

# 桂枝主要抑菌活性成分对柑橘青霉病菌的作用机制研究

陈玉环, 万春鹏, 彭旋, 陈金印

(江西省果蔬保鲜与无损检测重点实验室, 江西农业大学农学院, 江西南昌 330045)

**摘要:** 以意大利青霉菌(*Penicillium italicum*)为供试菌, 研究桂枝主要抑菌活性成分肉桂醛、肉桂酸的抑菌机制。通过测定肉桂醛、肉桂酸对供试菌的孢子萌发、菌丝生长形态、细胞膜通透性、可溶性糖和蛋白质含量以及代谢关键酶活性的影响, 以阐明二者的作用机理。研究发现, 肉桂醛溶液对供试菌的最小抑菌浓度(MIC)、最小杀菌浓度(MFC)分别为 0.025 mg/mL 和 0.1 mg/mL, 肉桂酸溶液分别为 0.1 mg/mL 和 0.4 mg/mL; 与对照组相比, 经处理的菌体, 其孢子萌发率降低, 菌丝扭曲膨大或断裂, 细胞膜渗透率增强, 菌体内可溶性糖及蛋白质含量减少, 琥珀酸脱氢酶(Succinate dehydrogenase, SDH)和苹果酸脱氢酶(Malate dehydrogenase, MDH)活性降低。试验结果表明, 肉桂醛和肉桂酸能有效抑制意大利青霉菌的孢子萌发, 阻碍菌体生长, 破坏细胞膜致使通透性增加, 内含物外渗, 且能有效破坏三羧酸循环(Tricarboxylic acid cycle, TCA)过程, 菌体能量代谢途径受阻, 从而抑制其正常的生长发育。

**关键词:** 意大利青霉菌; 肉桂醛; 肉桂酸; 抑菌机制

文章编号: 1673-9078(2016)10-45-51

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.10.008

## Study on the Antifungal Mechanisms of the Main Active Ingredients of

### *Ramulus cinnamomi* against *Penicillium italicum*

CHEN Yu-huan, WAN Chun-peng, PENG Xuan, CHEN Jin-yin

(Jiangxi Key Laboratory for Postharvest Technology and Non-destructive Testing of Fruits & Vegetables, College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Jiangxi Nanchang 330045, China)

**Abstract:** *Penicillium italicum* was used as the test fungal species in this study to investigate the antifungal mechanism of the main active ingredients of *Ramulus cinnamomi*, namely cinnamaldehyde and cinnamic acid. The mechanisms of the action of cinnamaldehyde and cinnamic acid were identified by evaluating their effects on spore germination, cell membrane permeability, mycelial morphology, soluble sugar content, and the activities of key metabolic enzymes. Results showed that the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum fungicidal concentration (MFC) of cinnamaldehyde were 0.025 mg/mL and 0.1 mg/mL, respectively, and the MIC and MFC of cinnamic acid were 0.1 mg/mL and 0.4 mg/mL, respectively. Compared to the control group, the treated fungi had a low spore germination rate, distorted, swollen, and broken mycelia, elevated cell membrane permeability, reduced soluble sugar and protein content, and reduced activities of succinate dehydrogenase (SDH) and malate dehydrogenase (MDH). The experimental results indicated that cinnamaldehyde and cinnamic acid could inhibit spore germination and mycelial growth in *Penicillium italicum*, damage the cell membrane to increase permeability, facilitate leakage of intracellular contents, interrupt the tricarboxylic acid cycle (TCA) process, and block the energy-generating metabolic pathways, thus inhibiting the growth and development of mycelia.

**Key words:** *Penicillium italicum*; cinnamaldehyde; cinnamic acid; antifungal mechanisms

收稿日期: 2015-11-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(31460533); 江西省教育厅科技落地计划项目(111); 江西省教育厅科技项目(GJJ-14287); 江西省博士后科研择优资助项目(2013KY31); 留学人员科技活动项目(人社厅函[2013]277号); 中国博士后科学基金第54批面上项目(2013M541870)资助

作者简介: 陈玉环(1990-), 女, 在读硕士生, 研究方向: 果蔬采后生理与贮藏技术

通讯作者: 陈金印(1962-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 果蔬采后生理与

贮藏技术

柑橘采后霉变是贮藏的最大问题之一, 贮藏过程中, 柑橘青霉病十分常见, 传播速度比柑橘绿霉病快, 常导致整箱水果腐烂变质, 柑橘青霉菌在低温条件下也可生产, 病害发生后便很难控制, 造成果实严重的腐烂。此外, 其它生产领域每年由微生物引起的经济损失数额也十分巨大。随着人们对食品安全及自身健康的重视, 传统的一些化学杀菌剂越来越不被消费者

接受,目前,国内外在寻找并开发药性强、残留少且无毒的抗菌物质并将其用于杀菌及食品防腐。我国中草药资源丰富,价格便宜且耐抗性、毒副作用小<sup>[1]</sup>,国内外许多学者通过对大量的中草药进行筛选研究发现,许多植物提取液具有良好的抑菌效果<sup>[2,3]</sup>,且其提取液在果蔬保鲜上也得到应用并且效果显著<sup>[4,5]</sup>。从天然产物中探索活性物质进而研发新型药物是另一条行之有效的途径,天然产物本身具有复杂的化学结构和生物活性多样性,研究发现,天然植物中的活性成分如挥发油、生物碱类、酚类和黄酮类等物质均具有良好的抑菌效果<sup>[6,7]</sup>,且该类活性物质具有较好的保鲜效果<sup>[8,9]</sup>。

