

# 柠檬醛和辛醛混合物对指状青霉的抑制作用

陶能国, 段小芳, 凡凤, 黄师荣

(湘潭大学化工学院生物与食品工程系, 湖南湘潭 411105)

**摘要:** 本研究采用琼脂稀释培养法测定柠檬醛、辛醛以及柠檬醛+辛醛混合物 (V/V, 4:1) 对指状青霉菌丝体生长的影响, 并对柠檬醛+辛醛混合物抑菌机制进行初步探讨。结果表明, 柠檬醛+辛醛混合物 (V/V, 4:1) 能明显抑制指状青霉菌丝体生长, 最小抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 和最小杀菌浓度 (minimal fungicidal concentration, MFC) 均为 2.50  $\mu\text{L/mL}$ , 而柠檬醛的 MIC 和 MFC 分别为 2.50  $\mu\text{L/mL}$  和 5.00  $\mu\text{L/mL}$ , 辛醛的 MIC 和 MFC 分别为 0.63  $\mu\text{L/mL}$  和 2.50  $\mu\text{L/mL}$ 。扫描电镜结果显示, 经 MIC (MFC) 的柠檬醛+辛醛混合物处理后, 指状青霉菌丝体表面发生严重塌陷和多重褶皱, 菌丝结构发生不规则扭曲, 表明细胞完整性遭到严重破坏。此外, 指状青霉菌丝体胞外 pH、胞外电导率以及 260 nm 处的吸光度值均随柠檬醛+辛醛混合物 (V/V, 4:1) 浓度增加显著增加。本研究结果表明, 柠檬醛+辛醛混合物 (V/V, 4:1) 能破坏指状青霉细胞结构的完整性, 增加细胞膜通透性, 导致细胞内物质泄漏, 从而导致菌丝体死亡。

**关键词:** 柠檬醛; 辛醛; 指状青霉; 抑制机理

文章编号: 1673-9078(2015)6-73-77

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.6.012

## Inhibitory Effects of Citral and Octanal Mixture on *Penicillium digitatum*

TAO Neng-guo, DUAN Xiao-fang, FAN Feng, HUANG Shi-rong

(Department of Biotechnology and Food Engineering, College of Chemical Engineering, Xiangtan University, Xiangtan 411105, China)

**Abstract:** The effects of citral, octanal, and citral/octanal mixture (4:1, V/V) on the mycelial growth of *Penicillium digitatum* were investigated by using the agar dilution method. In addition, preliminary investigation was performed on the corresponding inhibitory mechanism of citral/octanal mixture against *P. digitatum*. Results showed that the citral/octanal mixture significantly inhibited mycelial growth of *P. digitatum*, with a minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal fungicidal concentration (MFC) of 2.50  $\mu\text{L/mL}$  for both. In contrast, the MIC and MFC of citral were 2.50 and 5.00  $\mu\text{L/mL}$ , respectively, and those of octanal were 0.63 and 2.50  $\mu\text{L/mL}$ , respectively. Scanning electron microscopy (SEM) showed that citral/octanal mixture treatment resulted in severe collapse and multiple folds on the hypha surface, causing irregular distortions in the structure and destroying cell integrity. Moreover, extracellular pH, extracellular conductivity, and absorbance at 260 nm significantly increased after treatment with citral/octanal (4:1, V/V). These results indicated that the citral/octanal mixture could destroy cellular integrity and increase the cell membrane permeability of *P. digitatum*, thereby causing leakage of cellular components, leading to the death of *P. digitatum*.

**Key words:** citral, inhibitory mechanism, octanal, *Penicillium digitatum*

柑橘果实因水分含量高、pH 较低以及营养价值较高等特点, 极易被真菌侵染发病<sup>[1]</sup>。由指状青霉 (*Penicillium digitatum*) 引起的绿霉病每年都给柑橘产业带来巨大的经济损失。目前, 人们多采用传统的化学杀菌剂控制绿霉病害, 给人类健康及环境带来潜在威胁。近年来, 植物精油及其萜类组分因具有高效、安全无毒、不易诱导致病菌产生抗性等优点不断地应用于果蔬采后病害生物控制实践, 具有较大的应用潜

收稿日期: 2014-08-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31271964); 湖南省教育厅青年项目 (12B126)

