

研究报告



生姜精油化学成分及其抗菌活性

鲁萌萌^{1,2} 李文茹¹ 周少璐¹ 孙廷丽¹ 谢小保^{*1}

1 广东省微生物研究所 广东省科学院 华南应用微生物国家重点实验室 广东省菌种保藏与应用重点实验室
广东 广州 510070

2 长江大学生命科学学院 湖北 荆州 434025

摘要:【背景】随着耐药微生物种类的增多和耐药性增强,抗耐药微生物新药的发现已成为全球关注的问题。生姜精油是纯天然植物精油,是天然抗菌材料的优选。【目的】分析生姜精油的化学成分,研究生姜精油对常见条件致病菌抗菌活性的影响,并阐明其可能的抗菌机制。【方法】采用气相色谱/质谱技术(Gas Chromatography/Mass Spectrometry, GC/MS)对生姜精油的化学成分进行分析,利用牛津杯法、最小抑菌浓度法(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)、最小杀菌浓度法(Minimum Bactericidal Concentration, MBC)和生长曲线绘制法研究生姜精油的抗菌活性和抗菌动力学特征,并通过透射电镜(Transmission Electron Microscopy, TEM)观察生姜精油对细菌超微结构的影响。【结果】生姜精油的化学成分主要为姜烯(22.014%)、 β -倍半水芹烯(11.276%)、 α -法呢烯(8.222%)、 α -姜黄烯(6.854%)、姜酮(5.610%)、姜辣二酮(5.192%)、6-姜烯酚(4.670%)、桉烯(3.393%)和 β -红没药烯(3.080%)等萜类物质。生姜精油对枯草芽孢杆菌的MIC和MBC分别为2.3 $\mu\text{g/mL}$ 和4.6 $\mu\text{g/mL}$;对表皮葡萄球菌及金黄色葡萄球菌的MIC均为9.2 $\mu\text{g/mL}$,MBC均为18.4 $\mu\text{g/mL}$;对肺炎克雷伯菌的MIC和MBC分别为18.4 $\mu\text{g/mL}$ 和36.8 $\mu\text{g/mL}$ 。生长曲线结果显示,生姜精油能延长细菌的生长停滞期、抑制细菌的生长速率。透射电镜结果表明,生姜精油能引起细菌细胞膜破损,致使胞内物质渗漏。【结论】生姜精油富含萜类化合物,具有中度的抗菌活性,能破坏细菌细胞膜的完整性,引起菌体损伤和死亡。本文有望更好地为有害微生物的防控提供新方法。

关键词: 生姜精油, 化学成分, 抗菌活性

Chemical component and antibacterial activity of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) essential oilLU Mengmeng^{1,2} LI Wenru¹ ZHOU Shaolu¹ SUN Tingli¹ XIE Xiaobao^{*1}

1 Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou, Guangdong 510070, China

2 College of Life Sciences, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025, China

Abstract: [Background] With the increase of resistant microorganisms and the enhancement of drug

Foundation item: Basic and Applied Basic Research Foundation of Guangdong Province (2020A1515010850)

***Corresponding author:** Tel: 86-20-37656986; E-mail: xiexb@gdim.cn

Received: 15-07-2020; **Accepted:** 27-10-2020; **Published online:** 18-01-2021

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金(2020A1515010850)

***通信作者:** Tel: 020-37656986; E-mail: xiexb@gdim.cn

收稿日期: 2020-07-15; **接受日期:** 2020-10-27; **网络首发日期:** 2021-01-18

resistance, it has become a global concern to find new drugs against resistant microorganisms. Ginger essential oil is a pure natural plant essential oil, which is a preferred choice of natural antibacterial materials. **[Objective]** To analyze chemical components of ginger essential oil, study its antibacterial activity against common opportunistic pathogens, and illustrate its possible antibacterial mechanisms. **[Methods]** The chemical components of ginger essential oil were analyzed using gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). The antibacterial activity of ginger essential oil was studied by Oxford cup method, minimum inhibitory concentration (MIC), and minimum bactericidal concentration (MBC), respectively. Its kinetic growth characteristics were recorded by dynamic growth curves. The effect of ginger essential oil on bacterial ultrastructure was observed by transmission electron microscopy (TEM). **[Results]** The main chemical components of ginger essential oil were terpenes, including zingiberene (22.014%), β -sesquiphellandrene (11.276%), α -farnesene (8.222%), α -curcumene (6.854%), zingerone (5.610%), gingerdione (5.192%), 6-shogaol (4.670%), sabinene (3.393%), and β -bisabolene (3.080%). The MIC and MBC of ginger essential oil were 2.3 $\mu\text{g/mL}$ and 4.6 $\mu\text{g/mL}$ for *Bacillus subtilis*, 9.2 $\mu\text{g/mL}$ and 18.4 $\mu\text{g/mL}$ for both *Staphylococcus epidermis* and *Staphylococcus aureus*, 18.4 $\mu\text{g/mL}$ and 36.8 $\mu\text{g/mL}$ for *Klebsiella pneumoniae*, respectively. The experimental results of dynamic growth curves showed that ginger essential oil could prolong the growth lag phase and inhibit the growth rate of the bacteria. Moreover, results of TEM observation showed that ginger essential oil could destroy the cellular membrane and cause the leakage of the intracellular macromolecules. **[Conclusion]** Ginger essential oil is rich in terpenoids and has moderate antibacterial activity, which could destroy the integrity of cellular membrane and cause cell damage and death. This paper is expected to provide new methods for the prevention and control of harmful microorganisms.

