

野棉花叶活性组分抑制酵母菌的研究

王洁¹, 邱琛¹, 钟凯^{1,*}, 高鸿¹, 黄毅娜^{2,*}, 高晓玲³, 徐正君³

(1. 四川大学轻纺与食品学院, 四川成都 610065;

2. 四川大学华西公共卫生学院, 四川成都 610041;

3. 四川农业大学水稻研究所, 四川温江 611130)

摘要:本研究以野棉花叶为原料, 采用正己烷(料液比 1:20 g/mL)脱脂处理后, 以甲醇(料液比 1:25 g/mL)为提取剂提取, 经大孔吸附树脂 Diaion HP-20 层析柱, 以抗酵母菌活性为筛选方法获得 100% 甲醇洗脱液为抗菌活性组分。通过牛津杯法和微量稀释法测定野棉花叶活性组分对供试菌株的抑菌活性、最小抑菌浓度和最低杀菌浓度, 采用杀菌曲线和透射电镜初步探究其对酵母菌生长的影响。结果表明, 野棉花叶活性组分的浓度为 10 mg/mL 时, 对黑曲霉和酿酒酵母均具有抑制效果, 抑菌圈直径分别为: 黑曲霉 9.20 mm, 酿酒酵母 15.10 mm。但对不同种酿酒酵母的抑菌活性有所不同, 抑菌圈直径范围为 14~17 mm, 所测得的最小抑菌浓度为 29.30~58.60 $\mu\text{g/mL}$, 最低杀菌浓度为 117.20~468.80 $\mu\text{g/mL}$ 。杀菌曲线结果表明, 活性组分的抑菌作用主要表现在酵母菌的生长对数期; 透射电镜观察的结果表明其通过破坏酵母菌细胞壁或细胞膜的结构, 导致酵母菌内容物外泄使得细胞死亡。

关键词:野棉花叶, 抗酵母菌活性, 杀菌曲线, 透射电镜

Study on anti-yeast activity of active fraction obtained from *Urena lobata* L. leaves

WANG Jie¹, QIU Chen¹, ZHONG Kai^{1,*}, GAO Hong¹, HUANG Yi-Na^{2,*}, GAO Xiao-Ling³, XU Zheng-Jun³

(1. College of Light Industry, Textile and Food Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China;

2. West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China;

3. Rice Institute, Sichuan Agricultural University, Wenjiang 611130, China)

Abstract: In the present study, the leaves of *Urena lobata* L. were used as raw material. *U. lobata* leaves were treated with n-hexane (1:20 g/mL) to remove the low polarity components, and then extracted with methanol (1:25 g/mL). By bioassay guide of anti-yeast activity, the 100% methanol elution was obtained as the main active fraction from the crude extract through macroporous resin Diaion HP-20 column chromatography. The antimicrobial activity of all strains was investigated by Oxford cup method. The micro-dilution method was used to calculate Minimum inhibitory concentrations (MICs) and Minimum fungicidal concentration (MFCs). Meanwhile, the effects of the active fraction on yeast growth cycle and cell morphology were observed according to killing curves and transmission electron microscope (TEM), respectively. At a concentration of 10 mg/mL, the active fraction exhibited 9.20 mm of inhibitory zone diameter against *Aspergillus niger* and 15.10 mm of inhibitory zone diameter against *Saccharomyces cerevisiae*. However, the anti-yeast activity was different from different kind of *Saccharomyces cerevisiae* with inhibitory zone diameters ranging from 14 to 17 mm. The MICs and MFCs of the active fraction were detected to be in ranges of 29.30~58.60 $\mu\text{g/mL}$ and 117.20~468.80 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The killing curves indicated that the anti-yeast activity mainly occurred at the log phase. The TEM results showed that the active fraction killed yeast cells through destructing yeast cell wall and membrane, and resulting in the leakage of cytoplasm.