作者简介: 陶能国 (1979-), 男, 博士, 教授, 研究方向为食品贮藏与保鲜

力<sup>[2]</sup>。

柠檬醛是一种天然的类异戊二烯化合物, 是开链单萜中最重要的代表之一, 具有柠檬的香味<sup>[3]</sup>。辛醛, 又名羊脂醛, 其和柠檬醛一样, 广泛存在于茶树、柑橘等植物精油中<sup>[4]</sup>。贾雷等<sup>[5]</sup>研究桉柑果皮精油内潜在的 6 种抑菌成分 (辛醛、柠檬醛、癸醛、壬醛、芳樟醇、 $\alpha$ -松油醇) 对意大利青霉和指状青霉菌丝体的影响, 结果表明: 辛醛抑菌效果最好, 其次为柠檬醛。并且随着果实的发育, 桉柑精油中的抑菌成分的相对含量发生变化, 但精油的抑菌效果总体稳定, 说明柑橘精油对青霉菌丝体的抑菌效果取决于抑菌成分的复合作用。

多种植物精油或精油组分的协同能增强其抑制效果<sup>[6]</sup>。Braga 等<sup>[7]</sup>研究发现, 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  丁香酚和 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  百里酚处理白色念珠菌 1 h 后细胞破损率分别为 8.80% 和 14.00%, 而 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  丁香酚+125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  百里酚复合处理能产生明显的协同增强作用, 1 h 后细胞破损率为 31.40%, 且处理时间越长混合组分优势越明显, 处理 4 h 时白色念珠菌细胞破损率达 100%, 显著高于单一组分的 30% 和 60%。Pérez-Alfonso 等<sup>[8]</sup>测定了 250  $\mu\text{L}/\text{mL}$  香芹酚和 250  $\mu\text{L}/\text{mL}$  百里酚单独及 1:1 (V/V) 混合处理指状青霉 48 h 后测定 600 nm 吸光值, 结果显示香芹酚和百里酚吸光度分别为 0.09 和 0.02, 而混合物吸光度值却远远小于 0.02, 说明混合物的抑菌效果优于单独组分。

本研究拟探讨柠檬醛+辛醛混合物对指状青霉菌丝体抑菌效果及初步机理, 为防治柑橘采后绿霉病提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

柠檬醛(95%)、辛醛(99%)购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; 磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、乙醇, 均为分析纯(AR)购自天津市恒兴化学试剂制造有限公司。

指状青霉(*P. digitatum*)分离于腐烂的柑橘果实表面, 现保存于湘潭大学生物与食品工程专业实验室。

### 1.2 仪器与设备

SPX-250B-D 生化培养箱, 上海博迅实业有限公司; UV2450 紫外分光光度计, 日本 SHIMADZU 公司; TDL5A 大容量冷冻离心机, 长沙英泰仪器有限公司; FA1004N 分析天平, 上海精密科学仪器厂; BL320H 电子天平, 日本 SHIMADZU 公司; PHS-W 系列微型 pH/mV 计, 上海般特仪器有限公司; DDS-W 系列微型电导率仪, 上海般特仪器有限公司; CoolSafe 110-4L 真空冷冻干燥机, 丹麦 LaboGene 公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 柠檬醛、辛醛及柠檬醛+辛醛混合物对指状青霉菌丝体的作用

采用琼脂稀释培养法<sup>[9]</sup>研究柠檬醛、辛醛及柠檬醛+辛醛混合物(4:1, V/V, 此体积比例为两者最小杀菌浓度之比)对指状青霉菌丝体生长的影响。柠檬醛、辛醛及柠檬醛+辛醛混合物的浓度设定采用倍半稀释

法, 取 19 mL 灭好菌的马铃薯葡萄糖固体培养基(PDA)冷却至 60  $^{\circ}\text{C}$  左右, 分别加至柠檬醛、辛醛、及其混合物, 使终浓度分别为 0.00、0.16、0.32、0.63、1.25、2.50、5.00  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , 并用占总体积 2.5% (V/V) 的吐温 80 作为醛类物质的溶解剂, 无菌水做补充最终每组总体积为 20 mL。从培养 7 d, 长势均匀的培养基上用打孔器打下菌饼 ( $d=6.0$  mm), 每个平板接种 3 个菌饼, 于  $25\pm 2$   $^{\circ}\text{C}$  的恒温培养箱培养 4 d。以生长 2 d 时完全没有菌丝生长的最低浓度作为最小抑菌浓度(MIC), 以生长 4 d 时肉眼看不到菌丝生长的最低浓度作为最小杀菌浓度(MFC)<sup>[9]</sup>, 采用十字交叉法每天测量菌丝体生长菌圈直径。每一浓度 3 次重复, 结果取平均值, 计算抑菌率。

$$\text{抑菌率} = (\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}) / (\text{对照菌落直径} - 6) \times 100\%$$