Keywords: ginger essential oil, chemical component, antibacterial activity

近年来, 由于抗生素在生物医药领域和畜禽养殖业中的大量和不规范使用, 为耐药菌的形成提供了有利的选择压力, 多重耐药菌和超级耐药菌的传播已成为日趋严重的全球性问题。在欧盟, 每年至少有 2.5 万人死于耐药菌感染, 抗生素的耐药性问题已引起许多国家的高度重视^[1]。大多数抗生素不仅生产成本非常高, 而且毒副作用大、不易降解, 而天然植物的产物则具有众多抗生素所不具备的优势, 例如, 能缓解一些难降解化学合成抗生素带来的环境污染压力, 通过简单熏蒸即可达到防霉防腐等抗菌功效, 简单体外涂抹便可缓解疼痛、眩晕、呕吐等症状, 有助于减少耐药菌的产生, 并且来源广泛、安全可靠、成本低^[2]。现阶段, 国内外的研究者对天然药物的关注度极高, 尤其是具有广谱抗菌活性的植物精油^[3]。植物精油是天然植物的高度浓缩提取物, 有研究表明, 从植物中提取的植物精油, 其功效比直接使用原植物组织或器官的功效更佳, 植物精油是潜在的天然抗菌材料^[4-5]。因此, 从植物中提

取有效的天然产物对改善抗生素带来的健康问题以及环境污染问题具有积极作用。

生姜(*Zingiber officinale* Roscoe)是姜科姜属的多年生草本植物的新鲜根茎, 在我国广泛栽培, 是一种药食两用的草本植物, 早在我国中医学中就被用来治疗风寒感冒、头晕腹泻等症状^[6]。近年来, 生姜精油已被证实有多种药理作用, 如抗氧化、抗菌、抗癌等作用^[7-9]。因此, 生姜对健康良好的作用受到了医学界、科研界以及工业生产界的重点关注。目前, 国内主要对生姜精油微胶囊化、纳米乳化以及抗菌复合膜的研究比较多, 例如微胶囊具有控制精油挥发和活性成分释放的能力, 能提高精油的稳定性, 生姜精油微胶囊能有效地保持果实良好的品质^[10]。国外则多研究生姜精油对害虫的防治, 例如将生姜精油喷洒在植物表面能减少害虫在植物上的停留时间, 降低杀虫剂对环境和昆虫的伤害^[11]。现阶段国内外有关生姜精油抗菌活性和抗菌机理的研究较少, 抗菌机制尚不明确。因此, 本文分析生姜精油的化学

成分, 并研究生姜精油的抗菌活性和抗菌机制, 以期为更好地开发利用生姜资源提供理论依据, 为有害微生物的防控提供新型环保抗菌材料。

1 材料与方法

1.1 菌种

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 6538、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*) ATCC 12228、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) ATCC 6633 和肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*) ATCC 4352, 本实验室保存。

1.2 主要试剂和仪器

LB 培养基、吐温 20、磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffer Saline, PBS), 广东环凯微生物科技有限公司; 生姜精油(超临界 CO₂ 萃取技术提取, 相对密度为 0.92 g/mL), 湖南和广生物科技有限公司。

紫外可见分光光度计, 上海元析仪器有限公司; 多功能酶标仪, Tecan Spark 公司; 气相色谱-质谱联用仪, Agilent Technologies 公司; 透射电子显微镜, 日立公司。

1.3 生姜精油化学成分的气质联用分析

采用气相色谱-质谱联用仪对生姜精油的化学成分进行分析, 所用色谱柱的型号为 Hp-5ms, 规格为: 30 mm×250 μm×0.25 μm。

色谱条件为: 初始温度为 60 °C, 保持 2 min 后以 10 °C/min 的速度升温至 220 °C 并保持 15 min。所载气体为氦气, 气体流速为 1.0 mL/min。以程序升温气化(Programmed Temperature Vaporization, PTV)进样模式分流进样, 分流比为 50:1。

质谱条件为: 以标准电子轰击(Electron Impact, EI)离子源(70 eV), 离子源温度为 230 °C, 进样口温度从初始温度 70 °C 升温至 250 °C。所用四极杆温度为 150 °C, 四极杆扫描范围为 29–500 m/z, 溶剂延迟 3 min。将生姜精油样品的质谱图与美国国家标准与技术研究院(National Institute of Standards and Technology, NIST)质谱库中的标样进行比对, 对生姜精油的化学成分进行分析鉴定。

1.4 生姜精油抑菌圈测定

用牛津杯法测定生姜精油的抑菌圈。分别取 100 μL 培养至对数生长期(10^7 CFU/mL, 下同)的表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和肺炎克雷伯菌菌悬液, 与 20 mL 熔化的 LB 固体琼脂培养基混匀, 倒入放有牛津杯的培养皿中, 待培养基凝固后取出牛津杯。然后向标有 CK₁ 的小孔中加入 150 μL 的 PBS 缓冲液作为空白对照组; 向标有 CK₂ 的小孔中加入 150 μL 吐温 20 与 PBS 缓冲液 1:1 (体积比)的混合物, 作为判断吐温 20 对实验是否有干扰的对照组; 向标有 100% 的小孔中加入 150 μL 的纯生姜精油; 向标有 50% 的小孔中加入 150 μL 吐温 20 和纯生姜精油 1:1 (体积比)的混合物。每种菌 3 个平行, 于 37 °C 恒温培养箱中培养过夜, 用电子游标卡尺测量各抑菌圈的直径并记录, 取平均值。抑菌圈直径<10 mm 判定为耐药和无抑菌作用; 等于 10 mm 判定为轻度敏感; 11–15 mm 判定为中度敏感; ≥16 mm 判定为高度敏感^[12]。

