

植物多酚对金黄色葡萄球菌耐热核酸酶抑制作用的研究

(华中农业大学食品科技学院 武汉 430070) 王小红 戚向阳 谢笔钧 史贤明 蔡杰

摘要 利用甲苯胺蓝法观察了不同植物多酚提取物对金黄色葡萄球菌耐热核酸酶活性的抑制作用。结果表明 在一定的浓度范围内(0~2mg/mL),多酚提取物均对金黄色葡萄球菌耐热核酸酶的活性存在抑制作用,其中苹果多酚和茶多酚的抑制效果最佳,而温度、pH变化对多酚提取物抑制耐热核酸酶的活性无明显影响。

关键词 多酚提取物,金黄色葡萄球菌,活性,抑制作用

中图分类号:TS202.3 文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2004)04-0066-04

植物多酚在自然界中广泛存在,具有极强的抗氧化、酶活性抑制、抑菌、抗致突变、抗炎、防辐射、降血压等活性,不少制品已被列入天然抗氧化剂(如茶多酚、葡萄籽提取物)^[1,2]。金黄色葡萄球菌(*Saphylococcus aureus*)是引起食品污染和细菌性食物中毒的一种重要细菌,在自然界中分布广泛,其致病力主要取决于产毒素和酶的能力,主要有溶血毒素、肠毒素、血浆凝固酶和耐热核酸酶等。本文以茶多酚、葡萄籽提取物、莲房原花青素、苹果多酚为研究对象,比较它们抑制金黄色葡萄球菌耐热核酸酶活性的效果^[3],以便为寻找天然抑菌剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

金黄色葡萄球菌 华中农业大学食品科技学院微生物教研室保存;茶多酚(A)、葡萄籽提取物(B)、莲房原花青素(C)、苹果多酚(D)均由华中农业大学食品科技学院食品化学教研室制备,其中苹果多酚(D)又按制备方法的不同分为几个部分,苹果多酚粗提物为D,乙酸乙酯不同条件的萃取物为D₁、D₂;甲苯胺蓝 生物染色剂;脱氧核糖核酸(DNA)生化试剂,购自中国医药(集团)上海化学试剂公司;其他试剂均为分析纯;肉汤培养基^[4] 牛肉膏 5g、氯化钠 5g、蛋白胨 10g、磷酸氢二钾 2g、蒸馏水 1000mL pH

7.2±0.2,121℃灭菌 20min 备用;甲苯胺蓝核酸琼脂^[5] 0.05mol/L Tris 缓冲液(pH9.0)1000mL DNA 0.3g,琼脂 10g 0.01mol/L 氯化钙 1mL,NaCl 10g 0.1mol/L 甲苯胺蓝(或 3.25%溶液)3mL,以上混合物煮沸,使琼脂和 DNA 完全溶解,稍凉后加入甲苯胺蓝,分装于试管中,用橡皮塞塞紧,置于 4~8℃冰箱保存备用。

1.2 实验方法

1.2.1 金黄色葡萄球菌耐热核酸酶酶液的制备

1.2.1.1 菌株的活化 将金黄色葡萄球菌斜面菌种转至琼脂斜面活化 2~3 代,直至其生长良好为止,于 4℃冰箱中储存备用。

1.2.1.2 酶液的制备 将活化后的金黄色葡萄球菌菌种于无菌工作台上接种于肉汤培养基中,置于 37±1℃培养箱中培养 3d,取出,隔水煮沸 15min,3000r/min 离心 20min。取上清液于另一支无菌试管内(下称酶液),置于 4℃冰箱中保存备用。

1.2.2 耐热核酸酶试验(TNase 试验)^[5,6] 先将甲苯胺蓝核酸琼脂融化,待冷却至 40~50℃后倾注平板,用 3mm 打孔器打孔,每孔用微量移液器注入待测样液 10μL,置于 37±1℃培养箱培养 12h,分别于不同时间观察结果一次,孔周围出现粉红色晕,其外圈被一蓝色圈围绕者表明 DNA 被水解为 TNase 试验阳性,并记录圈直径(mm),无变色环或白色环,无蓝圈者为阴性。TNase 试验一旦反应呈阳性,不会再转为阴性,且易判断。

