紫甘薯花色苷色素抑制金黄色葡萄球菌作用初探

韩永斌[1]，朱洪梅[2]，顾振新[1,*]，范龚健[1]，吕莹爽[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，江苏 南京 210095；
2.山西师范大学食品科技学院，山西 临汾 041004)

摘 要：本实验研究紫甘薯花色苷色素对金黄色葡萄球菌的抑制作用。结果表明，紫甘薯花色苷色素对金黄色葡萄球菌抑制的最低浓度为200μg/ml。金黄色葡萄球菌生长曲线和透射电镜观察表明，紫甘薯花色苷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、解体，导致细胞死亡。SDS-PAGE 分析表明，紫甘薯花色苷对大肠杆菌和金黄色葡萄球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：紫甘薯花色苷色素；金黄色葡萄球菌；抑菌作用

Preliminary Study on Inhibitory Effect of Anthocyanins from Purple Sweet Potato Against *Staph.aureus*

HAN Yong-bin[1]，ZHU Hong-mei[2]，GU Zhen-xin[1,*]， FAN Gong-jian[1]，LÜ Ying-shuang[1]
(1.Key Laboratory of Food Processing and Quality Control, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China；2.College of Food Science and Technology, Shanxi Normal University, Linfen 041004, China)

Abstract：The reults of bacteriostatic experiment of anthocyanins from purple sweet potato indicated that their minimum inhibitory concentration (MIC) on *Staph.aureus* is 200μg/ml. The observation under transmission electron microscope (TEM) was carried out and the growth curve of *Staph.aureus* was analyzed. It was indicated that the anthocyanins might change the permeability of cell membrane and make cell excrescent to inhibit cell division. As a result, cytoplasm becomes thin, disassembles and even dies. SDS-PAGE analysis suggested that the anthocyanins have some effects on synthesized quantities of some proteins, but no disappearence of special protein lines is found.

Key words：anthocyanins from purple sweet potato；*Staph.aureus*；inhibitory effect
中图分类号：TS201.3 文献标识码：A 文章编号：1002-6630(2008)10-0059-04

紫甘薯(*Ipomoes batats* L.)属于旋花科一年生草本植物，块根肉质紫红色，是一种较好的色素基源植物。紫甘薯花色苷的主要成分是矢车菊和芍药素[1-3]，且具有抗氧化和保健功能[4-5]。花色苷是植物特有的次生代谢产物，花色苷作为抑菌类物质使用，有特殊的作用方式及优越性，例如，不产生耐药性、不会导致环境的污染等。食品安全有赖于生产的各个环节，使用无污染、无残留、无毒副作用的食品添加剂是解决食品中有害化学物质残留的关键。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。本实验就紫甘薯花色苷对致病菌抑制作用方面进行了深入研究，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

紫甘薯(品种为“川山紫”)由徐州甘薯研究所提供，紫甘薯清洗后切成5～8mm薄片，50℃条件下烘干后粉碎过80目筛。金黄色葡萄球菌(*Staph.aureus*) 南京中医药大学病原与免疫学实验室。

1.2 方法

1.2.1 紫甘薯花色苷色素的制备

选用新鲜、无病虫害、无霉烂的紫甘薯块根作实验材料。紫甘薯制粉用酸化乙醇溶液(95% 乙醇:1mol/L 盐酸 =9:1)提取 3h，于 10000r/min 下离心 20min，取上清

收稿日期：2007-09-21
基金项目： 江苏省高技术项目(BG 2004323)
作者简介：韩永斌(1963-)，男，教授，博士，主要从事农产品加工与综合利用研究。E-mail：hanyongbin@njau.edu.cn
* 通讯作者：顾振新(1956-)，男，教授，博士，主要从事农产品加工与综合利用研究。E-mail：guzx@njau.edu.cn

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189.62mg/L)。

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[8]加入培养基中，将稀释后的金黄色葡萄球菌接种于各试管中，分别于37℃和28℃培养箱内恒温培养24h，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 抑制金黄色葡萄球菌生长实验

金黄色葡萄球菌培养至对数生长期时，按5%接种量分别接种于100ml LB液体培养基(牛肉膏0.5%、蛋白胨1%、NaCl 0.5%、pH7.2)中，于37℃ 150r/min培养，分别于0、2、4、6、8、10、12、24、36、48h取样，测样品OD_{640nm}，绘制花色苷作用后的*Staph. aureus*生长曲线。分组情况如下：对照组CK培养的同时加入1ml无菌水；A组和B组：培养的同时加入花色苷分别使其终浓度为1/2MIC、1MIC；C组和D组：培养4h后加入花色苷，分别使其终浓度为1/2MIC、1MIC；E组和F组：培养8h后加入花色苷，分别使其终浓度为1/2MIC、1MIC。

