

姜酚的抑菌机制研究

刘伟¹, 赵婧¹, 陈冬¹, 周春丽^{1,2}, 李全宏¹

(1. 中国农业大学食品科学与工程学院, 北京 100083) (2. 江西科技师范学院生命科学学院, 江西南昌 330013)

摘要: 试验研究了姜酚对 6 种食品相关的微生物的抑制活性。姜酚对试验目标微生物金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、痢疾志贺氏菌、酿酒酵母和黑曲霉菌的最低抑制浓度在 8.0 到 22.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, 表明姜酚可以有效的抑制所有的供试微生物。通过时间-杀菌试验表明不同浓度的姜酚可以有效延迟金黄色葡萄球菌和痢疾志贺氏菌的延滞期。电子显微图证实了姜酚对金黄色葡萄球菌、痢疾志贺氏菌和黑曲霉的外部形态和超微结构的改变。经过姜酚作用的细胞或菌丝可以在电子显微图中发现异常形态的改变, 如: 收缩、局部变形、细胞壁和细胞膜的破坏、细胞质的损耗等。细胞形态的改变可能是由于姜酚直接作用于细胞膜的结果。DNA 损伤试验表明在试验设定浓度下姜酚对于微生物没有基因毒性, 姜酚的作用机制需要进一步研究。

关键词: 姜酚; 抑菌; 生姜

文章编号: 1673-9078(2015)11-92-100

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.11.016

Antibacterial Mechanism of Gingerols

LIU Wei¹, ZHAO Jing¹, CHEN Dong¹, ZHOU Chun-li^{1,2}, LI Quan-hong¹

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

(2. School of Life Science, Jiangxi Science & Technology Normal University, Nanchang 330013, China)

Abstract: The antimicrobial potential of gingerols against six food-related bacteria was investigated in this study. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of gingerols against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Aspergillus niger* ranged from 8.0 to 22.0 $\mu\text{g/mL}$, showing that gingerols could effectively inhibit the growth of all test bacterial pathogens. The time-kill assay demonstrated that the lag phase of *S. aureus* and *S. dysenteriae* were apparently delayed by the different concentrations of gingerols. Electron micrographs confirmed the effects of gingerols on the morphological and ultrastructural characteristics of *S. aureus*, *S. dysenteriae*, and *A. niger*. Electron micrographs revealed that gingerols induced morphological changes to the cell or mycelia, such as shrinkage, local deformation, damage to cell wall and membranes, and loss of cytoplasm. These morphological alterations might be due to the direct effect of gingerols on the cell membrane. DNA damage assay revealed that gingerols had no genotoxic effect on the microbes within the test concentration range, and the functional mechanism of gingerols needs to be explored by further studies.

Key words: gingerols; antibacterial; ginger;

生姜 (*Zingibe officinale*, Roscoe) 通过溶剂萃取的方法可以得到姜油树脂, 相关研究表明姜油树脂的含量约占生姜的 5%~8%, 其中由姜酚组成的辛辣成分约占姜油树脂的 25%, 而 6-gingerol 是姜酚中含量最多的成分。张鲁明等^[1]发现通过超临界 CO_2 萃取的得到的姜油对大肠杆菌、沙门氏菌、痢疾志贺杆菌、苏门金杆菌和金黄色葡萄球菌均有一定的抑制作用, 抑菌最低质量浓度为 0.5~1.0 mg/mL 。Park 等^[2]研究了生姜的乙醇和正己烷提取物对可以引起牙周病的牙龈卟啉菌 (ATCC 53978), 牙髓卟啉单胞菌 (ATCC 35406)

收稿日期: 2015-02-06

基金项目: 十二五科技支撑计划项目 (2011BAD23B01); 公益性行业 (农业) 科研专项项目 (201303112)

作者简介: 刘伟 (1984-), 男, 博士, 研究方向: 农产品贮藏及加工

通讯作者: 李全宏 (1966-), 男, 教授, 研究方向: 农产品贮藏及加工

和中间普氏菌 (ATCC 25611) 的抑制作用, 结果发现 10-gingerol 和 12-gingerol 在最低抑制浓度为 4~0 $\mu\text{g/mL}$ 的条件下可以有效的抑制这些口腔病原菌, 在 6~30 $\mu\text{g/mL}$ 的条件下可以致其死亡。Ficker 等^[3]发现 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol 是生姜中抗真菌的主要成分, 这些化合物在浓度小于 1 mg/mL 的条件下, 对白色念珠菌在内的 13 种人类病原细菌有抑制作用。尽管国内外的研人员对生姜提取物 (生姜水提取、姜油树脂、姜油、姜辣素或姜酚) 的抑菌功能展开了一些研究, 但是对于姜酚 (gingerols) 抑菌机制的深入研究很少, 而且不同的试验由于缺乏统一的标准而影响其科学价值和应用前景。

生姜提取物中最主要的功能成分为姜酚^[4], 为了更加准确而系统地研究姜酚的抗菌活性, 为其以后在食品中的实际应用打下基础, 本试验拟首先采用牛津

杯双层平板法和最低抑制浓度测定姜酚对一些常见细菌和真菌的抗菌效果,然后采用生长曲线抑制、细胞膜渗透性测定、透射电子显微镜扫描、扫描电子显微镜扫描等方法对金黄色葡萄球菌、痢疾志贺氏菌和黑曲霉菌液的抑制机理进行深入研究。

1 材料与方法

1.1 原料

山东莱芜姜购自当美廉美超市, D101型大孔树脂均购于沧州宝恩吸附材料科技有限公司。试验目标微生物金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) (AS 1.89), 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) (AS 1.1849), 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) (AS 1.90), 志贺氏菌 (*Shigella dysenteriae*) (AS 1.1869), 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) (AS 2.430) 和黑曲霉 (*Aspergillus niger*) (AS 3.06249) 均购自中国科学院微生物研究所。水解酪蛋白肉汤培养基 (MHB)、水解酪蛋白琼脂培养基 (MHA)、马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA)、马铃薯葡萄糖肉汤培养基 (PDB) 购自北京奥博星生物技术责任有限公司。葡萄糖购自国药集团化学试剂有限公司, 吡啶橙 (AO) 染液、溴乙锭 (EB) 染液、刚果红染液购自美国Sigma公司, 细菌基因组DNA提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.2 主要仪器设备