Key words: *Urena lobata* L.; anti-yeast; killing curves; transmission electron microscope

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)19-0107-05

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2015.19.013

野棉花 (*Urena lobata* L.) 为锦葵科肖梵天花属植物, 又名地桃花、肖梵天花等, 主要分布于我国广西、

收稿日期: 2015-01-12

作者简介: 王洁 (1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学, E-mail: wangjie0207@163.com。

* 通讯作者: 钟凯 (1983-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 发酵工程, E-mail: eric211@163.com。

黄毅娜 (1976-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 毒理学, E-mail: dir0932@sina.com。

基金项目: 新世纪优秀人才支持计划 (NCET-10-0591); 四川省青年基金 (2012JQ0019)。

四川、云南、贵州等地。其根或全草可入药,主治感冒,风湿痹痛,月经不调,跌打肿痛,喉痹,乳痈,毒蛇咬伤等。目前,从野棉花中分离得到的化合物主要为黄酮类^[1]、醇类^[2]、酚酸类^[3]。研究表明,野棉花具有良好的抗恶性细胞增殖活性^[4]和抗氧化活性^[5],其水提物对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、肺炎链球菌、普通变形杆菌、粪肠球菌具有良好的抑制作用^[6-7]。U.K.Mazumder^[8]等发现野棉花甲醇提取物对表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、痢疾杆菌(*Shigella dysenteriae*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)均具有一定的抑菌活性。

酵母菌是一种单细胞真菌,属于兼性厌氧菌,对于蜜饯果脯、蜂蜜、泡菜、葡萄酒等高酸、高糖、高盐或长时间冰冻的食物,都易因腐败酵母菌感染而引起腐败。Loureiro^[9]等总结了引起葡萄酒变质的主要菌群为酵母菌,并且由于人们对人工防腐剂的安全性越来越不信任,使得从植物中提取活性成分以达到对食品中腐败酵母菌的控制是目前研究的重点之一。目前,对野棉花叶的研究多为对其物质成分的研究,而对其活性组分应用于抗腐败酵母菌的研究较少,并且抑菌机制尚不明确。本研究在前期对中草药的抗菌活性实验中发现,野棉花叶对酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)具有良好的抑菌活性^[10]。因此,本实验以抗酵母菌活性对野棉花叶柱层析组分进行筛选,并进一步选择具有抑菌活性的组分进行抑菌机理的探讨,期望能为野棉花叶作为一种新型的抗酵母菌抑制剂资源提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

野棉花叶(*Urena lobata* L) 四川省成都市荷花池中药材市场,经四川农业大学鉴定后用于后期实验,样品保存于四川大学轻纺与食品学院食品生物活性实验室。

大肠杆菌(*Escherichia coli* ATCC 25922),鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium* ATCC 14028),金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC 25923),枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* ATCC 21216),蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus* ATCC 10231),侧孢芽孢杆菌(*Bacillus laterosporus* ATCC 64),黄曲霉(*Aspergillus flavus* ATCC 204304),黑曲霉(*Aspergillus niger* ATCC 16404),根霉(*Rhizopus oryzae* ATCC 9363),青霉(*Penicillium citrinum* ATCC 14994),白色念珠菌(*Candida albicans* ATCC 10231),酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763) 四川大学食品科学与技术四川省重点实验室提供。G19、G25、G34 和 G42 四川大学食品科学与技术四川省重点实验室从腐败葡萄中分离纯化得到,经形态学观察、生理生化实验测定和 26S rDNA D1/D2 区序列分析鉴定属于酵母菌种。

常规分析纯试剂 成都市科龙化工试剂厂。

RV10CS25 旋转蒸发器 IKA® RV10 control,

德国;SPECTRA MAX190 酶标仪 美国 Molecular Devices;JB-CT-2F 超净工作台 苏州佳宝净化工程设备有限公司;MJ-250 恒温培养箱 上海和羽电子科技有限公司;LDZX-50FB 立式压力蒸气灭菌器 上海申安医疗器械厂;浙制 02810232 电热恒温水浴锅 余姚长江温度仪表厂;TGL16M 低温高速离心机 长沙湘智离心机仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 野棉花叶抑菌活性组分的制备 取野棉花干叶 50 g 粉碎,平均粒度为 200 μm ,按料液比 1:20 g/mL 用正己烷进行脱脂,在室温下磁力搅拌 24 h,分离上清液,得到滤渣。滤渣按料液比 1:25 g/mL 加入甲醇作为提取剂,磁力搅拌 24 h 后抽滤,获得上清液,真空浓缩后获得野棉花甲醇浸膏。将甲醇浸膏溶于 50~100 mL 甲醇,上大孔吸附树脂 Diaion HP-20 层析柱,用甲醇-水(甲醇浓度分别为 0、20%、40%、60%、80%、100%)梯度洗脱,洗脱流速为 1 mL/min,得到 6 个组分:F1、F2、F3、F4、F5、F6。

