ 个/ml。

抑菌性实验: 参照杨晓玲^[8]的方法进行。

2 结果与分析

2.1 彩叶草叶片色素的吸收光谱

取彩叶草叶片色素提取液, 在 400~600nm 范围内, 测定其吸收光谱曲线, 结果如图 1 所示。

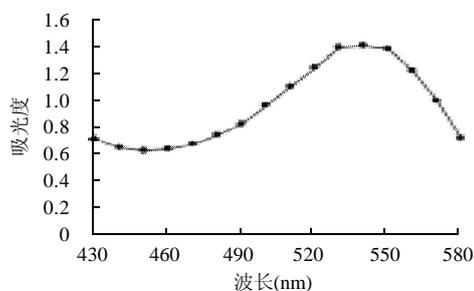


图1 彩叶草色素在可见光区的吸收光谱
Fig.1 Absorption spectrum of the pigment

由图 1 可见, 彩叶草叶片色素在可见区范围内有较大的吸收峰, 最大吸收波长约为 534nm。

2.2 pH 值对彩叶草色素的影响

表 1 彩叶草色素不同 pH 值的颜色及对应吸收波长
Table 1 Effects of pH value on stability of the pigment

pH	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0	12.0	13.0
λ_{\max}	527	534	550	554	595	604	608	609	610	608	606		
颜色	红	红	紫红	暗紫	深蓝	深蓝	蓝	蓝	蓝绿	翠绿	淡绿	黄绿	黄绿

调节彩叶草叶片色素提取液的 pH 值, 在不同 pH 值下测定彩叶草叶片色素的最大吸收波长, 并观察其对应

的颜色变化, 结果见表 1。

由表 1 可见, 随着 pH 值的升高, 最大吸收波长红移。pH12.0 以上波长开始不稳定, 而且颜色由绿变黄, 可能是色素的结构性质发生变化所致^[9]。彩叶草色素只有在酸性 pH 2 或弱酸性介质中才能保持其本色 - 红色。

2.3 自然光对彩叶草色素的影响

彩叶草色素稀释液在黑暗与自然光照射两种条件下存放不同时间后, 测定 480~580nm 范围内的吸收光谱, 结果见图 2、3。

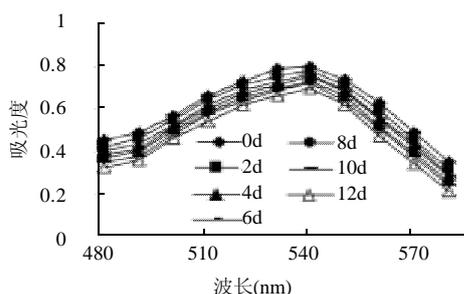


图 2 黑暗条件下彩叶草叶片色素的吸收光谱

Fig.2 Change of absorption spectrum of the pigment during storage under sunlight illumination

由图 2 可见, 在黑暗条件下, 随着时间的增加, 彩叶草叶片色素的最大吸收波长 534nm 处的吸光度最大降低了 11.1%, 总的变化不大, 表明黑暗条件下彩叶草色素的稳定性较好。

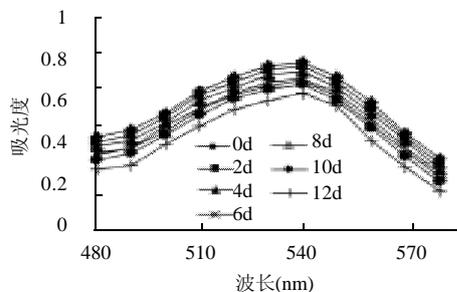


图 3 自然光照条件下彩叶草色素的吸收光谱

Fig.3 Change of absorption spectrum of the pigment during storage in a dark place

由图 3 可见, 随着自然光照射时间的增加, 彩叶草色素的最大吸收波长 534nm 处的吸光度与黑暗条件下色素提取液吸光值变化相比较, 降低幅度较小, 表明彩叶草叶片色素具有较好的耐光性。

2.4 温度对彩叶草色素的影响

表 2 温度对彩叶草色素稳定性的影响

Table 2 Effects of temperature on stability of the pigment

温度(°C)	室温	20	40	60	80
吸光度	0.554	0.552	0.536	0.301	0.283
溶液颜色	红色	红色	红色	淡红色	几乎无色

彩叶草叶片色素稀释液经不同温度恒温水浴加热 2h 冷却后, 分别测定在最大吸收波长处(534nm)吸光度, 结果如表 2 所示。

表 2 可见, 彩叶草色素在 60℃ 以下时稳定性较好, 达到 60℃ 时稳定性下降, 颜色变淡。说明彩叶草叶片色素对热不稳定。花色苷的热稳定性与其结构有关, 糖苷配基的羟基化使花色苷稳定性降低, 而甲基化、糖基化和酰基化能增强其稳定性。加热会使花色苷向着无色的结构移动^[10-11]。

