

生姜活性提取物对铜绿假单胞菌的抑制机理研究

杨楠, 王静, 余友恒, 朴兆佳, 马堃* (大连民族大学生命科学院, 辽宁大连 116600)

摘要 [目的]探究生姜的活性提取物对铜绿假单胞菌抑制作用的机理。[方法]采用有机溶剂浸提法提取生姜中的活性物质,探讨生姜在不同条件下的活性提取物对铜绿假单胞菌的抑制效果及抑菌机理。[结果]生姜提取物对铜绿假单胞菌有明显的抑制作用,且生姜提取物的稳定性较好,不同因素处理下仍具有较强的抑菌性。通过对微生物的生长曲线和电导率的测定,进一步证明生姜的活性提取物抑制了铜绿假单胞菌的生长。[结论]生姜的活性提取物对铜绿假单胞菌有较好的抑制作用。

关键词 生姜;活性提取物;铜绿假单胞菌;抑菌作用;机理

中图分类号 S632.5 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)20-0095-03

Research on Antimicrobial Mechanism of the Active Extract of *Zingiber officinale* Roscoe against *Pseudomonas aeruginosa*

YANG Nan, WANG Jing, YU You-heng, MA Kun* et al (College of Life Science, Dalian Minzu University, Dalian, Liaoning 116600)

Abstract [Objective] The research aimed to study the mechanism of the inhibitory effect of the active extract of *Zingiber officinale* Roscoe on *Pseudomonas aeruginosa*. [Method] The effective components of *Zingiber officinale* Roscoe were extracted by organic solvent extraction, the antibacterial activities and mechanism of *Zingiber officinale* Roscoe against *Pseudomonas aeruginosa* in different condition were discussed. [Result] The active extract of *Zingiber officinale* Roscoe had obvious inhibitory effect on *Pseudomonas aeruginosa*, and the stability of extract was good. The inhibitory effects of *Zingiber officinale* Roscoe still had a strong antiseptic power after various treatments. Through the determination of bacterial growth curve and electric conductivity, it was further proved that the active extract of *Zingiber officinale* Roscoe inhibited the growth of *Pseudomonas aeruginosa*. [Conclusion] *Zingiber officinale* Roscoe had better antibacterial effect on *Pseudomonas aeruginosa*.

Key words *Zingiber officinale* Roscoe; Active extracts; *Pseudomonas aeruginosa*; Antimicrobial activity; Mechanism

姜是姜科植物姜(*Zingiber officinale* Roscoe)的根茎,是日常生活中常见的香辛调味料。生姜是一种广泛应用的药食两用植物,作为传统中药广泛应用于临床。现代研究表明,生姜具有抗氧化、抗炎、保护心血管、降血糖、降低胆固醇以及抗肿瘤的作用^[1]。对于生姜的化学成分研究已有报道^[2-5],姜的化学成分复杂,已发现的有100多种,可归属为挥发油、姜辣素、二苯基庚烷三大类。姜辣素和二苯基庚烷具有较强的防腐及抗氧化作用,有研究表明,生姜提取物对多种微生物有明显抑制作用^[6-8]。这些研究对于食品行业中天然防腐剂的开发具有重要意义。笔者以水产品中典型的腐败菌铜绿假单胞菌为检验对象,通过测定不同温度、有机试剂及pH对生姜提取物稳定性的影响来探讨生姜抑菌作用的稳定性,并通过测定生姜提取物处理过的铜绿假单胞菌前后的生长曲线及电导率来初探生姜提取物的抑菌机理。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂 生姜(新鲜生姜购于辽宁大连市场);铜绿假单胞菌(来自大连民族大学食品安全实验室);牛肉膏、蛋白胨、琼脂,均为生化试剂;NaCl(AR级)、HCl(AR级)、NaOH(AR级)、无水乙醇(AR级)、甲醇(AR级)、丙酮(AR级)、乙腈(AR级)。牛肉膏蛋白胨培养基和营养肉汤培养基按参考文献[9]自制。

1.2 仪器与设备 CJ-1680超净工作台、HH-6型数显恒温水浴锅、JA-2003型电子天平、ZK-027型恒温干燥箱、旋转蒸发仪、XA-1型高速万能粉碎机、恒温培养箱、立式压力

