多酚及植物精油对扩展青霉生长及展青霉素 生成的抑制作用研究

王 媛 1 , 袁亚宏 1 , 杨丽霞 1 , 骆 莹 1 , 王 玲 1 , 张志伟 2 , 岳田利 1* (1. 西北农林科技大学食品科学与工程学院, 杨凌 7 12100; 2. 青岛农业大学食品科学与工程学院, 青岛 2 266109)

摘 要:目的 研究多酚及植物精油对扩展青霉生长及展青霉素生成的抑制作用。方法 将 10 种多酚、甜菜碱以及 3 种植物精油与 PDA 培养基混合得(多酚浓度 10 μ g/mL,精油浓度 0.5 μ L/mL),待培养基凝固后,在表面滴加 10μ L 10^6 孢子/mL 扩展青霉孢子悬液,28 °C培养 $10\sim14$ d。每 2 d 根据十字交叉法测定菌落直径,计算抑菌率,最后一天提取培养基中展青霉素并用高效液相色谱测定展青霉素的含量。结果 茶多酚及香草酸在 d 2 抑菌效果最佳,分别为 28.26%和 22.58%。菌体生长至 d 10,原儿茶酸的抑菌率最高,其次分别为香豆素,咖啡酸,金丝桃苷,香草酸,绿原酸,桂皮素,香草醇,甜菜碱,茶多酚。柠檬醛与大蒜油能够完全抑制扩展青霉的生长,姜黄油的抑菌率较弱。多酚类物质对扩展青霉合成毒素的影响并不显著(P>0.05),而植物精油对展青霉素的合成具有显著的抑制作用(P<0.05)。结论 多酚及植物精油对扩展青霉生长和产毒有一定抑制作用,这为开发具有抑菌作用可替代农药的天然产物提供理论基础。

关键词: 多酚; 植物精油; 扩展青霉; 展青霉素

Study on the effect of polyphenol and essential oil on the growth and patulin production of *Penicillium expansum*

WANG Yuan¹, YUAN Ya-Hong¹, YANG Li-Xia¹, LUO Ying¹, WANG Ling¹, ZHANG Zhi-Wei², YUE Tian-Li^{1*}

(1. College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; 2. College of Food Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

ABSTRACT: Objective To study the inhibition effect of polyphenol and essential oil on the growth and patulin production of *P. expansum*. **Methods** Ten kinds of polyphenol, betaine and 3 kinds of essential oil were mixed with PDA medium to obtain the concentration of each compound for 10 μ g/mL (polyphenol) and 0.5 μ L/mL (essential oil). Then 10 μ L of 10⁶ conidia/mL were inoculated in the center of each Petri dish and the dishes were incubated under 28 °C in the dark for 10~14 d. Each colony diameter was measured every 2 d to obtain the growth rate. Patulin was extracted with acetonitrile and determined at the last day using HPLC. **Results** Tea polyphenols and vanillic acid showed higher inhibition level than others at d 2 with the efficiency of 28.26% and 22.58% respectively. At the last day, protocatechuic acid exhibit the highest inhibition level, followed by coumarin, caffeic acid, hyperin, vanillic acid, chlorogenic acid, cinnamon, vanilla, betaine and tea polyphenols.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31371814)、国家科技基础性研究专项(2013FY113400)

Fund: Supported by National Natural Science Foundation of China (31371814) and National Basic Research Program of China (2013FY113400) *通讯作者: 岳田利, 教授, 主要研究方向为生物技术及食品安全控制技术。E-mail: yuetl@nwsuaf.edu.cn

^{*}Corresponding author: YUE Tian-Li, Professor, College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, No. 28, Xinong Road, Yangling 712100, China. E-mail: yuetl@nwsuaf.edu.cn

In addition, citral and garlic oil could completely inhibit the growth of P. expansum, but inhibition effect of turmeric oil was weak. The influence of polyphenols on the patulin production of P. expansum was not significant (P>0.05), while the influence of essential oil on the patulin production was significant (P<0.05). Conclusion Polyphenols and essential oils have some effect on growth and patulin production of P. expansum, which provide scientific basis to explore natural product with antifungal effect to replace pesticide.