1.5 生姜精油最小抑菌浓度或最小杀菌浓度的测定

取培养至对数生长期的表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和肺炎克雷伯菌菌悬液各 100 μL, 分别加入 96 孔板中, 再加入 100 μL 不同浓度的生姜精油, 使生姜精油终浓度分别为 18.4、9.2、4.6、2.3、1.15、0.575 μg/mL。以仅加培养基的组作为培养基对照组, 仅加不同浓度生姜精油的组作为精油对照组, 仅加菌悬液的组作为菌液对照组, 37 °C 恒温培养箱中培养过夜后于 600 nm 处测定吸光值, 每组实验 5 个平行。其中, 生姜精油对细菌的最低抑菌浓度(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)值为低于菌液对照组吸光值 5% 以下的最低生姜精油浓度^[13]。从肉眼可见无菌体生长的孔中取 10 μL 菌液涂布于 LB 固体琼脂培养基上, 37 °C 培养过夜, 将平板上无菌落生长的最低生姜精油浓度作为最小杀菌浓度。

1.6 生姜精油对细菌生长动力学的影响

采用多功能酶标仪测定各菌在不同浓度生姜精油中的生长曲线。分别取 10 μL 培养至对数生长期的表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌菌悬液，接种于含终浓度 9.2、4.6、2.3、1.15、0.575、0 $\mu\text{g/mL}$ 的生姜精油培养基中；取 10 μL 培养至对数生长期的枯草芽孢杆菌菌悬液，分别接种于含终浓度 4.6、2.3、1.15、0.575、0.287 5、0 $\mu\text{g/mL}$ 的生姜精油培养基中；取 10 μL 培养至对数生长期的肺炎克雷伯菌菌悬液，分别接种于含终浓度 9.2、4.6、2.3、1.15、0 $\mu\text{g/mL}$ 的生姜精油培养基中培养，并设置同实验方法 1.5 中的培养基对照组、精油对照组以及菌悬液对照组。设置多功能酶标仪温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ ，振动频率为 96 r/min，振幅为 6 mm，振动持续时间为 5 s，静置时间为 50 ms，于 600 nm 处每隔 1 h 自动测一次吸光值，共测 24 h。

1.7 生姜精油对细菌形态的影响

采用透射电镜观察生姜精油对细菌超微结构的影响。取处于对数生长期的表皮葡萄球菌、金

黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和肺炎克雷伯菌菌悬液各 500 μL (10^6 CFU/mL)，分别接种于 500 μL 含生姜精油终浓度为对应于各菌 MIC 的 LB 液体培养基中，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 的摇床孵育 6–8 h。用直头镊子固定铜网，取孵育后的培养物滴在铜网上，使菌体沉淀 10 min。取滤纸沿铜网边缘吸去表面多余液体，重复此操作 2 次；再将无菌纯水滴在铜网上，停留 10 s 并立即用滤纸吸干水分，重复此操作 5 次，使用透射电镜观察拍照。以不加生姜精油的组为空白对照组，实验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 生姜精油化学成分的气质联用分析

该生姜精油采用超临界 CO_2 萃取技术提取，并利用 GC/MS 对其进行化学成分分析，得到其总离子流图如图 1 所示，通过计算机 NIST 质谱库数据系统检索，与标准图谱比对，结合人工谱图解析，并采用面积归一法测定生姜精油各化学组分的相对含量，将部分化学组分列于表 1。由图 1 的生姜精油总离子流图可以看出，出峰时间主要集中在前期(5–19 min)，前期各组分的含量较高。

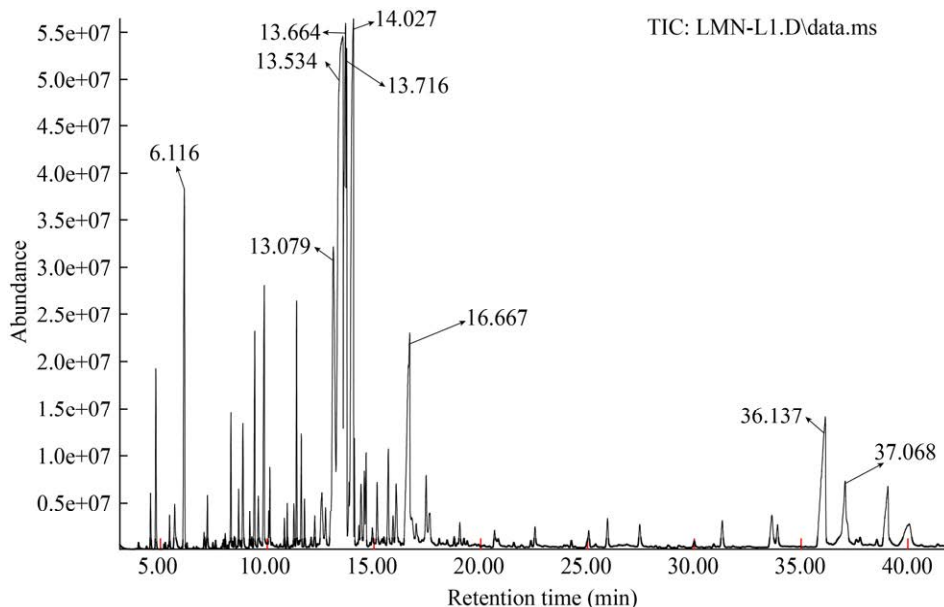


图 1 生姜精油总离子流图

Figure 1 Total ion chromatograms of ginger essential oil

表 1 生姜精油的化学成分分析结果
Table 1 Results of chemical component analysis of ginger essential oil