1.2.2 抑菌活性实验 吸取 50 μL 菌悬液($1 \times 10^5 \sim 10^6$ CFU/mL)加入已灭菌的培养基中,涂布棒涂匀后将无菌牛津杯放置于已冷却的含菌平板表面,成三角放置于三个顶点,分别注入 200 μL 受试物。放入各菌种适宜的温度下培养,观察各平板抑菌圈直径大小。用 95% 甲醇溶解提取物,故采用 95% 甲醇做阴性对照。10 mg/mL 青霉素和链霉素分别作为细菌、霉菌及酵母的阳性对照。每组 2 个平板,每个平板放置 3 个牛津杯,抑菌圈直径取平均值。

1.2.3 最小抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MFC)的测定 采用二倍稀释法稀释提取液,将活性组分 F6 稀释成 11 个浓度,用微量加样器从低浓度到高浓度依次加入杀菌后的 96 孔板中,每孔 10 μL ,第 12 孔为无药空白对照。将受试菌在 YPD 培养基上培养至对数生长期,挑取菌落悬浮于液体培养基中,调整其含菌量达到 1.5×10^8 CFU/mL。将上述菌悬液稀释 100 倍后用于微量稀释法 MIC 测定^[11]。将制备好的菌悬液加入 MIC 测定板中,每孔 190 μL 。此时,F6 组分的终浓度范围为 30~0.015 mg/mL。将 96 孔板置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 条件下恒温无菌培养 24 h 后,肉眼观察试管内液体澄清的最低受试物浓度即为 MIC。取已编号的平板培养基 12 个,将上述 1~12 号管中液体分别划线于平板培养基上,置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 条件下恒温培养 24 h 后,观察平板内无菌生长的最低受试物浓度即为其 MFC。

1.2.4 棉花叶活性组分对酵母菌的时间致死曲线绘制 采用对倍稀释将 F6 组分用 95% 甲醇稀释,终浓度分别为 $16 \times \text{MIC}$ 、 $8 \times \text{MIC}$ 、 $4 \times \text{MIC}$ 、 $2 \times \text{MIC}$ 值。将受试菌在 YPD 培养基上培养至对数生长期,挑取菌落悬浮于双倍液体培养基中,调整其含菌量达到 1.5×10^6 CFU/mL。

取灭菌后的试管 5 支分别加入 2 mL 不同浓度的 F6 组分,再加入 2 mL 菌悬液,各管终浓度为 $1 \times \text{MIC} \sim 8 \times \text{MIC}$,5 号管为不加受试物的对照管。置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 气浴摇床震荡培养,分别吸取培养 0、1、2、3、4、

表1 野棉花叶活性组分 F6 的抑菌效果

Table 1 Antimicrobial effect of active fraction F6 obtained from *Urena lobata* L.leaves

供试菌株	抑菌圈直径(mm) ^a		
	野棉花叶 ^b	阴性对照 ^c	阳性对照 ^d
革兰氏阴性菌			
大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>)	0	0	35.13
鼠伤寒沙门氏菌(<i>Salmonella typhimurium</i>)	0	0	28.19
革兰氏阳性菌			
金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>)	0	0	28.24
枯草芽孢杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>)	0	0	18.14
蜡状芽孢杆菌(<i>Bacillus cereus</i>)	0	0	15.34
侧孢芽孢杆菌(<i>Bacillus laterosporus</i>)	0	0	21.18
真菌			
黄曲霉(<i>Aspergillus flavus</i>)	0	0	25.22
黑曲霉(<i>Aspergillus niger</i>)	9.20	0	20.26
根霉(<i>Rhizopus oryzae</i>)	0	0	28.37
青霉(<i>Penicillium citrinum</i>)	0	0	26.17
白色念珠菌(<i>Candida albicans</i>)	0	0	24.28
酵母			
酿酒酵母(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	15.10	0	21.11

注:^a 牛津杯直径为 8 mm;^b 实验浓度为 10 mg/mL,每个牛津杯注入 200 μ L,每个平板含活性组分 2 mg;^c 用 95% 甲醇溶解提取物,故采用 95% 甲醇做阴性对照;^d 10 mg/mL 青霉素和链霉素分别作为细菌、霉菌及酵母的阳性对照,图 1 实验条件同。