KEY WORDS: polyphenol; essential oil; *P. expansum*; patulin

1 引言

扩展青霉是引起水果腐烂变质的一种常见霉菌、 许多扩展青霉在侵染水果的过程中能够产生展青霉 素。展青霉素具有潜在的致畸致癌性、已有 100 多个 国家对食物和饲料中的展青霉素设置限量标准[1]。抑 制扩展青霉的生长对于减少食品中展青霉素的污染 具有重要作用,目前,对于扩展青霉的抑制及杀灭措 施主要包括物理, 化学和生物控制。物理防治主要是 在水果加工前期进行,如剔除腐烂变质的水果,水果 贮藏期间严格控制仓库卫生或采用气调贮藏、辐照、 臭氧等措施[2-4]。生物防治主要是利用微生物与植物病 原菌的相互作用来抑制病原菌的生长,已报道的酵 母、枯草芽孢杆菌、乳酸菌都对扩展青霉有拮抗作用 [2,5-7]。虽然生物防治被认为是安全的抑菌措施、但其 杀菌效率与化学防治相比仍不够显著及高效。化学防 治措施如喷施杀菌剂依然在农户的种植过程中占主导 地位, 然而杀菌剂的大量使用刺激并导致了大量有害 菌产生耐药性, 使得传统杀菌剂的作用逐渐减弱[6]。同 时, 杀菌剂在食品和环境中的残留也引起公众担忧, 欧盟已禁止在欧洲使用杀菌剂类农药[8]。因此、发掘出 既对环境与人体不会产生危害又能起到高抑菌效果的 化学物质来逐渐替代杀菌剂类农药成了科研工作者的 研究热点。多酚广泛存在于植物体内,是天然有机化 合物、且具有抗氧化等多种保健作用; 植物精油同样 来源于高等植物, 具有抗菌、可降解等特点[9,10]。因此, 本文选择多酚及植物精油作为研究对象、考察天然产 物对扩展青霉生长及产毒的抑制作用、为实际应用中 选择可替代农药的天然产物提供理论依据。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 目标菌株及孢子悬液制备

扩展青霉(F-WY-12-04)分离自猕猴桃落果(陕西

省周至县);接种于 PDA 培养基上(马铃薯葡萄糖培养基),4 ℃条件下保存。经测定,该菌株在 PDA 培养基及猕猴桃上可产生大量展青霉素。

将该菌株在 PDA 培养基, $25\sim28$ °C 培养 7 d 后, 用无菌水冲洗孢子, 制备孢子悬浮液。用血球计数板计数, 调整孢子浓度为 1×10^6 个/ mL,分装至 1 mL 无菌离心管中, 4 °C 保存,一周内使用。

PDA 培养基制备: 马铃薯汁 1000 mL, 葡萄糖 20.0 g, 1000 琼脂 20 g, pH 值自然, 121 ℃灭菌 20 min。马铃薯去皮, 挖芽眼, 洗净, 切片, 称 300 g 放入 1000 mL 自来水中用文火煮沸 10~20 min, 双层纱布过滤, 滤液加水补至 1000 mL。

2.1.2 多酚及生物碱

实验选择了 1 种生物碱(甜菜碱)和 10 种多酚(茶多酚,香草醇,绿原酸,香草酸,原儿茶酸,香豆素,咖啡酸,金丝桃苷,桂皮素),以上化合物均为色谱级标准品,购于 sigma-aldrich 公司。将以上化合物均溶于 50%乙醇溶液中,配置成 $1000~\mu g/mL$ 的母液,4 %避光保存。

2.1.3 植物精油

柠檬醛(96%),姜黄油(99%),大蒜油(60%大蒜素),购买于江西雪松天然药用油有限公司,4℃冰箱避光保存。

2.1.4 展青霉素

展青霉素标准品(sigma-aldrich 公司)溶于乙酸乙酯,配制成 $100~\mu g/mL$ 的标准储备液, $-20~^{\circ}C$ 避光保存。展青霉素工作液制备: 取标准储备液 $40~^{\circ}C$ 蒸干后,用酸化水($pH~4.0~^{\circ}$ 冰乙酸水溶液)稀释成不同浓度, $4~^{\circ}C$ 冰箱避光保存。