序号 No.	保留时间 Retention time (min)	化合物名称 Compound	相对含量 Relative content (%)
1	13.534	Zingiberene	22.014
2	14.027	β -sesquiphellandrene	11.276
3	13.664	α -farnesene	8.222
4	13.097	α -curcumene	6.854
5	16.667	Zingerone	5.610
6	37.068	Gingerdione	5.192
7	36.137	6-shogaol	4.670
8	6.116	Sabinene	3.393
9	13.716	(S)- β -bisabolene	3.080
10	9.857	Geranial(E)-3,7-dimethyl-2,6-octadienal	2.083
11	39.069	6-gingerol	1.696
12	37.596	10-shogaol	1.662
13	9.414	(Z)-2,6-octadienal, 3,7-dimethyl	1.320
14	11.376	2-butenoidacid, 2-methyl-3,7-dimethyl-2,6-octadienyl ester	1.308
15	4.785	Camphene	1.048
16	42.973	8-shogaol	1.047
17	12.560	Trans- β -farnesene	0.988
18	8.863	Decanal	0.947
19	15.672	2,6-octadienal, 3,7-dimethyl	0.919

由表 1 可以看出,生姜精油的主要化学成分为单萜(15.073%)和倍半萜(69.478%)两大类化合物。其中,含量较高的化学成分分别为姜烯(22.014%)、 β -倍半水芹烯(11.276%)、 α -法呢烯(8.222%)、 α -姜黄烯(6.854%)、姜酮(5.610%)、姜辣二酮(5.192%)、6-姜烯酚(4.670%)、桉烯(3.393%)和 β -红没药烯(3.080%),占总成分的 70.311%。此外,还含有少量的姜辣素成分以及酮、醛类化合物,生姜精油可能是通过多种化学成分协同发挥作用从而产生抗菌效果。

2.2 生姜精油抑菌圈测定

抑菌圈实验结果如图 2 和表 2 所示,当生姜精油浓度为 100% 时,表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和肺炎克雷伯菌的抑菌圈直径分别为 13.4、13.3、13.9 和 12.1 mm,均表现为中

度敏感;当生姜精油的浓度为 50% 时,表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和肺炎克雷伯菌的抑菌圈直径分别为 15.8、15.6、16.6 和 8.0 mm (表 2),其中表皮葡萄球菌和金黄色葡萄球菌表现为中度敏感,枯草芽孢杆菌表现为高度敏感,肺炎克雷伯菌表现为耐药。CK₁ 和 CK₂ 对照组实验证明,实验中吐温 20 的浓度对细菌没有毒害作用,生姜精油浓度为 100% 和 50% 的实验组表明,吐温 20 有助于生姜精油在固体培养基中扩散(图 2)。

2.3 生姜精油最小抑菌浓度或最小杀菌浓度的测定

生姜精油最小抑菌浓度与最小杀菌浓度(Minimum Bactericidal Concentration, MBC)的测定结果如表 3 所示,生姜精油有较显著的抑菌和杀菌作用。本实验中,生姜精油对枯草芽孢杆菌

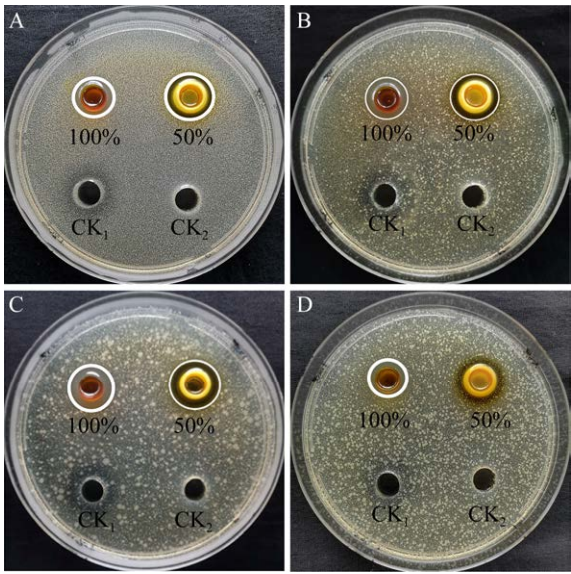


图 2 生姜精油对 4 种细菌的抑菌圈
Figure 2 Inhibition zone images of ginger essential oil on 4 kinds of bacteria

注: 100%: 纯生姜精油; 50%: 吐温 20 与生姜精油 1:1 混合液; CK₁: 灭菌的 PBS 缓冲液; CK₂: 吐温 20 与 PBS 缓冲液 1:1 的混合液
Note: 100%: Neat ginger essential oil; 50%: Mixture of Tween 20 and ginger essential oil 1:1; CK₁: Sterilized PBS; CK₂: Tween 20 mixed with PBS 1:1

