

核桃种皮多糖抑制大肠杆菌的研究

刘安军, 李海燕, 王云霞, 邓颖

(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 利用核桃种皮纯多糖WKPP-70-1-1, 以大肠杆菌为供试菌, 通过分析不同浓度下WKPP-70-1-1对大肠杆菌的作用, 确定其最小抑制浓度MIC为400 $\mu\text{g/mL}$ 。又通过对MIC下大肠杆菌的生长曲线的分析研究, 确定WKPP-70-1-1对大肠杆菌的作用是抑制而不是杀死, 而且其抑制时间集中在对数生长期, 到一定时间WKPP-70-1-1对大肠杆菌的抑制作用会解除, 最后对WKPP-70-1-1作用大肠杆菌菌体先后形态做了原子力显微镜的观察, 结果表明WKPP-70-1-1作用大肠杆菌后, 原本光滑无褶皱的菌体变得褶皱, 粗糙, 失去了规则形态结构。

关键词: 纯多糖; 最小抑制浓度; 生长曲线; 原子力显微镜

文章编号: 1673-9078(2011)1-29-31

Antimicrobial on *Escherichia coli* Activities of Polysaccharide from Walnut Kernel Pellicle

LIU An-jun, LI Hai-yan, WANG Yun-xia, DENG Ying

(College of Food Science and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The antimicrobial effect of pure polysaccharide from walnut kernel pellicle (WKPP-70-1-1) with different concentration on *E.coli* was studied and its minimum inhibitory concentration (MIC) was determined as 400 $\mu\text{g/mL}$. Analysis of growth curve of *E.coli* effected by MIC of WKPP-70-1-1 showed that WKPP-70-1-1 can inhibit the growth of *E.coli*, especially the logarithm phase of *E.coli*. After a certain time, the inhibition effect of WKPP-70-1-1 might disappear. The morphology of *E.coli* treated by WKPP-70-1-1 was observed by Atomic force microscopy and the results showed that smooth and no-wrinkle *E.coli* became wrinkles, rough, loss of the rules of morphology.

Key words: pure polysaccharide; MIC; growth curve; atomic force microscopy;

核桃系胡桃科核桃属植物, 在我国分布范围广阔^[1], 原产于近东地区, 又称胡桃、羌桃, 与扁桃、腰果、榛子并称为世界著名的“四大干果”。核桃经济价值很高^[2], 既可以生食、炒食, 也可以榨油、配制糕点、糖果等。核桃不仅味美, 而且营养价值很高, 被誉为“万岁子”、“长寿果”, 据测定, 100 g 核桃中脂肪 20~64 g (71%为亚油酸, 12%为亚麻酸), 蛋白质为 15~20 g, 糖类为 10 g, 以及含有钙、磷、铁、胡萝卜素、核黄素 (维生素 B2)、维生素 B6、维生素 E、胡桃叶醌、磷脂、鞣质等营养物质。本课题组前期从核桃种皮中提取出了纯度较高且活性较好的核桃种皮多糖^[3], 在此基础上, 研究了其对大肠杆菌的抑制作用, 为其应用提供参考。

1 材料与方法

收稿日期: 2010-09-15

作者简介: 刘安军 (1985-), 男, 教授, 主要从事畜产 (副产) 高附加值的开发利用及功能性食品研究

1.1 材料

1.1.1 原料

核桃, 天津塘沽学校大街菜市场; 产地: 天津。

1.1.2 供试菌种

大肠杆菌 (*Escherichia coli*), 天津科技大学功能性食品实验室提供。

1.1.3 仪器与药品试剂

HW·SY 系列电热恒温水浴锅、RE-52AA 旋转蒸发仪、DZF-6020 真空冷冻干燥机、SHB-III 型循环水式多用真空泵、TH-300 梯度混合器、DBS-100 电脑全自动部分收集器、TGL-16B 台式离心机、ESJ205-4 型电子天平、SP-2102UV 紫外可见分光光度计、JSPM-5200 原子力显微镜购自 JEOL 日本电子。