激光共聚焦显微镜 (LSM710) 购自德国 Zeiss 公司; 扫描电镜 (Quanta 200) 购自捷克 FEI 公司; 透射电镜 (H-7650B) 购自日本日立公司; 荧光光度计 (Cary Eclipse) 购自美国 Varian 公司; 电导率仪 (EC 215) 购自美国 Hanna 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 姜酚制备^[5]

采用 D101 型大孔树脂对姜油树脂提取液进行纯化, 上样液质量浓度 2 mg/mL, 流速 2 mL/min, 3 BV 去离子水洗脱, 然后用体积分数为 80% 乙醇以 2 mL/min 的流速洗脱 4 BV。然后在 40 °C 真空旋转蒸发除去姜酚溶液中的乙醇, 然后将其溶解于含有 1% 吐温-80 的无菌水中, 配制成浓度为 50 mg/mL 的待测原液, 于 4 °C 放置待用。

1.3.2 牛津杯双层平板扩散试验

将预先配置并灭菌的 MHA 或 PDA 培养基加热融化, 无菌条件下向培养皿 (90 mm) 加入 10 mL, 待

其充分冷却凝固后用无菌镊子夹取已灭菌的牛津杯 (ϕ 6×8×10 mm) 置于培养基表面, 然后向平板倒入 5 mL 融化的培养基, 待培养基冷凝后, 用无菌镊子取出牛津杯。取 50 μ L 培养至对数生长期的供试细菌或酵母菌液, 用无菌涂布棒均匀的涂布于培养基的表面; 取保存于斜面的黑曲霉, 用接菌环粘取黑曲霉在 PDA 培养基表面划线培养。取 50 μ L 浓度为 100 μ g/mL 姜酚溶液加入到相应的孔中, 以无菌的 1% 吐温 80 溶剂作为对照。细菌在 37 °C 恒温培养箱中培养 24 h, 酵母在 28 °C 恒温培养箱中培养 48 h, 黑曲霉在 28 °C 恒温培养箱中培养 96 h, 观察菌株的生长情况及有无抑菌圈, 并用游标卡尺测量抑菌圈直径。

1.3.3 最低抑制浓度 (MIC)

采用梯度稀释的方法测定姜酚对不同菌株的 MIC 值。取 5 mL 的 MHB 或 PDB 培养基倒入试管中, 121 °C 蒸气灭菌 20 min 冷却至室温后, 取不同体积的姜酚溶液加入到培养基中, 使其终浓度为 1~100 μ g/mL。取 100 μ L 对数期菌液加入溶有姜酚的培养基中在摇床中恒温培养, 细菌在 37 °C 培养 24 h, 酿酒酵母和黑曲霉孢子在 28 °C 培养 48 h。不含有菌液的培养基作为阴性对照。MIC 值定义为可以抑制微生物生长的最低浓度。

1.3.4 姜酚对微生物生长曲线抑制作用

姜酚对金黄色葡萄球菌和痢疾志贺氏菌的生长曲线抑制作用的测定方法如下: 将供试细菌培养至对数期, 按 2% 接种量加入到 MHB 培养基中, 根据 5.1.3.3 实验结果中姜酚对于金黄色葡萄球菌和痢疾志贺氏菌的 MIC 值确定姜酚的浓度, 以不加姜酚组作为对照。经 37 °C 100 r/min 摇床培养 24 h, 每隔 2 h 取 5 mL 菌液在波长为 600 nm 下用分光光度计测定其 OD 值。以时间 (h) 为横坐标, OD 值为纵坐标, 绘制姜酚对金黄色葡萄球菌和痢疾志贺氏菌抑制作用的生长曲线。

姜酚对黑曲霉的生长曲线抑制作用的测定通过测定黑曲霉菌丝的干重来计算。取 2% 黑曲霉孢子接入 50 mL PDB 培养基中培养 48 h 作为供试菌液, 根据 5.1.3.3 实验结果中的 MIC 值确定姜酚终浓度, 对照不加入姜酚溶液。经 28 °C、100 r/min 摇床培养 96 h, 每隔 12 h 取供试菌液在 4 °C、10000 r/min 下离心 10 min, 除去上清, 用无菌生理盐水洗涤两遍菌体后, 将菌丝置于不锈钢容器中, 80 °C 烘干至恒重。测定菌丝的重量。以时间 (h) 为横坐标, 菌丝干 (g) 重为纵坐标, 绘制姜酚对黑曲霉的抑制作用的生长曲线。

1.3.5 活菌计数法测定时间-杀菌曲线

姜酚对金黄色葡萄球菌和痢疾志贺氏菌的时间-杀菌曲线的测定方法如下: 将供试细菌培养至对数期,

取一定量菌液接种于 MHB 培养基中使细菌浓度达到 10^8 CFU/mL。根据 1.3.4 实验结果中姜酚对于金黄色葡萄球菌和痢疾志贺氏菌的 MIC 值, 配置培养基中姜酚的浓度达到 $1 \times \text{MIC}$ 或 $2 \times \text{MIC}$, 经 37°C 、 100 r/min 摇床培养 24 h, 每隔 2 h 取 1 mL 菌液进行梯度稀释, 用 MHA 培养基进行活菌计数, 对照组不添加姜酚。以时间为横坐标, 各时间点测得的平均菌落数的对数值作为纵坐标, 绘制时间-抑菌曲线图。

1.3.6 细胞膜渗透性测定

姜酚对微生物细胞膜的渗透性的通过相对电导率值进行测定。将培养至对数期的金黄色葡萄球菌、痢疾志贺氏菌和黑曲霉菌液分别在 4°C 、 10000 r/min 下离心 10 min 去除上清液收集菌体, 将菌体用 5% 的葡萄糖溶液反复清洗, 直到其电导率接近 5% 的葡萄糖溶液, 从而获得等渗细胞。根据 1.3.4 实验结果中的 MIC 值配制向 50 mL 5% 的葡萄糖溶液中加入姜酚溶液, 测定其电导率并计为 L_1 。将加入姜酚的 50 mL 等渗细胞溶液, 分别经 37°C 、 28°C 孵育 6 h, 每隔 1 h 取测定溶液的电导率计为 L_2 。等渗细胞溶液在沸水中加热 5 min 作为对照, 计为 L_0 。通过下面公式计算相对电导率:

$$\text{相对电导率}(\%) = 100 \times (L_2 - L_1) / L_0$$

1.3.7 几丁质测定

将培养至对数期的黑曲霉菌液, 按 2% 接种量加入到 PHB 培养基中, 根据 1.3.4 实验结果中的 MIC 值, 配制培养基中姜酚的浓度达到 $1 \times \text{MIC}$ 或 $2 \times \text{MIC}$, 对照组不添加姜酚, 28°C 培养 48 h 后, 在 4°C 、 10000 r/min 下离心 10 min, 除去上清, 将黑曲霉菌丝用 0.025% 刚果红染色黑暗中孵育 5 min。最后用蒸馏水清洗三次后, 通过荧光分光光度计测定菌丝。激发波长为 540 nm, 发射波长为 560~900 nm。