2.5 酸味剂对彩叶草色素的影响

彩叶草色素在不同浓度的三种酸味剂中, 存放不同时间后, 测定在最大吸收波长处(534nm)的吸光度, 结果如图 4~6 所示。

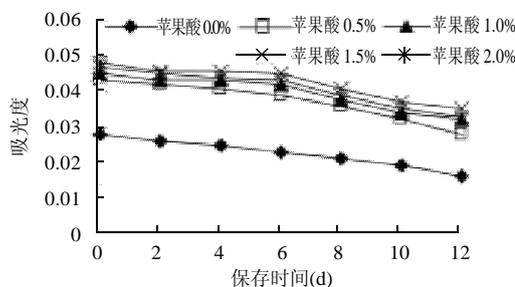


图 4 苹果酸对彩叶草色素的影响

Fig.4 Effects of different concentrations of malic acid on stability of the pigment

从图 4 可以看出, 在添加苹果酸后, 彩叶草色素提取液在最大吸收波长处的吸光度明显增加, 说明苹果酸对彩叶草色素具有明显的增色、护色作用。在苹果酸浓度为 1.5% 时增色效果较好, 最大吸收波长处的吸光度最大增加了 71.4%。但各种浓度之间吸光度的变化不大, 可以认为较低浓度的苹果酸即可增强该色素的着色效果。

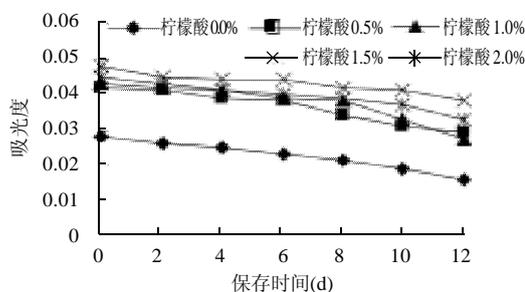


图 5 柠檬酸对彩叶草色素的影响

Fig.5 Effects of different concentrations of citric acid stability of the pigment

从图 5 可以看出, 在添加柠檬酸后, 彩叶草色素提取液在最大吸收波长处的吸光度增加, 说明柠檬酸对

彩叶草色素也具有增色、护色作用。在柠檬酸浓度为1.5%时增色效果较好,开始时最大吸收波长处的吸光度增加了53.6%。各种浓度之间吸光度的变化不大。

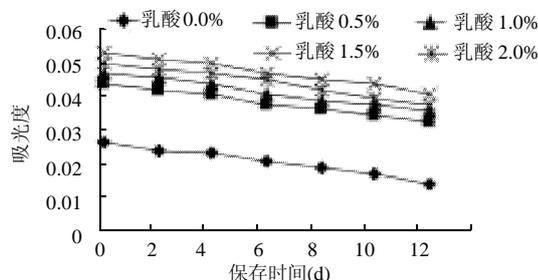


图6 乳酸对彩叶草色素的影响

Fig.6 Effects of different concentrations of lactic acid on stability of the pigment

从图6可以看出,在添加乳酸后,彩叶草色素提取液在最大吸收波长处的吸光度明显增加,说明乳酸对彩叶草色素同样具有增色、护色作用。在乳酸浓度为1.5%时增色效果较明显,吸光度增加了92.8%。不同浓度的乳酸增色作用差别不大。

比较图4、5、6可以看出,这三种酸味剂对色素均有明显的增色、护色作用。相同浓度下,柠檬酸的增色效果较苹果酸、乳酸差。这是由于柠檬酸的pH值相对苹果酸、乳酸高,在测试pH值对色素的影响时已知随pH值增加色素稳定性有所变化。除了pH值的原因使色素的稳定性增强外,还有可能是酸味物质使色素的结构更加稳定。从总体变化趋势上看,随着保存时间的延长,不管是添加了哪种酸味剂,下降幅度均小于不加任何物质的色素下降幅度,所以在彩叶草色素的应用中可采取添加一定浓度的酸味物质,提高色素在食品中的稳定性。

