

桑椹红色素抑菌作用的研究

段江莲, 徐建国

(山西师范大学食品科学与工程系, 山西 临汾 041004)

摘 要: 探讨了桑椹红色素对食品中常见的细菌、霉菌和酵母菌等微生物的抑制作用。实验表明, 桑椹红色素对大肠杆菌有较强的抑制作用, 对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的抑制作用较弱, 而对霉菌和酵母菌几乎没有抑制作用。

关键词: 桑椹红色素; 微生物; 抑菌

Study on Antimicrobial Effects of Mulberry Red Pigment

DUAN Jiang-lian, XU Jian-guo

(Department of Food Science and Engineering, Shanxi Normal University, Linfen 041004, China)

Abstract: The inhibitory effects of mulberry red pigment on bacterials, fungi and yeast found in foods were studied. The results indicate that mulberry red pigment has strong inhibitory effects on *E. coli* and weak effects on *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*, but has no effect on fungi and yeast.

Key words mulberry red pigment; microbe; antimicrobial activity

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)10-0087-03

桑椹红色素具有类黄酮的典型结构, 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, 破坏蛋白质分子结构而变性或失去活性, 导致细胞质的固缩, 从而使菌体解体、死亡。近年来, 随着消费者对化学防腐剂的安全性的担忧和对天然防腐剂的喜好, 关于天然色素在食品防腐保鲜方面的应用的研究也越来越多。

1 材料与方法

1.1 菌种与设备

1.1.1 菌种

大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus Subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、根霉(*Rhizopus oryzae*)、曲霉(*Aspergillus*)、青霉(*Penicillium*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)和酵母菌(*Saccharomyces*)均为山西师范大学生物系保存菌种。

1.2 设备

LSY 电热恒温水浴锅 北京医疗设备厂; LDZX-4BI 自动立式压力蒸汽灭菌器 上海申安医疗器械厂; SW-CJ-1BU/SW-CJ-1CU 超净工作台 上海博讯实业有限公司;

司; 0.1 μ m 细菌过滤膜 上海生仪分析技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌悬液的制备

1.2.1.1 菌种活化

使用前将保存的各种供试菌种接种于固体培养基上, 细菌接种在营养琼脂培养基上。酵母菌和霉菌接种在马铃薯葡萄糖琼脂培养基上。在恒温培养箱内培养后连续传代 2~3 次(细菌放在 37℃ 恒温培养箱中培养 24h, 酵母菌和霉菌放在 28℃ 恒温培养箱中分别培养 48h 和 72h), 使菌种充分恢复其生理性状^[1-3]。

1.2.1.2 制备悬液

在无菌操作条件下, 将活化的敏感菌试管斜面注入 5~10ml 的无菌生理盐水, 将接种环在酒精灯下灭菌后把斜面表层的菌苔轻轻刮下, 摇匀制成菌悬液或孢子悬浮液。

1.2.1.3 血球计数^[1]

将制成的菌悬液用无菌生理盐水以 1:10 依次稀释, 以无菌操作吸取 0.1ml 的菌液, 然后加入 0.9ml 的无菌液充分摇匀即成 1:10 的样品稀释液(1 液)。从 1 液中再用无菌吸管吸 0.1ml 注入 0.9ml 生理盐水中, 充分摇匀即成为

收稿日期: 2007-08-23

作者简介: 段江莲(1972-), 女, 实验师, 硕士, 研究方向为果品加工。

1:100 的样品稀释液。如此重复,将此菌液用无菌水以 10 倍顺序依次稀释为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 等不同浓度的菌液,选取适当浓度的菌液,用微量吸管吸取 $10\mu\text{l}$ 从盖玻片边缘滴入,菌液被吸入计数室,在高倍镜下观察计数室计数使菌悬液的浓度为 $10^4\sim 10^6$ 个/ml。计算公式如下:

样品细胞数(ml)=每小格中菌数平均数 $\times 400\times 10^4\times$ 稀释倍数

1.2.2 滤纸片法测定抑菌强度

在平皿内倒入已冷却至 50°C 左右的营养琼脂培养基约 15ml,供试菌不同,所用的培养基也不同。待培养基凝固后,用微量注射器吸取 $200\mu\text{l}$ 的菌悬液于平皿中然后用细菌涂布器将菌悬液涂布均匀,水平放置。将滤纸片用打孔器打成直径 7mm 的小圆片在 130°C 下干热灭菌后备用^[4]。将桑椹红色素配成溶液,用细菌过滤膜将溶液过滤在已灭菌的平皿中,然后用无菌镊子将已灭菌的滤纸片浸泡入滤液中,20min 后取出,沥干,以无菌操作将滤纸片贴在含菌的培养皿中,每个平皿放 3 片,同时放 1 片在无菌水中浸泡的滤纸片作为对照。每个处理三个重复。将贴有滤纸片的平皿分别放在恒温培养箱中培养(细菌 24~48h,酵母菌 28h,霉菌 36h)到时取出,测定抑菌圈大小。

