

# 茴香醛对黄曲霉菌的抑制作用

谢一嘉, 李晓凤, 余以刚, 张自强, 林旖晗, 肖性龙\*

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 该文研究了茴香醛 (*p*-Anisaldehyde, AS) 对黄曲霉 (*Aspergillus flavus*, *A. flavus*) 的抑菌效果。通过 96 孔板二倍稀释法确定了 AS 对黄曲霉的最小抑菌质量浓度 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) 和最小杀菌质量浓度 (Minimum Fungicidal Concentration, MFC) 分别为 0.80 mg/mL 和 3.20 mg/mL。2 MIC AS 处理对黄曲霉的孢子萌发抑制率、菌丝生物量合成抑制率、径向生长抑制率和黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 合成抑制率皆为 100%。与对照组相比, 24 h 内 4 MIC 组黄曲霉胞内核酸 (A<sub>260</sub>) 和蛋白 (A<sub>280</sub>) 释放量增长显著, 胞外电导率和 pH 值均升高。通过荧光增白剂 (Calcofluor White, CW) 染色实验证明, AS 处理对黄曲霉细胞壁隔膜无显著性影响。此外, 2 MIC AS 能够有效抑制黄曲霉侵染开心果, 第 8 天时霉菌总数下降了 1.89 lg CFU/g。综上所述, AS 处理显著抑制黄曲霉菌的生长, 对开心果霉菌减控有显著效果, 有望开发为新型抑菌剂应用到食品工业中。

**关键词:** 茴香醛; 黄曲霉; 抑菌作用; 开心果

文章编号: 1673-9078(2024)01-128-136

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.1.0234

## Inhibitory Effect of *p*-Anisaldehyde Against *Aspergillus flavus* Growth

XIE Yijia, LI Xiaofeng, YU Yigang, ZHANG Ziqiang, LIN Yihan, XIAO Xinglong\*

(School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** The antifungal activity of *p*-anisaldehyde (AS) against *Aspergillus flavus* was determined using the two-fold dilution method in 96-well plates. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of AS against *A. flavus* were found to be 0.80 mg/mL and 3.20 mg/mL, respectively. Spore germination, mycelial biomass synthesis, radial growth, and aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) synthesis were all completely inhibited in *A. flavus* cultures treated with 2 MIC (1.60 mg/mL) AS. Compared with the control group, the 4 MIC AS group released considerably more intracellular nucleic acid (A<sub>260</sub>) and protein (A<sub>280</sub>) within 24 h, as well as exhibited increased extracellular conductivity and pH value. The results of calcofluor white (CW) staining showed that AS treatment had no substantial effect on the cell wall septum of *A. flavus*. Moreover, 2 MIC AS could effectively inhibit the growth of *A. flavus* on pistachios, and the total number of molds decreased by 1.89 lg CFU/g on the 8th day. In conclusion, AS treatment substantially inhibited the growth of *A. flavus* and reduced the mold on pistachios. Therefore, it is expected to be developed as a new fungistatic agent for the food industry.

**Key words:** *p*-anisaldehyde; *Aspergillus flavus*; antifungal activity; pistachios

引文格式:

谢一嘉, 李晓凤, 余以刚, 等. 茴香醛对黄曲霉菌的抑制作用[J]. 现代食品科技, 2024, 40(1): 128-136.

XIE Yijia, LI Xiaofeng, YU Yigang, et al. Inhibitory effect of *p*-anisaldehyde against *Aspergillus flavus* growth [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(1): 128-136.

收稿日期: 2023-02-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (3217160293); 广东省自然科学基金资助项目 (2021A1515011068)

作者简介: 谢一嘉 (1998-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品工程, E-mail: 1241261544@qq.com

通讯作者: 肖性龙 (1977-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 食品质量与安全, E-mail: fexxl@scut.edu.cn

黄曲霉菌 (*Aspergillus flavus*, *A. flavus*) 是一种常见的腐生真菌, 属真菌门、半知菌亚门, 常污染采摘前后的农作物、粮食制品、坚果及谷物中, 导致农作物减产、粮食污染, 造成经济损失和食品安全问题<sup>[1]</sup>。作为病原性真菌, 黄曲霉会通过上呼吸道和伤口感染人体, 诱发人体过敏性肺炎以及上呼吸道过敏性疾病, 如外源性哮喘、肺泡炎和过敏性支气管曲霉病等, 免疫系统较弱或肺部患疾病的人因曲霉菌而出现健康问题的风险更高<sup>[2]</sup>。此外, 部分黄曲霉菌株在生长代谢过程中会产生黄曲霉毒素 (Aflatoxin, AFT), 主要包括黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub> 和 G<sub>2</sub> 等 20 多种, 具有强烈的致癌、致畸和致突变作用<sup>[3]</sup>。其中, AFB<sub>1</sub> 毒性最强, 约为氰化钾毒性的 10 倍、砒霜的 68 倍<sup>[4]</sup>, 被世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 划定为 I 类致癌物, 人体摄入少量的 AFB<sub>1</sub> 便会引起病变、神经源性心脏损伤、胃肠道疾病, 甚至死亡<sup>[5]</sup>。采用无毒或低毒的植物源天然产物控制黄曲霉及黄曲霉毒素污染成为研究热点。

茴香醛 (*p*-Anisaldehyde, AS), 学名甲氧基苯甲醛, 又名对茴香醛、大茴香醛, 广泛存在于茴香属、合金欢等植物之中<sup>[6]</sup>。茴香醛安全无毒, 是国标 GB 2760-2014 中可直接添加到食品中的食用香料, 在美国食品和药物管理局 (FDA) 的《联邦法规》(CFR) 中被归类为公认安全<sup>[7]</sup>。茴香醛具有抗氧化活性, 通过提高抗坏血酸 - 还原性谷胱甘肽循环的抗氧化潜力, 来激活抗氧化防御系统, 缓解活性氧的积累, 从而减缓水果的氧化腐烂<sup>[8]</sup>。此外, 茴香醛具有良好的抗菌活性, 能有效抑制许多食源性致病菌, 如单增李斯特氏菌<sup>[9]</sup>、金黄色葡萄球菌<sup>[10]</sup>和铜绿假单胞菌杆菌<sup>[11]</sup>等; 对假丝酵母<sup>[12]</sup>、柑橘酸腐病菌<sup>[13]</sup>等酵母和霉菌也显示出抗菌活性。