1.3.8 透射电子显微镜 (TEM) 检测

将经过方法 1.3.4 处理过的金黄色葡萄球菌、痢疾志贺氏菌和 5.1.3.7 处理过的黑曲霉菌液分别在 4°C 、 10000 r/min 下离心 10 min, 去除上清液收集菌体。菌体首先用含有 3% 戊二醛的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.2) 室温条件下固定 3 h。然后, 用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.2) 漂洗 3 次, 再用含有 1% 的四氧化锇的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.2) 室温条件下固定 1 h。用 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 丙酮, 顺序脱水各一次, 每次 60 min, 再用 100% 丙酮脱水 180 min。脱水后的样品嵌入到环氧树脂 812 中处理 45°C 24 h, 然后聚合到斯珀尔树脂中 (含有 1.50% 硬化剂 DMP-30 的环氧树脂 812) 处理 65°C 72 h。超薄切片机上切成约 50 nm 薄片。用 1% 磷钨酸染色。在

透射电镜上观察并采集图像。

1.3.9 扫描电子显微镜 (SEM) 检测

将经过方法 1.3.5 处理过的金黄色葡萄球菌、痢疾志贺氏菌和 1.3.8 处理过的黑曲霉菌液分别在 4°C 、 10000 r/min 下离心 10 min, 去除上清液收集菌体。首先用戊二醛固定, 然后用四氧化锇固定, 与 TEM 处理方法相同。用 25%、50%、75%、75% 和 100% 乙醇, 顺序脱水各一次, 每次 10 min。以 50%、70%、90% 和 100% 乙酸异戊酯逐级取代乙醇, 每级置换 3 min。临界点干燥。之后将样品用双面导电胶粘贴在样品台上, 离子溅射喷金, 厚度在 $1\ \mu\text{m}$ 左右。处理完的样品可自加速电压 12 kV 下观察, 选择典型视野采集图像。

1.3.10 姜酚对细菌基因组 DNA 的影响

将培养至对数生长期的金黄色葡萄球菌和痢疾志贺氏菌以 2% 接种至姜酚浓度分别为 $10\ \mu\text{g/mL}$ 、 $20\ \mu\text{g/mL}$ 、 $50\ \mu\text{g/mL}$ 、 $100\ \mu\text{g/mL}$ 的 MHA 培养基中, 对照组不加入姜酚, 经 37°C 、 100 r/min 摇床培养 24 h。在 4°C 、 10000 r/min 下离心 10 min, 去除上清液收集菌体。参照细菌基因组 DNA 提取试剂盒方法提取 DNA, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.11 激光共聚焦显微镜检测

将 10 mg 吖啶橙 (AO) 和 10 mg 溴化乙啶 (EB) 溶解于 10 mL 磷酸盐缓冲溶液 (PBS, 0.01 mol/L, pH 7.4) 中获得荧光染色溶液。分别取培养至对数期生长期的金黄色葡萄球菌和痢疾志贺氏菌液 1.5 mL 在 4°C 、 10000 r/min 下离心 10 min, 去除上清液收集菌体, 用 PBS 洗涤 3 遍菌体后重悬。根据 1.3.4 实验结果中的 MIC 值, 向菌液中加入姜酚使其终浓度为 MIC、 $2 \times \text{MIC}$, 对照组未添加姜酚溶液, 作用 1 h 后, 取 100 μL 菌体悬浮液, 加入 AO/EB 混合荧光染料, 在室温下暗处孵育 15 min, 用 PBS 洗涤 2 次, 10 μL 样品置于载玻片, 用盖玻片覆盖, AO/EB 荧光通过激光共聚焦显微镜 $400\times$ 进行观察并采集图片。

1.3.12 数据分析

所有试验均至少重复三次。数据方差分析 (ANOVA) 采用 SPSS 17.0 软件。数学模型拟合及绘图使用 Origin 8.5 软件。

2 结果与讨论

2.1 牛津杯双层平板扩散试验

通过牛津杯双层平板扩散试验得到姜酚对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、痢疾志贺氏菌、酿酒酵母和黑曲霉的抑菌圈效果如图 1 所示。姜酚对

6种微生物的抑菌圈直径和最低抑制浓度如表1所示。由表1的结果表明姜酚对6种微生物均有较强的抑制作用。抑菌圈的大小一方面受到抑菌成分的影响,另一方面还受到溶剂扩散的速度的影响。因此,牛津杯双层平板扩散试验只能定性判断姜酚溶液有无抑菌效果。

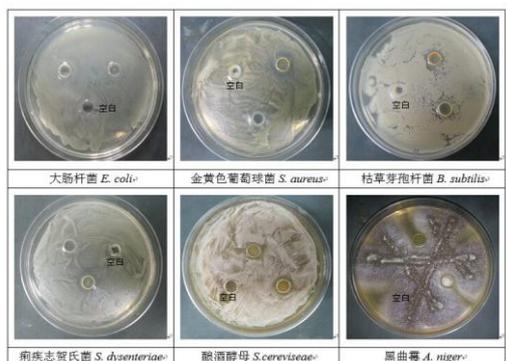


图1 姜酚对不同微生物的抑制作用

Fig.1 Inhibitory activity of gingerols against different microbes

表1 姜酚对不同微生物的抑菌圈直径和最低抑制浓度

Table 1 Inhibitory zone diameters and MICs of gingerols against different microbes