5、6、12、22、24 h 的培养液 200 μ L 液体加入 96 孔板,测定其 560 nm 处的 OD 值,绘制曲线。

1.2.5 透射电镜观察活性组分对酵母菌细胞的影响

配制 40 mL 酵母菌液体培养基,接种培养至对数生长期的酵母菌,加入 F6 组分,使终浓度为其 MFC 值。置于 28 $^{\circ}$ C 摇床中 175 r/min 振荡培养 12 h 后,取 2~4 mL 放于离心管中,用 1500~2000 r/min 离心 10~15 min,弃去上清液;再用吸管沿管壁缓慢加入约 0.5% 戊二醛固定液(原液用 PBS 按比例 1:6 稀释)离心洗脱,弃去上清液,重复三次。在 4 $^{\circ}$ C 环境中静置 10 min 后,用 10000 r/min 离心 15 min,弃去上清液,再用吸管沿管壁缓慢加入 3% 戊二醛固定液固定。将固定后的酵母菌送四川大学华西基础医学与法医学院电镜室进行透射电镜检测。

2 结果及讨论

2.1 野棉花叶抑菌活性组分的制备

野棉花叶采用正己烷进行脱脂处理,将所得滤渣再经甲醇提取,提取液蒸发浓缩后获得墨绿色甲醇浸膏,上大孔吸附树脂 Diaion HP-20 层析柱(重量为 500 g),用水-甲醇梯度洗脱后获得 6 个组分:F1(3.91 g)、F2(2.96 g)、F3(0.71 g)、F4(0.42 g)、F5(0.55 g)、F6(0.72 g)。

2.2 抑菌活性实验

2.2.1 野棉花叶活性组分的抑菌活性 采用牛津杯法对 F1~F6 各组分的抗酵母菌活性进行测定,结果表明,当各组分浓度为 10 mg/mL 时,F1~F5 组分对酵母菌均无抑菌活性,仅有 F6 组分对酵母菌具有良好的抑菌效果。因此,本实验对 F6 组分的抑菌活性进行了测定,其对两株受试菌株均表现出了抑菌活性,测试结果如表 1 所示。由结果可知,当 F6 组分浓度为

10 mg/mL 时,对常见的细菌无抑菌活性,但对黑曲霉(*Aspergillus niger*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)表现出抑菌活性,抑菌圈直径分别为 9.20 mm 和 15.10 mm。其中,酿酒酵母的抑菌圈直径较黑曲霉的大,说明对酿酒酵母的抑菌效果更好。因此,后继实验主要围绕活性组分 F6 对腐败食品中酵母菌的抑制活性展开研究。

2.2.2 野棉花叶活性组分 F6 对酵母菌的抑菌活性 抑菌实验的结果表明野棉花叶活性组分 F6 对酵母菌具有较强的抑菌活性,因此我们采用牛津杯法测定了 F6 组分对腐败食品中分离出的不同种酵母菌的抑菌活性,供试的 4 株菌株为从腐败葡萄中分离纯化所得,经 26S rDNA D1/D2 区序列分析鉴定均属于酿酒酵母属。实验结果如图 1 所示,当野棉花叶活性组分的浓度为 10 mg/mL 时,对 G19 和 G42 种类的酵母菌抑菌效果良好,抑菌圈直径分别为 17.13 mm 和 17.03 mm;而对 G25 和 G34 种类的酵母菌抑制效果较小,抑菌圈直径均为 14.03 mm。由此表明,野棉花叶组分 F6 对不同种酵母菌均具有抑菌活性,但由于菌种的不同其抑制效果有所差异。Amit Kumar Tyagi 等^[12]对薄荷精油的抗酵母菌活性进行了测定,当加入 10 μ L 薄荷精油时,酵母菌的抑菌圈直径为 12 mm,我们的测定结果与其相似,但野棉花叶活性组分和薄荷精油的抗菌活性存在较小差异,可能是由于组分的活性物质基础不同。同时,野棉花叶 F6 组分对不同种酵母菌的抑菌活性存在差异,可能是由于所选菌株细胞膜差异所造成,活性组分可通过破坏酵母菌细胞膜以达到抑菌作用,由于各酵母菌的细胞膜组成成分的比例有所差异,导致了抑菌活性差异的存在。