作为天然植物源提取物, 茴香醛具有抗菌活性强、成本低、来源广等优点, 具有较大的开发前景。在目前的国内外研究报道中, 鲜见有应用茴香醛作为抑菌剂抑制黄曲霉菌的研究报道。因此, 本实验研究了茴香醛对黄曲霉的抑菌作用, 通过测定孢子萌发率、菌丝干重、菌落直径和 AFB<sub>1</sub> 含量, 探究茴香醛对黄曲霉抑制效果; 通过测定细胞壁完整性、内容物释放量、胞外电导率和 pH 值, 初步探究茴香醛潜在的抗真菌机制; 最后评估茴香醛作为熏蒸剂在开心果中的霉菌减控效应, 为天然植物源抑菌剂的开发与应用提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、材料与试剂

黄曲霉菌株 (*Aspergillus flavus* GDMCC 3.493) 购于广东省微生物菌种保藏中心; 开心果 (*Pistacia vera* L.) 由广东南兴天虹果仁制品有限公司提供; 茴香醛 (*p*-Anisaldehyde, AS; 纯度 ≥ 99%) 购于上海麦克林生化科技有限公司; 卡尔科弗卢尔荧光增白剂 (Calcofluor White, CW) 购于 Sigma-aldrich 公司; 抗荧光淬灭封片剂购于碧云天生物技术有限公司; Beacon 黄曲霉毒素试剂盒 (20-0017) 购于北京安易世纪科技有限公司; 马铃薯葡萄糖液体培养基 (PDB)、马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA) 购于广州环凯微生物有限公司。

### 1.2 主要仪器与设备

DSX-18L 高压蒸汽灭菌器, 上海申安医疗器械厂; Spectra Max M5 酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司; HZQ-F100 恒温振荡培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; LRH-150-S 恒温恒湿培养箱, 广东省医疗器械厂; FA2104 分析天平, 舜宇恒平仪器; KLCZ-880A 超净工作台, 北京亚泰科隆仪器技术有限公司; JW-3021HR 高速冷冻离心机, 上海卢湘仪离心机仪器有限公司; Digital Sight 10 荧光显微镜, 日本 Nikon 公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 黄曲霉活化和孢子悬浮液制备

黄曲霉在 PDA 平板上于 (28 ± 2) °C 培养 5~7 d 至大量产孢。加入适量 0.05% (质量分数) 的 Triton X-100 溶液 (0.01 mol/L PBS 为溶剂), 反复吹打菌体至孢子脱落, 用四层擦镜纸过滤, 得到滤液即为孢子悬浮液。孢子悬浮液稀释后于显微镜下观察, 通过血球计数板进行孢子计数, 现配现用。

#### 1.3.2 茴香醛对黄曲霉的最小抑菌浓度及最小杀菌浓度测定

采用 96 孔板二倍稀释法测定 AS 对 *A. flavus* 的 MIC 和 MFC。在 96 孔板每孔中加入 100 μL 的 PDB, 在第一个孔中加入 100 μL 的 AS 母液 (102.4 mg/mL, 体积分数 50% 的无水乙醇溶解), 混匀后, 移取 100 μL 混合液于第 2 个孔中吹打混匀, 重复上述步骤至第 10 个孔, 弃去 100 μL 混合液。每孔加入 100 μL 孢子悬浮液 (10<sup>6</sup> CFU/mL), 使 AS 最终质量

浓度分别为 25.60、12.80、6.40、3.20、1.60、0.80、0.40、0.20、0.10 和 0.05 mg/mL。未加 AS 的孔作阳性对照，未加孢子悬浮液的孔作阴性对照。将 96 孔板置于培养箱中，(28±2) °C 培养 24 h。以肉眼观察不到菌丝的孔对应的浓度为 MIC。从上述无肉眼观察到真菌生长的孔中吸取 100 μL 混合液，接种在 PDA 的平板上，(28±2) °C 培养 48 h，无肉眼观察到菌体生长对应的最低浓度为 AS 的 MFC。

### 1.3.3 茴香醛对黄曲霉孢子萌发的影响

参考卫梦绮<sup>[14]</sup>的方法并稍加修改。在 PDB 中加入孢子悬浮液（最终浓度为 10<sup>6</sup> CFU/mL），加入 AS 使其最终质量浓度为 0、1/2 MIC、MIC 和 2 MIC，(28±2) °C、180 r/min 震荡培养。以芽管长度超过孢子直径一半为萌发标准，每 3 h 取样，通过显微镜观察孢子萌发状态，每次镜检孢子数量不少于 100 个。对照组孢子萌发率 ≥85% 时，观察结束，记录孢子萌发率（视野中萌发孢子数占总观察孢子数百分比值）。

### 1.3.4 茴香醛对黄曲霉菌丝生物合成的影响

参考 Li 等<sup>[15]</sup>的方法并稍加修改。在 YES 培养基（质量分数 2% 酵母提取物，质量分数 18% 蔗糖和质量分数 0.006% MgSO<sub>4</sub>）中加入孢子悬浮液（最终浓度为 10<sup>5</sup> CFU/mL），加入 AS 使其最终质量浓度分别为 0、1/2 MIC、MIC 和 2 MIC，(28±2) °C，180 r/min 震荡培养。在第 2、3 和 4 天时抽滤并收集菌丝，于烘箱内 80 °C 烘至恒重，记录菌丝干重。

### 1.3.5 茴香醛对黄曲霉在 PDA 径向生长的影响

添加 AS 于 48 °C 左右的 20 mL PDA 中，使其最终质量浓度为 0、1/2 MIC、MIC 和 2 MIC，充分混匀后倒平板冷却。移取 10 μL 孢子悬浮液（10<sup>6</sup> CFU/mL）接种于平板中心，于 (28±2) °C，90% RH 的恒温恒湿培养箱中静置培养。每隔 1 d 采用十字交叉法测量菌落直径，以菌落直径对时间作图得到黄曲霉菌生长速率曲线，斜率为生长速率，延滞期为菌落直径达到 10 mm 所需要的时间。