桂枝(*Ramulus cinnamomi*),毛茛目(*Ranunculales*)樟科(*Cinnamomum*)常绿乔木植物肉桂(*Cinnamomum cassia* Presl.)的干燥嫩枝,具有很好的药理功效及临床作用。课题组前期研究发现桂枝提取液对多种植物病原菌有很好的抑菌效果<sup>[10]</sup>,并以柑橘意大利青霉和指状青霉为靶菌株,鉴定出其主要抑菌活性成分为肉桂醛和肉桂酸,且二者均具有广谱的抑菌活性<sup>[11,12]</sup>;研究还发现这两种活性成分在柑橘保鲜上有较好的防护效果,能有效减轻柑橘采后病害指数。本文基于以上研究,进一步对肉桂醛和肉桂酸抑制柑橘青霉病菌的药理活性进行研究,主要从对病原菌孢子萌发、菌丝生长形态、细胞膜渗透率、菌体内可溶性糖及蛋白质含量和代谢关键酶琥珀酸脱氢酶(SDH)及苹果酸脱氢酶(MDH)活性的影响这几个方面展开抑菌机制的探索,以期今后肉桂醛和肉桂酸在其他领域抑菌及保鲜等方面上的开发应用提供一定理论参考价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料

意大利青霉菌(*Penicillium italicum*) (江西农业大学农学院植物病理实验室提供);肉桂醛和肉桂酸(化学纯 98%,上海阿拉丁试剂有限公司);PDA培养基(马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,水 1 L);PDB培养液(即不加琼脂的PDA培养基);葡萄糖,琼脂粉,萘酚,乙酸乙酯,浓 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,草酸,醋酸铅,磷酸盐,乙醇,吐温-80 等试剂均为分析纯;蛋白质测定试剂盒(考马斯亮蓝法),琥珀酸脱氢酶(SDH)试剂盒,苹果酸脱氢酶(MDH)试剂盒(南京建成生物工程研究所)

### 1.2 主要仪器设备

移液器(上海赛默飞世尔仪器有限公司);血球计

数板(上海市求精生化试剂仪器有限公司);JY202 电子天平(上海浦春计量仪器有限公司);5804R 冷冻离心机(德国 Eppendorf);DDS-307A 电导率仪(上海精密科学仪器有限公司);IS-RDH1 卧式恒温振荡器(美国精骐有限公司);YXQ-LS-70A 立式压力蒸汽灭菌器(上海博迅实业有限公司);DK-S28 电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司);MIR-254 恒温培养箱(日本三洋公司);KQ-500B 超声波清洗机(昆山超声仪器有限公司);T6 新悦紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司);HS-1300U 洁净工作台(苏净集团苏州安泰有限公司);SpectraMax M2 Molecular Devices 多功能酶标仪(上海美谷分子仪器有限公司);PH50-2A43L-PL 生物显微镜(青岛起航光电技术有限公司)。

## 1.3 试验方法

### 1.3.1 菌悬液的制备

无菌环境中,用接种环将供试菌接到 PDA 培养基上,于 28 °C 恒温培养箱中培养 7 d 后,4 °C 保存备用。

将供试菌种用 PDB 培养液洗入锥形瓶中,将过滤的孢子悬浮液稀释并用血球计数板在显微镜下计数,使其终浓度约为 10<sup>8</sup> cfu/mL。

### 1.3.2 肉桂醛、肉桂酸对意大利青霉菌抑菌活性的测定

无菌条件下,采用二倍稀释法,将肉桂醛和肉桂酸制成终浓度为 0.00625~0.8 mg/mL 的含药培养基,倒入平板冷凝。用直径 8 mm 打孔器打取边缘菌块,用接种棒分别将其转接到各个不同浓度的含药 PDA 培养基中央,并使带菌丝的一面与培养基充分接触,每个处理平行 3 次,将其放于 28 °C 恒温培养箱中培养。2 d 后观察,以不长菌的培养皿的最低含药浓度为最小抑菌浓度(MIC),将无菌生长的培养皿继续培养 7 d 后观察,以不长菌的培养皿的最低含药浓度为最小杀菌浓度(MFC)。

### 1.3.3 肉桂醛、肉桂酸对意大利青霉菌孢子萌发率的影响

无菌条件下,将制好的孢子悬浮液与各不同浓度的肉桂醛溶液(对照为 1%的吐温-80)和肉桂酸溶液(对照为 95%的乙醇)用移液器按 9:1 比例滴入凹玻片凹槽中,使肉桂醛作用的终浓度为 0.2 mg/mL、0.1 mg/mL、0.05 mg/mL、0.025 mg/mL,肉桂酸作用的终浓度为 0.8 mg/mL、0.4 mg/mL、0.2 mg/mL、0.1 mg/mL,并将玻片放在 28 °C 恒温培养箱中培养,12 h 后进行镜检,观察各浓度处理的病原菌孢子的萌发情况,在显