2.6 糖类物质对彩叶草色素的影响

彩叶草色素在不同浓度的糖类中存放不同时间后,测定在最大吸收波长处(534nm)的吸光度,结果如图7~9所示。

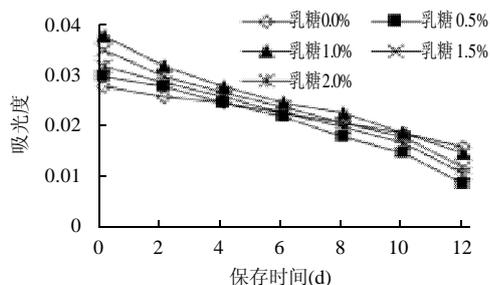


图7 乳糖对彩叶草色素的影响

Fig.7 Effects of different concentrations of lactose on stability of the pigment

从图7可以看出,在添加乳糖溶液后,色素在最大吸收波长处的吸光度有所增加,说明乳糖对色素具有增色效果,且乳糖浓度为1.0%时增色作用最明显,吸光度增加了35.7%。但随着时间的延长,增色作用逐渐降低,在保存10d后各处理条件下的吸光度均低于没有添加乳糖的色素原液。

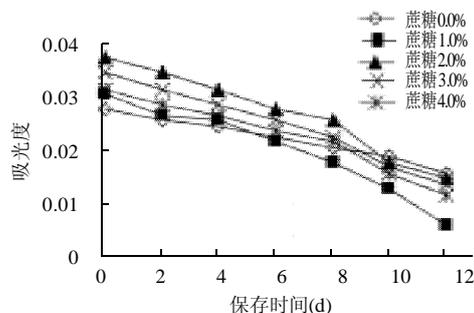


图8 蔗糖对彩叶草色素的影响

Fig.8 Effects of different concentrations of sucrose on stability of the pigment

从图8可以看出,在添加蔗糖溶液后,色素在最大吸收波长处的吸光度有所增加,说明蔗糖对色素具有一定的增色效果,且不同浓度的蔗糖溶液对色素的增强作用有所不同,2.0%的蔗糖溶液增强作用较好,最大吸收波长处的吸光度增加了35.7%。但随着时间的延长,增色作用逐渐降低直到消失。

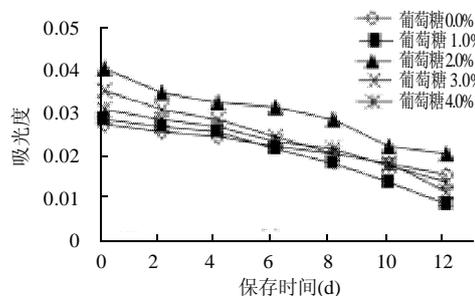


图9 葡萄糖对彩叶草色素的影响

Fig.9 Effects of different concentrations of glucose on stability of the pigment

从图9可以看出,葡萄糖溶液对色素也具有一定增色作用,其中以葡萄糖浓度为2%时增色效果较好,且增色作用一直持续。其他浓度的增色效果则随着时间的延长,增色作用逐渐降低至消失。

比较上述图7~9可以看出,这三种糖类物质在较短时间内(6d以内)对色素均有一定的增色、护色作用。但随着时间的延长,糖类物质对色素的增色、护色作用逐渐降低直到消失。到8~10d吸光度比对照(不加糖的色素原液)还低,但2%的葡萄糖增色效果一直持续。三种糖的浓度相同时,增色效果相差不多,其中葡萄糖的增色效果在短期内较明显。每种糖在不同浓度,不

同时间条件下, 增色效果不同。

2.7 彩叶草叶片色素抑菌效果

用色素提取原液浸泡滤纸片进行抑菌实验。将涂布好的平皿置于 37℃ 恒温箱中培养, 24h 后取出观察细菌生长情况, 拍照并记录抑菌圈的有无及大小。所得抑菌实验结果见表 3。

表 3 彩叶草色素提取液的抑菌效果

Table 3 Antibacterial activities of the pigment against *E. coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*

编号	大肠杆菌 抑菌圈大小(cm)	金黄色葡萄球菌 抑菌圈大小(cm)	枯草芽孢杆菌 抑菌圈大小(cm)
1	0.78	0.80	0.82
2	0.72	0.75	0.81
3	0.71	0.78	0.80
4	0.76	0.70	0.85
平均值	0.73	0.77	0.82

由表 3 可知, 彩叶草色素提取液对大肠杆菌, 金黄色葡萄球菌, 枯草芽孢杆菌均有一定程度的抑制作用, 同时由表中不同菌种的抑菌圈直径的大小可以看出, 彩叶草色素提取液对枯草芽孢杆菌的抑菌效果最为明显, 抑菌圈直径达 0.85cm, 其次为金黄色葡萄球菌和大肠杆菌。

3 讨论

花青素又名花色素, 天然条件下多呈花色苷。它广泛存在于植物的果实、花、茎和叶。花色素不仅色彩绚丽, 且生理活性也高, 它是羟基供体, 自由基清除剂, 在眼科学和治疗各种血液循环失调疾病等方面均有疗效^[12]。五色彩叶草叶片中含有红色素, 是良好的色素资源植物。