### 1.3.6 茴香醛对黄曲霉产毒的影响

参照 1.3.4 中方法培养黄曲霉 5 d 后收集样品，于 10 000 r/min 条件下离心 3 min，取上清液并根据 Beacon 黄曲霉毒素试剂盒（20-0017）说明书步骤，检测 AFB<sub>1</sub> 含量。

### 1.3.7 茴香醛对黄曲霉细胞膜的影响

#### 1.3.7.1 细胞内容物释放量的测定

参照 Hu 等<sup>[16]</sup>的方法测定细胞内容物释放量。将孢子悬浮液加入到 40 mL PDB 中，使其最终浓度为 10<sup>5</sup> CFU/mL，(28±2) °C，180 r/min 震荡培养 24 h 后，8 000 g 条件下离心 10 min 收集菌丝，用 0.01 mol/L PBS 洗涤 2 次并重悬至 40 mL，加入 AS 使其最终质量浓度为 0、MIC、2MIC 和 4 MIC，(28±2) °C、180 r/min 震荡培养，分别于 0、2、4、8、12、18 和 24 h 取适量混合物于 3 500 g 离心 5 min，取上清液于 260 nm、280 nm 处测定吸光值。PBS 校准空白。

#### 1.3.7.2 胞外电导率和 pH 值的测定

按照 1.3.7.1 方法培养黄曲霉 24 h 后收集菌丝，用无菌水洗涤 2 次并重悬至 40 mL，加入 AS 使其最终质量浓度 0、MIC、2MIC 和 4 MIC，(28±2) °C、180 r/min 震荡培养，分别于 0、2、4、8、12、18 和 24 h 取适量混合物于 8 000 g 离心 5 min，测上清液的电导率和 pH 值。

### 1.3.8 茴香醛对黄曲霉细胞壁的影响

吸取适量孢子悬浮液加入到 40 mL PDB 中（最终浓度为 10<sup>5</sup> CFU/mL），(28±2) °C，180 r/min 震荡培养 24 h，加入 AS（最终质量浓度为 0、1/2 MIC、MIC 和 2 MIC）继续培养 24 h。取少量菌丝滴加于载玻片上，加入 10 μL CW 和 10 μL 质量分数 10% 的 KOH 溶液，静置 1 min，滴加 1 滴抗荧光淬灭剂保护荧光，置于荧光显微镜下观察拍照。

### 1.3.9 茴香醛的体外抑菌作用

#### 1.3.9.1 茴香醛熏蒸试验

采用点接触法在 20 mL PDA 平板中心接种 10 μL 10<sup>6</sup> CFU/mL 孢子悬浮液。计算平板容积，分别将滴加有 0 MIC、1/2 MIC、MIC 和 2 MIC AS 的滤纸片贴于培养皿盖中心处，用封口膜密封，置于恒温恒湿培养箱中，28 °C、90% RH 培养 5 d，观察黄曲霉在 PDA 上的生长状况。其中，1 MIC=0.80 mg/cm<sup>3</sup>。

#### 1.3.9.2 霉变率的测定

开心果样品处理和接种参照 Xu 等<sup>[17]</sup>的方法略作修改。挑选水分含量在 5% 左右的带壳开心果，剥壳取仁，选择种皮完整、大小相近、无霉变的开心果果仁于 121 °C 高压灭菌 15 min 以消除背景菌。按 1:2 ( $V_{果仁}:V_{孢子液}$ ) 比例，将开心果果仁加入到孢子悬浮液（10<sup>6</sup> CFU/mL）中，(28±2) °C、180 r/min

震荡培养 5 min 后,用无菌滤网沥干水分。每个培养皿(直径 9 mm)中放入 12 粒开心果,培养皿盖中心粘贴滴加有 AS 的滤纸片(最终质量浓度为 0、1/2 MIC、MIC 和 2 MIC),用封口膜密封后,在恒温恒湿培养箱(28±2)℃、90% RH 静置培养 8 d,期间每隔 2 d 观察培养期间的开心果的霉变状态并计算霉变率(霉变开心果果仁数占总开心果果仁数的百分比值)。其中,1 MIC=0.80 mg/cm<sup>3</sup>。

### 1.3.9.3 霉菌总数的测定

根据 GB 4789.15-2016《食品微生物学检测霉菌和酵母计数》的方法,对 1.3.9.2 中获得的开心果果仁样品霉菌总数进行计数。

### 1.3.10 数据分析

实验重复 3 次,采用 Origin 2018 软件处理数据,结果表示为平均值±标准差;采用 IBM SPSS Statistics 26 进行单因素方差分析,通过 Duncan 多重比较进行显著性差异分析, $P<0.05$  表示差异显著。

## 2 结果与讨论

### 2.1 AS对黄曲霉的MIC和MFC

AS 对黄曲霉的 MIC 和 MFC 值分别为 0.80 mg/mL 和 3.20 mg/mL。Ce 等<sup>[10]</sup>报道 AS 对金黄色葡萄球菌的 MIC 值为 2.50 mg/mL;Lin 等<sup>[7]</sup>报道 AS 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的 MIC 值均为 5.00 mg/mL;Che 等<sup>[18]</sup>报道 AS 对指状青霉和意大利青霉的 MIC 和 MFC 均为 2.0 μL/mL,这说明 AS 的对不同菌株抑菌活性差异较大,对黄曲霉抑制效果显著。

### 2.2 AS对孢子萌发的抑制作用

由图 1 可知,黄曲霉孢子在培养第 6 小时后开始部分萌发,AS 处理下的孢子萌发数量与 CK 组相比显著减少( $P<0.05$ )。培养第 12 小时,CK 组孢子萌发率达到 88.46%,与 CK 组相比,1/2 MIC 和 MIC 处理下黄曲霉孢子萌发抑制率分别为 35.19% 和 93.97%。值得一提的是,2 MIC 处理下的黄曲霉孢子萌发在 12 h 内完全被抑制。图 2 为 12 h 时不同质量浓度的 AS 处理下的孢子萌发状态观察图。可以发现 12 h 时 CK 组黄曲霉孢子大多数已经延伸出芽管,形成菌丝体锥形,1/2 MIC 处理组的孢子已有部分萌发,但芽管长度较短,萌发相对延后, MIC 和 2 MIC 处理组的孢子呈球状,几乎未见萌发。从孢子萌发率和孢子萌发状态观察可以发现,AS 对黄曲霉孢子萌发有显著的抑制作用,且呈剂量依