显微镜下统计 100 个左右孢子的萌发数, 每个处理重复 3 次, 计算各浓度下孢子的萌发率和抑制率。

萌发率(%)=萌发个数/总孢子个数×100

抑制率(%)=( $\eta_0 - \eta_1$ )/ $\eta_0 \times 100$

式中:  $\eta_0$  为对照组萌发率,  $\eta_1$  为处理组萌发率。

### 1.3.4 肉桂醛、肉桂酸对意大利青霉菌菌丝形态的影响

无菌条件下, 将制好的孢子悬浮液与各不同浓度的肉桂醛溶液(对照为 1%的吐温-80)和肉桂酸溶液(对照为 95%的乙醇)用移液器按 9:1 比例滴入凹玻片凹槽中, 使肉桂醛作用的终浓度为 0.2 mg/mL 和 0.1 mg/mL, 肉桂酸作用的终浓度为 0.8 mg/mL 和 0.4 mg/mL, 并将玻片放在 28 °C 恒温培养箱中培养, 2 d 后在 10 倍显微镜下观察菌丝的生长情况, 每个处理平行 3 次。

### 1.3.5 肉桂醛、肉桂酸对意大利青霉菌细胞膜渗透性的影响

将 1 mL 菌悬液接种于 99 mL 的 PDB 培养液中, 摇床振荡培养若干天后(28 °C, 180 r/min), 分别加入不同浓度的肉桂醛和肉桂酸溶液(药液作用的终浓度参照 1.3.3, 下同), 对照组加入等量 1%的吐温-80 和 95%的乙醇, 立即从各组中取出 10 mL 进行离心(10000 r/min, 15 min), 取上清液测定电导率, 其余继续摇床培养, 每隔 1 h 后再取 10 mL 各培养液离心, 测定其上清液的电导率, 每个处理重复 3 次。

### 1.3.6 肉桂醛、肉桂酸对意大利青霉菌菌体可溶性糖含量的影响

采用蒽酮比色法测定。将意大利青霉菌孢子悬浮液接于 PDB 培养液中, 摇床中振荡培养 5 d 后(28 °C、180 r/min), 加入不同浓度的肉桂醛和肉桂酸溶液, 对照组加入等量 1%的吐温-80 和 95%的乙醇, 继续振荡培养 3 d 后过滤, 用无菌水冲洗菌丝体 3 遍并用滤纸吸干, 称取 0.5 g 的菌丝, 于冰浴的研钵中研磨至糊状, 用蒸馏水将其转入三角瓶中, 加水至 50 mL, 于沸水浴中计时 15 min 后取出, 待冷却至室温后定容至 250 mL, 再向其中加入 2.5 mL、10%的醋酸铅溶液, 摇匀, 以沉淀其中的蛋白质, 随后再加入 0.5 g 草酸结晶, 除去过量的醋酸铅, 摇匀后过滤, 各取 2 mL 滤液于试管中, 加入 0.5 mL 蒽酮和 5 mL 浓 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 振荡后于沸水浴中计时 5 min, 快速冷却后于 620 nm 波长的分光光度计下测定并记录其吸光值, 重复测定 3 次, 以葡萄糖原液作标准曲线( $y=0.0047x-0.002$ ,  $R^2=0.9974$ ), 按如下公式计算可溶性糖含量:

可溶性糖含量(%)=100×(A×V)/(V<sub>s</sub>×W×10<sup>6</sup>)

式中 V<sub>s</sub>: 测定时取样体积 (mL); W: 样品质量 (g); A:

查标准曲线所得的含糖量 (μg); V: 样品总体积 (mL)。

### 1.3.7 肉桂醛、肉桂酸对意大利青霉菌菌体蛋白质含量的影响

参照 1.3.6 方法培养并制得菌丝, 用无菌水及磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.5) 冲洗菌丝体 3 遍后用滤纸吸干, 称 0.5 g 的菌丝, 在冰浴的研钵中加磷酸缓冲液和石英砂将其研至糊状, 转移至 10 mL 离心管中并用磷酸缓冲液补足 10 mL, 于 4 °C、2500 r/min 冷冻离心 10 min, 取上清液并严格按照试剂盒说明书操作, 静置 10 min 后于波长 595 nm 测定并记录各管吸光值, 每个处理重复 3 次。蛋白标准品浓度为 0.563 g/L, 并按如下式计算蛋白质含量(mg/mL)。

待测样本蛋白含量 = ( $O_1 - O_0$ )/( $O_2 - O_0$ )×c

注: O<sub>1</sub> 为测定管 OD 值, O<sub>2</sub> 为标准管 OD 值, O<sub>0</sub> 为空白管 OD 值, c 为标准浓度。