1.2.3 植物多酚对 TNase 活性的抑制试验

1.2.3.1 混合液的制备 用分析天平分别准确称取 0.0080g 的 A、B、C、D、D₁ 和 D₂ 配制成 8mg/mL 的样品原液备用。将上述样品原液用蒸馏水作连续倍比稀释,使其终浓度分别为 2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625mg/mL。将已稀释成不同浓度的样液按每个稀释度取 1.0mL 于灭菌试管内,再于每支试管内加入 1.0mL 酶液。另取酶液 1.0mL,加蒸馏水 1.0mL 作为对照用。加毕,置于 37±1℃保温箱保温 12h,取出试验。

1.2.3.2 植物多酚对 TNase 活性的抑制作用 取备妥的甲苯胺蓝琼脂玻片,用微量移液器于每个小孔

收稿日期:2003-08-08

作者简介:王小红(1970-),女,讲师,在职博士生,研究方向:食品微生物和食品安全。

内注入 10 μ L 不同稀释浓度的样液-酶液混合液,每个浓度做两个平行。同法于孔内注入不加样液的酶液作空白对照。置于 37 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C 保温箱保温 12h,取出测定粉红色酶环直径(mm),并按下式计算植物多酚样品对金黄色葡萄球菌耐热核酸酶活性的抑制率:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{空白圈直径} - \text{样品圈直径}}{\text{空白圈直径}} \times 100\%$$

1.2.4 不同 pH 对植物多酚抑制 TNase 活性的影响 选用茶多酚(A)与苹果多酚(D₁)作试验样品,样液浓度为 0.4mg/mL。选用柠檬酸盐-磷酸盐、磷酸氢二钠-磷酸二氢钠的缓冲体系分别配成 pH3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 的缓冲溶液。用分析天平准确称取 0.0010mg 的 A、D₁,用不同 pH 的缓冲溶液配成浓度为 1mg/mL 的样液原液备用。用不同 pH 的缓冲溶液代替蒸馏水,按前述混合液制备方法配制样液浓度为 0.5mg/mL 的样液-酶液混合物,以及空白对照液,以下步骤同 1.2.3.2,测不同 pH 条件下,植物多酚样品对金黄色葡萄球菌 TNase 活性的抑制作用。

1.2.5 不同温度对植物多酚抑制 TNase 活性的影响 选用茶多酚(A)与苹果多酚(D₁)作试验样品,样液浓度为 0.4mg/mL。按前述混合液制备方法配制样液浓度为 0.5mg/mL 的样液-酶液混合物,将其分别置于 20、40、60、80、100 和 120 $^{\circ}$ C 的条件下处理 30min,得到六个不同温度梯度处理的样液-酶液混合物以及空白对照液,以下步骤同 1.2.3.2,测不同温度条件下,植物多酚样品对金黄色葡萄球菌 TNase 活性的抑制作用。