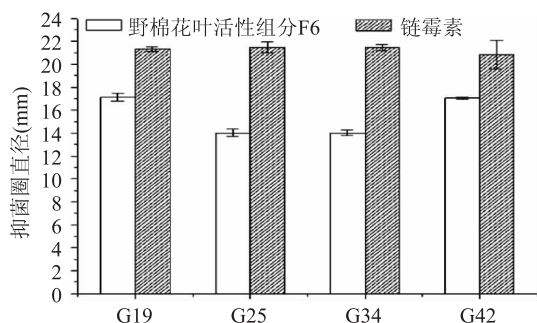


图1 野棉花叶活性组分 F6 对不同种酵母菌的抑菌活性

Fig.1 The inhibitory zone diameter of active fraction

F6 obtained from *Urena lobata* L.leaves on different yeasts

注:G19 与 *Saccharomyces cerevisiae* (AY529515.1) 同源,G25 与 *Saccharomyces cerevisiae* (AJ746340.1) 同源,G34 与 *Saccharomyces cerevisiae* (JQ277730.1) 同源,G42 与 *Saccharomyces cerevisiae* (JX103178.1) 同源。

2.2.3 最小抑菌浓度 (MIC) 和最低杀菌浓度 (MFC) 的测定 本实验采用微量稀释法和划线平板法测定了野棉花叶活性组分 F6 对腐败酵母菌的 MIC 及 MFC 值,结果如表 2 所示。结果表明,野棉花叶活性组分 F6 对不同酵母菌的敏感性不同。对 G19 和 G25 酵母菌的最小抑制浓度均为 58.60 $\mu\text{g}/\text{mL}$,但两者的最低杀菌浓度有所不同,对 G19 的最低杀菌浓度为 468.80 $\mu\text{g}/\text{mL}$,高于对 G25 的最低杀菌浓度 117.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。野棉花叶活性组分 F6 对 G34 和 G42 菌株的最小抑菌浓度均为 29.30 mg/mL ,最低杀菌浓度均为 117.20 mg/mL 。其中,对 G19 菌株的 MIC 值和 MFC 值均为四株菌株中最高,对 G34 和 G42 的 MIC 值和 MFC 值均为四株菌株中最低。因此,F6 组分在相对较低浓度时,供试的酵母菌菌株的生长均有效地被抑制。该结果与其他研究结果相似,薄荷精油对不同种酵母菌的 MIC 值的范围为 0.56~2.25 mg/mL ^[12];Ricardo Salazar-Aranda^[13] 等对墨西哥东北部的 17 种植物提取物进行了抗菌活性测定,发现 *Ceanothus coeruleus*, *Chrysanthinia mexicana*, *Cordia boissieri* 三类植物对光滑念珠球菌 (*C.glabrata*) 都具有抗菌活性,MIC 值的范围为 31.25~125.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。同时,不同的酵母菌菌株对野棉花叶活性组分 F6 的敏感程度有所差异,产生差异的原因可能由于受试酵母菌生长差异导致,F6 组分对酵母菌的抑制作用主要表现在对数期,而在前期实验中发现 G19 酵母菌在 4 株菌种中生长最缓慢,其在生长 5 h 后方才进入对数期,并且对数期时间较其余三种长,而这可能是导致 F6 组分对 G19 酵母菌的 MIC 及 MFC 值较高的原因。

2.3 野棉花叶活性组分 F6 对酵母菌的抑菌机制

2.3.1 野棉花叶活性组分 F6 对 G42 酵母菌的杀菌曲线 图 2 表示了不同浓度 (0~8 \times MIC) 野棉花叶活性组分 F6 处理后 G42 酵母菌的生长曲线。各酵母菌培养基的起始 OD_{560} 值均在 0.08~0.10 之间,在经过 1 d 培养后,其 OD_{560} 值发生了改变。在 0~6 h 的延迟期间,各浓度下的酵母菌数目几乎没有变化;

但当进入生长对数期后,2 \times MIC、4 \times MIC 及 8 \times MIC 浓度处理下的培养基 OD_{560} 值明显比对照组低,说明其含菌量减少;12 h 后进入稳定期发现,对照组酵母菌培养基最终 OD_{560} 值为 1.15,而经 1 \times MIC、2 \times MIC、4 \times MIC 和 8 \times MIC 野棉花叶活性组分处理后的培养基,其最终 OD_{560} 值分别为 1.04、0.54、0.08 和 0.10。这表明随着处理的活性组分浓度的升高,酵母菌的含菌量降低,在活性组分浓度为 4 \times MIC 和 8 \times MIC 时,吸光值与初始值已无明显变化,表明 F6 组分在 4 \times MIC 下已完全抑制了酵母菌生长,而该抑制作用主要表现在酵母菌生长的对数期。