### 1.3.8 肉桂醛、肉桂酸对意大利青霉菌琥珀酸脱氢酶 (SDH) 活性的影响

将意大利青霉菌孢子悬浮液接种于 PDB 培养液中, 于 28 °C、180 r/min 摇床中振荡培养 5 d 后, 加入不同浓度的肉桂醛和肉桂酸溶液, 对照组加入等量 1%的吐温-80 和 95%的乙醇, 继续振荡培养 3 d 后过滤, 用无菌水冲洗菌丝体 3 遍后用滤纸吸干, 称 0.5 g 的菌丝, 在冰浴的研钵中加磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.5) 和石英砂将其研至糊状, 转移至 10 mL 离心管中并用磷酸缓冲液补足 10 mL, 用超声波发生器破碎菌体细胞, 冷冻离心 10 min (4 °C, 2500 r/min), 取上清液并严格按照试剂盒说明书操作, 在 600 nm 波长下比色, 5 s 时记下吸光值 A<sub>1</sub>, 65 s 时再次记下吸光值 A<sub>2</sub>, 求出 2 次的吸光差值 ( $\Delta A=A_1-A_2$ ), 每个处理重复 3 次。以每分钟反应体系吸光度降低 0.01 为 1 个比活性单位, 并按下式计算。

SDH活力[U/(mg pro·min)]=( $\Delta A \div 0.01$ )/(t×n×c')

注: t 为反应时间, n 为取样量, c' 为样本蛋白浓度。

### 1.3.9 肉桂醛、肉桂酸对意大利青霉菌苹果酸脱氢酶 (MDH) 活性的影响

参考 1.3.8 培养并制备菌丝, 称取 0.5 g 菌丝并参照上述方法制得上清液, 取上清液, 严格按照试剂盒说明书操作, 在紫外分光光度计 340 nm 处比色, 20 s 时记下吸光值 A<sub>1</sub>, 1 min 20 s 时再次记下吸光值 A<sub>2</sub>, 求出 2 次的吸光差值 ( $\Delta A=A_1-A_2$ ), 每个处理重复 3 次。以反应体系每分钟催化 1 μmol 的底物转变成产物则为 1 个酶活力单位, 并按下式计算 MDH 活力[U/(mg pro·min)]。

MDH活力=(测定 $\Delta A$ -空白 $\Delta A$ )×V×k/(6.2×d×n×c')

注: V 为反应液总体积, k 为样本稀释倍数, d 为比色光径,

n 为取样量, c' 为样本蛋白浓度。

### 1.4 数据处理与分析

用 Excel 2003 软件进行数据统计处理, 并绘制图形; 用 DPS 9.50 软件绘制毒力测定的标准曲线, 求得毒力回归方程、相关系数 r、有效浓度及其置信区间; 采用 SPSS 17.0 进行差异显著性分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 肉桂醛、肉桂酸对意大利青霉菌的抑菌效果

肉桂醛和肉桂酸对意大利青霉菌有较好的抑菌效果。试验结果显示, 肉桂醛对意大利青霉菌的 MIC 和 MFC 分别为 0.025 mg/mL、0.1 mg/mL, 肉桂酸对意大利青霉菌的 MIC 和 MFC 分别为 0.1 mg/mL、0.4 mg/mL, 以上述浓度为肉桂醛和肉桂酸对意大利青霉

抑菌机理的进一步研究提供参考。

### 2.2 肉桂醛、肉桂酸对意大利青霉菌孢子萌发率的影响

由表 1 和表 2 可知, 肉桂醛和肉桂酸对意大利青霉菌的孢子萌发具有显著的抑制效果, 且随着药剂浓度的增加, 供试菌种的孢子萌发量减少, 抑制作用增强。0.2 mg/mL 的肉桂醛处理病原菌时, 其孢子萌发抑制率达 97.44%、0.8 mg/mL 的肉桂酸处理病原菌时, 孢子萌发抑制率可达 97.09%, 肉桂醛和肉桂酸处理浓度对数与病原菌孢子萌发抑制率的机率值之间呈线性关系, 其作用的毒力回归方程分别为  $y=8.04+1.73x$ ,  $r=0.98$  和  $y=7.08+1.93x$ ,  $r=0.99$ , 肉桂醛处理的  $EC_{50}$ 、 $EC_{95}$  分别为 0.0189 mg/mL 和 0.1257 mg/mL, 肉桂酸处理的  $EC_{50}$ 、 $EC_{95}$  分别为 0.0873 mg/mL 和 0.6239 mg/mL, 且经邓肯氏方差分析, 各药液的不同浓度处理之间及其与对照组之间的差异均显著。

表 1 肉桂醛对意大利青霉菌孢子萌发的抑制作用

Table 1 Inhibitory effect of cinnamaldehyde on spore germination in *Penicillium italicum*

肉桂醛浓度/(mg/mL)	萌发率/%	抑制率/%	毒力回归方程(y)	有效浓度/(mg/mL)	置信区间/(mg/mL)
0.2	2.17±0.37	97.44±0.02 <sup>Aa</sup>	$y=8.04+1.73x$	$EC_{50}:0.0189$	0.0125~0.0270
0.1	6.33±1.10	92.52±0.35 <sup>Bb</sup>			
0.05	18.33±0.81	78.35±0.47 <sup>Cc</sup>	$r=0.98$	$EC_{95}:0.1257$	0.1086~0.1539
0.025	33.33±0.69	60.63±0.39 <sup>Dd</sup>			
0 (1%吐温-80)	84.67±1.05	0.00±0.00 <sup>Ee</sup>			

表 2 肉桂酸对意大利青霉菌孢子萌发的抑制作用

Table 2 Inhibitory effect of cinnamic acid on spore germination in *Penicillium italicum*