2.2 实验方法

2.2.1 多酚及植物精油对扩展青霉的抑制作用

分别量取 20 mL PDA 培养基置于 18 mm×150 mm玻璃试管中, 灭菌, 待培养基温度下降至60 ℃左右时, 取以上200 μL多酚溶液或10 μL挥发油加入培

养基中制成 10 μg/mL 的含多酚成分培养基和 0.5 μL/mL 的含精油培养基,混匀后迅速倒入 90 mm 培养皿中,待培养基凝固后,在培养基中部滴加 10 μL, 10^6 个孢子/mL 的扩展青霉孢子悬液,置于 28 ℃条件下培养 $10\sim14$ d,每 2 d 根据十字交叉法测量菌落直径,每个处理做 3 个平行。以未加入抑菌成分和加入 200 μL, 50% 乙醇的培养基作为空白对照 $[^{11,12}]$ 。

抑菌率=[1 - (P - PC)]×100

P 为加入抑菌成分后的菌落直径, PC 为对应的空白组的菌落直径。

2.2.2 抑菌成分对扩展青霉产生展青霉素的影响

实验组和对照组的扩展青霉在 $28 \, ^{\circ}$ C,,相对湿度 $80\%\sim90\%$ 的条件下培养 $10\,d$ 后,提取培养基中的展青霉素: 从培养基中的菌落下方不同位置取 $6\, ^{\circ}$ 6 mm 直径的培养基,称重,加入 $1\,m$ L 色谱乙腈,震荡,室温避光浸提 $1\,h$,最后经过 $0.22\,\mu$ m 滤膜过滤后用高效液相色谱(LC- $2010\,A$,日本岛津)进行检测。色谱柱: $250\,m$ 4.6 mm i.d., $5\,m$ (Eclipse Plus C18,美国安捷伦);流动相: 乙腈: 水($1:9,\,V:V$);流速: $1\,m$ L/min;进样量: $20\,\mu$ L;检测波长: $276\,m$ m。展青霉素浓度表示为 μ g/g 培养基。每个样品进行 $3\, ^{\circ}$ 个平行实验 $^{[11]}$ 。

2.3 数据分析

实验中所有数据的方差分析及多重比较均使用 SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 处理。当各 组试验数据满足方差齐性时, 使用 Turkey 检验; 不 满足方差齐性时, 使用 Games-Howell-test 检验。

3 结果与分析

3.1 多酚及生物碱对扩展青霉的抑制作用

由于实验中用到的多酚种类较多,所以结合文献中报道的浓度 $^{[11]}$,初步选择 $10~\mu g/mL$ 的浓度进行抑菌性评价。如图 1~m示,甜菜碱和多酚对扩展青霉都有一定程度的抑菌效果。扩展青霉在 28~C培养 10~d之后,原儿茶酸的抑菌率最高,为 11.52%,其次分别为香豆素、咖啡酸、金丝桃苷、香草酸、绿原酸、桂皮素、香草醇、甜菜碱、茶多酚。

根据单因素方差分析及显著性检验(*P*<0.05), 菌株生长 d 2, 加入抑菌成分(实验组)和未加入抑菌成分(对照组)的培养基的菌落直径没有显著性差异(*P*>0.05); 从菌落生长d4到d10, 实验组与对照组的显著性差异逐渐明显: 菌株生长 d 4, 对照组与加入

香豆素,咖啡酸,金丝桃苷的实验组有显著性差异 (P<0.05),与咖啡酸差异极显著(P<0.01);菌株培养 d 6,对照组与加入原儿茶酸,香豆素,咖啡酸,金丝桃苷,桂皮素的实验组存在显著性差异(P<0.05),与咖啡酸差异极显著(P<0.01);菌株生长 d 8,除了甜菜碱,茶多酚,绿原酸,实验组与其他 7 种多酚物质均有显著性差异(P<0.05),与香豆素,咖啡酸,金丝桃苷差异极显著(P<0.01);菌株生长 d 10,对照组与所有实验组均存在显著性差异(P<0.05),与除桂皮素和茶多酚之外的其余 8 种成分差异极显著(P<0.01)。