表 2 野棉花叶活性组分 F6 最小抑菌浓度及最低杀菌浓度

Fig.2 The minimum inhibitory concentrations and minimum fungicidal concentration of active fraction F6 obtained from *Urena lobata* L.leaves on different yeasts

供试菌株	野棉花叶活性组分 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
	MIC	MFC
G19	58.60	468.80
G25	58.60	117.20
G34	29.30	117.20
G42	29.30	117.20

注:G19 与 *Saccharomyces cerevisiae* (AY529515.1) 同源,G25 与 *Saccharomyces cerevisiae* (AJ746340.1) 同源,G34 与 *Saccharomyces cerevisiae* (JQ277730.1) 同源,G42 与 *Saccharomyces cerevisiae* (JX103178.1) 同源。

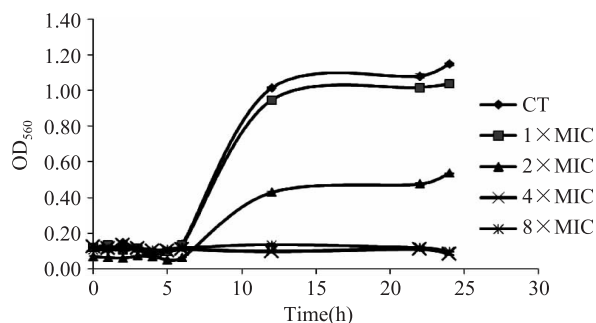


图2 野棉花叶活性组分 F6 处理后 G42 酵母菌的杀菌曲线

Fig.2 The killing curves of G42 yeast of active fraction

F6 obtained from *Urena lobata* L.leaves

注:CT 为阴性对照;G42 与

Saccharomyces cerevisiae (JX103178.1) 同源。

2.3.2 透射电镜观察野棉花叶活性组分 F6 对 G42 酵母菌细胞的影响 由图 3 可知,经野棉花叶活性组分 F6 处理后的 G42 酵母菌细胞形态与对照组有显著差异。如图 3 中 A、B 所示,未加入野棉花叶活性组分的 G42 酵母菌细胞膜和细胞壁较为完整光滑,细胞壁和细胞膜结合紧密,细胞质均匀化。用 117.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 野棉花叶活性组分处理 1 d 后,酵母菌菌体表面变粗糙,细胞壁变薄,细胞膜破裂,甚至出现细胞内容物于细胞膜破裂处渗出的现象 (如图 3C、图 3D)。由透射电镜观察可初步推测野棉花叶活性组分通过破坏酵母菌的细胞壁和细胞膜,使得内容物外泄,从而导致酵母菌细胞死亡。Pradnya 等^[14] 采用荧光显微镜观察了加入香芹酚和百里酚的

葡萄酒中腐败酵母菌,发现其细胞膜破裂,同时采用酶标仪检测了死亡酵母菌的内容物溶出量,发现随着受试物加入量的增加,内容物溶出越多,我们研究的结果与其文献报道相似。

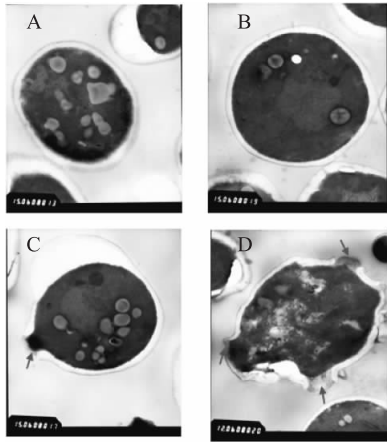


图3 野棉花叶活性组分 F6 处理后的 G42 酵母菌透射电镜照片

Fig.3 TEM image of the Strain G42 treated with active fraction F6 obtained from *Urena lobata* L.leaves

注:A、B:正常培养的 G42 酵母菌形态;C、D:野棉花叶活性组分处理后的 G42 酵母菌形态。G42 与 *Saccharomyces cerevisiae*(JX103178.1)同源。