2 结果与讨论

2.1 茶多酚(A)、葡萄籽提取物(B)、莲房原花青素(C)对 TNase 活性抑制作用的比较

图 1~图 3 为不同浓度的茶多酚(A)、葡萄籽提取物(B)、莲房原花青素(C)对 TNase 活性抑制效果

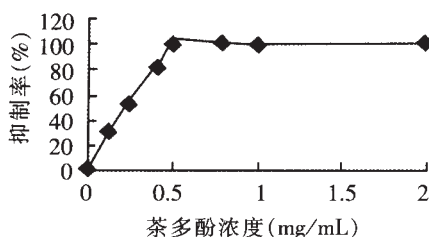


图 1 茶多酚对 TNase 活性抑制作用

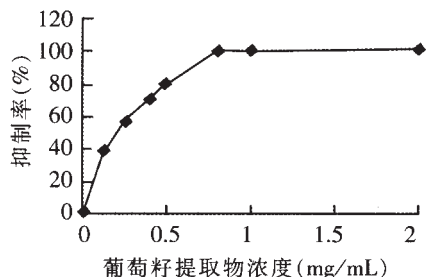


图 2 葡萄籽提取物对 TNase 活性抑制作用

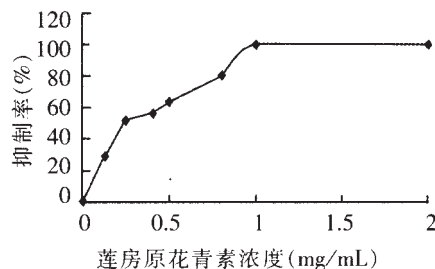


图 3 莲房原花青素对 TNase 活性抑制作用

的影响。

由图可知,在 0~2mg/mL 的浓度范围内,茶多酚、葡萄籽提取物、莲房原花青素对 TNase 活性有较强的抑制作用,并在 0~1mg/mL 浓度范围内,多酚样品对 TNase 活性的抑制率与浓度剂量呈正相关。当茶多酚、葡萄籽提取物、莲房原花青素的浓度分别为 0.5、0.8、1mg/mL 时,已无酶环出现,可完全抑制 TNase 活性。经单因素方差分析可知,茶多酚、葡萄籽提取物、莲房原花青素浓度变化对 TNase 活性的抑制效果存在显著性的影响($p < 0.01$)。

2.2 不同苹果多酚(D、D₁、D₂)对 TNase 活性抑制作用的比较

图 4~图 6 分别为在 0~2mg/mL 的浓度范围内,采用不同方法制备得到的苹果多酚提取物对 TNase

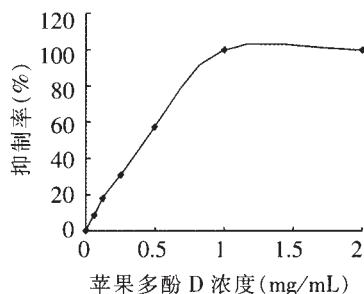


图 4 苹果多酚 D 对 TNase 活性抑制作用

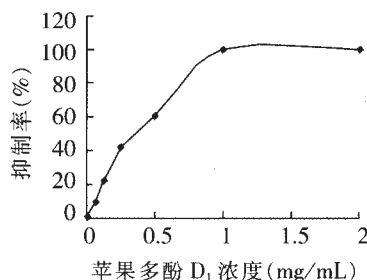


图 5 苹果多酚 D₁ 对 TNase 活性抑制作用

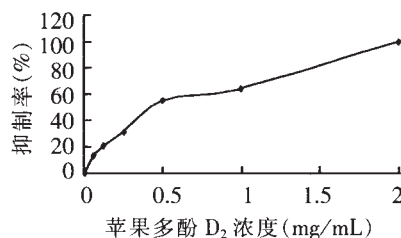


图 6 苹果多酚 D₂ 对 TNase 活性抑制作用

活性抑制效果的比较。

由图可知,在 0~2mg/mL 的浓度范围内,苹果多酚提取物对 TNase 活性有较强的抑制作用,并随提取物浓度的增加,所形成的酶环直径逐渐缩小,其抑制率升高,且抑制率与浓度剂量呈正相关。其中, D、D₁ 在浓度为 1mg/mL 时,即可完全抑制 TNase 活性; D₂ 在浓度为 2mg/mL 时,也可完全抑制 TNase 活性。经单因素方差分析可知,不同苹果多酚提取物浓度变化对 TNase 活性的抑制效果存在显著性的影响($p < 0.01$)。

不同苹果多酚提取物对 TNase 活性的抑制作用同其组成有关,其中 D 是苹果原料经乙醇提取,再经柱层析分离纯化及真空干燥得到的粗提取物; D₁ 和 D₂ 是 D 用乙酸乙酯萃取后,得到的乙酸乙酯相浓缩干燥物(D₁)和水相浓缩干燥物(D₂)。由于提取条件不同,三种苹果提取物的组成不同^[7],D 中原花青素含量最高为 70.76%;乙酸乙酯相(D₁)中酚类物质较复杂,有儿茶素、酚酸、黄酮及原花青素二聚体;水相(D₂)中酚类物质则主要为三聚体以上的原花青素。