表 2 生姜精油对 4 种细菌的抑菌圈直径

Table 2 Inhibition zone of ginger essential oil on 4 kinds of bacteria

菌种 Bacterial species	菌种类型 Type of strains	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter (mm)			
		100%	50%	CK ₁	CK ₂
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	G ⁺	13.4	15.8	8.0	8.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	G ⁺	13.3	15.6	8.0	8.0
<i>Bacillus subtilis</i>	G ⁺	13.9	16.6	8.0	8.0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	G ⁻	12.1	8.0	8.0	8.0

注: 100%: 纯生姜精油; 50%: 吐温 20 与生姜精油 1:1 混合液; CK₁: 灭菌的 PBS 缓冲液; CK₂: 吐温 20 与 PBS 缓冲液 1:1 的混合液

Note: 100%: Neat ginger essential oil; 50%: Mixture of Tween 20 and ginger essential oil 1:1; CK₁: Sterilized PBS; CK₂: Tween 20 mixed with PBS 1:1

表 3 生姜精油的 MIC 和 MBC

Table 3 MIC and MBC of ginger essential oil (μg/mL)

菌种 Bacterial species	菌种类型 Type of strains	最小抑菌浓度 MIC (μg/mL)	最小杀菌浓度 MBC (μg/mL)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	G ⁺	9.2	18.4
<i>Staphylococcus aureus</i>	G ⁺	9.2	18.4
<i>Bacillus subtilis</i>	G ⁺	2.3	4.6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	G ⁻	18.4	36.8

的抑菌和杀菌效果最好, MIC 值为 2.3 μg/mL, MBC 值为 4.6 μg/mL; 对肺炎克雷伯菌的抑菌和杀菌效果最差, MIC 值为 18.4 μg/mL, MBC 值为 36.8 μg/mL; 对表皮葡萄球菌及金黄色葡萄球菌的抑菌和杀菌效果适中, MIC 值均为 9.2 μg/mL, MBC 值均为 18.4 μg/mL。该结果与上述牛津杯法测抑菌圈的结果具有一致性。

2.4 生姜精油对细菌生长动力学的影响

4 种细菌在不同浓度生姜精油中的生长曲线结果如图 3 所示, 经生姜精油处理的实验组中, 表皮葡萄球菌(图 3A)、金黄色葡萄球菌(图 3B)、枯草芽孢杆菌(图 3C)以及肺炎克雷伯菌(图 3D)的生长延滞期均有不同程度的延长, 对数生长期的生长速率均降低, 且生姜精油浓度越大, 细菌的生长延滞期越长, 对数生长期的生长速率越低; 而未经生姜精油处理的组接种后很快进入对数生

长期。生姜精油浓度为 9.2 μg/mL 时, 表皮葡萄球菌和金黄色葡萄球菌的生长被完全抑制; 枯草芽孢杆菌的生长在生姜精油浓度为 2.3 μg/mL 时被完全抑制; 生姜精油浓度越高, 抑制肺炎克雷伯菌生长的时间越长, 生姜精油浓度为 9.2 μg/mL 时肺炎克雷伯菌被抑制了约 14 h 后才开始缓慢生长繁殖, 并且生长速率明显降低。上述实验结果表明表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌以及肺炎克雷伯菌的生长具有生姜精油浓度依赖性现象, 即生姜精油的浓度越高, 能抑制细菌生长的时间越持久。

2.5 生姜精油对细菌形态的影响

透射电镜结果显示(图 4), 经生姜精油处理后的细菌其细胞形态发生了明显的改变。空白对照组中的表皮葡萄球菌(图 4A1)、金黄色葡萄球菌(图 4B1)、枯草芽孢杆菌(图 4C1)和肺炎克雷伯菌(图 4D1)的细胞表面均光滑饱满, 形态规则, 细胞质均匀。然而经生姜精油处理后, 表皮葡萄球菌的细胞膜破损, 胞内物质发生渗漏, 并形成空泡(图 4A2); 金黄色葡萄球菌的细胞膜破裂并严重变形(图 4B2); 枯草芽孢杆菌细胞表面变得粗糙多孔, 细胞质外漏(图 4C2); 肺炎克雷伯菌细胞表面破损, 部分细胞质固缩并移到细胞两端(图 4D2)。可见, 生姜精油能引起细菌细胞膜破损、胞内物质发生渗漏、细胞质固缩、出现空泡等一系列超微结构的改变。

3 讨论与结论

有研究报道, 生姜精油的主要化学成分为碳水化合物(50%–70%)、脂类(3%–8%)、萜烯和酚类化合物, 其中萜烯类化合物主要有姜烯、β-红没药烯、α-法呢烯、β-倍半水芹烯和 α-姜黄烯^[14]。本实验中的生姜精油是采用超临界 CO₂ 萃取技术提取的, 其主要化学成分为萜烯类化合物, 其中单萜类化合物占 15.073%, 倍半萜类化合物占 69.478%, 倍半萜类化合物的含量远高于单萜类化合物的含量。有相关报道指出, 单萜类化合物的抗菌活性