DEAE-Sephadex A-25、Sephadex G-75, 均为鼎国生物公司产品, 氢氧化钠、盐酸、乙醇、乙酸乙酯、氯仿、正丁醇、氯化钠、浓硫酸、苯酚, 均为分析纯。

1.2 核桃仁种皮多糖的提取纯化

将核桃仁用水浸泡, 至可以手剥下核桃仁种皮,

将核桃仁种皮自然晾干,备用。取一定量核桃仁种皮,浸泡在 0.25 mol/L 的 NaOH-乙醇溶液中,40 °C 恒温水浴锅中浸泡 18 h。弃去上清,用无水乙醇清洗 2 次,用适量蒸馏水浸泡残渣 1 h,重复 2 次,抽滤收集水溶液,用 1 mol/L 的 HCl 调 pH 至中性,55 °C 旋蒸浓缩至一定体积。乙酸乙酯去脂,Sevage 法除蛋白质,70% 乙醇醇析,DEAE Sephadex A-25 凝胶柱、Sephadex G-75 凝胶柱层析纯化,冷冻干燥得到纯多糖。

1.3 核桃仁种皮多糖的抑菌实验

1.3.1 培养基的制备

细菌培养基:牛肉膏 5 g,蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 水 1000 mL, pH 7.0~7.2 (配制固体培养基需加入 20 g 琼脂),分装,在 0.1 MPa 下高压灭菌 20 min,备用^[4]。

EMB 培养基:取 50 g EMB 培养基溶于蒸馏水中,定容至 1000 mL, pH 自然,分装,在 0.1 MPa 下高压灭菌 20 min,备用。

1.3.2 菌种的活化与菌悬液的制备

取试管若干,装入溶化的细菌培养基,灭菌后摆成斜面。在无菌条件下用划线法将供试菌种接入到斜面培养基上,然后再适宜的温度条件下于培养箱中培养活化(温度 37 °C,时间 24 h)。然后分别挑取一环已活化好的菌种放入 9 mL 无菌水中,振荡摇匀,制成一系列菌悬液,浓度约为 10^7 cfu/mL~ 10^8 cfu/mL,备用^[5]。

1.3.3 抑菌圈试验

准备若干直径为 5 mm,长 1 cm 的圆筒状物体于 121 °C 干热灭菌 20 min,备用。将融化的无菌培养基倒入平皿,每个平皿约 10 mL 培养基,冷却凝固,用无菌镊子夹取无菌圆筒状物体 4 个,插入装有培养基的平皿中。

吸取 100 μ L 菌悬液,加入到 15 mL 未凝固的细菌培养基中,吹吸均匀,倒入到插有圆柱状物体的平皿中,待凝固后,拔出圆柱状物体,在周围的 3 个孔中加入 100 μ L 400 μ g/mL WKPP-70-1-1,中间的孔加入 100 μ L 的无菌水做对照。做 3 组平行。恒温培养箱 37 °C,24 h 倒置培养,观察抑菌圈直径,比较抑菌效果。

1.3.4 最小抑制浓度(MIC)的测定

将 WKPP-70-1-1 加入到 50 °C 左右为凝固的细菌固体培养基中,使其终浓度为 100 μ g/mL、200 μ g/mL、300 μ g/mL、400 μ g/mL、500 μ g/mL、600 μ g/mL,再分别移取各菌悬液 100 μ L,充分混匀,倒入平皿,待其完全冷却凝固后,于恒温培养箱中,37 °C 倒置培养。每个浓度作三个重复。观察,以不长菌或者菌落数最少的最低浓度为最小抑制浓度(MIC)。

1.3.5 生长曲线的绘制

将试管编号为正常组 0、1、2、3、4、5、6、7、8 及加药组 0^+ 、 1^+ 、 2^+ 、 3^+ 、 4^+ 、 5^+ 、 6^+ 、 7^+ 、 8^+ 。分别加入 4 mL 细菌液体培养基培养基,在 0.1 MPa 下高压灭菌 20 min,备用。在超净工作台中向 0~8 号试管中分别加入 0.5 mL 无菌水,0.5 mL 菌悬液;向 0^+ ~ 8^+ 号试管中分别加入 0.5 mL WKPP-70-1-1 (使终浓度为 400 μ g/mL),0.5 mL 菌悬液。置于恒温培养箱中,37 °C 培养,将正常组和加药组的试管按照编号顺序于 0 h、4 h、8 h、12 h、16 h、24 h、38 h、48 h 取出,吹吸均匀,于波长 600 nm 测吸光度值,根据 OD 值绘出生长曲线。