2.3 不同 pH 条件对植物多酚抑制 TNase 活性的影响

图 7、图 8 是以茶多酚(A)与苹果多酚(D₁)为试验样品,样液浓度为 0.4mg/mL 时,不同 pH 条件对植物多酚抑制 TNase 活性效果的影响,空白对照样品的酶环直径为 15.1mm。由图可知,当 pH 分别为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 时,多酚样品对 TNase 活性的抑制效果不受影响。经不同 pH 缓冲液处理的茶多酚样液-酶液混合物所产生的粉红圈直径均为 7.1mm 左右,苹果多酚(D₁)样液-酶液混合物所产生的粉红圈直径均为 8.3mm 左右。由此可知,不同 pH 对两者抑制酶活性的影响不大,所得的图形基本上是一斜率为零的直线。

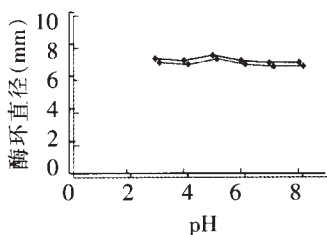


图 7 pH 对茶多酚(A)抑制 TNase 活性效果影响

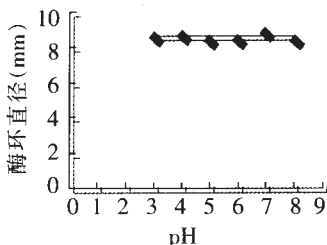


图 8 pH 对苹果多酚(D₁)抑制 TNase 活性效果影响

2.4 不同温度条件对植物多酚抑制 TNase 活性的影响

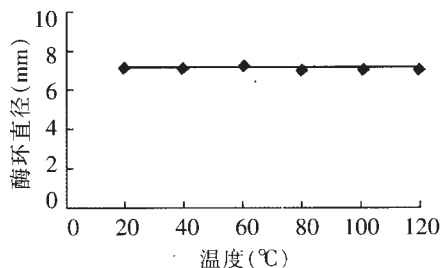


图 9 温度对茶多酚(A)抑制 TNase 活性效果影响

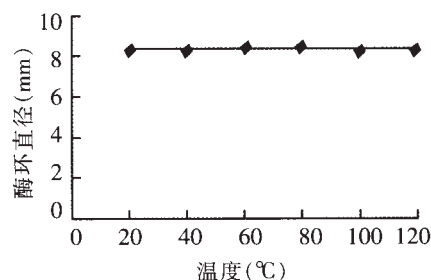


图 10 温度对苹果多酚(D₁)抑制 TNase 活性效果影响

图 9~图 10 是以茶多酚(A)与苹果多酚(D₁)为试验样品,样液浓度为 0.4mg/mL 时,不同温度条件对植物多酚抑制 TNase 活性效果的影响,空白对照样品的酶环直径为 15.1mm。由图可知,经 20、40、60、80、100 和 120℃的条件下处理 30min,多酚样品对 TNase 活性的抑制效果不受影响。经不同温度条件处理的茶多酚样液-酶液混合物所产生的粉红圈直径均为 7.1mm 左右,苹果多酚(D₁)样液-酶液混合物所产生的粉红圈直径均为 8.3mm 左右。由此可知,不同温度条件对两者抑制酶活性的影响不大,所得的图形基本上是一斜率为零的直线。

3 结论

3.1 不同植物多酚提取物对金黄色葡萄球菌 TNase 活性均有一定的抑制作用,且提取物不同其酶活抑制效果不同,这主要是由不同植物来源的多酚提取物中多酚类物质的组成及含量不同引起的。本实验选用的茶多酚样品中总酚含量在 95%以上,且其酯型儿茶素含量达 60%;苹果多酚(D₁)以含黄酮、儿茶素单体及原花青素低聚体为主;葡萄籽提取物和莲房原花青素中主要酚类物质是原花青素,尤其以二聚体的含量最为丰富^[1,8,9]。故在本实验中,茶多酚、葡萄籽提取物、苹果多酚均对金黄色葡萄球菌 TNase 活性显示抑制作用。