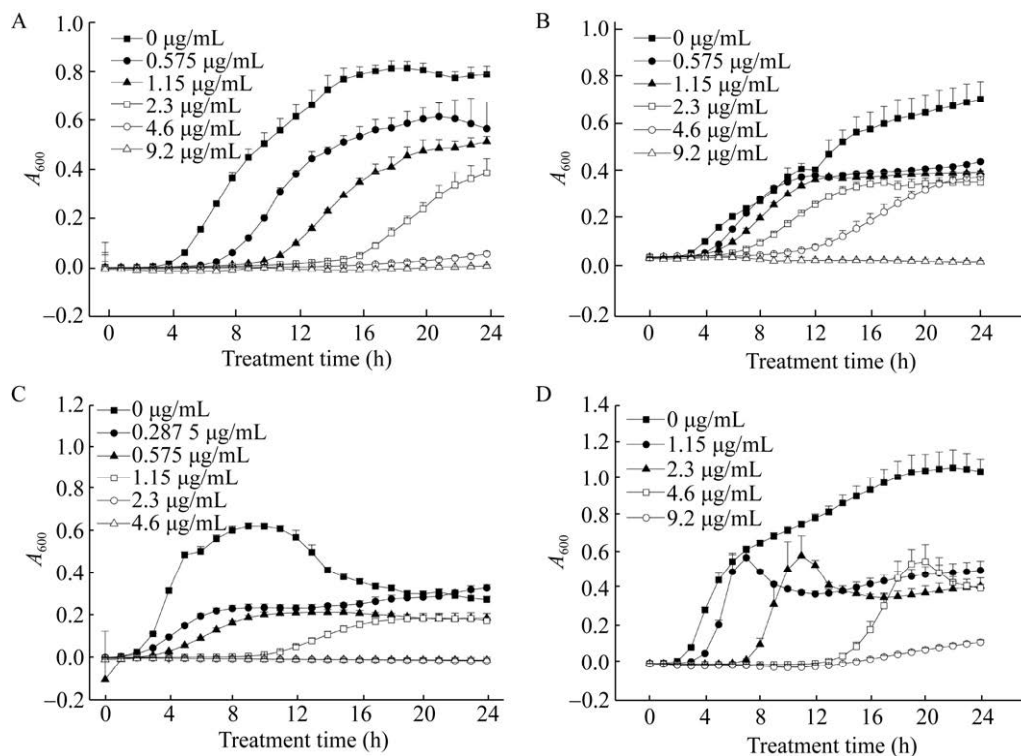


图3 各菌在不同浓度生姜精油中的生长曲线图

Figure 3 Dynamic growth curves of each strain in different concentrations of ginger essential oil

注: A: 表皮葡萄球菌; B: 金黄色葡萄球菌; C: 枯草芽孢杆菌; D: 肺炎克雷伯菌

Note: A: *S. epidermidis*; B: *S. aureus*; C: *B. subtilis*; D: *K. pneumoniae*

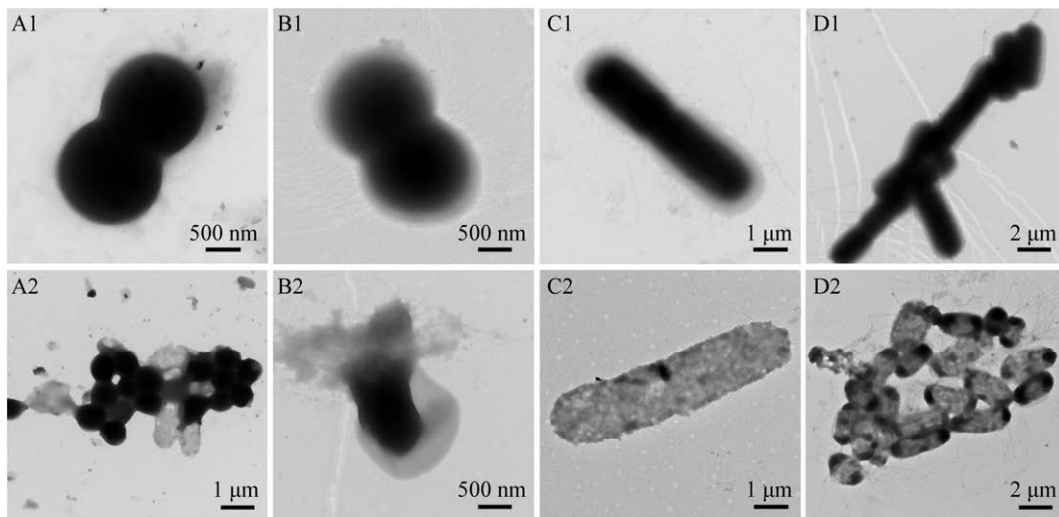


图4 生姜精油处理前后各菌的透射电镜图

Figure 4 TEM images of each strain before and after ginger essential oil treatment

注: A1、A2: 表皮葡萄球菌; B1、B2: 金黄色葡萄球菌; C1、C2: 枯草芽孢杆菌; D1、D2: 肺炎克雷伯菌; A1、B1、C1、D1: 空白对照组; A2、B2、C2、D2: 试验组

Note: A1, A2: *S. epidermidis*; B1, B2: *S. aureus*; C1, C2: *B. subtilis*; D1, D2: *K. pneumoniae*; A1, B1, C1, D1: Blank control group; A2, B2, C2, D2: Test group