赖效应。紫苏精油处理黄曲霉也可以显著抑制孢子萌发,2 MIC 紫苏精油处理下未观察到黄曲霉孢子形态学变化<sup>[16]</sup>,这与本研究结果相似。

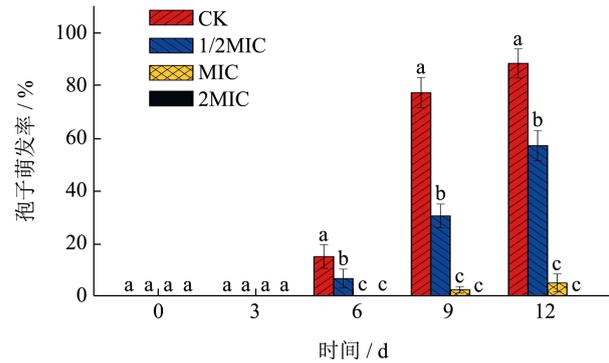


图 1 AS 对孢子萌发率的影响

Fig.1 Effects of AS on spore germination rate

注:小写字母不同表示各组存在显著性差异( $P<0.05$ ),下同。

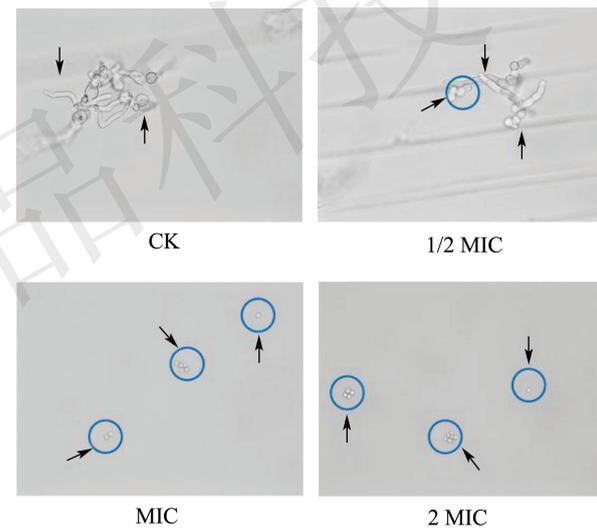


图 2 12 h 时黄曲霉孢子显微镜观察图

Fig.2 Microscopic observation of *A. flavus* spores at 12 h

### 2.3 AS对菌丝生物合成的抑制作用

AS 对黄曲霉菌丝生物量的抑制作用可以通过测定菌丝干质量来反映。如图 3 所示,与 CK 组相比,随着 AS 质量浓度越大,对应处理组中菌丝干重越小,AS 浓度与菌丝干质量呈负相关。第 2 天时,1/2 MIC 和 MIC 处理组的菌丝干质量分别为 0.42 g 和 0.02 g,菌丝生物量显著下降( $P<0.05$ ),对菌丝生长的抑制率分别为 20.75% 和 96.22%,在第 3 天时的抑制率分别为 14.94% 和 50.57%,在第 4 天时分分别为 11.59% 和 36.23%。这说明随着时间推移,1/2 MIC 和 MIC 剂量的 AS 对黄曲霉菌丝生物合成的抑制效果逐渐降低,但 2 MIC 处理组在测试时间

点内未观察到菌丝生长。结果表明, AS 对黄曲霉菌丝生物的合成有明显的抑制作用, 2 MIC 的 AS 能够完全抑制黄曲霉菌丝生物合成。Su 等<sup>[19]</sup>研究发现, 肉桂醛处理黄曲霉的 MIC 为 0.07 mg/mL, 当肉桂醛浓度为 0.52 mg/mL (8 MIC) 时, 才能完全抑制菌丝生长。

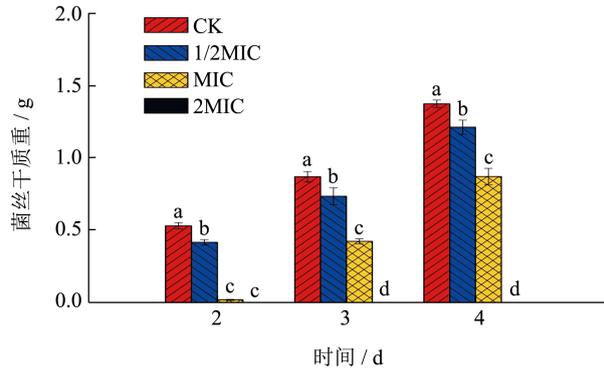


图 3 AS 对菌丝干质量的影响

Fig. 3 Effect of AS on dry weight of mycelium

#### 2.4 AS对黄曲霉径向生长的抑制作用

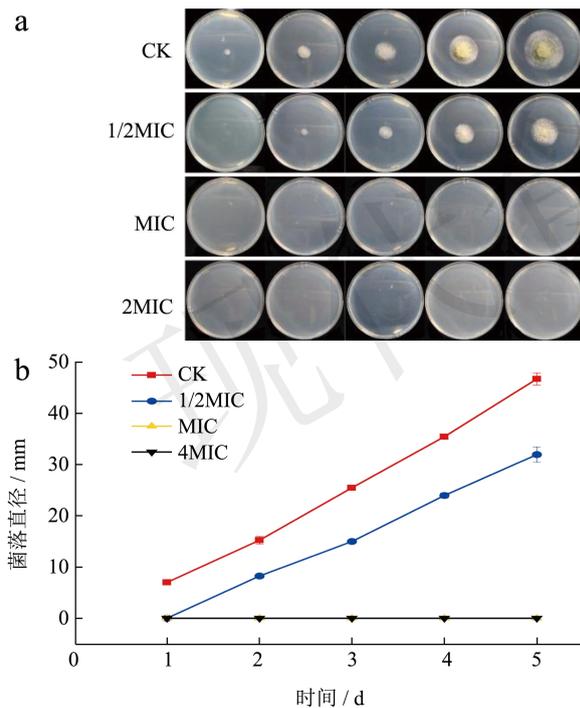


图 4 AS 处理后黄曲霉的菌落形态 (a) 和菌落直径 (b)