1.2.3 最低抑菌浓度的测定

根据滤纸片法测定结果,选取抑菌效果最好的大肠杆菌进行最低抑菌浓度实验。取 5ml 融化并冷却至 50°C 的营养琼脂培养基于小试管中,同时加入 $100\mu\text{l}$ 1% 的美蓝染液和的 $200\mu\text{l}$ 大肠杆菌菌悬液,充分摇匀后直立于试管架上使形成 3~4cm 高的直立柱^[5]。待培养基凝固后将桑椹红色素分别配制成浓度为 12.5%、7.5%、4.5%、3.25% 的溶液,用细菌滤膜将色素溶液过滤后分别向各试管中加入约 0.3ml 各浓度的色素溶液于直立柱上,同时在一直立柱上加入 0.3ml 的无菌水作为对照。将试管放入 37°C 的恒温培养箱中培养 1~2d 定时观察并记录结果。

1.2.4 抑菌率测定

用平板菌落计数法测定桑椹红色素对大肠杆菌的最低抑菌浓度。将桑椹红色素分别配制成浓度为 12.5%、7.5%、4.5%、3.25% 的溶液,用细菌过滤膜分别滤入已干热灭菌的平皿中,充分摇匀,水平放置。将营养琼脂培养基加热融化,待冷却至 50°C 左右后倒入含不同浓度色素的平皿中,将其与色素溶液充分混匀,放置待凝。在无菌条件下,用已灭菌的微量注射器吸取 $200\mu\text{l}$ 的大肠杆菌菌悬液于平皿中,细菌涂布器在酒精灯上灭菌后将菌液涂布均匀,然后倒置于培养箱中培养 24h 后观察并计菌数^[6]。每个处理三个重复,取其平均值计算

出抑菌率。用不加色素的含菌平皿作对照。

$$\text{抑菌率} = \frac{\text{菌落平均数目} \times \text{稀释倍数}}{\text{菌悬液数日}}$$

1.2.5 抑菌 pH 范围的测定

用 pH1 的盐酸和 pH3 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液将色素配成 pH 值分别为 2、3、5、7 的色素溶液,然后用细菌滤膜将色素溶液过滤于已灭菌的平皿中并充分摇匀,在每个平皿中倒入约 15ml 的营养琼脂培养基,待冷却凝固后用微量注射器吸取 $200\mu\text{l}$ 的菌悬液于各平皿中,用细菌涂布器将菌液涂布均匀,然后倒置于培养箱中培养 24h 后观察结果。每个 pH 梯度做三个重复^[7]。

1.2.6 抗热性测定

用移液管分别吸取 2ml 的色素溶液于试管中,分别在温度为 60、80、100、 121°C 各处理 20min 后用细菌滤膜过滤于无菌平皿中,每个梯度三个重复^[4]。再将每个平皿中倒入约 15ml 的营养琼脂培养基,待冷却凝固后用微量注射器吸取 $200\mu\text{l}$ 的菌悬液于各平皿中,用细菌涂布器将菌液涂布均匀,然后倒置于培养箱中培养 24h 后观察结果。

2 结果与分析

2.1 滤纸片法测定结果

表 1 桑椹红色素对微生物的抑制作用
Table 1 Inhibitory effects of mulberry red pigment on microbe

供试菌种	抑菌圈大小	无菌水对照
大肠杆菌	+++	-
枯草芽孢杆菌	++	-
金黄色葡萄球菌	+	-
酵母菌	+-	-
热带假丝酵母	+-	-
根霉	-	-
青霉	-	-
曲霉	-	-
黑曲霉	-	-

注: - 表示无抑菌圈出现; +- 表示抑菌圈不明显; + 表示抑菌圈直径 8~9mm; ++ 表示抑菌圈直径 10~12mm; +++ 表示抑菌圈直径 13mm 以上。

由表 1 可以看出,将平皿在培养箱中培养 24h 后,大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌的滤纸片周围的菌落有递减趋势;培养 36h 后,大肠杆菌滤纸片周围出现明显的抑菌圈,枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌的滤纸片周围也有抑菌圈出现,测量其大小,大肠杆菌抑菌圈直径 14mm,金黄色葡萄球菌抑菌圈直径 11mm,枯草芽孢杆菌抑菌圈直径 9mm。这说明桑椹红色素对大肠杆菌的抑制作用最强,对枯草芽孢杆菌和金

色葡萄球菌均有一定的抑制作用,但作用较弱。将酵母菌、霉菌分别培养48h和72h后,滤纸片周围菌落均有减弱趋势但没有抑菌圈出现,这说明桑椹红色素对酵母菌和霉菌几乎没有抑制作用。