在稳定性实验中得出, 彩叶草色素在 pH ≤ 2.0 时能保持较稳定的红色; 虽然温度在 60℃ 以上彩叶草色素的热稳定性不佳, 但温度低于 60℃ 时彩叶草色素热稳定性较好, 因此彩叶草色素可在酸性、60℃ 以下的条件下应用。此外, 因五色彩叶草色素具有较好的耐光性, 增加了其扩大应用范围的可能性。

众所周知花色苷类色素稳定较差, 容易褪色, 原因是多方面的, 主要是色素本身分子结构不稳定。如能增强色素的稳定性, 就可提高其应用价值。在提取时用温和方法, 比如蒸馏水浸提法, 可减少色素糖苷键的断裂, 使其结构保持稳定。姚伙旺等^[13]研究表明, 添加酸味剂等可增强色素稳定性。本研究中, 通过添加不同的酸味剂, 明显提高了彩叶草色素的增色、护色作用, 提高了彩叶草色素的稳定性。其原因除了酸

味剂可降低色素溶液的 pH 值而影响稳定性外, 还有可能是酸味物质影响了该色素存在的结构平衡, 这种平衡有利于色素的稳定存在。所以, 在彩叶草色素的应用中, 可添加一定浓度的酸味物质提高其稳定性。

马银海等^[14]研究表明, 蔗糖对萝卜红色素的稳定性无影响。本实验中看到, 糖类物质(蔗糖、乳糖、葡萄糖)在一定时间内对彩叶草色素都有增色作用, 但随着时间的延长, 这种增强作用很快下降。糖类物质对色素的增色作用可能是糖的存在有利于糖苷键的形成, 从而提高了彩叶草色素的显色能力。随着时间的延长, 溶液中糖类物质发生变化, 糖苷键结构平衡发生改变, 增色作用也随之消失。

天然色素有一定的抑菌作用, 卢成瑛等研究表明红檫木花红色素具有抗菌活性^[15], 本抑菌性实验中选取的菌种具有代表性, 大肠杆菌和枯草芽孢杆菌为革蓝氏阴性菌, 金黄色葡萄球菌为革蓝氏阳性菌^[16], 由此可见, 彩叶草色素提取液对革蓝氏阴性菌和革蓝氏阳性菌均有抑制效果。该色素作色素的同时兼具有防腐作用。

参考文献:

- [1] 阎炳宗. 我国天然色素现状及发展方针[J]. 精细与专用化学品, 1999 (9): 8-9.
- [2] 杨运英, 廖伟平, 梁建遯. 彩叶草及其在园林中的应用[J]. 广东农业科学, 2005, 73(6): 78-81.
- [3] 马三梅, 王永飞. 彩叶草的种植利用[J]. 生物学教学, 2005, 30(5): 68-69.
- [4] 唐传核, 彭志英. 天然花色苷类色素的生理功能及应用前景[J]. 冷饮与速冻食品工业, 2000(1): 25-27.
- [5] 杨晓玲, 郭金耀. 皱皮木瓜花色苷类的色谱、光谱特性研究[J]. 山西农业大学学报, 1993, 13(1): 85-87.
- [6] 曾顺德, 漆巨容, 张迎君. 天然食用色素的提取、纯化及应用[J]. 食品研究与开发, 2004, 25(6): 79-81.
- [7] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003.
- [8] 杨晓玲, 郭金耀. 女贞果实色素抑菌活性的研究[J]. 北方园艺, 2008 (11): 25-28.
- [9] 卢钰, 董现义, 杜景平, 等. 花色苷研究进展[J]. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2004, 35 (2): 315-320.
- [10] KONG J M, CHINA L S, GOH N K, et al. Analysis and biological activities of anthocyanins[J]. Phytochemistry, 2003, 64(5): 923-933.
- [11] 王川. 橙皮花色苷的分离鉴定与稳定性研究[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(8): 38-40.
- [12] 庞志申. 花色苷研究概况[J]. 北京农业科学, 2000, 18 (5): 37-41.
- [13] 姚伙旺, 曾秋平, 劳永民. 食品添加剂对荔枝果皮花色苷稳定性影响的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(5): 152-156.
- [14] 马银海, 彭永芳, 阎孝金. 萝卜红色素的稳定性研究[J]. 食品科学, 1997, 18(11): 34-37.
- [15] 卢成瑛, 唐克华, 唐慧, 等. 红檫木花红色素提取物抗菌活性[J]. 中国林副特产, 2005(3): 9-11.
- [16] 吴雪辉, 张志远, 秦慧慧, 等. 板栗壳天然色素的抑菌和清除自由基作用研究[J]. 食品科技, 2006(6): 133-136.