Fig.4 Colony morphology (a) and colony diameter (b) of *A. flavus* after AS treatment

如图 4a 所示, AS 处理的黄曲霉菌落形态发生明显改变, 未经 AS 处理的黄曲霉在 PDA 中正常生长, 在第 3 天时开始产黄色孢子, 在第 5 天时大量产孢。1/2 MIC 处理组的黄曲霉产孢延后至第 4 天, 第 5 天时菌落中心孢子稀疏, 菌丝粗糙, 菌丝形态

发生异常。MIC 和 2 MIC 处理组的黄曲霉在 PDA 中无法生长。菌落直径量化对应图 4b, 培养至第 5 天时, 1/2 MIC 处理组的黄曲霉直径仅为 CK 组的 68.37%, MIC 和 2 MIC 处理组的菌丝直径皆为 0 mm。由表 1 可知, AS 还能够降低黄曲霉的生长速率, 并延长延滞期, 1/2 MIC 处理组的黄曲霉生长速率较 CK 组生长速率下降了 21.02%, 延滞期增加了 62.14%。以上结果表明, AS 对黄曲霉表现出显著的抑菌活性, 能够有效地抑制黄曲霉生长。Salma 等<sup>[20]</sup>研究发现, 0.10 mg/mL 香芹酮和 1.00 mg/mL 芳樟醇能够显著降低黄曲霉的生长速率, 1.50 mg/mL 的香芹酮和 2.00 mg/mL 的芳樟醇能够完全抑制黄曲霉在 PDA 上的径向生长。

表 1 AS处理对黄曲霉生长速率和延滞期的影响

Table 1 Effects of AS treatment on growth rate and lag

phase of <i>A. flavus</i>		
浓度	生长速率/(mm/d)	延滞期/d
CK	9.99 ± 0.12 <sup>a</sup>	1.40 ± 0.01 <sup>a</sup>
1/2 MIC	7.98 ± 0.33 <sup>b</sup>	2.27 ± 0.03 <sup>b</sup>
MIC	NA	NA
2 MIC	NA	NA

注: 同列右肩不同的小写字母表示具有显著差异 ( $P < 0.05$ )。

#### 2.5 AS对黄曲霉产毒的抑制作用

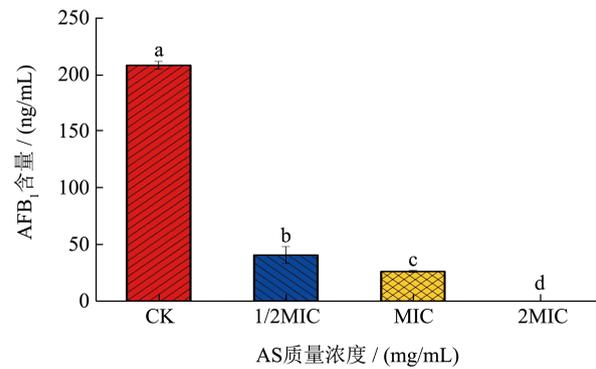


图 5 不同浓度 AS 对 AFB<sub>1</sub> 生物合成的影响

Fig.5 Effects of different concentrations of AS on AFB<sub>1</sub> biosynthesis

为进一步研究 AS 对黄曲霉产毒的影响, 研究了不同 AS 浓度处理下, 黄曲霉在液体培养基中的 AFB<sub>1</sub> 产量。如图 5 所示, AFB<sub>1</sub> 的产量与 AS 质量浓度呈负相关。培养 5 d 后, 1/2 MIC 和 MIC 的处理组的 AFB<sub>1</sub> 产量分别仅为 CK 组的 19.55% 和 12.58%。这些结果表明, AS 可以进一步抑制黄曲霉次级代谢产物 AFB<sub>1</sub> 的合成。多数天然产毒对黄

曲霉表现抗真菌活性的同时,也表现出显著的产毒抑制作用,姜黄精油以剂量依赖性方式抑制黄曲霉孢子萌发和 AFB<sub>1</sub> 合成,4 μL/mL 的姜黄精油对黄曲霉孢子萌发抑制率和 AFB<sub>1</sub> 合成抑制率分别为 85.47% 和 58.50%<sup>[21]</sup>。

## 2.6 AS对黄曲霉细胞膜破坏作用

### 2.6.1 细胞内容物释放量变化

$A_{260}$  和  $A_{280}$  值可以反映核酸和蛋白质泄露量<sup>[22]</sup>。如图 6a 所示,CK 组  $A_{260}$  值在 24 h 内无明显变化,AS 处理组的  $A_{260}$  值较 CK 组高,这是因为 AS 在 260 nm 处有的吸收峰。AS 处理组  $A_{260}$  总体上呈增长趋势,表明 AS 处理组黄曲霉细胞膜通透性发生变化,有核酸物质泄露。4 MIC 处理组在 8 h 时  $A_{260}$  趋于最大值,表明高浓度的 AS 处理使得细胞膜通透性破坏加速,内容物加速流出。

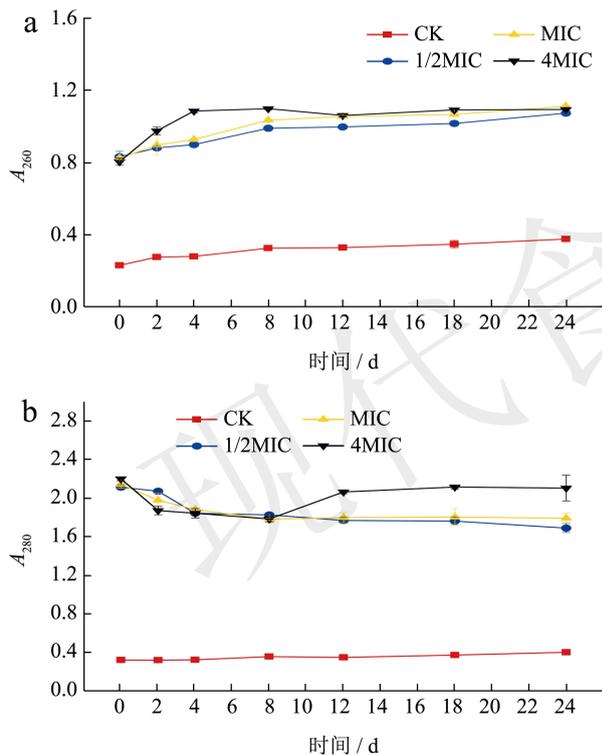


图 6 AS 对黄曲霉细胞核酸 (a) 和蛋白 (b) 释放量的影响  
Fig.6 Effect of AS on the release of nucleic acid (a) and protein (b) from *A. flavus* cells