2.2 最低抑菌浓度的测定结果

表2 对大肠杆菌最低抑菌浓度的测定
Table 2 Minimal inhibitory concentration to *E.coli*

浓度(%)	12.5	7.5	4.5	3.25
色带变化	+++	++-	+-	---
无菌水对照	-	-	-	-

注:+++表示直立柱完全为蓝色色带;++-表示直立柱有白色色带出现;+-表示直立柱白色色带增宽;---表示直立柱完全为白色色带。

由表2的测定结果可知,桑椹红色素对大肠杆菌的最低抑菌浓度为4.5%。直立柱呈现蓝色说明没有菌生长,如果直立柱中有菌生长则美兰被还原为无色。在培养箱中培养24h后,色素浓度为12.5%的试管中完全为蓝色,说明浓度为12.5%时色素的抑菌率为100%。浓度为7.5%、4.5%的试管底部均有不同程度的白色色带出现,色素浓度越低,白色色带越宽,说明浓度降低后色素的抑菌能力有所下降。色素浓度为3.25%的试管及加入无菌水的试管几乎全变为白色,说明当色素浓度降低为3.25%时几乎没有抑菌作用。

2.3 抑菌率测定结果

表3 对大肠杆菌抑菌率的测定
Table 3 Inhibitory rate to *E.coli*

浓度(%)	12.5	7.5	4.5	3.25
被测皿菌数	0	650	750	1000
对照皿菌数	1000	1000	1000	1000
抑菌率(%)	35	100	25	0

由表3可知,色素浓度为4.5%时抑菌率为25%,浓度为7.5%时抑菌率为35%。随着色素浓度增加抑菌率明显变大,这与最低抑菌浓度的测定结果相同。实验中观察到将含有大肠杆菌菌悬液的平皿在培养箱中培养24h后,色素浓度为12.5%的平皿内无菌落出现,色素浓度为7.5%、4.5%、3.25%的培养皿均有菌落出现。

2.4 抑菌pH范围的测定结果

表4 抑菌pH范围的测定
Table 4 pH value range of bacteriostasis

pH值	2	3	5	7
菌落生长情况	-	-	-	+
无菌水对照	+	+	+	+

注: +表示有菌落出现; -表示无菌落出现。

由表4可知,pH值分别为2、3、5的平皿内均无大肠杆菌生长,pH值为7的平皿内有菌落出现。分析其原因,可能是pH7时破坏了色素中抑菌成分的结构,而酸性条件不会破坏色素中的抑菌成分,所以桑椹红色素宜在酸性条件下使用,其抑菌pH范围为3~5。

2.5 抗热性测定结果

表5 抗热性测定
Table 5 Heat resistance

温度(℃)	60	80	100	121
菌落生长情况	-	-	-	-
无菌水对照	+	+	+	+

注: +表示有菌落出现; -表示无菌落出现。

由表5可以看出,在温度为121、100、80、60℃各处理下的培养皿内均无菌落出现,说明桑椹红色素的热稳定性良好。但121℃处理后色素的结构有所破坏,所以使用温度应低于100℃。

3 结 论

桑椹红色素对细菌抑制作用较强,对酵母菌的抑制作用次之,桑椹红色素对霉菌几乎没有抑制作用。色素的抑菌能力随其浓度升高而增强,随环境介质的pH值降低而增强。桑椹红色素对细菌的抑制作用大小为:大肠杆菌>金黄色葡萄球菌>枯草芽孢杆菌。桑椹红色素对霉菌和酵母菌几乎没有抑制作用。最低抑菌浓度实验表明,桑椹红色素的最低抑菌浓度为4.5%;该物质抑菌pH范围为2~5,在酸性条件下抑菌效果更好且热稳定性良好。桑椹红色素具有色素的着色和抑菌双重功能,是理想的功能性天然色素。

参考文献:

- [1] 韩涛,姚磊,李丽萍.桑叶提取物抑菌作用的研究[J].生物学杂志,2005(6):21-24.
- [2] 童群义,高孔荣,周正宏.红曲色素抑菌作用的研究[J].食品工业科技,1997(5):51-52.
- [3] 刘绍军.食品微生物学试验技术[M].北京:中国农业出版社,2000.
- [4] 王关林,岳静,李洪艳,等.甘薯花青素的提取及其抑菌效果分析[J].中国农业科学,2005,38(11):2321-2326.
- [5] 祖若夫,胡宝龙,周德庆.微生物学实验教程[M].上海:复旦大学出版社,1993:191-204.
- [6] 王关林,姜丹,方宏筠,等.高产细菌素菌株WJ K84-1的诱变筛选及其对植物病原菌抑菌机理的研究[J].微生物学报,2004,44(1):23-28.
- [7] 江英,邓辉.南瓜抑菌作用的研究[J].食品科技,2005(10):37-39.