1.3.6 原子力显微镜观察核桃种皮多糖作用大肠杆菌前后单个菌形态的变化^[6]

(1) 取活化的大肠杆菌一环于装有 100 mL 牛肉膏蛋白胨培养基的 500 mL 三角瓶中 37 °C,培养 18 h。

(2) 分别取液体培养基 1 mL 于含多糖 40 mg/mL 的牛肉膏蛋白胨培养基和不含多糖的牛肉膏蛋白胨培养基中,37 °C 培养 12 h,3000 r/min,10 min 离心取菌体,蒸馏水 3000 r/min,10 min 洗涤三次,将洗净的菌体稀释至一定的浓度轻轻涂于盖玻片上,隔夜自然晾干,原子力显微镜观察菌体。

2 结果与分析

2.1 抑菌圈实验结果分析

经反复实验验证 WKPP-70-1-1 虽然不能完全抑制供试菌种的生长,但是可以有效减少供试菌种生长的数量,因此以在一定范围内的菌落数量大大少于周围菌落数量的标准来测定抑菌圈的直径。由图 1 可知,WKPP-70-1-1 对大肠杆菌具有一定的抑制作用。抑菌圈的直径为 10 mm。



图 1 WKPP-70-1-1 的抑菌效果

Fig.1 Antibacterial effect of WKPP-70-1-1

2.2 核桃仁种皮多糖的最小抑制浓度(MIC)

由表 1 可知,WKPP-70-1-1 对着大肠杆菌有一定的抑菌作用,虽然不能完全抑制其生长,但是却可以有效地减少菌落的生成。因此,本试验以使菌落数在

0~50 个的 WKPP-70-1-1 浓度作为核桃仁种皮多糖的最小抑制浓度 (MIC)。根据实验结果得出, 当 WKPP-70-1-1 浓度为 300 $\mu\text{g/mL}$ 时, 每个平皿中的大肠杆菌菌落数的平均值为 10 个, 继续增加 WKPP-70-1-1 的浓度至 600 $\mu\text{g/mL}$, 大肠杆菌的菌落数仍然在此数量范围内, 因此认为其 MIC 值为 400 $\mu\text{g/mL}$ 。

表 1 WKPP-70-1-1 的最小抑制浓度 (MIC)

Table 1 The MIC required different concentration of WKPP-70-1-1

多糖浓度/ $(\mu\text{g/mL})$	100	200	300	400	500	600
菌落个数	278	95	42	10	10	12

2.3 生长曲线

实验结果如图 2 所示, 400 $\mu\text{g/mL}$ 的 WKPP-70-1-1 对大肠杆菌有一定的抑制作用, 通过测定菌悬液在波长为 600 nm 处的吸光值来判断抑菌效果, 吸光值越小, 活菌的数量值越小, 抑菌效果越好。