#### 1.3.2 柠檬醛+辛醛混合物(4:1, V/V)对指状青霉表面形态的影响

用扫描电镜观察混合物对指状青霉表面形态的影响。从培养 7 d 长势均匀的指状青霉平板上打下菌饼 ( $d=6.0$  mm), 接种于含有柠檬醛+辛醛混合物(浓度为: 0, MIC (MFC)) 的 PDA 中间。25 $\pm$ 2  $^{\circ}\text{C}$  下培养 4 d 割下菌饼, 将其固定在 2.5% 的戊二醛磷酸盐缓冲液(pH 6.8)中 24 h, 水洗 3 次, 每次 20 min。水洗后将样品在乙醇系列梯度(30%、50%、70%、90%)中脱水, 每次 20 min, 最后用纯乙醇脱水 45 min。然后真空冷冻干燥, 喷金, 在扫描电镜下观察菌丝表面形态。

#### 1.3.3 柠檬醛+辛醛混合物(4:1, V/V)对指状青霉胞外电导率的影响

采用微型电导仪测定柠檬醛+辛醛混合物对指状青霉胞外电导率的影响。将指状青霉接种于马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB)中, 25 $\pm$ 2  $^{\circ}\text{C}$ , 160 r/min 震荡培养 48 h 后水洗, 4000 r/min 离心 15 min, 将沉淀下来的菌丝体在磷酸缓冲液(PBS, pH 7.0)中混和均匀。加入 1 $\times$ MIC (MFC) 的柠檬醛和辛醛的混合物处理 0、30、60、120 min 后, 测定其胞外电导率, 每一浓度 3 次重复, 用磷酸缓冲液(pH 7.0)作对照。

#### 1.3.4 柠檬醛+辛醛混合物(4:1, V/V)对指状青霉菌丝体细胞成分释放的影响

参照 Paul 等<sup>[10]</sup>的方法, 培养及处理方法如 1.3.3, 加入浓度为 1 $\times$ MIC (MFC) 的柠檬醛+辛醛混合物, 处理 0、30、60、120 min 取样, 12000 r/min 离心 2 min 收集上清液, 在 260 nm 处测量吸光度值, 每一浓度 3 次重复, 对照组用磷酸缓冲液(pH 7.0)进行校正。

#### 1.3.5 柠檬醛+辛醛混合物(4:1, V/V)对指状青霉胞外 pH 的影响

采用微型 pH/mV 计测定柠檬醛、辛醛混合物对指状青霉胞外 pH 的影响。培养及处理方法如 1.3.3, 测定胞外 pH, 每一浓度 3 次重复, 用磷酸缓冲液 (pH7.0) 作对照。

### 1.3.6 数据分析

每一组有 3 次重复, 采用常规的分析方法标注标准偏差, 数据分析采用 SPSS16.0 统计分析软件,

表 1 柠檬醛和辛醛的混合物对指状青霉菌丝体生长的影响

Table 1 Effects of the citral/octanal mixture on *P. digitatum* mycelium

浓度 (L/mL)	抑菌率/%					
	2 d			4 d		
	柠檬醛	辛醛	柠檬醛+辛醛(4:1)	柠檬醛	辛醛	柠檬醛+辛醛(4:1)
0	0.00±0.58 <sup>f</sup>	0.00±0.58 <sup>d</sup>	0.00±0.58 <sup>f</sup>	0.00±0.58 <sup>e</sup>	0.00±0.58 <sup>e</sup>	0.00±0.58 <sup>f</sup>
0.16	24.42±1.53 <sup>e</sup>	45.23±0.43 <sup>c</sup>	21.61±0.43 <sup>e</sup>	17.80±0.38 <sup>f</sup>	14.80±0.14 <sup>d</sup>	33.87±0.25 <sup>e</sup>
0.32	29.15±0.58 <sup>d</sup>	73.66±0.75 <sup>b</sup>	37.49±0.76 <sup>d</sup>	22.91±1.53 <sup>c</sup>	50.69±0.72 <sup>c</sup>	41.13±0.57 <sup>d</sup>
0.63	32.31±0.76 <sup>c</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>	61.35±0.28 <sup>c</sup>	43.27±1.53 <sup>d</sup>	65.48±0.25 <sup>b</sup>	48.39±0.57 <sup>c</sup>
1.25	46.48±0.58 <sup>b</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>	89.78±0.00 <sup>b</sup>	51.63±1.00 <sup>c</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>	83.86±0.56 <sup>b</sup>
2.50	100.00±0.00 <sup>a</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>	64.00±0.50 <sup>b</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>
5.00	100.00±0.00 <sup>a</sup>					

