

五味子木脂素对大肠杆菌的抑菌机理及效果

冯亚净,张媛媛,王瑞鑫,李书国*

(河北科技大学 生物科学与工程学院,河北 石家庄,050018)

摘 要 研究了五味子中的抗菌成分木脂素对食品中常见致病菌大肠杆菌的抑制作用及抑菌机理。采用牛津杯法测定抑菌圈直径、倍比稀释法测定最低抑菌浓度,评价了木脂素对大肠杆菌的抑菌效果;并通过测定微生物的生长曲线、电导率、耗糖率及扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)图来推测、观察抑菌机理。结果表明:木脂素对大肠杆菌有明显的抑制作用,抑菌圈直径达 27 mm,最低抑菌质量浓度为 6.25 mg/mL;生长曲线的结果表明,木脂素可抑制大肠杆菌对数期的生长;电导率和耗糖率的测定及扫描电镜表明,其抑菌机理之一是破坏了细菌细胞膜的平滑形态,内容物大量流出,造成代谢紊乱,影响对糖类等营养物质的吸收,从而发挥抗菌抑菌作用。

关键词 五味子;木脂素;抑菌效果;抑菌机理;食品安全

食品营养丰富,不但能够为人体提供各种所需的营养物质,也为微生物的滋生和繁殖提供了优越的条件,食用腐败变质的食品会导致食品安全问题,弃之则造成食物的资源浪费和经济损失,因此食品的防腐保鲜是现代食品工业面临的主要问题之一。在食品中添加适量的安全高效的抗菌剂、抑菌剂,是预防食品腐烂变质造成浪费和保证食品安全问题的主要措施。一般认为,食品防腐剂抑制微生物的机制主要是通过影响微生物的细胞亚结构,这些亚结构包括细胞壁、细胞膜以及代谢有关的酶等,只要抑制其中一个亚结构,微生物就会被抑制甚至杀灭^[1]。植物源食品防腐剂具有安全性高、来源广泛、天然等优点,已成为食品防腐保鲜研究的热点之一。

五味子 *Fructus Schisandrae Chinensis*, 始载于《神农本草经》,为木兰科植物五味子(*Schisandra chinensis* Turcz Baill)干燥成熟的果实^[2],广泛分布在我国南部地区,是我国重要的药用植物资源之一^[3],北五味子在一定的贮存条件下存放数年不发霉。前人的研究表明,五味子中有效的抗菌抑菌成分为木脂素类物质,主要以五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素等为代表^[4-5],是一类以 1,2,3,4-联苯-1,3-环辛二烯为母核的木脂素,具有抗病毒、抗氧化、抗肿瘤、保肝降酶、镇痛以及免疫调节等作用^[6-7],还

具有温补、益气、生津、护肝^[8]、降糖^[9]、减轻疲劳、改善心血管功能等保健作用。基于这些已确定的药理作用,五味子被广泛应用于中药制剂和中医临床中,目前对其研究也主要集中在成分分析和种类差异上^[10],而对其在食品中防腐保鲜的应用及抑菌机理的研究较少。若能将五味子提取物开发成为食品防腐剂,不仅能够延缓食品的腐败变质,而且还可利用其保健功能作用,对人体产生有益的影响。本文旨在研究五味子中木脂素提取物的抗菌抑菌作用及抑菌机理,以期开发成天然、高效的植物源食品防腐剂、发挥五味子的保健功能和在食品工业的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

五味子(*Fructus Schisandrae Chinensis*):石家庄市神威大药房;牛肉膏、蛋白胨、琼脂粉(生物试剂):北京奥博星生物技术有限公司;葡萄糖、氢氧化钠(分析纯):天津市河东区红岩试剂厂;蔗糖(分析纯):天津博迪化工股份有限公司;氯化钠(分析纯):天津市恒兴化学试剂制造有限公司;无水乙醇(分析纯):天津市富宇精细化工有限公司;丙酸钙、脱氢乙酸钠(食用级):石家庄市食品添加剂公司;大肠杆菌(*Escherichia coli*):来源于河北科技大学微生物实验室。