菌种	抑菌圈直径 /mm	MIC /($\mu\text{g/mL}$)
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	15.75 \pm 0.56	10.0 \pm 0.8
枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	12.43 \pm 0.42	12.0 \pm 1.4
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	12.34 \pm 0.87	14.0 \pm 1.8
痢疾志贺氏菌 <i>S. dysenteriae</i>	17.29 \pm 0.96	8.0 \pm 1.2
酿酒酵母 <i>S. cerevisiae</i>	12.13 \pm 0.74	16.0 \pm 2.6
黑曲霉 <i>A. niger</i>	9.41 \pm 0.65	22.0 \pm 3.2

通过最低抑制浓度实验表明姜酚溶液对金黄色葡萄球菌和痢疾志贺氏菌的抑制作用最强,枯草芽孢杆菌和大肠杆菌次之,对酿酒酵母和黑曲霉的抑制作用相对最弱。张鲁明等^[1]采用滤纸片法发现通过丙酮溶解的姜油树脂对苏云金杆菌、痢疾志贺菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、沙门氏菌均有一定的抑制作用,抑制效果为苏云金杆菌>痢疾志贺菌>金黄色葡萄球菌>大肠杆菌>沙门氏菌,最低抑制浓度分别为0.5、0.5、1.0、1.0、1.0 mg/mL。

2.2 姜酚对微生物生长曲线抑制作用

姜酚对金黄色葡萄球菌和痢疾志贺氏菌的生长曲线抑制作用如图2所示,对照组中的两种细菌分别经过短暂的迟滞期后进入快速生长的对数期,然后分别经过10h和8h后进入稳定期。当培养基中姜酚的浓度达到MIC值时,两种细菌的OD值都几乎没有改变,表明姜酚可以有效抑制金黄色葡萄球菌和痢疾志贺氏

菌的繁殖。

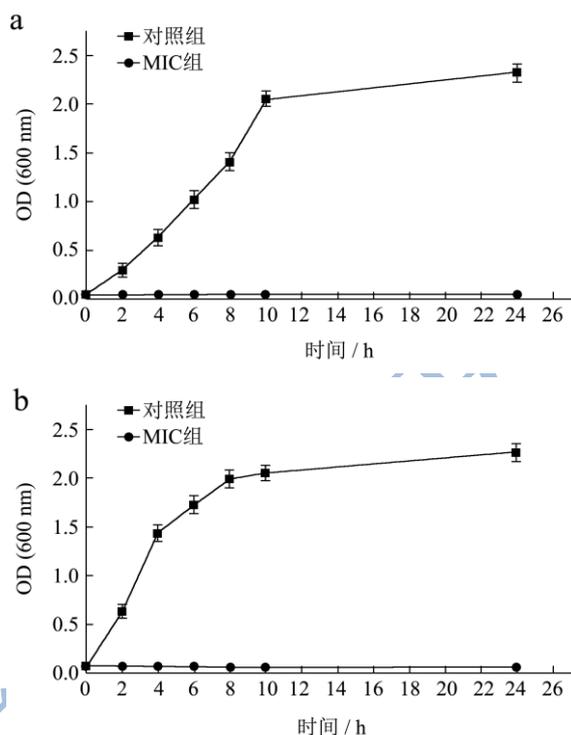


图2 姜酚对金黄色葡萄球菌(a)和痢疾志贺氏菌(b)的生长曲线抑制作用

Fig.2 Inhibitory effect of gingerols on the growth curves of *S. aureus* (a) and *S. dysenteriae* (b)

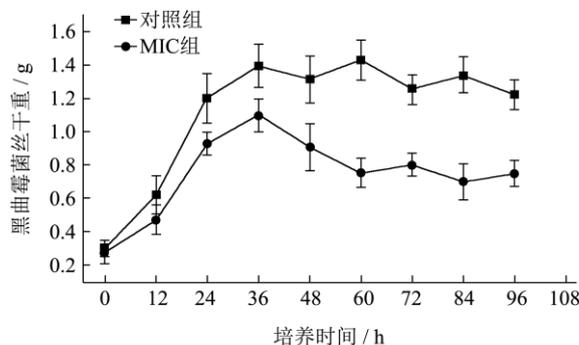


图3 姜酚对黑曲霉菌的生长曲线抑制作用

Fig.3 Inhibitory effect of gingerols on the growth curve of *A. niger*

姜酚对黑曲霉菌的生长曲线抑制作用如图3所示。对照组经过36h快速繁殖后进入稳定期,36h到96h黑曲霉菌丝生物量基本保持稳定。当培养基中姜酚的浓度达到MIC值时,黑曲霉菌丝的干重在36h之前与对照的增加的趋势相一致,然后突然减少,60h后进入稳定的阶段,表明姜酚影响了黑曲霉菌丝的繁殖。

2.3 活菌计数法测定时间-抑菌曲线

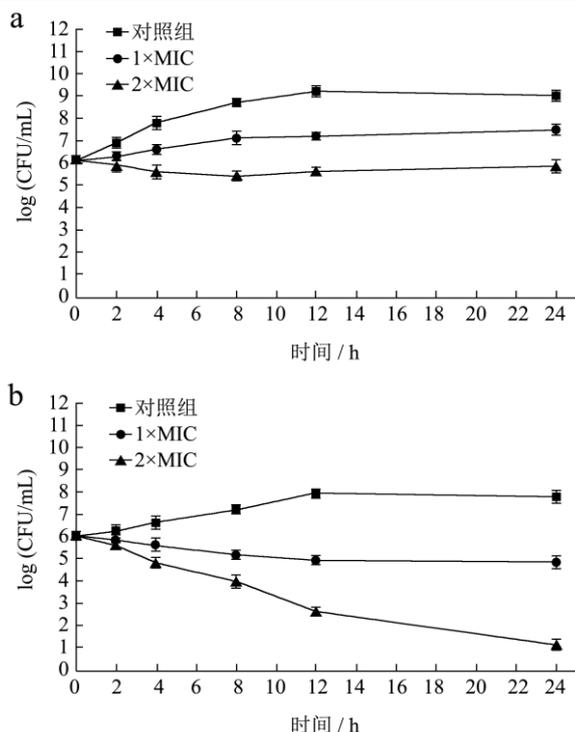


图4 活菌计数法测定姜酚对金黄色葡萄球菌 (a) 和痢疾志贺氏菌 (b) 的时间-杀菌曲线

Fig.4 Time-kill curves of gingerols against *S. aureus* A and *S. dysenteriae* B obtained using the plate counting technique