注: 同一列不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

柠檬醛、辛醛及柠檬醛+辛醛混合物 (4:1, V/V) 对指状青霉的菌丝体有不同程度的抑制作用 (表 1), 其中混合物的抑菌能力最强, 辛醛次之, 柠檬醛效果较差。辛醛 MIC 和 MFC 分别为 0.63  $\mu\text{L/mL}$  和 1.25  $\mu\text{L/mL}$ , 柠檬醛 MIC 和 MFC 分别为 2.50  $\mu\text{L/mL}$  和 5.00  $\mu\text{L/mL}$ 。根据柠檬醛和辛醛的 MFC, 确定柠檬醛 + 辛醛混合物的比例为 4:1 (V/V)。由表 1 可得, 柠檬醛+辛醛的 MIC 和 MFC 均为 2.50  $\mu\text{L/mL}$ , 其中辛醛的有效浓度为 0.50  $\mu\text{L/mL}$ , 柠檬醛的有效浓度为 2.00  $\mu\text{L/mL}$ , 均小于各自单独作用时的 MIC 和 MFC。

上述结果表明柠檬醛+辛醛混合物 (4:1, V/V) 能发生显著的协同作用。Pérez-Alfonso 等<sup>[8]</sup>在采用香芹酚、百里酚及其二者的混合物 (1:1, V/V) 进行抑菌实验时也得到了类似的结果。这种协同很可能是由于柠檬醛和辛醛具有不同的分子性质, 如分子量, 亲水/亲油平衡性, 极性, 氢键受体能力, 氢键供体能力<sup>[7]</sup>。鉴于微生物易对单组份抑菌物质产生抗性, 而多组分的芳香类物质不仅能协同作用于微生物, 且其作用靶点和作用机理存在差别, 因而复合组分的研究和应用显得尤为重要<sup>[11]</sup>。

## 2.2 扫描电镜观察指状青霉表面形态的变化

由图 1 可以看出, 对照 (图 1 a, b) 菌丝表面形态规则, 粗细均匀, 结构呈丰满完整的圆柱形。而经浓度为 MFC (2.50  $\mu\text{L/mL}$ ) 的混合物处理的指状青霉菌

one-way ANOVA 来分析显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

## 2 结果与讨论

### 2.1 柠檬醛、辛醛及柠檬醛+辛醛 (4:1, V/V)

对指状青霉菌丝体的作用

丝体表面发生严重塌陷, 并出现多重褶皱 (图 2c), 结构也发生不规则扭曲, 出现凹凸干瘪 (图 2d)。可能由于经过柠檬醛+辛醛混合物处理之后, 细胞内物质泄露, 指状青霉的菌丝体的完整性遭到破坏。

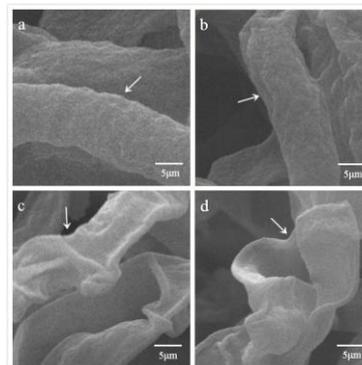


图 1 柠檬醛和辛醛的混合物对指状青霉菌丝体形态的影响

Fig.1 Effects of the citral/octanal mixture on *P. digitatum* morphology

注: a, b: 对照; c, d: MFC 处理。

### 2.3 柠檬醛+辛醛混合物对指状青霉细胞膜通

透性的影响

细胞膜通透性异常增加是细胞损伤的早期表现, 细胞膜在维持细胞生命活动所需内含物 (如糖类、蛋白质、无机盐等) 含量上发挥重要作用, 细胞膜损伤能导致细胞内含物的泄露<sup>[2]</sup>。对混合物作用的指状青