肉桂酸浓度/(mg/mL)	萌发率/%	抑制率/%	毒力回归方程 (y)	有效浓度/(mg/mL)	置信区间/(mg/mL)
0.8	2.67±0.74	97.09±0.51 <sup>Aa</sup>	$y=7.08+1.93x$	$EC_{50}:0.0873$	0.0812-0.0924
0.4	8.50±1.02	90.73±0.93 <sup>Bb</sup>			
0.2	21.67±1.09	76.36±1.01 <sup>Cc</sup>	$r=0.99$	$EC_{95}:0.6239$	0.4986-0.6923
0.1	38.17±0.91	58.36±0.87 <sup>Dd</sup>			
0 (95%乙醇)	91.67±1.17	0.00±0.00 <sup>Ee</sup>			

注: 上述表中数据为平均数±标准差。不同大、小写字母表示经 Duncan 氏多重检验方法分别在  $p<0.01$  和  $p<0.05$ ; 水平差异极显著或显著 (下同)。

### 2.3 肉桂醛、肉桂酸对意大利青霉菌菌丝形态的影响

改变病原菌菌丝形态是抑菌及杀菌物质的作用途径之一, 其可使菌丝呈多种畸形态甚至断裂, 从而阻碍其正常的生长发育<sup>[10]</sup>。本试验用显微镜观察经肉桂醛和肉桂酸处理 2 天后的意大利青霉菌菌丝形态 (图 1), 两对照组的菌丝细长平滑, 表面平整 (如图

1 的 a1、b1), 经药液处理过的病原菌菌丝都呈现出不同的形态。肉桂醛浓度为 0.1 mg/mL 时, 菌丝膨大、缠绕并扭结成团 (图 1 中 a2); 处理浓度为 0.2 mg/mL 时, 菌丝表面皱缩、凸起, 芽管膨大, 菌丝甚至断裂, 从而使菌体内含物渗出 (图 1 中 a3)。当肉桂酸浓度为 0.4 mg/mL 时, 菌丝分枝增多, 扭曲、膨大且表面不平滑 (图 1 中 b2); 处理浓度为 0.8 mg/mL 时, 菌丝膨大出现裂痕, 菌体内含物外渗 (图 1 中 b3)。试验结果表明一定浓度的肉桂醛和肉桂酸溶液能有效干

扰意大利青霉菌的正常生长,从而达到抑菌的作用,且以高浓度处理的效果显著。

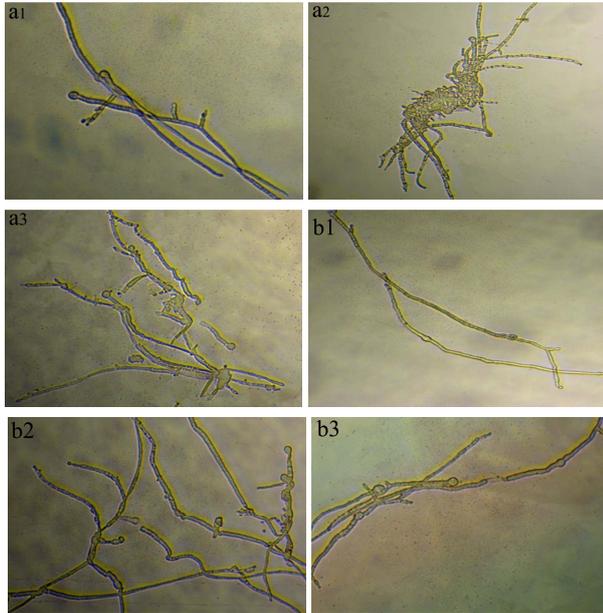


图1 肉桂醛、肉桂酸对意大利青霉菌菌丝形态的影响

Fig.1 Effect of cinnamaldehyde and cinnamic acid on the hyphal morphology of *Penicillium italicum*

注: a1、b1:两对照处理; a2、a3 分别为 0.1 mg/mL 和 0.2 mg/mL 肉桂醛处理; b2、b3 分别为 0.4 mg/mL 和 0.8 mg/mL 肉桂酸处理。

## 2.4 肉桂醛、肉桂酸对意大利青霉菌细胞膜渗透性的影响

病原菌的细胞膜具有保护、识别、物质交换、分泌等功能,抑菌或杀菌剂能破坏细胞膜,菌体的磷脂双层受损,保护屏障被打破甚至破坏了细胞膜的结构,细胞内的电解质渗漏到培养液中,致使培养液的电导率升高,因此,电导率值的变化可以反映菌体细胞膜通透性的变化<sup>[10]</sup>。

由图2可以看出,随着肉桂醛和肉桂酸处理液浓度的升高以及处理时间的延长,所测定的菌液电导率呈上升趋势,各处理组的涨幅都比对照组大,处理4h后各组电导率的变化渐趋平缓,说明肉桂醛和肉桂酸破坏了意大利青霉菌的细胞膜,使细胞膜的稳定性发生变化,致使通透性增强,菌体内的电解质渗出,从而测得培养液电导率升高。处理1h时,肉桂醛浓度为0.025和0.05 mg/mL时以及肉桂酸浓度为0.1和0.2 mg/mL时,处理组与溶剂对照的电导率值相差较大(图2a和b),在肉桂醛浓度为0.1 mg/mL及以上和肉桂酸浓度为0.4 mg/mL及以上时,菌液电导率值的上升更加显著,与溶剂对照组差异极显著( $p < 0.01$ );