3 结论

本实验以抗酵母菌活性为筛选方法,对野棉花叶经正己烷脱脂处理、甲醇提取后,再经 HP-20 柱层析水-甲醇梯度洗脱所得的 6 个组分进行抑菌活性筛选,结果表明只有 F6 组分(100% 甲醇洗脱液)表现出良好的抗酵母菌活性,由此获得了野棉花叶中抗酵母菌的活性组分 F6。同时,对该活性组分 F6 的抑菌活性进行测定,发现其只对黑曲霉(*Aspergillus niger*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)具有抑菌效果;由于酵母菌种类不同,表现出不同程度的抑菌活性,其抑菌圈直径范围为 14~17 mm,野棉花叶活性组分 F6 对不同种酵母菌的 MIC 值和 MFC 值的范围分别为 29.30~58.60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 117.20~468.80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。通过时间致死曲线和透射电镜的实验进一步表明,野棉花叶活性组分 F6 对酵母菌具有良好的抑制作用,当浓度达为 $4 \times \text{MIC}$ 时,酵母菌的生长已被完全抑制;而且经 F6 组分处理后的酵母菌细胞结构不完整,细胞壁及细胞膜受到损害,有内容物渗出,从而导致酵母细胞死亡。目前,本研究仅就野棉花叶的活性组分对酵母菌的抑制活性及机理进行了初步地探讨,今后的研究重点将是围绕其抑制酵母菌的分子作用机制进行更深层次地探讨。

参考文献

- [1] Jia L, A YM, Jing LL, et al. Three New Flavonoid Glycosides from *Urena lobata* [J]. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2011(13):907-914.
- [2] Dinda B, Banik R, Roychoudhury D, et al. Chemical Constituents of *Oroxylum indicum* Roots and *Urena lobata* roots [J]. *Journal of the Indian Chemical Society*, 2012(9):1279-1281.
- [3] 贾陆,郭海波,敬林林,等.地桃花化学成分研究,II,酚酸类等化学成分[J].*中国医药工业杂志*, 2009, 40(10):746-749.
- [4] Pieme CA, Penlap VN, Ngogang J, et al. *In vitro* Cytotoxicity and Antioxidant Activities of Five Medicinal Plants of Malvaceae Family from Cameroon [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2010(29):223-228
- [5] Lissy KP, Simon TK, Lathab MS. Antioxidant Potential of *Sida retusa*, *Urena lobata* and *Triumfetta rhomboidea* [J]. *Ancient Science of Life*, 2006, 25(3-4):10-5
- [6] 陈勇,谢臻,韦韬,等.地桃花水提物的体外抗菌实验研究[J].*亚太传统医药*, 2011, 7(10):29-30
- [7] 覃巧,邹小琴,杨玉芳,等.广西地桃花水提物与抗菌药物对 G+ 球菌的体外联合抗菌作用[J].*中国药师*, 2013, 16(10):1475-1478
- [8] Mazumder UK, Gupta M, Manikandan L, et al. Antibacterial Activity of *Urena lobata* root [J]. *Fitoterapia*, 2001(72):927-929
- [9] Loureiro V, Malfeito-Ferreira M. Spoilage Yeasts in the Wine Industry [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 9(86):23-50
- [10] 四川农业大学.从野棉花叶中提取酵母菌抑制剂的方法:中国, CN102742920B [P] 2013.07.31. <http://www.pss-system.gov.cn/sipopublicsearch/search/search/showViewList.shtml>
- [11] Rentsenkhand T, Miklós T, László G, et al. Anti-yeast Activities of Some Essential Oils in Growth Medium, Fruit Juices and Milk [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2011(144):480-486
- [12] Amit KT, Davide G, Anushree M, et al. Anti-yeast Activity of Mentha Oil and Vapours through *in Vitro* and *in Vivo* (Real Fruit Juices) Assays [J]. *Food Chemistry*, 2013(137):108-114
- [13] Ricardo SA, Luis Alejandro PL, Joel LA, et al. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Plants from Northeast of Mexico [J]. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2011:1-6
- [14] Pradnya SC, Santosh GT. Antifungal Activity and Mechanism of Action of Carvacrol and Thymol Against Vineyard and Wine Spoilage Yeasts [J]. *Food Control*, 2014(46):115-120.