1.2.4 金黄色葡萄球菌菌体蛋白SDS-PAGE电泳分析

金黄色葡萄球菌培养至对数生长期时，按5%接种量分别接种于100ml/LB液体培养基中，分为对照组和处理组，对照组加入1ml无菌水，试验组加入花色苷使其终浓度为1MIC，继续于37℃、110r/min培养，分别于4、8h取样，稀释成相同吸光值取样25ml于5000r/min离心10min，然后用生理盐水洗涤两次，加1%溶菌酶30℃水浴反应30min，1000r/min离心10min取上清液，上清液中加入缓冲液50μl，沸水浴5～10min，5000 r/min离心10min，取上清液进行SDS-PAGE凝胶电泳。实验用浓缩胶浓度为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。

1.2.5 透射电子显微镜观察实验

将处于对数生长期的*Staph.aureus*作为对照组，加入紫甘薯花色苷200μg/ml为处理组，培养4、8h后分别取样，按电镜样品制备及超薄切片技术[9]操作，用吸管沿管壁缓慢加入0.3%戊二醛固定液，4℃静置15～30min。再用10000～13000r/min离心10min，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 紫甘薯花色苷色素最小抑菌浓度

由表1可知，紫甘薯花色苷的浓缩液对金黄色葡萄球菌的抑制效果明显，最低抑制浓度为200μg/ml。

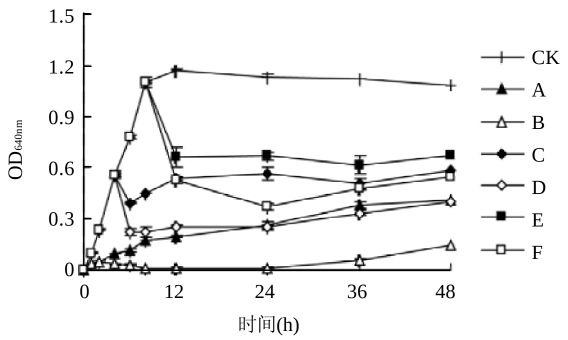
表1 紫甘薯花色苷最小抑菌浓度(MIC)的测定结果
Table 1 MIC of anthocyanins from purple sweet potato

供试菌种	花色苷浓度(μg/ml)								
	800	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125
金黄色葡萄球菌	－	－	－	＋	＋	＋	＋	＋	＋

注：－表示无菌种生长，＋表示有菌生长。

2.2 紫甘薯花色苷对金黄色葡萄球菌生长的影响

由金黄色葡萄球菌生长曲线(图1)可见，当菌体培养一段时间后再加入紫甘薯花色苷色素，可使菌体浓度在较短时间内下降到较低水平，这一效果随着花色苷加入量的增加变得更加明显。随花色苷作用时间的延长，菌体浓度有所回升，花色苷的抑菌作用变弱，主要原因是部分花色苷随着作用时间的延长在碱性的LB培养基环境中转变成假碱和查耳酮形式存在[10]，抑菌作用变弱。



A、C、E分别为0、4、8h加入1/2倍MIC的花色苷溶液；B、D、F分别为于0、4、8h加入1倍MIC的花色苷溶液，CK为对照。

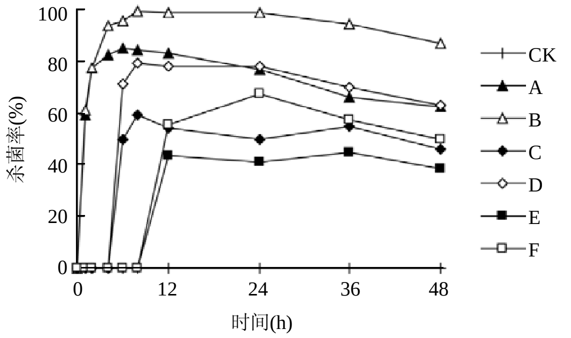
图1 紫甘薯色素对金黄色葡萄球菌生长曲线的影响
Fig.1 Effects of anthocyanins from purple sweet potato on *Staph.aureus* growth curve

2.3 紫甘薯花色苷对金黄色葡萄球菌抑菌率的影响

从图2可见，无论何种浓度的紫甘薯花色苷对金黄色葡萄球菌的抑制率均随作用时间的延长先上升然后逐渐下降。菌体浓度越高，花色苷的抑菌率越小。菌体浓度相同，杀菌效果随着花色苷浓度的增加而升高。在菌体对数生长期内，短时间内其抑菌率迅速增加，表明生长期的金黄色葡萄球菌可能对花色苷较为敏感，而其对接近稳定期的金黄色葡萄球菌作用较弱。

2.4 紫甘薯花色苷对金黄色葡萄球菌蛋白质合成的影响

从金黄色葡萄球菌的电泳图谱(图3)可以看出，花

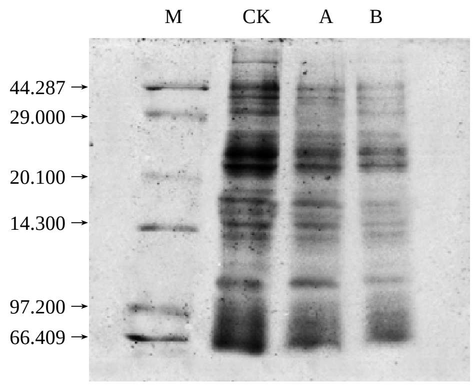


A、C、E 分别为 0、4、8h 加入 1/2 倍 MIC 的花色苷溶液；B、D、F 分别为于 0、4、8h 加入 1 倍 MIC 的花色苷溶液；CK 为对照。

图 2　紫甘薯色素对金黄色葡萄球菌抑菌效果

Fig.2　Inhibitory effects of anthocyanins from purple sweet potato on *Staph.aureus*