通过活菌计数法测定姜酚对金黄色葡萄球菌和痢疾志贺氏菌的时间-杀菌曲线如图4所示。对照组中金黄色葡萄球菌经过12 h培养后增加了2.9个对数值；当培养基中姜酚的浓度达到MIC值时，活菌数量经过12 h缓慢的增加了1.1个对数值，说明在该浓度下姜酚没有完全抑制细菌的生长，但是延长了其延滞期。当培养基中姜酚的浓度达到2倍MIC值时，活菌数量经过24 h降低了0.28个对数值。对照组中痢疾志贺氏菌经过24 h培养后增加了1.75个对数值；当培养基中姜酚的浓度达到MIC值时，活菌数量经过24 h降低了1.19对数值，减少了19.67%；当培养基中姜酚的浓度达到2倍MIC值时，活菌数量经过24 h降低了4.89对数值，减少了80.83%。结果表明姜酚的浓度和作用时间对于细菌的抑制作用都有影响。

2.4 激光共聚焦显微镜检测结果分析

痢疾志贺氏菌和金黄色葡萄球菌受到不同浓度姜酚作用后经过的AO&EO荧光染色的荧光显微图如图5所示。吖啶橙(AO)能透过胞膜完整的细胞，嵌入细胞核DNA，使之发出明亮的绿色荧光。溴乙锭(EB)仅能透过胞膜受损的细胞，嵌入核DNA，发橘红色荧光。凋亡的细胞呈现为染色增强，荧光更为明亮，均匀一致的圆状或固缩状、团块状结构。非凋亡细胞核

呈现荧光深浅不一的结构样特征。因此，可以根据荧光发射和细胞核染色的形态学特征对不同状态的细胞进行区分。具有统一的绿色细胞核和有序的结构可以被认定为正常的细胞，其具有完整的膜结构；具有统一的橘红色到红色的细胞核并具有橘红色的结构可以被认定为凋亡的细胞，细胞膜遭到破坏^[6]。

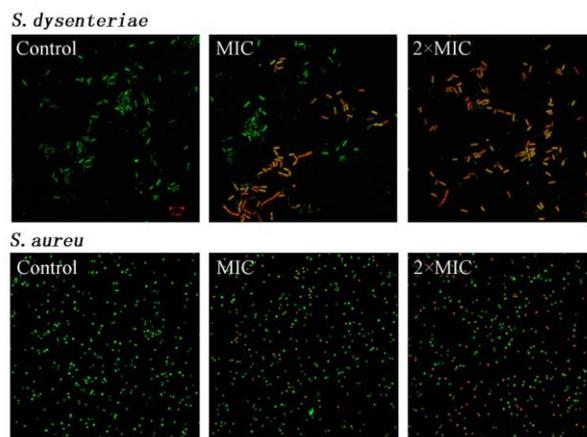


图5 痢疾志贺氏菌和金黄色葡萄球菌受到不同浓度姜酚作用的荧光显微图

Fig.5 Fluorescence micrographs of *S. dysenteriae* and *S. aureus* after treatment with different concentrations of gingerols

表2 荧光染色法测定不同浓度姜酚对痢疾志贺氏菌和金黄色葡萄球菌的抑制作用

Table 2 Inhibitory effect of different concentrations of gingerols on *S. aureus* A and *S. dysenteriae* B detected by fluorescence staining

姜酚浓度	痢疾志贺氏菌		金黄色葡萄球菌	
	凋亡细胞个数	%	凋亡细胞个数	%
对照	13 ± 5.62	4.02	25 ± 8.96	7.45
MIC	78 ± 8.38	60.65	35 ± 12.54	15.34
2×MIC	114 ± 15.45	85.62	173 ± 20.12	69.21

在荧光显微镜下观察结果如图所示，根据颜色特征进行计数如表2所示。对照组中痢疾志贺氏菌和金黄色葡萄球菌绝大部分细胞均发出明亮的绿光；经过1倍MIC浓度姜酚处理后，标记为橘红色荧光的细胞比例达到60.65%和15.34%。部分呈现黄色荧光可能是细胞膜受损程度较低，EB仅能部分取代AO与DNA结合，于是部分细胞同时发出红色和绿色荧光，并因两种染料的结合量和相对荧光强度的不同呈现出中间状态的黄色。经过2倍MIC浓度姜酚处理后，标记为红色和橘红色荧光的细胞比例升高至85.62%和69.21%。结果表明痢疾志贺氏菌和金黄色葡萄球菌经过姜酚作用后，大部分的细胞膜遭到破坏，进而发生凋亡。

2.5 SEM 结果分析

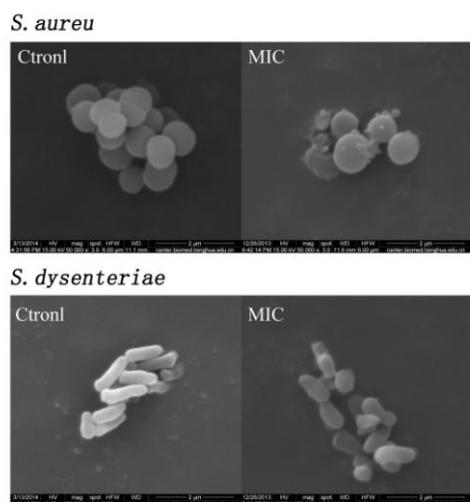


图 6 金黄色葡萄球菌和痢疾志贺氏菌受到姜酚作用 24 h 的 SEM 图

Fig.6 SEM images of *S. aureus* and *S. dysenteriae* treated with gingerols for 24 h

金黄色葡萄球菌和痢疾志贺氏菌受到浓度达到 MIC 值的姜酚作用 24 h 后的 SEM 图如图 6 所示。从图中可以看到，金黄色葡萄球菌经过姜酚的作用后，其形态与对照组相比较有明显的改变。未经过姜酚作用的金黄色葡萄球菌保持完整的细胞结构，形态饱满，具有光滑的表面；而经过姜酚处理 24 h 后，部分菌体的形态发生改变，细胞表明有不规则的突起，在细胞周围有很多碎片，表明姜酚可以破坏金黄色葡萄球菌的细胞壁的通透性和完整性。