同样,AS 在 280 nm 亦有吸收峰,在 280 nm 处的吸光度值较高。在 0~8 h 期间,AS 处理组的  $A_{280}$  值呈下降趋势,在 8 h 后,  $A_{280}$  值上升并趋于最大值,这可能是 AS 处理前期,疏水性的醛类化合物 AS 具有疏水性,破坏了细胞膜,导致细胞膜的通透性升高<sup>[23]</sup>,部分小分子的 AS 进入到细胞中,

大分子的蛋白尚且无法完全泄露,吸光值下降。8 h 后,4 MIC 处理组的细胞膜被完全破坏,蛋白质完全泄露,吸光值上升。以上实验表明,AS 处理能够破坏黄曲霉细胞膜通透性。

### 2.6.2 胞外电导率和 pH 值变化

细胞内容物具有导电性和酸碱度,通过测定胞外电导率和 pH 值的变化趋势可以反应 AS 对黄曲霉细胞膜破坏程度。如图 7a 所示,CK、2 MIC 和 4 MIC 处理组电导率在 24 h 内呈不同程度的上升趋势,1/2 MIC 处理组电导率呈先上升后下降趋势。2 MIC 和 4 MIC 处理组的电导率较 CK 组升高显著,细胞膜通透性上升,胞内电解质物质流出。MIC 处理组在 8 h 前电导率上升,说明前期黄曲霉菌丝细胞膜完整性遭到破坏;8 h 后 MIC 处理组电导率下降,推测是黄曲霉耐药性机制启动和质膜修复,导致渗透压发生变化<sup>[24]</sup>。

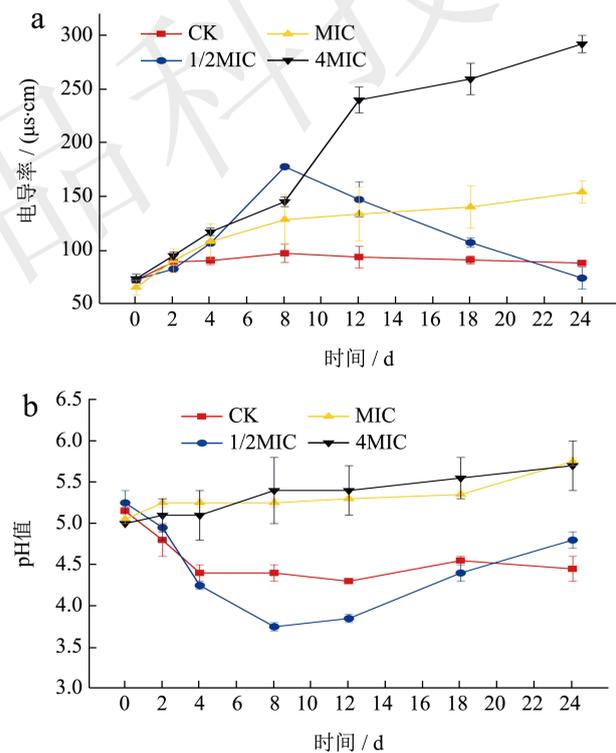


图 7 AS 对黄曲霉细胞外电导率 (a) 和 pH 值 (b) 的影响  
Fig.7 Effect of AS on extracellular conductivity (a) and pH (b) of *A. flavus*

图 7b 反映了 24 h 内不同质量浓度 AS 处理后黄曲霉细胞外的 pH 值变化趋势。CK 组的 pH 呈略微下降趋势,这可能与细胞内外渗透压变化有关。MIC 处理组的 pH 值先下降后上升,这可能是在 8 h 前,AS 破坏了细胞膜完整性,导致酸性物质流出,在 8 h 时后,细胞自我修复,酸碱物质的在细胞膜

内外的流动发生变化。2 MIC 和 4 MIC 处理组的 pH 值均显著高于 CK 组, 推测有更多碱性物质流出。pH 值的变化趋势在不同天然产物处理不同菌株中表现不同, 如二氢杨梅素<sup>[25]</sup>提高黄曲霉胞外 pH 值, 邻香兰素<sup>[20]</sup>降低黄曲霉胞外 pH 值。

以上结果表明, 不同质量浓度的 AS 处理后黄曲霉的胞外电导率和 pH 值变化趋势不同, 2 MIC 及以上的 AS 处理后的黄曲霉胞外电导率增加, pH 值降低, 呈浓度依赖效应, 能够对黄曲霉细胞膜造成不可逆损伤。MIC 的 AS 处理的黄曲霉胞外电导率先上升后下降, pH 值先下降后上升。黄曲霉细胞膜不仅作为细胞屏障, 还调控、介导多种细胞功能, 具有一定抗逆性<sup>[26]</sup>。不同质量浓度的 AS 对细胞膜的何种结构和成分的破坏及破坏程度仍有待深入研究。