霉菌丝体外电导率的测定发现(图2),随着处理时间的增加对照组与处理组电导率逐渐增大,且加入1×MIC(MFC)混合物的处理组电导率比对照组高,以30 min时最为明显,相差(65.20±3.00) μs/cm。说明柠檬醛+辛醛混合物能导致指状青霉菌细胞膜通透性增加,从而增大指状青霉胞外电导率。

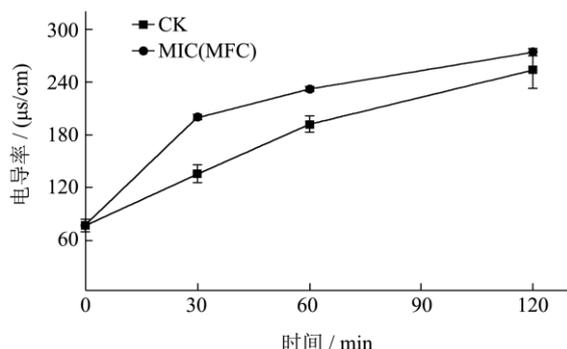


图2 柠檬醛和辛醛的混合物对指状青霉胞外电导率的影响  
Fig.2 Effect of the citral/octanal mixture on *P. digitatum* extracellular conductivity

## 2.4 柠檬醛+辛醛(4:1, V/V)对指状青霉菌丝体细胞成分释放的影响

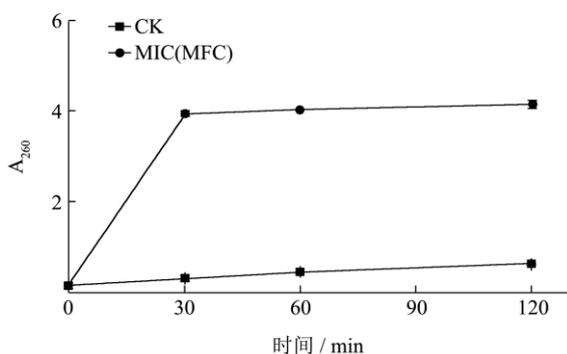


图3 柠檬醛和辛醛的混合物对指状青霉260nm处细胞成分的释放  
Fig.3 Effect of the citral/octanal mixture on *P. digitatum* absorbance at 260 nm

用MFC的柠檬醛+辛醛混合物处理的指状青霉,测定胞外液在260 nm处的吸光度值发现(图3),处理组的吸光度值在30 min内显著增加,且明显高于对照组。30 min时处理组的A<sub>260nm</sub>为(3.94±0.07),对照组的仅为(0.30±0.06),30~120 min两者的A<sub>260nm</sub>基本保持不变。通常情况下,A<sub>260nm</sub>的显著增加暗示着细胞内核酸和蛋白质等物质的泄漏,给细胞膜及细胞质带来不可逆转的损害<sup>[10]</sup>。

## 2.5 柠檬醛+辛醛混合物对指状青霉胞外pH

的影响

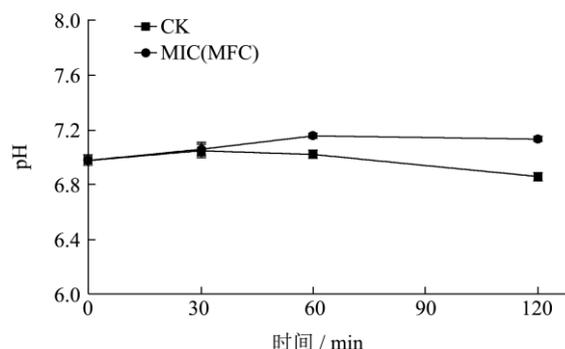


图4 柠檬醛和辛醛的混合物对指状青霉胞外pH的影响  
Fig.4 Effect of the citral/octanal mixture on *P. digitatum* extracellular pH