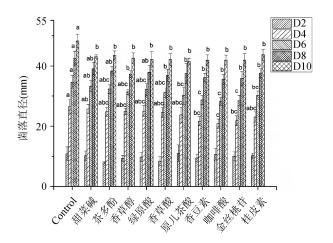


图 1 10 天培养期内多酚及甜菜碱对扩展青霉生长的抑制效果

Fig. 1 Inhibition effect of polyphenol and betaine on the growth of *P. expansum* for 10 d

实验中发现、不同抑菌物质发挥其抑菌效果的 作用时间并不相同, 从图 2 可以看出, 甜菜碱、茶多 酚、香草醇、绿原酸及香草酸均在菌株生长 d 2 抑菌 效果最佳, 其中茶多酚的抑菌率可以达到 28.26%, 后期的抑菌效果则开始降低、第4天的抑菌效果最差、 由于实验中多酚的浓度并未达到扩展青霉的致死浓 度、伴随孢子的逐渐萌发、多酚缓慢消耗、致使抑菌 效果的持续时间短[12], 因此,这种突然降低与多酚成 分的浓度低及扩展青霉的迅速生长密切相关。结合图 1可以看到, 扩展青霉从d2到d4正处于生长速率最 快的阶段, 因此, 少量的抑菌物质并不能发挥明显作 用。当扩展青霉生长速率降低之后, 这 5 种成分的抑 菌率又逐渐增加。原儿茶酸、香豆素、咖啡酸、金丝 桃苷、香豆素及桂皮素则与以上5种物质不同,这5 种成分的抑菌率逐渐增加至 d 6,然后呈现下降趋势, 这同样与多酚物质被扩展青霉生长所消耗相关,但可

以认为扩展青霉在生长过程中对甜菜碱,茶多酚,香草醇,绿原酸及香草酸的消耗要高于原儿茶酸,咖啡酸,金丝桃苷,香豆素和桂皮素,从而导致前5种成分的抑菌率迅速下降。虽然这10种物质由于结构及与扩展青霉的作用机理不同导致最佳抑菌时间不同,但总体均呈现出抑菌效果先升高又下降的趋势。因此,在实际应用中,要到达持续的抑菌效果,既需要提高多酚的浓度,又可以根据实验结果在适当时间(如,抑菌活性开始减弱)及时补充多酚物质,或者利用微胶囊技术将多酚进行包埋,使其能够缓慢释放并防止多酚被氧化,从而延长抑菌效果。

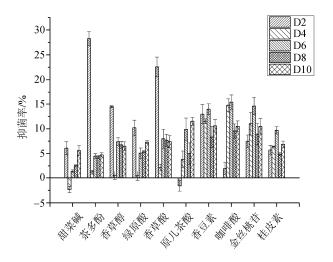


图 2 多酚及甜菜碱不同时间对扩展青霉生长的抑制率 Fig. 2 Inhibition ratio of polyphenol and betaine on the growth of *P. expansum* at different time

3.2 柠檬醛、姜黄油及大蒜油对扩展青霉的抑菌作用

3 种精油对扩展青霉的生长均有抑制作用, 由表 1 可以看出 0.5 μL/mL 的柠檬醛和大蒜油能够完全抑制扩展青霉的生长, 并起到杀菌的作用, 姜黄油则不能完全抑制扩展青霉的生长, 但也在一定程度上限

制了菌株的生长。在扩展青霉生长的 d 6, d 8, d 10, 空白对照组与姜黄油差异显著(P<0.05), 但在 d 12、d 14, 姜黄油的抑菌作用逐渐下降,与对照组差异不显著(P>0.05)。对照组与柠檬醛,大蒜油在扩展青霉生长的 d 4、d 6、d 8、d 10、d 12、d 14 始终差异很显著(P<0.01)。文献中报道植物精油对多种能够产生真菌毒素的霉菌具有抑制作用,比如肉桂醛能够抑制镰刀菌、赭曲霉等真菌。同时,通过扫描电镜及透射电镜的观察发现植物精油的加入可以使正常菌丝褶皱、变薄,细胞质与细胞壁分离,细胞器皱缩等使得霉菌生长受到抑制甚至死亡,从而抑制其产生毒素[13,14]。