要强于倍半萜类化合物的抗菌活性^[15-16]。然而本研究中抗菌活性的实验表明, 生姜精油仅具有中度的抗菌活性, 这可能是由于生姜精油中倍半萜类化合物的含量高于单萜类化合物所致。Sivasothy 等^[17]利用水蒸气蒸馏法提取红姜的叶和根状茎的挥发油, 获得的叶挥发油以 β -石竹烯为主, 根状茎挥发油以单萜类化合物为主, 同时发现叶挥发油和根状茎挥发油均对细菌有中等抗菌活性。可见, 生姜的品种、提取精油的方式、提取部位、工艺、产地等的差异都会导致精油化学成分和含量的不同, 但抗菌活性的差别不显著。也有报道称, 使用同种方法或者同一植物所提取的精油的成分也会不同, 但目前国内尚无提取精油的统一标准^[18]。总体上, 生姜精油具有抗菌活性是毋庸置疑的, 并且很可能是由多种化学成分协同发挥抗菌作用。

生姜精油对枯草芽孢杆菌有显著的抑制和杀灭作用, 其 MIC 值为 2.3 $\mu\text{g/mL}$, MBC 值为 4.6 $\mu\text{g/mL}$; 生姜精油对肺炎克雷伯菌的抗菌活性最弱, 其 MIC 值为 18.4 $\mu\text{g/mL}$, MBC 值为 36.8 $\mu\text{g/mL}$; 对金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌的抗菌活性较强, 其 MIC 值均为 9.2 $\mu\text{g/mL}$, MBC 值均为 18.4 $\mu\text{g/mL}$ 。生姜精油的最小抑菌浓度与抗菌动力学实验的结果具有一致性, 当生姜精油浓度达到 MIC 值的浓度时, 对细菌的生长抑制程度达到临界值; 生姜精油浓度低于 MIC 值的浓度时, 细菌的生长对生姜精油的浓度有明显的依赖性, 即生姜精油浓度越高, 能抑制细菌生长的时间越长, 主要体现在细菌的生长延滞期延长, 对数生长期的生长速率减慢。卢彩会等^[19]也报道了姜黄油能够延长细菌的生长延滞期, 并抑制细菌的生长速率。也有研究报道香料类的精油对微生物的生长延滞期有延长作用, 并能抑制微生物的生长^[20]。本实验中, 抗菌活性的实验结果表明, 革兰氏阳性菌比革兰氏阴性菌对生姜精油更敏感。这可能是由于革兰氏阴性菌的细胞膜上

含有亲水性的脂多糖, 能阻断生姜精油中的疏水性成分进入细胞, 从而降低了生姜精油对细胞造成的损伤^[21]。Debbarma 等^[22]对生姜、桉树、甜橙 3 种植物精油的抗菌活性进行了研究, 其中生姜精油对细菌的抗菌活性最好, 而且枯草芽孢杆菌对生姜精油最敏感, 与本实验的结果相似。枯草芽孢杆菌与金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌均为革兰氏阳性菌, 但枯草芽孢杆菌对生姜精油的敏感性却高于金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌, 对于这个问题, 可做进一步研究与讨论。目前植物精油的抗菌机理主要有: 增加细胞膜的通透性引起胞内无机离子的失衡; 渗透进入微生物细胞内破坏细胞的生物酶系统; 干扰微生物的蛋白合成等^[23-25]。本实验中透射电镜的结果显示, 生姜精油的抗菌机制是能破坏细菌的细胞膜结构, 引起细胞膜破损, 细菌无法快速恢复, 胞内物质发生渗漏, 导致细菌细胞发生致命性的损伤。

综上, 本研究所用的生姜精油经 GC/MS 分析得到的主要成分为姜烯、 β -倍半水芹烯、 α -法呢烯、 α -姜黄烯、姜酮、姜辣二酮、6-姜烯酚、桉烯和 β -红没药烯, 占总成分的 70.311%。生长动力学实验表明, 生姜精油能延长细菌的生长迟滞期、降低细菌的生长速率。利用 TEM 发现生姜精油能破坏细菌的细胞膜, 使细胞内物质外溢, 导致细菌不能及时修复生姜精油对细胞膜造成的破坏和损伤, 引起细菌死亡, 从而达到一定的抗菌效果。

REFERENCES

- [1] Li WR, Zeng TH, Xie XB, Shi QS, Li CL. Inhibition of the *pqsABCDE* and *pqsH* in the *pqs* quorum sensing system and related virulence factors of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 strain by farnesol[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2020, 151: 104956
- [2] Rahmani AH, Shabrmi FMA, Aly SM. Active ingredients of ginger as potential candidates in the prevention and treatment of diseases via modulation of biological activities[J]. International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology, 2014, 6(2): 125-136