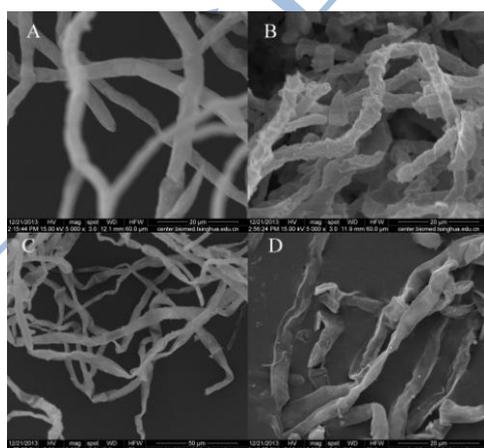


图 7 黑曲霉菌丝受到姜酚作用 48 h 的 SEM 图

Fig.7 SEM images of *A. niger* hyphae treated with gingerols for 48 h

注：A: Control、B:MIC、C:2×MIC、D:2×MIC。

Shan 等^[7]研究了虎杖根提取物的抑菌功能，通过 LC-MS 测定其主要成分为芪类化合物和羟基蒽醌类

化合物，通过扫描电镜发现活性成分可以通过破坏金黄色葡萄球菌的细胞壁，抑制其繁殖。一般来讲，酚类化合物的抑菌作用主要通过细胞膜聚集，破坏结构组织，引起通透性的增加，导致细胞内部组分的泄漏，或与蛋白质的非特异性结合破坏微生物酶系统，导致细胞的死亡^[8]。对照组中的痢疾志贺氏菌为典型的棒状长杆型，经过姜酚处理 24 h 后菌体呈现为球形或短杆型，表明姜酚可以影响痢疾志贺氏菌细胞的分裂。

黑曲霉菌丝受到不同浓度姜酚作用 24 h 后的 SEM 图如图 7 所示。A 为对照组 (5000×)，黑曲霉菌丝形态饱满，具有典型的锥形结构和光滑的表面。B 为经过 1 倍 MIC 浓度姜酚作用 48 h 后黑曲霉菌丝形态 (5000×)，可以观察到黑曲霉菌丝形态发生一致的变化，菌丝的结构发生收缩变形，表面变得粗糙，有明显的褶皱。C 为经过 2 倍 MIC 浓度姜酚作用 48 h 后黑曲霉菌丝形态 (2000×)，D 同样是经过 2 倍 MIC 浓度姜酚作用 48 h 后黑曲霉菌丝形态 (5000×)，可以发现黑曲霉菌丝发生进一步形态的变化，变为干瘪的条状形态。黑曲霉菌丝发生的逐步的形态变化，可以归结为姜酚使菌丝体中细胞质的流失造成的结果。

Plodpai 等^[9]发现 125 μg/mL 假鹰爪 (*Desmos chinensis*) 提取物可以改变立枯丝核 (*Rhizoctonia solani*) 菌丝的形态，使其变得粗糙并产生颗粒。Rittiwong 等^[10]发现高浓度的苯甲酸酯衍生物和双黄酮可以通过改变细胞膜的通透性而影响真菌的结构形态。

2.6 TEM 结果分析

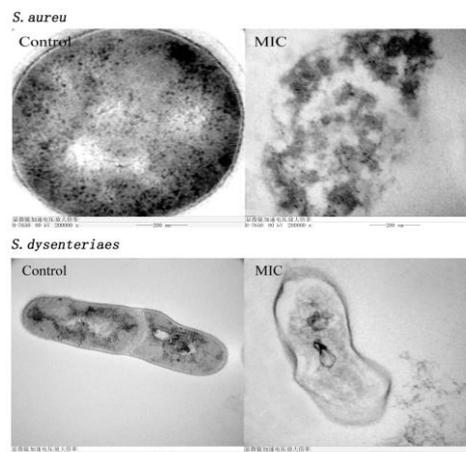


图 8 金黄色葡萄球菌和痢疾志贺氏菌受到姜酚作用 24 h 的 TEM 图

Fig.8 TEM images of *S. aureus* and *S. dysenteriae* treated with gingerols for 24 h

痢疾志贺氏菌和金黄色葡萄球菌受到姜酚作用

24 h 的 TEM 图如图 8 所示。对照组中金黄色葡萄球菌保持正常的形态,细胞壁、细胞膜结构完整,胞壁和胞膜结合紧密,细胞质中电子密度比较均匀。经过姜酚作用 24 h 的金黄色葡萄球菌的形态与对照组相比有明显的改变,细胞壁遭到破坏,发生细胞溶解,细胞内部产生空腔,说明经历了细胞降解、细胞质从细胞内部向周围环境释放的过程。对照组中的痢疾志贺氏菌呈现长棒状的形态,而且其正处于分裂的状态,细胞壁、细胞膜结构完整,细胞质、细胞器完整的存在于细胞中;而经过姜酚处理 24 h 的痢疾志贺氏菌呈现短杆的形态,发生质壁分离,在破坏的细胞周围散布着细胞碎片。细胞内含有少量细胞器,但是细胞质大量损失,TEM 结果与 SEM 结果相一致。

Zeng 等^[11]研究了鼠曲草精油的抑菌功能,通过 GC-MS 分析其主要成分为丁子香酚(18.24)、芳樟醇(10.62%)、石竹烯(8.86%)等,通过透射电镜发现精油可以使枯草芽孢杆菌细胞发生溶解,导致细胞内部组分泄露到周围的环境环境中。