对指状青霉胞外pH测定可知(图4),当处理时间≤30min时,对照组(CK)和1×MIC(MFC)的柠檬醛+辛醛混合物处理后的胞外pH之间无显著差异,分别为(7.04±0.05)和(7.06±0.05)(P<0.05)。处理时间>30 min时,柠檬醛+辛醛混合物处理的指状青霉的胞外pH值增大,并在60 min时达到最大值(7.16±0.02),随后保持相对平稳趋势。而对照组的指状青霉胞外pH随着处理时间的增加呈逐渐降低趋势,并在120 min时达到最低值(6.86±0.03)。

pH是控制许多细胞过程的关键因素,如DNA转录、蛋白质的合成以及酶的活性<sup>[12]</sup>。柠檬醛+辛醛混合物的处理使得指状青霉的胞外pH增加,这意味着胞内质子的积累,随着质子的积累胞内pH永久失衡,导致细胞酸化、蛋白质变性以及能量损失<sup>[13]</sup>,因而影响细胞的正常生长。

## 3 结论

实验结果表明较小浓度的柠檬醛、辛醛混合(4:1, V/V)就能够有效抑制指状青霉菌丝体的生长,其混合物的MIC、MFC均为2.50 μL/mL。MIC(MFC)的柠檬醛、辛醛混合物通过改变细胞膜的通透性使得细胞膜内物质大量泄漏,胞外pH增加,破坏细胞的生存环境,从而加速指状青霉死亡。

## 参考文献

[1] Talibi I, Boubaker H, Boudyach E H, et al. Alternative methods for the control of postharvest citrus diseases [J]. Journal of Applied Microbiology, 2014, 117(1): 1-17  
[2] 吴建挺,张悦丽,张博,等.11种植物精油对6种植物病原真菌的抑菌活性研究[J].植物科学学报,2013,31(2):198-202  
WU Jian-ting, ZHANG Yue-li, ZHANG Bo, et al. Antifungal

- activity of eleven plant essential oils against six plant pathogenic fungi [J]. *Plant Science Journal*, 2013, 31(2): 198-202
- [3] Wuryatmo E, Able A J, Ford C M, et al. Effect of volatile citral on the development of blue mould, green mould and sour rot on navel orange [J]. *Australasian Plant Pathology*, 2014, 43: 403-411
- [4] Caccioni D R L, Guizzardi M, Biondi D M, et al. Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1998, 43(1): 73-79
- [5] 贾雷,何湘丽,陶能国,等.不同发育期桉柑精油对意大利青霉和指状青霉的抑制作用[J].*食品工业科技*, 2013,34(7):68-72  
JIA Lei, HE Xiang-li, TAO Neng-guo, et al. The inhibitory effects of Ponkan essential oils at different ripening stage on *P. italicum* and *P. digitatum* [J]. *Food Science Technology*, 2013, 34(7): 68-72
- [6] Sukorini H, Sangchote S, Khewkhom N. Control of postharvest green mold of citrus fruit with yeasts, medicinal plants, and their combination [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2013, 79: 24-31
- [7] Braga P C, Sasso M D, Culici M, et al. Eugenol and thymol, alone or in combination, induce morphological alterations in the envelope of *Candida albicans* [J]. *Fitoterapia*, 2007, 78(6): 396-400
- [8] Pérez-Alfonso C O, Martínez-Romero D, Zapata P J, et al. The effects of essential oils carvacrol and thymol on growth of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* involved in lemon decay [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2012, 158(2): 101-106
- [9] Sharma N, Tripathi A. Effect of citrus snensis (L.)Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*(L.)Van Tieghem [J]. *Microbiological Research*, 2008, 163(3): 337-344
- [10] Paul S, Dubey R C, Maheswari D K, et al. Trachyspermum ammi (L.) fruit essential oil influencing on membrane permeability and surface characteristics in inhibiting food-borne pathogens [J]. *Food Control*, 2011, 22(5): 725-731
- [11] 杨念婉,李艾莲.植物精油应用于害虫防治研究进展[J].*植物保护*,2007,33(6):16-21  
YANG Nian-wan, LI Ai-lian. Advances in the research of plant essential oils for pest control [J]. *Plant Protection*, 2007, 33(6): 16-21
- [12] Turgis M, Han J, Caillet S, et al. Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhi* [J]. *Food Control*, 2009, 20(12): 1073-1079
- [13] Oonmetta-aree J, Suzuki T, Gasaluck P, et al. Antimicrobial properties and action of galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus* [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2006, 39(10): 1214-1220