3.2 植物多酚提取物对金黄色葡萄球菌 TNase 活性的抑制作用基本不受环境 pH、温度条件变化的影响,具有较强的耐酸、耐热稳定性。

3.3 植物多酚提取物对金黄色葡萄球菌 TNase 活性

腐乳后发酵过程大豆异黄酮含量与存在形式的研究

(广东省农业机械研究所, 广州 510630)

龚 丽

(中国水产科学研究院南海水产研究所, 广州 510300)

郝淑贤

(华南农业大学食品学院, 广州 510642)

潘 珂 陈永泉 刘 欣

摘 要: 研究了腐乳恒温后发酵不同时期大豆异黄酮的存在形式与含量的变化, 找出其变化规律, 以指导生产实践。

关键词: 腐乳, 后发酵, 大豆异黄酮

中图分类号: TS214.2 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2004)04-0069-03

大豆异黄酮是大豆生长过程中形成的具有生理活性的物质, 随着对其生理活性的了解, 近年大豆异黄酮的研究倍受关注。腐乳是中国传统的发酵豆制品, 其制作过程分为三个阶段: 豆腐坯的制作、前发酵与后发酵阶段。后发酵又称后熟, 主要是酶系与微生物协同参与反应的过程。腐乳色、香、味的形成关

键在于后发酵。据报道, 发酵可使丹贝(一种发酵豆制品)中异黄酮的存在形式发生转变, 增强其生理活性, 但对于腐乳这种高营养价值的植物奶酪型食品中的异黄酮目前却没有研究。本实验针对腐乳后发酵过程中异黄酮的变化进行较为系统的研究, 以期腐乳营养价值的确定提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

石油醚 分析纯, 沸点 30~60℃; 乙醇、甲醇 均为分析纯; 乙酸 色谱纯; 前发酵结束装罐腐乳 广州金源食品厂, 以腐乳毛霉为菌种; 双蒸水。

FA2104 电子天平 上海天平仪器厂; 电热恒温培养箱 黄石医疗器械厂; 电热恒温水浴锅 跃新科学仪器厂; 飞利浦二合一搅拌机 飞利浦公司; 高效液相色谱仪 美国; CS1012 型电热彭风干燥

收稿日期: 2003-09-04

抑制作用的实验表明, 植物多酚提取物具有较好的抑菌、防腐作用, 是可利用和开发的天然食品添加剂^[10]。

参考文献:

- [1] 樊兴土, 朱全芬, 夏春华. 茶叶中原花色素类物质[J]. 天然产物研究与开发, 1992, 4(2): 85~93.
- [2] 国植, 徐莉. 原花青素: 具有广阔发展前景的植物药[J]. 国外医药(植物药分册), 1996, 11(5): 196~203.
- [3] 印德贤, 刘明强. 金荞麦对金黄色葡萄球菌胞外耐热核酸酶活性的影响[J]. 南通医学院学报, 1999, 19(4): 427.
- [4] 李阜棣, 喻子牛, 何绍江. 农业微生物学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996.
- [5] 孟昭赫. 食品卫生检验方法注解微生物学部分(第一版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1990.
- [6] G F Ibrahim. A simple sensitive method for determining staphylococcal thermonuclease in cheese[J]. Applied Bacteriology, 1981, 51: 307~312.
- [7] 戚向阳, 王小红, 荣建华. 不同苹果多酚提取物清除·OH 效果的研究[J]. 食品工业科技, 2001, 22(4): 7~9.
- [8] Gow-Chin Yen. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity [J]. Agric Food Chem, 1997, 45: 30~34.
- [9] Stanislaw Burda, Wieslaw Oleszek, Chang Y Lee. Phenolic compound and their changes in apples during maturation and cold storage[J]. Agric Food Chem, 1990, 38: 945~948.
- [10] 凌关庭. 有第七营养素之称的多酚类物质[J]. 中国食品添加剂, 2000(1): 28~37.