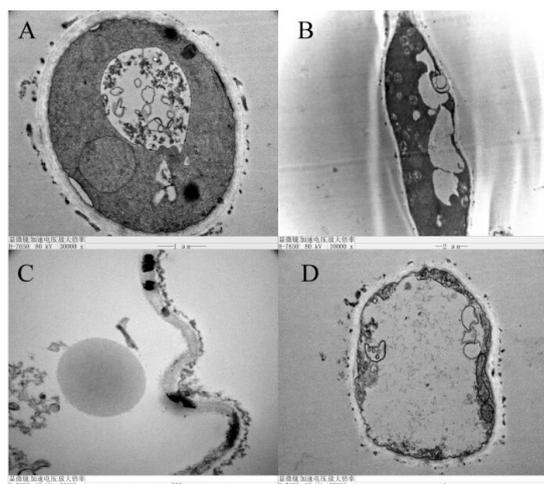


图9 黑曲霉菌丝受到姜酚作用 48 h 的 TEM 图

Fig.9 TEM images of *A. niger* hyphae treated with gingerols for 48 h

注: A: Control, B:MIC, C:2×MIC, D: 4×MIC。

黑曲霉菌丝受到不同浓度姜酚作用 48 h 的 TEM 图如图 9 所示。对照组中黑曲霉菌丝横切面图中的细胞壁均一、完整,由完整的纤维层包裹。细胞质膜与细胞壁附着紧密。细胞质内部的主要的细胞器如:细胞核、线粒体、囊泡等都呈现正常的状态。经过 1 倍 MIC 浓度姜酚作用 48 h 后,黑曲霉菌丝纵切面图中显示菌丝体内部的形态发生改变,细胞质膜与细胞壁逐渐分离,可能是细胞质部分降解,使得空泡面积增大。经过 2 倍 MIC 浓度姜酚作用 48 h 后,菌丝细胞的外部形态发生收缩,细胞壁失去完整性,但是没有完全的分解。菌丝内部细胞质和细胞器包括细胞核、内质

网和线粒体溶解,导致大量空泡的形成,从而抑制黑曲霉菌丝的繁殖。

2.7 电导率测定

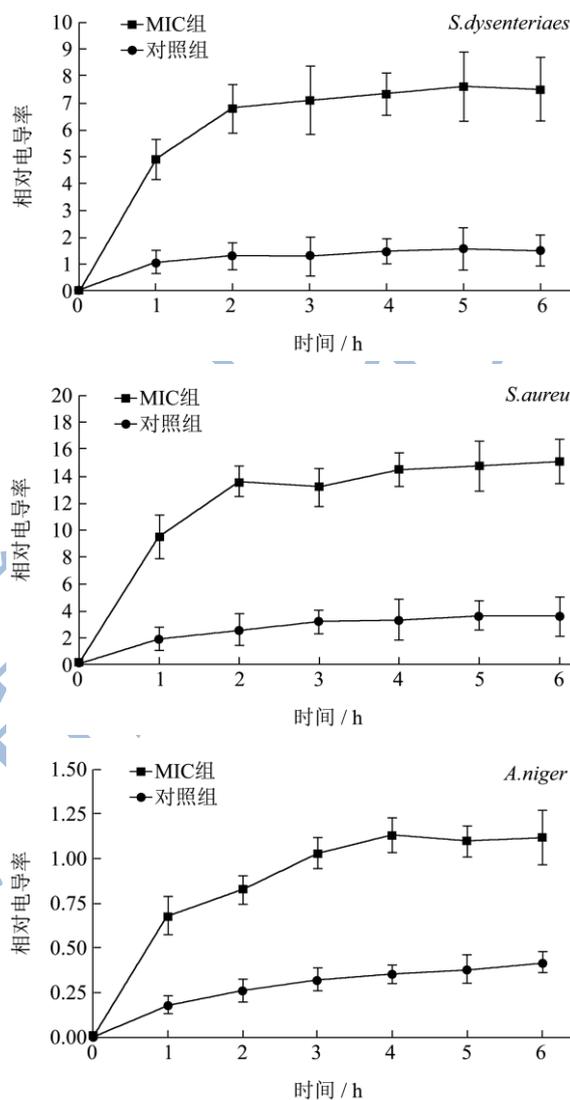


图 10 痢疾志贺氏菌、金黄色葡萄球菌和黑曲霉菌生长过程中受到姜酚作用的相对电导率

Fig.10 Relative electrical conductivity during the growth of *S. dysenteriae*, *S. aureus*, and *A. niger* in the presence of gingerols

痢疾志贺氏菌、金黄色葡萄球菌和黑曲霉菌生长过程中受到姜酚作用的相对电导率如图 10 所示。细胞膜通透性的改变直接影响电导率的测定结果,因此通过电导率的测定可以反映姜酚对于微生物的细胞膜通透性的影响。与对照组相比,三种供试微生物在 MIC 浓度姜酚的作用 6 h 后的相对电导率都有显著的增加,其中金黄色葡萄球菌的相对电导率最高达到 18.1%,而黑曲霉的相对电导率最低为 1.12%。

试验表明痢疾志贺氏菌、金黄色葡萄球菌和黑曲霉菌生长过程中的微生物膜的细胞膜受到姜酚的作用

都逐渐增加,可能导致细胞内组分的泄漏,例如 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Na^+ 等^[12]。

2.8 几丁质含量测定

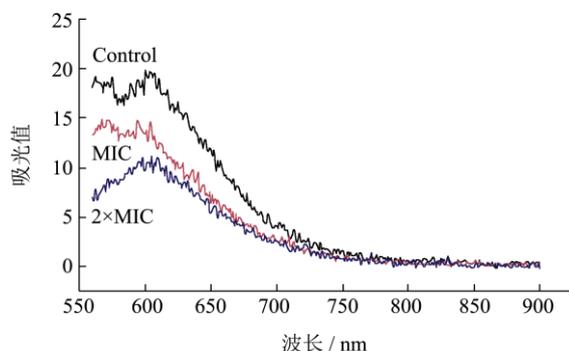


图 11 分光光度法测定黑曲霉菌丝受到姜酚作用 48 h 几丁质含量变化

Fig.11 Spectrophotometric profiles of chitin in *A. niger* hyphae treated with gingerols for 48 h

分光光度法测定黑曲霉菌丝受到姜酚作用 48 h 几丁质含量变化如图 11 所示。刚果红可以与多糖类化合物(如纤维素)合成红色复合物,在特定波长处具有吸收值,却不与纤维素水解后产物发生反应。几丁质为 N-乙酰葡萄糖胺通过 β 连接聚合而成的结构同多糖,是黑曲霉菌丝体细胞壁的主要组成成分。因此,可以通过该方法测定黑曲霉菌丝中几丁质含量的变化。与对照组相比较,黑曲霉菌丝受到 MIC、 $2 \times MIC$ 浓度姜酚作用 48 h 后,通过比较 608 nm 波长吸收值的变化,发现几丁质的含量分别减少了 22.86% 和 42.41%。

结果说明姜酚使黑曲霉菌丝的通透性增强,使细胞壁遭到破坏,从而减少了几丁质的含量。Wu 等^[13]发现多甲氧基黄酮可以破坏黑曲霉细胞壁的通透性,一方面使黑曲霉的几丁质含量减少,另一方面通过电导率的测定说明其通透性增强。