- [3] Chen XM, Fang GL, Chen ME, Cai DC, Zhang ZJ, Zhou RX. Research progress on antibacterial effect and detection technology of plant essential oils[J]. Shandong Chemical Industry, 2017, 46(10): 67-69 (in Chinese)
陈秀敏, 方桂丽, 陈敏儿, 蔡大川, 张志军, 周瑞兴. 植物精油的抑菌作用及检测技术研究进展[J]. 山东化工, 2017, 46(10): 67-69
- [4] Shiroooye P, Mokaberinejad R, Ara L, Hamzeloo-Moghadam M. Volatile constituents of ginger oil prepared according to Iranian traditional medicine and conventional method: a comparative study[J]. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 2016, 13(6): 68-73
- [5] Sadekuzzaman M, Mizan MFR, Kim HS, Yang S, Ha SD. Activity of thyme and tea tree essential oils against selected foodborne pathogens in biofilms on abiotic surfaces[J]. LWT, 2018, 89: 134-139
- [6] Li JP, Wang YS, Ma H, Hao JD, Yang H. Comparative study on the main chemical components of dried ginger and ginger[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2001, 26(11): 748-751 (in Chinese)
李计萍, 王跃生, 马华, 郝近大, 杨桦. 干姜与生姜主要化学成分的比较研究[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(11): 748-751
- [7] Höferl M, Stoilova I, Wanner J, Schmidt E, Jirovetz L, Trifonova D, Stanchev V, Krastanov A. Composition and comprehensive antioxidant activity of ginger (*Zingiber officinale*) essential oil from Ecuador[J]. Natural Product Communications, 2015, 10(6): 1085-1090
- [8] Sharma PK, Singh V, Ali M. Chemical composition and antimicrobial activity of fresh rhizome essential oil of *Zingiber officinale* roscoe[J]. Pharmacognosy Journal, 2016, 8(3): 185-190
- [9] Babasheikhali SR, Rahgozar S, Mohammadi M. Ginger extract has anti-leukemia and anti-drug resistant effects on malignant cells[J]. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2019, 145(8): 1987-1998
- [10] Ban ZJ, Zhang JL, Li L, Luo ZS, Wang YJ, Yuan QP, Zhou B, Liu HD. Ginger essential oil-based microencapsulation as an efficient delivery system for the improvement of Jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) fruit quality[J]. Food Chemistry, 2020, 306: 125628
- [11] Da Silva IM, Zanuncio JC, Brügger BP, Soares MA, Zanuncio AJV, Wilcken CF, De Souza Tavares W, Serrão JE, Sedyama CS. Selectivity of the botanical compounds to the pollinators *Apis mellifera* and *Trigona hyalinata* (Hymenoptera: Apidae)[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 4820
- [12] Zhang TH, Wu YX, Dian ZH, Zuo GY. Screening of antimicrobial activity of 19 Chinese herbal medicines ethanol extracts *in vitro*[J]. Guihaia, 2019: 1-11 (in Chinese)
张铁焕, 吴玉霞, 莫佐红, 左国营. 19 种常见中药材醇提物的体外抗菌活性筛选[J]. 广西植物, 2019: 1-11
- [13] Jin H, Li HS, Tie JF, Han J, Su YX. Establishment of a broth microdilution MIC testing method for disinfectants[J]. Chinese Journal of Disinfection, 2018, 35(11): 801-804,808 (in Chinese)
金虹, 李海帅, 帖金凤, 韩杰, 苏裕心. 应用微量稀释法测定消毒剂最小抑菌浓度方法的建立[J]. 中国消毒学杂志, 2018, 35(11): 801-804,808
- [14] Prasad S, Tyagi AK. Ginger and its constituents: role in prevention and treatment of gastrointestinal cancer[J]. Gastroenterology Research and Practice, 2015, 2015: 142979
- [15] Sinha GK, Gulati BC. Antibacterial and antifungal study of some essential oils and some of their constituents[J]. Indian Perfumer, 1990, 34(2): 126-129
- [16] Srivastava A, Shukla YN, Kumar S. Recent development in plant derived antimicrobial constituents: a review[J]. Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences, 2000, 22(2/3): 349-405
- [17] Sivasothy Y, Chong WK, Hamid A, Eldeen IM, Sulaiman SF, Awang K. Essential oils of *Zingiber officinale* var. *rubrum* Theilade and their antibacterial activities[J]. Food Chemistry, 2011, 124(2): 514-517
- [18] Singh G, Kapoor IPS, Singh P, De Heluani CS, De Lampasona MP, Catalan CAN. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*[J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46(10): 3295-3302
- [19] Lu CH, Zhao MM, Mou DH. Antimicrobial activity and bacteriostatic mechanism of turmeric oil[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(21): 108-113 (in Chinese)
卢彩会, 赵明明, 牟德华. 姜黄油的抑菌活性及抑菌机理[J]. 食品工业科技, 2018, 39(21): 108-113
- [20] Shelef LA. Antimicrobial effects of spices[J]. Journal of Food Safety, 1984, 6(1): 29-44
- [21] Bezić N, Skočibušić M, Dunkić V, Radonić A. Composition and antimicrobial activity of *Achillea clavennae* L. essential oil[J]. Phytotherapy Research, 2003, 17(9): 1037-1040
- [22] Debbarma J, Kishore P, Nayak BB, Kannuchamy N, Gudipati V. Antibacterial activity of ginger, eucalyptus and sweet orange peel essential oils on fish-borne bacteria[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2013, 37(5): 1022-1030
- [23] Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJE. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol[J]. Journal of Applied Microbiology, 2001, 91(3): 453-462
- [24] El-Baroty GS, El-baky HHA, Farag RS, Saleh MA. Characterization of antioxidant and antimicrobial compounds of cinnamon and ginger essential oils[J]. African Journal of Biochemistry Research, 2010, 4(6): 167-174
- [25] Sikkema J, Weber FJ, Heipieper HJ, De Bont JAM. Cellular toxicity of lipophilic compounds: mechanisms, implications, and adaptations[J]. Biocatalysis, 1994, 10(1/4): 113-122