1.2 主要仪器设备

手提式压力蒸汽灭菌锅(YMSII-280B型),宁

第一作者:硕士研究生(李书国教授为通讯作者, E-mail: lishuguo602@126.com)。

基金项目:河北省科技支撑计划项目(14227121D);河北省大学生创新创业训练项目(201310082045)

收稿日期:2015-09-17,改回日期:2015-10-16

波市镇海金鑫医疗器械有限公司;恒温恒湿培养箱(LHS-15型),上海一恒科学仪器有限公司;电热鼓风干燥箱(GZX-9070型),上海博讯实业有限公司医疗设备厂;回转式恒温调速摇瓶柜(YPW-I型),上海通特电讯设备厂;快速提取仪(SZF-06A型),上海新嘉电子有限公司;旋转蒸发仪(RE52CS-1型),上海亚荣生化仪器厂;紫外可见分光光度计(UV-2000型),上海尤尼柯仪器有限公司;场发射扫描电镜(HITACHI S-4800-I型),日本Hitachi公司。

1.3 实验方法

1.3.1 五味子木脂素的提取

五味子经60℃干燥2h后粉碎,采用超声波辅助乙醇提取的方法,在乙醇的体积分数为80%、温度85℃,超声时间30min,料液比1:8的条件下回流提取2h,得五味子木脂素提取液,经旋转蒸发仪真空浓缩,冷冻干燥成粉,4℃冰箱密闭保存,备用。

1.3.2 抑菌效果的测定

将大肠杆菌菌种活化后,用无菌生理盐水稀释,调整菌悬液浓度在 $10^7 \sim 10^8$ CFU/mL,备用。将木脂素粉末1.0g溶于20mL体积分数80%的乙醇中,制成浓度为50mg/mL的抑菌液,以体积分数80%的乙醇做对照,采用牛津杯法进行抑菌试验,试验重复3次。以体积分数80%的乙醇配制相同浓度的化学防腐剂丙酸钙、脱氢乙酸钠为对照。将各平板置于恒温恒湿培养箱中培养,温度37℃,湿度80%,24h,用十字交叉法计算平均抑菌圈直径大小。

1.3.3 最低抑菌浓度MIC的测定

采用倍比稀释法,用体积分数80%的乙醇将木脂素稀释成一系列浓度梯度的溶液,分别2mL溶液加入到18mL的培养基中,使其最终质量浓度为25,12.5,6.25,3.125,1.25,0.625,0.3125mg/mL,倒入培养皿,待凝固后均匀涂布菌悬液各100μL,37℃温度培养48h,每个浓度重复3次,观察菌落生长状况,无菌生长的最低浓度即为最低抑菌浓度。

1.3.4 抑菌机理的研究

1.3.4.1 五味子木脂素对大肠杆菌生长情况影响的测定

取14个试管分为两组,分别依次编号为试验组和对照组1~11号,分别在试管中加入8mL液体培养基,高温灭菌备用。试验组11支试管中分别加入适量木脂素提取液使其终浓度为1.3.3中得到的最低抑菌浓度,菌悬液0.2mL,对照组加入与试验组等量的体积分数80%的乙醇溶液和菌悬液0.2mL,置

于恒温培养箱中,37℃培养。将试验组和对照组的试管按编号顺序分别于0、2、5、9、12、15、20、25、30、33、36h取出,振荡均匀,于波长600nm处测定吸光度值,根据OD值绘制出生长曲线。

1.3.4.2 大肠杆菌菌悬液电导率的测定

用无菌水调节菌液浓度为 10^7 CFU/mL,移取1.5mL菌液于50mL烧杯中,加入30mL去离子水和1.5mL的1MIC的木脂素溶液,然后分别在0、5、20、30、60、90、120、150和180min时测定电导率,每次试验重复3次;以添加1.5mL体积分数为80%乙醇的组为对照。