2.9 姜酚对细菌 DNA 基因组的影响

姜酚对痢疾志贺氏菌、金黄色葡萄球菌的 DNA 损伤试验如图 12 所示。超过 MIC 值的不同浓度姜酚对两种细菌的 DNA 基因组的电泳条带与对照组比较没有明显差异。结果表明姜酚没有对细菌的 DNA 基因组造成破坏,所以姜酚对微生物的细胞壁、细胞膜的破坏作用是抑制其繁殖的主要原因。

3 结论

3.1 姜酚对金黄色葡萄球菌 *S. aureus*、枯草芽孢杆菌 *B. subtilis*、大肠杆菌 *E. coli*、痢疾志贺氏菌 *S.*

dysenteriae、酿酒酵母 *S.cerevisiae*、黑曲霉 *A. niger* 均有较强的抑制作用。最低抑制浓度试验表明姜酚溶液对痢疾志贺氏菌的抑制作用最强, MIC 为 $8 \mu\text{g/mL}$, 对黑曲霉的抑制作用相对最弱, MIC 为 $22 \mu\text{g/mL}$ 。根据试验结果,建议食品中姜酚的用量至少达到 $50 \mu\text{g/mL}$ 可以保证其抑菌的效果。

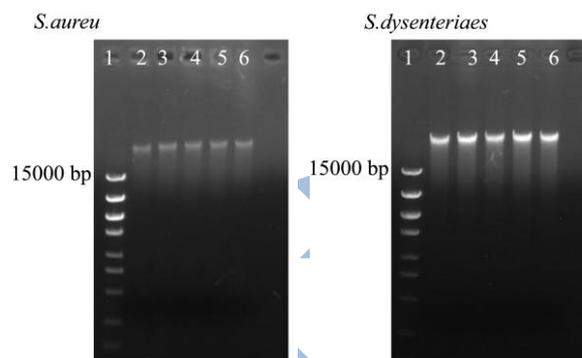


图 12 姜酚对痢疾志贺氏菌、金黄色葡萄球菌的 DNA 损伤试验

Fig.12 DNA damage assay of *S. dysenteriae* and *S. aureus* treated with gingerols

注: 1: Marker DL 15000; 2: $0 \mu\text{g/mL}$; 3: $20 \mu\text{g/mL}$; 4: $40 \mu\text{g/mL}$; 5: $60 \mu\text{g/mL}$; 6: $100 \mu\text{g/mL}$ 。

3.2 姜酚可以破坏金黄色葡萄球菌 *S. aureus* 的细胞壁的通透性和完整性,使细胞发生溶解,产生空腔。姜酚可以影响痢疾志贺氏菌 *S. dysenteriae* 细胞的分裂,使细胞发生质壁分离。但是姜酚对细菌的 DNA 基因组没有影响。

3.3 姜酚可以使黑曲霉菌丝的结构发生收缩变形,表面变得粗糙,甚至变为干瘪的条状形态,使菌丝内部细胞质和细胞器包括细胞核、内质网和线粒体溶解,导致大量空泡的形成,从而抑制黑曲霉菌丝的繁殖,同时降低几丁质的含量。

参考文献

- [1] 张鲁明,王龙厚,陈雪香,等.姜油树脂的超临界 CO_2 萃取条件及其抑菌活性[J].作物研究,2011,25(2):149-152
ZHANG Lu-ming, WANG Long-hou, CHEN Xue-xiang, et al. Ginger oleoresins extraction with sfe-CO_2 and its antimicrobial activity [J]. Crop Research, 2011, 25(2): 149-152
- [2] Park M, Bae J, Lee DS, et al. Antibacterial activity of [10]-gingerol and [12]-gingerol isolated from ginger rhizome against periodontal bacteria [J]. Phytotherapy Research, 2008, 22(11): 1446-1449
- [3] Ficker C, Smith ML, Akpagana K, et al. Bioassay-guided isolation and identification of antifungal compounds from

- ginger [J]. *Phytotherapy Research*, 2003, 17(8): 897-902
- [4] Nagendra KL, Manasa D, Srinivas P, et al. Enzyme-assisted extraction of bioactive compounds from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) [J]. *Food Chemistry*, 2013, 139(1-4): 509-514
- [5] 刘伟,周春丽,赵婧,等.大孔吸附树脂纯化生姜提取物中 6-姜酚工艺优化.农业机械学报,2014,45(6):237-328
LIU Wei, ZHOU Chun-li, ZHAO Jing, et al. Purification of 6-gingerol from Oleoresin with Macroporous Resin [J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2014, 45(6): 237-328
- [6] Mei L, Lu Z, Zhang W, et al. Bioconjugated nanoparticles for attachment and penetration into pathogenic bacteria [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(38): 10328-10337
- [7] Shan B, Cai YZ, Brooks JD, et al. Antibacterial properties of *Polygonum cuspidatum* roots and their major bioactive constituents [J]. *Food Chemistry*, 2008, 109(3): 530-537
- [8] 赵振军,刘勤晋,黎星辉.茶多酚对真菌合成洛伐他汀能力的影响[J].现代食品科技,2014,30(2):124-128
ZHAO Zhen-jun, LIU Qin-jin, LI Xing-hui. Effect of Tea Polyphenols on the Ability of Fungi to Produce Lovastatin. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(2): 124-128
- [9] Plodpai P, Chuenchitt S, Petcharat V, et al. Anti-rhizoctonia solani activity by *Desmos chinensis* extracts and its mechanism of action [J]. *Crop Protection*, 2013, 43: 65-71
- [10] Rittiwong T, Mutarapat T, Ponglimanont C, et al. Saiyutones A-D: four new unusual biflavones from *Desmos chinensis* [J]. *Tetrahedron*, 2011, 67(30): 5444-5449
- [11] Zeng WC, Zhu RX, Jia LR, et al. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oil from *Gnaphalium affine* [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2011, 49(6): 1322-1328
- [12] Diao WR, Hu QP, Zhang H, et al. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) [J]. *Food Control*, 2014, 35(1): 109-116
- [13] Wu T, Cheng D, He M, et al. Antifungal action and inhibitory mechanism of polymethoxylated flavones from *Citrus reticulata* Blanco peel against *Aspergillus niger* [J]. *Food Control*, 2014, 35(1): 354-359