蒸汽灭菌器、UV-2550紫外分光光度计、摇床以及实验室其他常规仪器。

1.3 试验方法

1.3.1 生姜活性物质的提取。生姜,洗净,用刀切成5 mm左右薄片,放入恒温干燥箱中。在80℃下烘干6~8 h,再用高速万能粉碎机将姜粉碎。参考范紫焯^[10]的方法,称取100 g姜粉,以1:2:8的比例放入姜粉、无水乙醇和无菌水进行浸泡,充分搅匀,置于水浴锅上,温度为50℃,浸泡6 h以上。浸泡后,趁热缓慢分离出上清液,进行抽滤。将抽滤液装入圆底烧瓶,并连接好减压回收装置,将圆底烧瓶置于恒温水浴锅中,减压回收乙醇。最初瓶内剧烈沸腾,等到蒸馏缓慢进行,冷凝液也渐渐减少,则停止加热,取下圆底烧瓶。将生姜提取物用保鲜膜包裹,防止其成分的挥发。

1.3.2 抑菌效力试验。采用牛津杯法^[11],即将适量铜绿假单胞菌接种于营养肉汤培养基中,过夜振荡培养(37℃, 100 r/min);再将50 μL过夜培养物接种于营养肉汤培养基中,振荡培养(37℃, 100 r/min)6 h,得到铜绿假单胞菌。

融化后的牛肉膏蛋白胨营养琼脂培养基倒入培养皿中,冷却凝固后加入菌悬液,用玻璃涂布棒均匀涂在培养基表面,置于37℃恒温箱中培养15 min,使琼脂表面干燥待用。用无菌镊子将牛津杯(直径9 mm)置于含菌培养皿(每个培养皿内2个牛津杯)中,每个牛津杯内加样150 μL,以生理盐水(以CK表示)为阴性对照。将培养皿置于37℃培养24 h,取出后测其抑菌圈直径大小。以上操作均在无菌条件下进行。

1.3.3 不同浓度生姜活性提取物对抑菌效果的影响。根据抑菌圈测定结果,采用琼脂打孔法测定样品MIC。于超净工作台内,向每个灭菌培养皿中倾注10~15 mL的高压灭菌过的牛肉膏蛋白胨进行铺底,每个培养皿厚度均匀,待琼脂冷

基金项目 大连民族大学大学生创新创业训练计划项目(XA201603084)。
作者简介 杨楠(1995—),女,内蒙古包头人,本科生,专业:食品科学与工程。*通讯作者,工程师,硕士,从事食品分析与检测研究。
收稿日期 2017-05-05

却凝固后,备用。吸取 200~300 μL 铜绿假单胞菌菌液加入到冷却后的培养基中,用镊子夹取牛津杯放在制好的抑菌圈培养基内,并在培养基上做好标记。每个牛津杯内分别加样 150 μL ,同时设立灭菌水为空白对照。将培养皿移入 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养,在接下来的 6~12 h 内观察菌体的生长情况。重复 3 个平板。

1.3.4 热稳定性试验。将质量浓度为 2.00% 的生姜活性提取物溶液分成不同的组分,在 20、40、60、80、100 和 120 $^{\circ}\text{C}$ 6 个水浴温度下处理 20 min,采用牛津杯法观察温度对生姜活性提取物抑菌活性的影响。重复 3 个平板。

1.3.5 不同有机试剂对生姜活性提取物抑菌效果的影响。分别用甲醇、丙酮、乙腈和乙醇处理质量浓度为 2.00% 的生姜活性提取物溶液 1 h,同样采用牛津杯法观察不同有机试剂对生姜活性提取物抑菌活性的影响。重复 3 个平板。

1.3.6 不同 pH 对生姜活性提取物抑菌效果的影响。将质量浓度为 2.00% 的生姜活性提取物溶液分成不同的组分,用氢氧化钠和盐酸调配成 6 个 pH 区间(3~4、4~5、5~6、6~7、7~8 和 8~9),采用牛津杯法观察 pH 对生姜活性提取物抑菌活性的影响。重复 3 个平板。

1.3.7 细菌生长曲线。将适量铜绿假单胞菌接种于营养肉汤培养基中,过夜振荡培养(37 $^{\circ}\text{C}$,160 r/min)。再将 50 μL 过夜培养物接种于营养肉汤培养基中,振荡培养(37 $^{\circ}\text{C}$,100 r/min)12 h,得到铜绿假单胞菌。取少量假单胞菌过夜培养至对数期,加入生姜提取物使其终浓度为 2%,于 30 $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 摇床振荡培养。于 0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24 h 分别取样,在 600 nm 处测定其吸光值。

1.3.8 菌液电导率的测定。取少量培养至对数期的铜绿假单胞菌,向其中加入生姜提取物使其浓度为 2.00%,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 摇床振荡培养。参考李婷婷等^[12]的方法,在 0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24 h 分别取样测定培养液的电导率,确定金属离子渗出的变化趋势。