## 2.7 细胞壁完整性观察结果

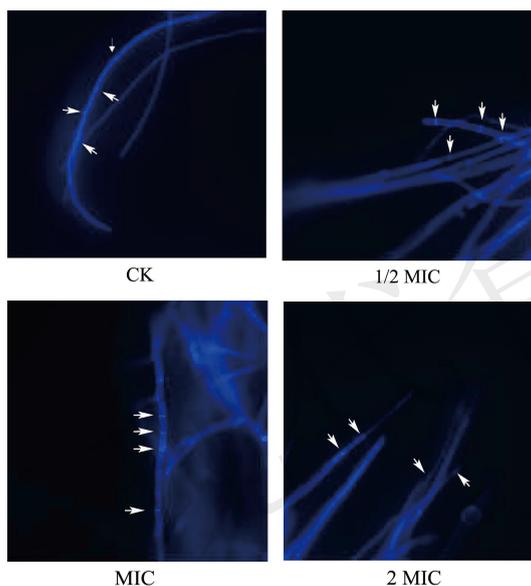


图 8 AS 处理后黄曲霉菌丝 CW 荧光染色图

Fig.8 CW fluorescence staining of *A. flavus* mycelium after AS treatment

黄曲霉细胞中的几丁质存在于菌丝隔膜中<sup>[27]</sup>, 卡尔科弗卢尔荧光增白剂是一种能够与细胞壁中几丁质结合的非特异性荧光染料, 通过荧光染色可以观察几丁质分布。从图 8 可以观察到几丁质主要存在于细胞壁和隔膜中, 各处理组中的隔膜清晰明亮, 分布较为均匀, 隔膜数量没有显著性差异, 这说明 AS 处理对黄曲霉细胞壁几丁质含量变化影响不大。不同天然产物对黄曲霉细胞壁影响不同, 丹皮酚处理减少黄曲霉隔膜数量<sup>[28]</sup>, 但邻香兰素处理对隔膜数量影响不大<sup>[29]</sup>。

## 2.8 AS 对开心果体外抑菌作用

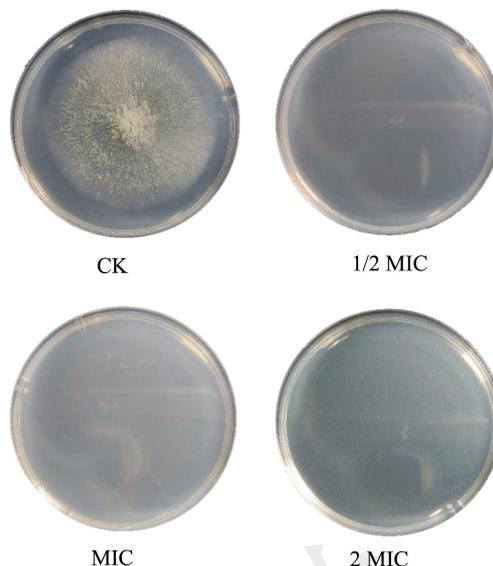


图 9 不同浓度 AS 熏蒸处理后黄曲霉在 PDA 的生长状况

Fig.9 Growth of *A. flavus* in PDA after different concentrations of AS fumigation treatment

如图 9 所示, AS 熏蒸处理 5 d 后, 对黄曲霉生长有明显抑制作用, CK 组黄曲霉正常生长且大量产孢, AS 处理组黄曲霉在 PDA 上无法生长。多数植物源提取物都具有一定的挥发性, 通过熏蒸处理同样表现出抗真菌活性, 方策<sup>[30]</sup>通过用香芹酚熏蒸处理, 能够有效抑制玉米、花生上黄曲霉的生长。熏蒸试验结果表明, AS 通过挥发接触方式对黄曲霉菌表现出抗真菌活性, 可进一步进行 AS 体外抑菌实验。

开心果易受黄曲霉侵染, 因此选择开心果作为 AS 体外抑菌试验的食品基质。不同质量浓度 AS 处理的黄曲霉在开心果上的生长情况如图 10 所示, 培养 2 d 时, CK 组多数开心果表面出现白色菌丝, AS 处理组无肉眼可见的菌丝。培养 4 d 时, CK 组开心果上的黄曲霉已经产出密集黄色孢子, AS 处理组已有部分开心果出现白色菌丝, 但菌丝呈棉团状, 形态异常, 肉眼无法观察到孢子。第 6~8 天, CK 组黄曲霉菌丝生长密集, 大量产孢, 孢子几乎覆盖整个果仁, 不同质量浓度 AS 处理组差异较小, 多数果仁表面部分部位有白色菌丝团, 但数量较少, 且未见产孢。

开心果黄曲霉污染量化结果如图 11a 所示, 第 4 天时, CK 组霉变率达到 100%, 1/2 MIC、MIC 和 2 MIC 处理组霉变率分别为 69.04%、59.68% 和 56.29%, 呈浓度依赖关系, 第 8 天时 AS 处理组间霉变率无显著性差异, 在 83.51%~93.34% 之间。

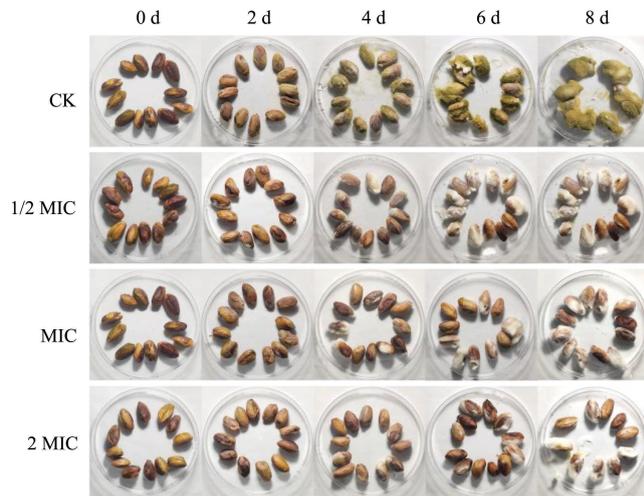


图 10 不同浓度 AS 熏蒸处理后开心果中黄曲霉的生长变化  
Fig.10 Growth changes of *A. flavus* in pistachio after different concentrations of AS fumigation treatment

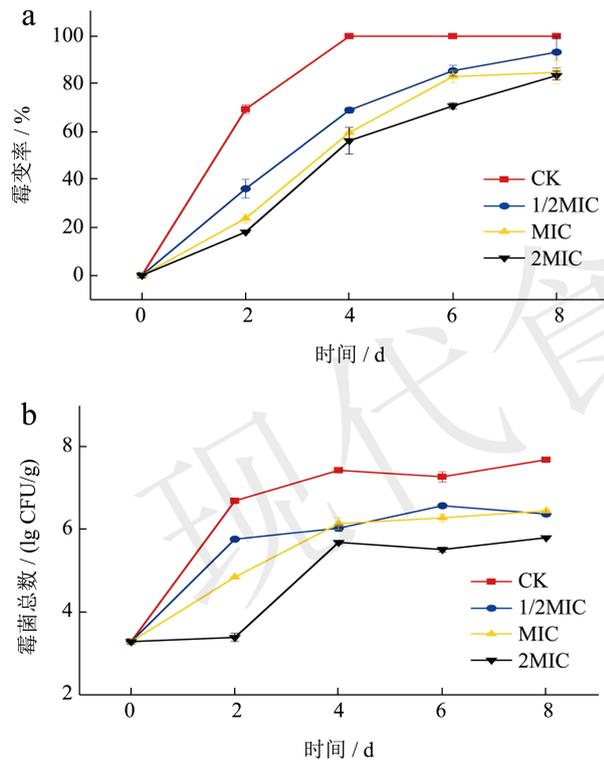


图 11 AS 对开心果霉变率 (a) 和霉菌总数 (b) 的影响  
Fig.11 Effect of AS on the mildew rate (a) and total mold count (b) of pistachios