处理后期,各组与对照组差异明显,说明肉桂醛和肉桂酸溶液对细胞膜的稳定性及细胞内环境造成一定的影响,从而抑制意大利青霉菌的生长。这与周梦娇等<sup>[10]</sup>研究中草药对青霉菌菌抑菌机制的结果相一致。

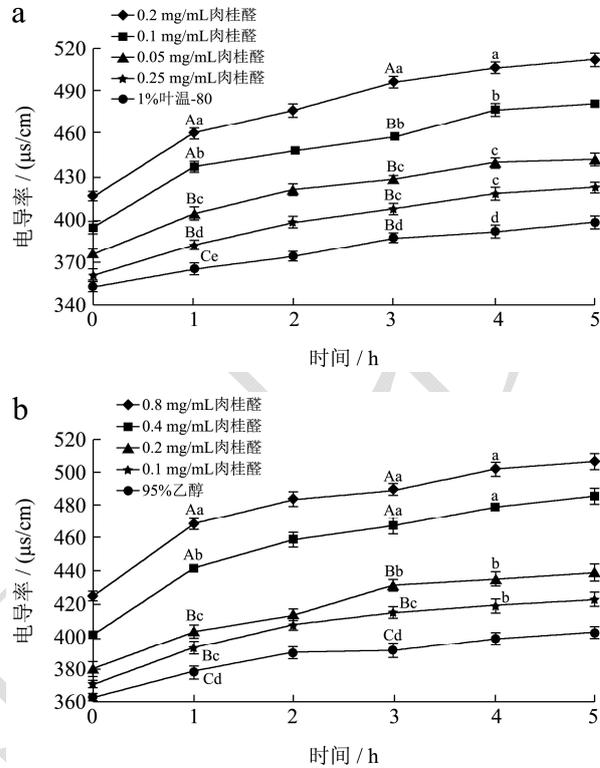


图2 肉桂醛、肉桂酸对意大利青霉菌细胞膜渗透性的影响

Fig.2 Effect of cinnamaldehyde and cinnamic acid on the cell membrane permeability of *Penicillium italicum*

## 2.5 肉桂醛、肉桂酸对意大利青霉菌菌体可溶性糖含量的影响

菌丝的繁殖生长需要培养液提供外源营养物质,当菌体细胞膜遭到破坏,营养物质的吸收会受影响,其自身细胞内的糖类物质含量也会发生变化。由图3a可知,在整个培养期间,意大利青霉菌菌体内的可溶性糖含量随肉桂醛和肉桂酸处理浓度的升高呈下降趋势。肉桂醛、肉桂酸对照菌体可溶性糖含量分别为1.37%和1.32%,MIC浓度(0.025和0.1 mg/mL)处理后含量分别为1.09%和1.11%,而经0.2 mg/mL肉桂醛和0.8 mg/mL肉桂酸处理后其含量只有0.70%和0.65%,各浓度处理均与对照组差异极显著( $p < 0.01$ ),这说明经一定浓度的肉桂醛和肉桂酸溶液处理能有效降低病原菌体内可溶性糖含量,且高浓度处理的糖含量更低,从而更有效地抑制菌体生长繁殖。该研究结果与前期桂枝提取液对柑橘病害菌体可溶性糖含量影响<sup>[13]</sup>的结果相符。

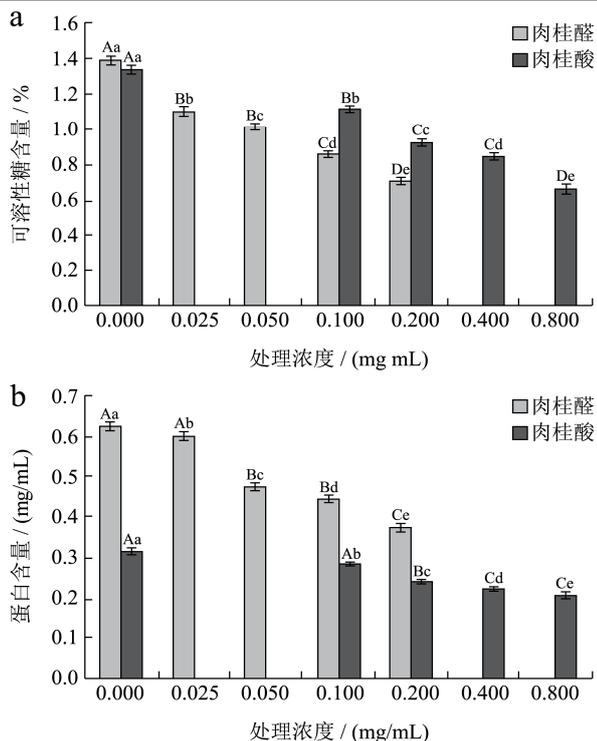


图3 肉桂醛、肉桂酸对意大利青霉菌可溶性糖和蛋白质含量的影响

Fig.3 Effect of cinnamaldehyde and cinnamic acid on the soluble sugar and protein content of *Penicillium italicum*