3.3 多酚及甜菜碱对扩展青霉合成展青霉素的 影响

扩展青霉在多酚等抑菌物质的作用下生长 10 d 后,提取培养基中的展青霉素进行高效液相色谱 (HPLC)分析、结果如图 3 所示。经过方差分析及多重 比较、各个物质作用后的扩展青霉产生的展青霉素 浓度与对照组没有显著性差异(P>0.05), 但是甜菜碱, 茶多酚、香草醇、香草酸作用后的扩展青霉产生的展 青霉素反而略高于对照组、这可能与扩展青霉在添 加少量活性物质的条件下加速合成代谢产物以抵御 不利条件有关。其他 6 种物质作用后的扩展青霉产生 的展青霉素较对照组略低。文献中报道槲皮素可以影 响扩展青霉合成展青霉素的基因表达[11], 本实验的 结果也反映出,不同物质对同一菌株的作用方式各 不相同, 有些物质能够通过抑制霉菌细胞壁上麦角 固醇的合成而抑制菌体生长、但对其某种物质的代 谢或相关基因的表达却没有影响;而有些物质则能 够干预菌体中代谢产物的合成及基因的表达。因此、 可以根据抑菌方式的不同, 将多种成分进行复配, 从 而达到既能抑制菌体生长又能防止有害代谢物的生 成的目的。

表 1 姜黄油、柠檬醛、大蒜油对扩展青霉生长的抑制作用 (n=3)
Table 1 Inhibition effect of turmeric oil, citral and garlic oil on the growth of *P. expansum* (n=3)

	菌落直径(mm) [#]						
	D2	D4	D6	D8	D10	D12	D14
CK	10.11 ± 1.05^{a}	16.54±0.71 ^a	28.3 ± 0.8^{a}	35.16±1.32 ^a	42.98±1.32 ^a	47.61 ± 1.25^{a}	52.10±1.40 ^a
姜黄油	$8.74{\pm}1.02^a$	14.82 ± 0.58^a	24.1 ± 0.62^{b}	29.07 ± 0.98^{b}	38.26 ± 0.71^{b}	43.00 ± 1.01^a	47.73±2.11 ^a
柠檬醛	$0_{\rm p}$	$0_{\rm p}$	$0^{\rm c}$	0^{c}	0^{c}	0_{p}	$0_{\rm p}$
大蒜油	O_p	$0_{\rm p}$	$0^{\rm c}$	0^{c}	0^{c}	O_p	$0_{\rm p}$

[#] 平均值±标准偏差 同一列的不同字母表示数值具有显著性差异(P<0.05)

3.4 柠檬醛、姜黄油及大蒜油对扩展青霉合成 展青霉素的影响

扩展青霉在 3 种植物精油的作用下生长 14 d 后,提取培养基中的展青霉素并经过 HPLC 检测,结果如图 4 所示。利用方差分析与多重比较,对照组菌株产生的展青霉素浓度与姜黄油作用后菌株产生的展青霉素具有显著性差异(P<0.05)。而由于含有柠檬醛与大蒜油的培养基中的扩展青霉并未生长,因此,菌液下方的培养基中没有任何展青霉素。文献中也报道,

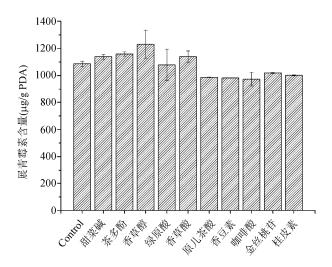


图 3 扩展青霉在多酚和甜菜碱作用下生长 10 d 后 PDA 培养基中展青霉素的含量

Fig. 3 Amount of patulin producted by *P. expansum* in PDA medium with polyphenol and betaine after 10 d

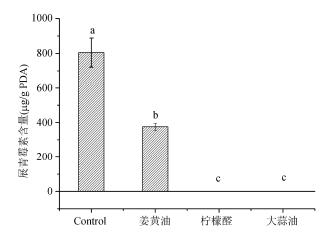


图 4 扩展青霉生长 14 d 后单位培养基中展青霉素的含量 Fig. 4 Amount of patulin producted by *P. expansum* in PDA medium with essential oil after 14 d

柠檬醛能够抑制赭曲霉生长及赭曲霉素的合成^[13]。 但是精油在应用中也具有一定的限制因素,比如挥 发性和易氧化性。从而随着时间的延长,有效的抑菌 成分减少,导致精油的抑菌作用可能会逐渐减弱,后 期可对精油进行包埋或制备成纳米乳液等处理以保 护其不被氧化并延长精油的作用时间^[15,16]。