色苷对金黄色葡萄球菌的蛋白表达未见有明显影响，没有特征性条带的消失，但对部分蛋白质的合成量有影响。这表明花色苷可以抑止菌体细胞内某些蛋白质的合成。至于花色苷是否能够影响蛋白质的合成而导致菌体细胞生长受阻或死亡需要深入研究。



A、B 分别为 1MIC 处理 4h 和 8h；M 为标准分子量蛋白。

图 3　*Staph.aureus* SDS-PAGE 电泳图谱

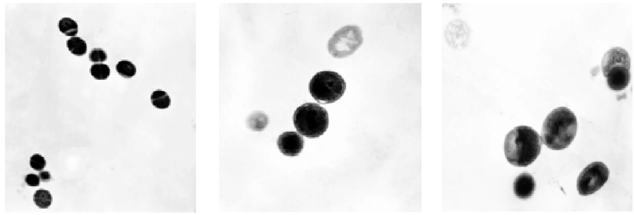
Fig.3　SDS-PAGE electrophoresis profile of *Staph.aureus*

2.5　紫甘薯花色苷对金黄色葡萄球菌显微特征的影响

从透射电镜图(图 4)可以看出，对照组菌体边缘清晰、平整、无缺陷、无裂痕，经紫甘薯花色苷作用 4h 后的实验组则可以明显的看到菌体变形，细胞质稀释，出现明显的质壁分离。随花色苷作用时间延长，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。这表明，花色苷能够导致金黄色葡萄球菌细胞壁破裂或者空洞形成，导致内容物外泄，细胞代谢无法正常进行，最终导致菌体死亡。

3　讨　论

紫甘薯花色苷加入菌液后，短时间抑制金黄色葡萄球菌的作用较明显。但随着作用时间的延长，抑菌作用逐渐减弱。这主要是因为花色苷在水溶液中以二苯基苯并吡喃阳离子、醌型碱、假碱、查耳酮形式存在，这四种形式随溶液的 pH 值变化而发生可逆改变，同时溶液的颜色也随其结构改变而改变。在酸性溶液中，花色苷以红色的二苯基苯并吡喃阳离子形式和蓝色的醌型碱存在，二苯基苯并吡喃阳离子失去 C 环氧上的阳离子可逆转化成醌型碱。随着溶液 pH 值进一步升高，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[10]。LB 培养基 pH 值在 7.0 左右，花色苷刚加入以二苯基苯并吡喃阳离子形式存在，此时抑菌活性最强；随着加入时间的延长花色苷互逆转变成其它三种形式，抑菌作用减弱。说明二苯基苯并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对金黄色葡萄球菌的作用[11]主要发生在对数生长期，即细胞分裂增殖期。



a (× 12000)　　b (× 20000)　　c (× 30000)

a.为对照组细胞；b.为 1MIC 的花色苷作用 4h；c.为 1MIC 的花色苷作用 8 h 。

图 4　透射电镜观察花色苷对 *Staph. aureus* 形态影响

Fig.4　Effects of anthocyanins on morphology of *Staph.aureus*.by TEM

经花色苷作用后，*Staph.aureus* 菌体出现严重质壁分离，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。王关林[11]等对中药抑菌作用研究中曾报道，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量明显减少，直至消失。通过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，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。

参考文献：

[1] GODA Y, SHIMIZU T, KATO Y. Two acylated anthocyanins from purple sweet potato [J]. 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* [J]. 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*

[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1999, 63: 1420-1424.
[4] FURUTA S, SUDA L, NISHIBA Y, et al. High tert-buthylperoxyl rodical scavenging activities of potato cultirars with purple flesh[J]. Food Sci Technol Int Tokyo, 1998(4): 33-35.
[5] SUDA I, FURUTA S, NISBHIBA Y, et al. Redution of liver induced by carbin tetyachtoride in rats administered purple-colored sweet potato juice[J]. Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi, 1997, 44: 315-318.
[6] CHENG C L, WANG Z Y. Bacteriostasic activity of anthocyanin of malva sylvestris[J]. 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[J]. 辽宁农业科学, 2005(2): 47.
[8] 徐叔云, 卞如廉, 陈修. 药理实验方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 1063-1114.
[9] 朱丽霞. 生物学中的电子显微镜技术[M]. 北京: 北京大学出版社, 1983: 11-72.
[10] SHI Z L, BASSA I A, GABRIEL S L, et al. Anthocyanin pigments of sweet potato [J]. Food Science, 1992, 57(3): 755-757,
[11] 王关林, 蒋丹, 方红筠. 天南星抑菌作用及其机理研究[J]. 畜牧兽医学报, 2004, 35(3): 280-285.