## 2.6 肉桂醛、肉桂酸对意大利青霉菌菌体蛋白质含量的影响

构成菌体生物膜的磷脂双分子层内嵌有大量的蛋白质分子,这些蛋白质决定着许多重要的代谢功能,如胞内外的信息传递、能量交换以及物质运输等。当细胞遭受损害时,菌体内的蛋白质含量也会受到影响<sup>[13]</sup>。从图 3b 可以看出,肉桂醛、肉桂酸对照菌体蛋白含量分别为 0.61 mg/mL 和 0.32 mg/mL,随二者处理浓度的升高,菌体蛋白含量不断下降,经 0.2 mg/mL 肉桂醛和 0.8 mg/mL 肉桂酸处理的菌体蛋白含量分别只有 0.36 mg/mL 和 0.21 mg/mL。对照组的菌体蛋白含量明显高于肉桂醛和肉桂酸处理组,且与各处理均达显著差异水平 ( $p < 0.05$ ),表明经肉桂醛和肉桂酸溶液处理能有效减少菌体内蛋白质的含量,扰乱菌体的生理代谢过程,从而达到抑菌效果。

## 2.7 肉桂醛、肉桂酸对意大利青霉菌琥珀酸脱氢酶 (SDH) 活性的影响

琥珀酸脱氢酶 (SDH) 是 TCA 循环的一个重要的酶,其与膜紧密结合,是连接氧化磷酸化与电子传

递的枢纽之一,可为能量代谢的呼吸链提供电子,其活性常作为 TCA 循环程度的一个指标,反映着细胞的能量代谢状况<sup>[14]</sup>。各药液对意大利青霉菌琥珀酸脱氢酶 (SDH) 活性的影响如图 4a 所示,随着肉桂醛和肉桂酸处理液浓度的增加,琥珀酸脱氢酶活性不断降低,各浓度处理与溶剂对照组均呈极显著性差异 ( $p < 0.01$ ),且高浓度的药液能维持菌体更低的 SDH 活性,说明肉桂醛和肉桂酸处理液对意大利青霉菌细胞具有损害作用,能有效抑制琥珀酸脱氢酶活性,引起细胞能量代谢受阻,一些需要能量的代谢活动无法正常运行,从而阻碍菌丝的正常生长。

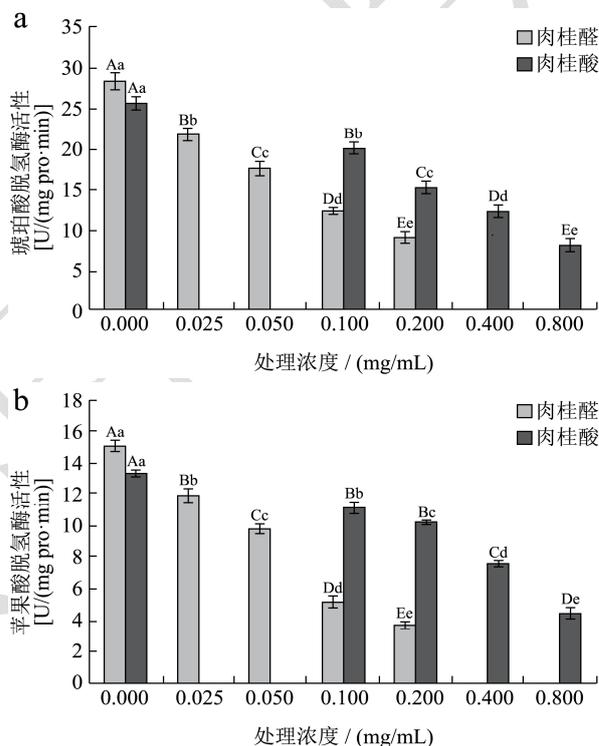


图4 肉桂醛、肉桂酸对意大利青霉菌琥珀酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶活性的影响

Fig.4 Effect of cinnamaldehyde and cinnamic acid on the SDH and MDH activities in *Penicillium italicum*

## 2.8 肉桂醛、肉桂酸对意大利青霉菌苹果酸脱氢酶 (MDH) 活性的影响

苹果酸脱氢酶是细胞生长代谢和繁殖所必须的另一个关键酶,能催化苹果酸与草酰乙酸间的可逆转换,影响整个三羧酸循环 (TCA) 的运转,对细胞代谢至关重要,广泛存在于线粒体中及菌体的细胞膜上,MDH 活性与细胞呼吸代谢紧密相关,能反映细胞代谢是否正常。由图 4b 可以看出,菌丝内苹果酸脱氢酶活性随肉桂醛和肉桂酸处理液浓度的增加呈下降趋势,不同浓度的肉桂醛和肉桂酸处理都与对照组差异

极显著 ( $p < 0.01$ ), 高浓度处理的菌体的 MDH 活性更低, 说明药液处理能显著降低意大利青霉菌的苹果酸脱氢酶活性, 从而使细胞能量代谢活动无法正常进行, 或使细胞死亡, 这进一步说明了肉桂醛和肉桂酸可能是通过抑制意大利青霉菌的 MDH 活性以达抑菌效果, 这与 Xie 等<sup>[14]</sup>在中草药对真菌细胞内的能量代谢关键酶活性影响的研究有相似的结论。