1.3.4.3 菌体消耗糖量的测定

根据蒽酮比色法^[11]测定培养液中糖含量。添加适量提取液到活化的菌液中,适宜条件培养,每隔2h取上清液100μL,稀释至1mL,冷水浴5min后,加入4mL蒽酮试剂并摇匀,沸水浴5min,迅速冷却至室温并静置1min,在620nm处测吸光度值,记录数据并计算含糖量;以不添加五味子木脂素提取液为对照。

1.3.4.4 菌体形态观察

为进一步确定抑菌机理是否为破坏细菌细胞的结构,采用扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)观察菌体形态。大肠杆菌接种于液体培养基中,37℃条件下培养12h(浓度调整为 1×10^7 CFU/mL)。取10mL菌悬液分别加入0MIC、1MIC浓度的木脂素溶液,所有样品均培养4h。取出菌液用磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)清洗3次,2.5%戊二醛溶液在4℃条件下固定过夜。梯度浓度的酒精溶液(30%、50%、70%、80%、90%、100%)逐级脱水,每次20min,离心(8000r/min, 5min),弃上清液,100%乙醇脱水2次。叔丁醇置换酒精2次,每次20min,干燥,离子溅喷金,上SEM观察。

1.3.5 数据统计分析

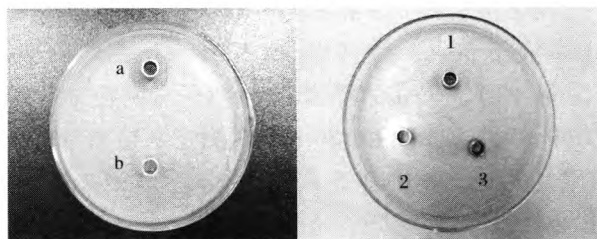
以上测定均为3组平行,结果以平均值±标准差方式表示。利用spass17.0软件进行数据统计计算,采用单因素方差分析(ANOVA)进行显著性差异分析($P < 0.05$),文中的数据图均利用OriginLab Origin V8.0处理完成。

2 结果与讨论

2.1 五味子木脂素的抑菌效果

由图1可知,体积分数80%乙醇对照对其抑菌圈直径为8mm,添加50mg/mL的五味子木脂素提

取物对大肠杆菌的平均抑菌圈大小为 27 mm,而相同浓度的化学防腐剂脱氢乙酸钠和丙酸钙的平均抑菌圈直径分别为 24 mm、14 mm,二者对大肠杆菌的抑菌效果均低于五味子木脂素提取液,说明五味子木脂素对大肠杆菌具有显著的抑制作用。



a - 木脂素提取液; b - 体积分数 80 % 乙醇对照; 1 - 五味子木脂素提取液; 2 - 脱氢乙酸钠溶液; 3 - 丙酸钙溶液

图 1 五味子木脂素对大肠杆菌的抑菌效果

Fig. 1 Antibacterial effect of lignanoid against *E. coli*

2.2 五味子木脂素对大肠杆菌的最低抑菌浓度 (MIC)

由表 1 可知,五味子木脂素提取液对大肠杆菌的最低抑菌质量浓度为 6.25 mg/mL,表明低浓度的木脂素溶液仍然可以表现出抑菌活性。

表 1 大肠杆菌最低抑菌浓度 (MIC)

Table 1 MIC of lignanoid against *E. coli*

观察结果	木脂素质量浓度/(mg · mL ⁻¹)					
	25	12.5	6.25	1.25	0.625	0.3125
抑菌效果	-	-	-	+	++	+++

2.3 抑菌机理的探讨

2.3.1 五味子木脂素对大肠杆菌生长的影响

通过测定添加五味子木脂素的菌悬液(浓度为 $10^7 \sim 10^8$ CFU/mL)在波长为 600 nm 处的吸光值来判断抑菌效果,吸光值越小,活菌的数量越少,抑菌效果越好。

由图 2 可知,未添加五味子木脂素的大肠杆菌生长良好,具有典型的生长曲线特征,而加入提取物试验组的 OD 值位于未添加组下方,且五味子木脂素在对数期即发挥抑菌作用,大肠杆菌的生长受到抑制,对数期延后,不再符合正常大肠杆菌的生长趋势,在 12 h 后微生物呈缓慢增长的趋势。结果说明五味子中的木脂素类物质能够明显抑制大肠杆菌的生长繁殖,但不能杀死大肠杆菌,作用一定的时间后抑制作用会减弱或消除,分析可能是由于抑菌物质浓度的下