4 结 论

本实验研究了多酚及植物精油对扩展青霉的抑菌效果及对扩展青霉合成展青霉素的影响。结果表明,每种物质对扩展青霉都具有一定程度的抑制作用,多酚及甜菜碱的抑菌效果和对展青霉素合成的影响都不及植物精油。柠檬醛与大蒜油能够完全抑制扩展青霉的生长;姜黄油的抑菌率则较弱,但对展青霉素的合成具有显著的抑制作用。实际应用当中,可根据多酚及植物精油的特点,采取不同的方式实现果蔬加工前后的扩展青霉的抑菌作用。

参考文献

- European-Commission. Regulation (EC) No 1881/2006 of 19
 December 2006setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs [C]. Official J Eur Union L, 2006, L364: 5–24.
- [2] Hawar S, Vevers W, Karieb S, et al. Biotransformation of patulin to hydroascladiol by *Lactobacillus* plantarum [J]. Food Control, 2013, (34): 502–508.
- [3] Palou L, Usall J, Smilanick JL, et al. Evaluation of food additives and low-toxicity compounds as alternative chemicals for the control of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* on citrus fruit [J]. Pest Manage Sci, 2002, (58): 459–466.
- [4] Palou L, Smilanick JL, Crisosto CH, et al. Ozone gas penetration and control of the sporulation of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* within commercial packages of oranges during cold storage [J]. Crop Prot, 2003, (22): 1131–1134.
- [5] Svetlana ZY, Stefan S, Dusica D, et al. Control of penicillium expansum by combining bacillus subtilis [C]. IV International Symposium, 2013.
- [6] Spadaro D, Lorè A, Garibaldi A, et al. A new strain of Metschnikowia fructicola for postharvest control of *Penicillium* expansum and *Patulin accumulation* on four cultivars of apple [J]. Postharvest Biol Tec, 2013, (75): 1–8.
- [7] Guerrero V, Guigon C, Berlanga D, et al. Complete control of Penicillium expansum on apple fruit using a combination of antagonistic yeast Candida oleophila [J]. Chil J Agr Res, 2014, 74: 427–431.
- [8] European-Parliament. Commission Regulation 1107/2009 of 21

- October 2009 concerning the placing ofplant protection products on the market [C]. Official J Eur Union, 2009, L309: 1–50.
- [9] Kalemba D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils [J]. Curr Med Chem, 2003, 10: 813–829.
- [10] Isman MB. Plant essential oils for pest and disease management[J]. Crop Prot, 2000, 19: 603–608.
- [11] Sanzani S, De-Girolamo A, Schena L, et al. Control of Penicillium expansum and patulin accumulation on apples by quercetin and umbelliferone [J]. Eur Food Res Tec, 2009, 228: 381–389.
- [12] 张雅丽, 李建科, 刘柳. 没食子酸的体外抑菌作用研究[J]. 食品工业科技, 2013, 11(34): 81-84.

 Zhang YL, Li JK, Liu L. Antimicrobial activities of gallic acid *in vitro* [J]. Sci Technol Food Ind, 2013, 11(34): 81-84.
- [13] Xing FG, Hua HJ, Selvaraj JN, et al. Growth inhibition and morphological alterations of Fusarium verticillioides by cinnamon oil and cinnamaldehyde [J]. Food Control, 2014, 46: 8.
- [14] Hua HJ, Xing FG, Selvaraj JN, et al. Inhibitory effect of essential oils on aspergillus ochraceus growth and ochratoxin a production [J]. Plos One, 2014, 9: 10.

- [15] Sivakumar D, Bautista-Banos S. A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage [J]. Crop Protect, 2014, 64: 27–37.
- [16] Prakash B, Media A, Mishra PK, et al. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities-potentials and challenges [J]. Food Control, 2015, 47: 381–391.

(责任编辑: 卢忆)

作者简介



王 媛,博士研究生,主要研究方向 为展青霉素及其产生菌的控制技术。 E-mail: wyfight-2015@outlook.com



岳田利,博士,教授,主要研究方向为 食品生物技术及食品安全控制技术研究。 E-mail: yuetl@nwafu.edu.cn