### 3 结论

本试验研究结果初步表明, 桂枝主要抑菌活性物质肉桂醛和肉桂酸对意大利青霉菌都表现了较强的抑菌效果, 二者对意大利青霉菌的孢子萌发及菌丝生长均有较强的抑制作用, 减少菌体内糖类及蛋白质的含量, 并能较好地抑制能量代谢相关酶如 SDH、MDH 的活性, 且随处理药液浓度的提高, 抑制效果增强, 从而有效阻碍菌体生长或致死。其抑菌机理可能主要是通过破坏菌体的细胞膜结构稳定性, 扰乱物质及能量代谢等活动来实现。关于菌体内可溶性糖和蛋白含量降低的原因到底是由于处理液作用后导致外泄还是抑制了其合成, 还有待进一步探究, 而关于对核酸等生物大分子物质的信息表达以及通过扫描电镜(SEM)结合荧光标记对抑菌活性成分在细胞内的定位、作用靶点等抑菌机理内容的研究亦还有待完成。肉桂醛、肉桂酸作为新型天然活性物质杀菌剂, 在新药研制及大田试验推广等方面将具有较好的开发价值, 同时也为今后二者在柑橘等果蔬保鲜领域的应用提供一定的参考。

### 参考文献

- [1] Sharma R R, Singh Dinesh, Singh Rajbir. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review [J]. *Biological Control*, 2009, 50(3): 205-221
- [2] 刘翔, 马林, 吕东元, 等. 33 种药用及食用香料植物的抑菌活性研究[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(8): 3580-3582  
LIU Xiang, MA Lin, LV Dong-yuan, et al. Study on antimicrobial activities of 33 herbal and edible spice plants [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2009, 37(8): 3580-3582
- [3] Curtis Hannah, Noll Ulrike, Störmann Judith, et al. Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and oomycetes [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2004, 65(2): 79-89
- [4] 陈楚英, 陈明, 付永琦, 等. 丁香提取液可食性复合涂膜对新余蜜橘常温保鲜效果的影响[J]. *现代食品科技*, 2014, 30(2): 117-123  
CHEN Chu-ying, CHEN Ming, FU Yong-qi, et al. Preservation of postharvest Xinyu tangerine coated with edible compounds from clove extracts under ambient temperature storage [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(2): 117-123
- [5] Zeng Rong, Zhang Ashan, Chen Jinyin, et al. Impact of carboxymethyl cellulose coating enriched with extract of *Impatiens balsamina* stems on preservation of 'newhall' navel orange [J]. *Scientia Horticulturae*, 2013, 160(2): 44-48
- [6] Runyoro D, Ngassapa O, Vagionas K, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of four *Ocimum* species growing in Tanzania [J]. *Food Chemistry*, 2010, 119(1): 311-316
- [7] Du Plooy Wilma, Regnier Thierry, Combrinck Sandra. Essential oil amended coatings as alternatives to synthetic fungicides in citrus postharvest management [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2009, 53(3): 117-122
- [8] Castillo S, Navarro D, Zapata P J, et al. Antifungal efficacy of aloe vera *in vitro* and its use as a preharvest treatment to maintain postharvest table grape quality [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2010, 57(3): 183-188
- [9] Nielsen Per V, Rios Rodrigo. Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, 60(2-3): 219-229
- [10] 周梦娇, 万春鹏, 陈金印. 11 种中草药提取物对柑橘意大利青霉抑菌活性及机理研究[J]. *食品与发酵工业*, 2014, 40(4): 37-41  
ZHOU Meng-jiao, WAN Chun-peng, CHEN Jin-yin. Antifungal activity and antifungal mechanism of Chinese herbs extracts against *Penicillium italicum* [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2014, 40(4): 37-41
- [11] 万春鹏, 周梦娇, 刘洋, 等. 桂枝抑制柑橘采后两种病原菌活性物质研究[J]. *江西农业大学学报*, 2014, 36(2): 319-325  
WAN Chun-peng, ZHOU Meng-jiao, LIU Yang, et al. Antifungal activity of *Ramulus cinnamomi* extracts against two key citrus postharvest pathogens [J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2014, 36(2): 319-325
- [12] 陈玉环, 陈楚英, 彭旋, 等. 桂枝主要抑菌活性成分对 15 种植物病原菌的室内毒力测定[J]. *中国南方果树*, 2015, 44(5): 48-50  
CHEN Yu-huan, CHEN Chu-ying, PENG Xuan, et al. Indoor

- virulence of the main antifungal active ingredients of ramulus cinnamomi to fifteen kinds of plant pathogens [J]. South China Fruits, 2015,44(5): 48-50
- [13] 周梦娇,万春鹏,陈金印.柑橘绿霉病中草药高效抑菌剂的筛选及抑菌机理研究[J].现代食品科技,2014,30(3):144-150  
ZHOU Meng-jiao, WAN Chun-peng, CHEN Jin-yin. Screening and antifungal mechanism of Chinese herb extracts against green mold of citrus [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(3): 144-150
- [14] Xie L L, Tang W, Li P P, et al. Antibacterial effects of the ethanol- extracts from three traditional Chinese medicines in *Aeromonas hydrophila* [J]. J. Biochem. Mol. Biol., 2014, 30(10): 1007-1016