降或者微生物适应了新的生长环境,故大肠杆菌出现了短暂的二次生长。

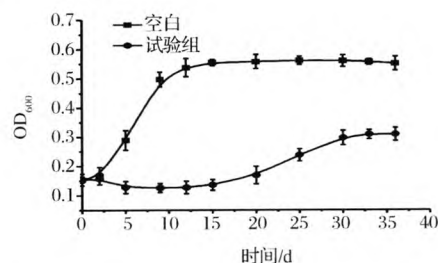


图 2 木脂素对大肠杆菌生长曲线的影响

Fig. 2 Influence of lignanoid on growth curve for *E. coli*

2.3.2 五味子木脂素对大肠杆菌菌液电导率的影响

五味子木脂素的乙醇提取液对大肠杆菌菌液电导率的影响结果如图 3 所示。

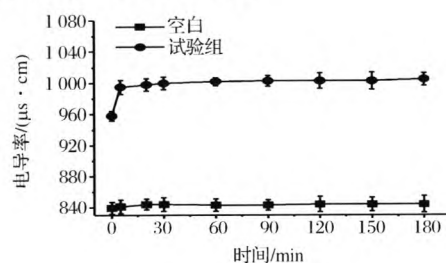


图 3 木脂素对大肠杆菌菌液电导率的影响

Fig. 3 Influence of lignanoid on the electrical conductivity of *E. coli*

由图 3 可知,添加五味子木脂素提取物菌液的电导率明显高于空白组,在 5 min 时的电导率明显升高,5 min 以后增加缓慢,整体上呈上升的趋势,而空白组几乎保持不变。电导率是衡量溶液中离子强度高低的特征参数,其值与离子组分浓度密切相关。菌体的保护屏障是细胞膜,当遇到强抑菌剂时会使细胞膜遭到破坏,菌体的保护屏障被打破,其内部的电解质外泄至溶液中,从而使电导率上升,因此菌液电导率的变化可以反映细胞膜通透性的变化^[12]。图 3 结果说明了五味子乙醇提取液中的抗菌抑菌成分木脂素对大肠杆菌的抑制作用机理之一可能是通过破坏其细胞膜,使细胞的通透性增加,内容物大量渗出而达到抗菌的目的。也有可能是菌体在代谢过程中产生小分子物质而导致电导率变化。

2.3.3 五味子木脂素对大肠杆菌糖消耗量的影响

为了验证是否为细胞膜结构破坏导致菌液电导率上升,对菌体消耗糖的代谢进行了观察,结果如图 4 所示。

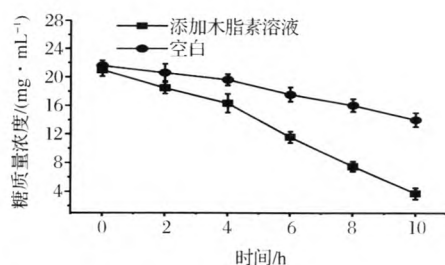


图4 木脂素大肠杆菌培养液中糖消耗的影响

Fig. 4 Influence of lignanoid on the consumption of sugar of *E. coli*

由图4可知,加入五味子木脂素提取液处理的菌液,其糖浓度较空白组明显下降,反应10 h时,两者浓度相差4倍,从而可判断五味子木脂素对菌体的抑

制作用,一方面可能是先破坏细胞的微结构从而影响菌体的代谢和繁殖,另一方面也有可能是限制和阻碍了菌体对糖利用吸收的新陈代谢,通过破坏大肠杆菌的代谢达到抑菌作用。因为糖作为微生物生长所需的碳源和首要的能量储备物质,对微生物的生长和繁殖有很大的相关性。当微生物处于正常生长状态时,会吸收和利用外源糖,微生物对培养液中糖的消耗越多,说明生长越旺盛,当微生物的吸收代谢受阻或死亡时,其对糖的利用率会下降。