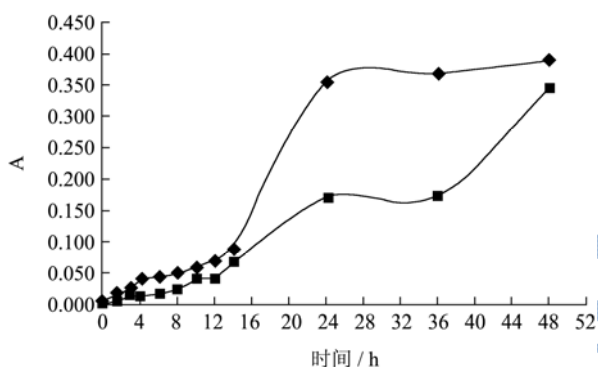


图 2 WKPP-70-1-1 对大肠杆菌生长曲线的影响

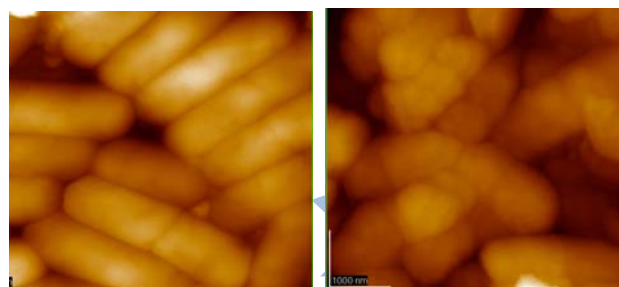
Fig.2 Effect of WKPP-70-1-1 on *E.scherichiacoli* growth curve

如图2所示, WKPP-70-1-1组OD值位于正常组OD值下方, 这说明, 核桃种皮多糖对大肠杆菌有一定的抑制作用。对数生长期, WKPP-70-1-1组OD值远小于正常组OD值, 说明WKPP-70-1-1在对数生长期对大肠杆菌有明显的抑制作用, 到生长第24 h大肠杆菌生长到稳定期, 多糖对它的抑制作用达到最大, 直到稳定期的第12 h, WKPP-70-1-1组大肠杆菌开始加速生长, 在第48 h, WKPP-70-1-1组OD值几乎与正常组OD值相等, 这可能说明, 核桃种皮多糖对大肠杆菌的抑制作用到一定时间会解除, 同时证明, 核桃种皮多糖对大肠杆菌的作用是抑制而不是杀死。

原子力显微镜可以很直观的观察药物作用前后细菌形态的变, 大肠杆菌为革兰氏阴性菌, 正常生理状态的大肠杆菌菌体呈短杆状, 表面光滑, 菌体饱满 (如图3正常组), 核桃种皮多糖作用后, 大肠杆菌菌体细胞壁褶皱, 变得粗糙, 菌体失去了规则形态结构 (如

图3 WKPP-70-1-1组), 这说明核桃种皮可能是通过破坏细胞壁的某些结构从而达到抑制大肠杆菌菌体生长的作用。

2.4 原子力显微镜观察 WKPP-70-1-1 作用大肠杆菌前后菌形态的变化



正常组 WKPP-70-1-1组

图 3 大肠杆菌的形态

Fig.3 Shape of *E.scherichiacoli* detected by AFM

3 结论

本文对核桃种皮多糖抑制大肠杆菌的功能做了进一步的研究, WKPP-70-1-1对大肠杆菌的抑菌圈直径为 10 mm, 最小抑制浓度为400 $\mu\text{g/mL}$ 。生长曲线的研究表明, WKPP-70-1-1对大肠杆菌的作用为抑制, 且其抑制时间段为对数生长期和稳定器的前期。原子力显微镜观察WKPP-70-1-1对大肠杆菌抑制方式为破坏细菌细胞壁, 使细胞壁褶皱、粗糙、失去原有的规则性。此研究有一定的理论基础, 具有应用价值, 为以后核桃种皮的开发以及将核桃种皮多糖应用于食品工业打下了基础。

参考文献

- [1] 万政敏.核桃青皮中多酚类物质及其抗氧化性的分析[M]. 内蒙古,内蒙古农业大学,2004
- [2] 翟梅枝,王磊,何文君,等.核桃青皮乙醇提取物抑菌活性研究[J].西北植物学报,2009,29(1):2542-2547
- [3] 刘安军,王玥玮,朱振元,等.核桃仁种皮多糖的提取及抑菌作用的研究[J].现代食品科技,2010,26(4):362-369
- [4] 莫开菊,秦恩华,王俊亮,杨梅叶提取物抑菌作用研究[J].湖北民族学院学报,2008,9(26):072-272
- [5] 苏伟,赵利,刘建涛,等.黄精多糖抑菌及抗氧化性能研究[J].食品科学,2007,28(8):55-57
- [6] 陈勇,蔡继业,邢少碌,等.多种肿瘤细胞表面超微结构的原子力显微镜观察及药物对细胞膜表面超微结构影响的初步研究[J].电子显微学报,2003,22(2):100-104