2 结果与分析

2.1 抑菌效力试验 试验结果表明,生姜提取物对铜绿假单胞菌有很强的抑制作用。当生姜提取物质量浓度高于 0.25% 时,对铜绿假单胞菌有抑菌效果,生姜提取物质量浓度为 0.25%~2.00% 时,抑菌圈直径逐渐增大;当生姜提取物质量浓度为 4.00% 时,其抑菌效果最明显,抑菌圈直径为 20.3 mm。

2.2 热稳定性试验 由图 1 可知,生姜的活性提取物经 6 种温度处理 15 min 后,抑菌效力并未受较大影响。与常温对照组相比,40 $^{\circ}\text{C}$ 的抑菌圈达到最大,表明此温度下的抑菌效力最好。而随着温度的升高,抑菌圈有不同程度的减小,温度为 120 $^{\circ}\text{C}$ 时,抑菌效力最差。60~120 $^{\circ}\text{C}$ 各个温度条件下抑菌圈直径无明显变化,可见不同温度对生姜活性提取物的处理不影响其中有效成分的抑菌活性。说明生姜活性提取物的热稳定性较好。

2.3 有机试剂对生姜提取物抑菌效力的影响 由图 2 可知,分别经甲醇、丙酮、乙腈和乙醇处理过的生姜活性提取

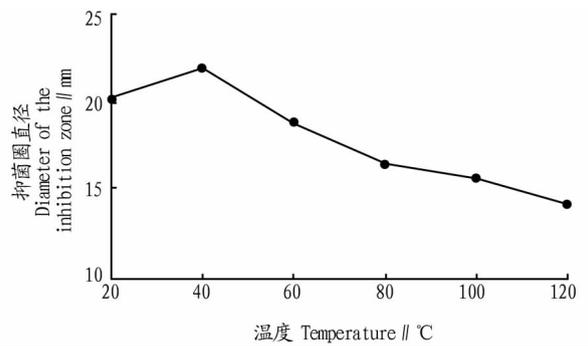


图 1 不同热处理温度对生姜提取物抑菌效力的影响

Fig. 1 Effect of heat treatment on inhibitory effectiveness of the active extract of *Zingiber officinale* Roscoe

物,除乙醇处理后抑菌圈增大较多,其余 3 种有机溶剂的抑菌效力均比较稳定。可见,生姜提取物不受有机试剂的影响,稳定性良好。

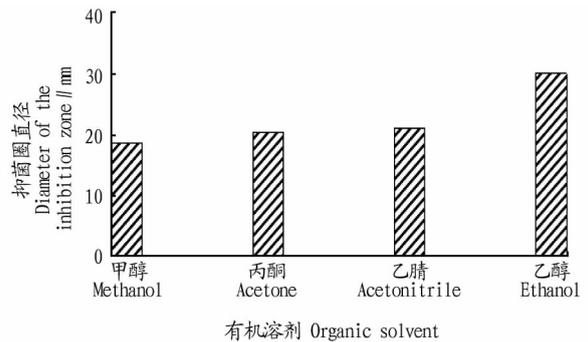


图 2 不同有机溶剂对生姜提取物抑菌效力的影响

Fig. 2 Effect of organic solvent on inhibitory effectiveness of the active extract of *Zingiber officinale* Roscoe

2.4 pH 对生姜提取物抑菌效力的影响 由试验结果可知,当 pH 在 5~6、6~7、7~8、8~9,生姜活性提取物的抑菌能力具有一定的稳定性,抑菌圈直径保持在 14.9~15.3 mm;而在酸性(pH 为 3.0)条件下,抑菌效力达到最大,抑菌圈直径达 15.9 mm,但不排除因过酸条件下盐酸抑制铜绿假单胞菌的生长。

2.5 细菌生长曲线 菌液的光密度值(OD 值)可以用来衡量菌液中细菌数目的多少,且菌悬液的浓度与其吸光值成正比。因此,OD 值变化可以反映生姜提取物对铜绿假单胞菌的抑制作用。由图 3 可知,经生姜提取物处理的试验组的细菌生长曲线与正常培养的对照组存在明显差异;且对照组中铜绿假单胞菌在 12 h 进入稳定期,而生姜处理组因细菌受到抑制,其生长缓慢,在 18 h 才进入稳定期,表明生姜提取物能有效抑制铜绿假单胞菌菌体生长繁殖。

2.6 菌液电导率的测定 细菌细胞膜是细菌的保护屏障。当细菌遇到不利生长条件或者抑菌剂作用时,细菌细胞膜会遭到破坏,丧失其半透性且流动性降低,进而菌体的保护屏障被打破,内部电解质(如 K^+)大量渗入至培养液,导致培养液的电导率的改变。因此,菌液电导率的变化反映了细菌细胞膜通透性的变化情况^[13]。

由图 4 可知,当铜绿假单胞菌培养液经生姜提取物处理