2.3.4 不同处理情况下大肠杆菌的形态变化

为了进一步验证五味子木脂素对细胞膜结构的破坏作用,通过扫描电镜观察大肠杆菌的形态变化,结果如图5所示。

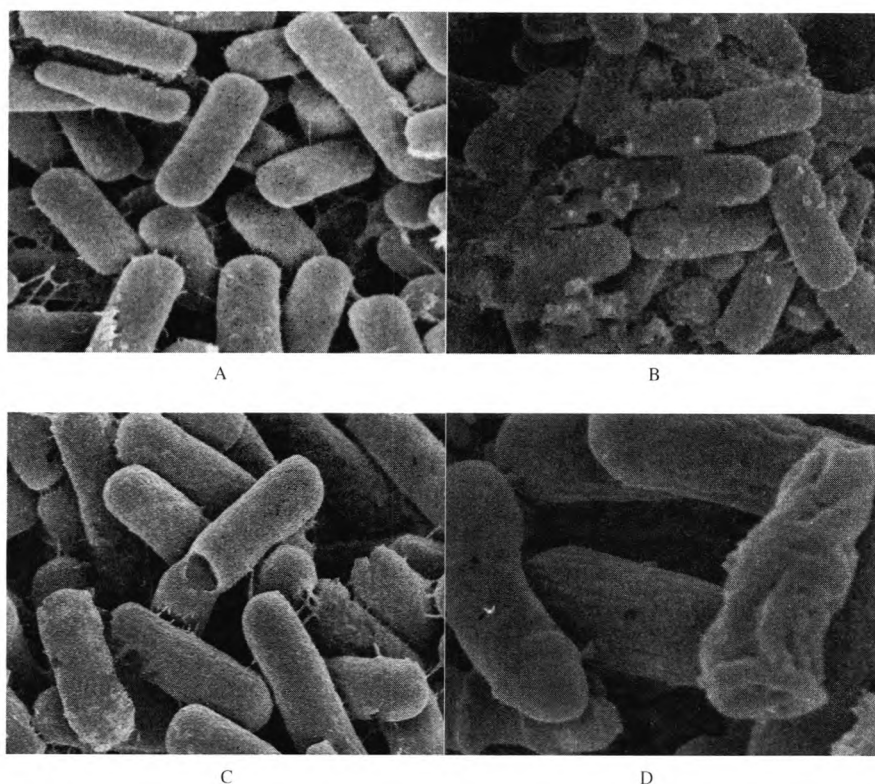


图5 不同处理下大肠杆菌 SEM 图

Fig. 5 SEMs of different treatments on *E. coli*

注:A为正常大肠杆菌的形态($\times 8$ k),B、C、D为五味子木脂素处理过的大肠杆菌的形态(依次为: $\times 8$ k、 $\times 20$ k、 $\times 35$ k)

由图5可知,正常的大肠杆菌菌体细胞完整、饱满,表面光滑,分布均匀;而经过五味子木脂素提取液处理4 h后的大肠杆菌形态遭到破坏,聚集粘连。图5(C)可以看出,菌体细胞表面褶皱不光滑,菌体形态发生变形,部分菌体发生裂解死亡;图5(D)中可以明显的看出菌体形态的扭曲变形,个别有孔洞出现。

木脂素具有疏水性,可以透过细胞壁,大肠杆菌菌体细胞发生的形态变化说明五味子中的抗菌抑菌成分破坏了细胞膜的平滑形态,在细胞膜上形成孔洞,使菌体细胞破裂,内容物渗漏,细胞代谢发生紊乱,从而发挥抗菌抑菌的作用。扫描电镜图从形态学方面证实了五味子的抑菌机理,与以上从电导率变化这一生

理角度的抑菌机理推测一致。

3 结论

(1)五味子木脂素对大肠杆菌有显著的抑制作用,其在 50 mg/mL 浓度下的平均抑菌圈大小为 27 mm,优于化学防腐剂。

(2)五味子木脂素的最低抑菌质量浓度 MIC 为 6.25 mg/mL。

(3)五味子木脂素对大肠杆菌的抑菌机理主要是对细胞膜结构造成破坏作用,使细胞膜的平滑形态变得褶皱,细胞凹陷变形,甚至破损,影响菌体对糖等营养物质的吸收代谢,使菌体的生长繁殖受到阻碍和抑制。

参 考 文 献

- [1] 郭新竹,宁正祥,胡新宇,等. 食品防腐剂作用机理的研究进展[J]. 食品科技,2001,22(5):40-42
- [2] 史琳,王志成,冯叙桥. 五味子化学成分及药理作用的研究进展[J]. 药物评价研究,2011,34(3):208-211
- [3] 邓白罗,谢碧霞,刘晖,等. 南五味子的地理分布与园林应用[J]. 中南林业科技大学学报,2009,29(5):184-186
- [4] LI Xin-ying, YANG Mei, HUANG Jie-yun, et al. Preparative separation and purification of deoxyschizandrin from *Schisandrae Sphenantherae Fructus* by high-speed counter-current chromatography[J]. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2013,3(6):429-433
- [5] RADOSLAW J. E, AGNIESZKA S, HALINA E, et al. Analysis of lignans in *Schisandra chinensis* fruits, leaves, biomasses from *in vitro* cultures and food supplements[J]. Journal of Functional Foods, 2013(5):1576-1581
- [6] YE Chun, HAN Na, TENG Fu-kang, et al. Extraction optimization of polysaccharides of *Schisandrae fructus* and evaluation of their analgesic activity[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013(57):291-296
- [7] LI R T, SUN H D. Studies on the chemical constituents and bioactivities of five *Schisandra* medicinal species and *Elsholtzia bodinieri* [J]. Journal of the Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, 2008,25(4):569-575
- [8] YUNA Takimoto, HAI-YAN Qian, EMI Yoshigai, et al. Gomisins N in the herbal drug gomishi (*Schisandra chinensis*) suppresses inducible nitric oxide synthase gene via C/EBP β and NF- κ B in rat hepatocytes[J]. Nitric Oxide, 2013,28:47-56
- [9] DAE Young Kwon, DA Sol Kim, HYE Jeong Yang, et al. The lignan-rich fractions of *Fructus Schisandrae* improve insulin sensitivity via the PPAR- γ pathways in *in vitro* and *in vivo* studies[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2011(135):455-462
- [10] 应国清,俞志明,单剑锋,等. 北五味子有效组分的研究进展[J]. 河南中医,2005,25(6):84-87
- [11] 李丽萍,紫茎泽兰提取物对细菌的抑制作用及抑菌机理的研究[D]. 北京:北京林业大学,2010
- [12] 赵淑艳,呼世斌,吴焕利,等. 山茱萸提取物抑菌活性成分稳定性的研究[J]. 食品科学,2008,29(1):98-101

Antibacterial effect of Lignanoid from *Fructus Schisandrae chinensis* on the *Escherichia coli* and its mechanism

FENG Ya-jing, ZHANG Yuan-yuan, WANG Rui-xin, LI Shu-guo*

(Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China)

ABSTRACT The inhibitory effect of the lignanoid from *Fructus Schisandrae chinensis* on the common pathogenic bacteria in food and its mechanism were studied. Diameter of inhibition zone (DIZ) and minimum inhibition concentration (MIC) were measured to describe antibacterial activity of lignanoid. More attention was emphasized on the mechanism of antibacterial action against *Escherichia coli* by scanning electron microscope (SEM) observation and measurement of growth curve, electrical conductivity, and sugar consume. Results showed that DIZ for *Escherichia coli* reached 27 mm and MIC was 6.25 mg/mL. Bacterial growth curve showed that lignanoid inhibited bacterial growth. In addition, the results showed that one of its antibacterial mechanisms was that it influenced the metabolism and played an antibacterial role due to destruction of the cell membrane of bacteria and leakage of a large number of contents.

Key words *Fructus Schisandrae chinensis*; lignanoid; antimicrobial activity; antimicrobial mechanism; food safety