通过测定霉菌总数进一步量化 AS 处理下黄曲霉侵染开心果的情况。如图 11b 所示, 在储藏期内, AS 能够有效减少开心果的霉菌总数, 并且随着 AS 质量浓度的提高, 霉菌总数下降。在 0~2 d 时, CK 组霉菌总数快速增长, 由 3.28 lg CFU/g 增长到 6.69 lg CFU/g, 增长率达到 103.96%, 1/2 MIC、MIC 和 2 MIC 处理组增长率分别仅为 75.30%、47.56%

和 27.44%。第 8 天时, 未经 AS 处理的霉菌总数达到 7.69 lg CFU/g, 而 1/2 MIC、MIC 和 2 MIC 处理组中的霉菌总数分别为 6.37、6.44 和 5.80 lg CFU/g, AS 处理组与 CK 存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。结果表明, AS 熏蒸处理可以显著抑制开心果黄曲霉的正常生长, 证实了 AS 作用新型食品防霉剂的应用潜力。

### 3 结论

本文研究了 AS 对黄曲霉的抑菌效果。结果发现 AS 对黄曲霉有较强的杀菌效果, 对黄曲霉孢子萌发、菌丝生物量合成、菌落径向生长和 AFB<sub>1</sub> 生物合成均有显著的抑制效果。不同质量浓度的 AS 处理后, 黄曲霉细胞膜通透性有不同程度下降, 内容物释放量, 胞外电导率和 pH 值增加, 但细胞壁中几丁质含量和分布变化不大。此外, AS 能够有效抑制黄曲霉侵染开心果。本研究为扩大 AS 在食品工业中的应用提供了理论基础, 有望将其开发为新型抑菌剂。

### 参考文献

- [1] 赵颖, 李倩, 朱晓嫻, 等. 邻香兰素对黄曲霉生长的抑制作用研究 [J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2022, 43(2): 79-85.
- [2] TIAN F, WOO S Y, LEE S Y, et al. Antifungal activity of essential oil and plant-derived natural compounds against *Aspergillus flavus* [J]. Antibiotics, 2022, 11(12): 1727.
- [3] KABAK B. Aflatoxins in foodstuffs: Occurrence and risk assessment in Turkey [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2021, 96: 103734.
- [4] 李倩, 赵颖, 朱晓嫻, 等. 天然产物抑制黄曲霉生长及其产毒的研究进展 [J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2021, 42(1): 132-140.
- [5] PICKOVA D, OSTRY V, MALIR F. A recent overview of producers and important dietary sources of aflatoxins [J]. Toxins, 2021, 13(3): 186.
- [6] API A M, BELSITO D, BOTELHO D, et al. RIFM fragrance ingredient safety assessment, *p*-methoxybenzaldehyde, CAS Registry Number 123-11-5 [J]. Food and Chemical Toxicology, 2022, 165: 113131.
- [7] LIN Y, HUANG R, SUN X, et al. The *p*-Anisaldehyde/ $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes as a sustained release agent: Characterization, storage stability, antibacterial and antioxidant activity [J]. Food Control, 2022, 132: 108561.
- [8] XU Y, CAI Z, BA L, et al. Maintenance of postharvest quality and reactive oxygen species homeostasis of pitaya fruit by essential oil *p*-anisaldehyde treatment [J]. Foods, 2021, 10(10): 2434.

- [9] CHEN X, ZHANG X, MENG R, et al. Efficacy of a combination of nisin and *p*-Anisaldehyde against *Listeria monocytogenes* [J]. Food Control, 2016, 66: 100-106.
- [10] SHI C, ZHAO X, MENG R, et al. Synergistic antimicrobial effects of nisin and *p*-Anisaldehyde on *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk [J]. LWT, 2017, 84: 222-230.
- [11] ADEWUNMI Y, NAMJILSUREN S, WALKER W D, et al. Antimicrobial activity of, and cellular pathways targeted by, *p*-anisaldehyde and epigallocatechin gallate in the opportunistic human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2020, 86(4): 2489.
- [12] SHREAZ S, BHATIA R, KHAN N, et al. Exposure of *Candida* to *p*-anisaldehyde inhibits its growth and ergosterol biosynthesis[J]. J Gen Appl Microbiol, 2011, 57(3): 129-136.
- [13] 李路,李蔚,车金鑫,等. *p*-茴香醛抑制柑橘酸腐病菌的作用机制[J].食品科学,2020,41(9):133-138.
- [14] 卫梦绮. 枯茗醛对黄曲霉生长的抑制作用及机理初探[D].西安:陕西科技大学,2019.
- [15] LI S, ZHANG S, LV Y, et al. Heptanal inhibits the growth of *Aspergillus flavus* through disturbance of plasma membrane integrity, mitochondrial function and antioxidant enzyme activity [J]. LWT, 2022, 154: 112655.
- [16] HU Z, YUAN K, ZHOU Q, et al. Mechanism of antifungal activity of *Perilla frutescens* essential oil against *Aspergillus flavus* by transcriptomic analysis [J]. Food Control, 2021, 123: 107703.
- [17] XU D, WEI M, PENG S, et al. Cuminaldehyde in cumin essential oils prevents the growth and aflatoxin B1 biosynthesis of *Aspergillus flavus* in peanuts [J]. Food Control, 2021, 125: 107985.
- [18] CHE J, CHEN X, OUYANG Q, et al. *p*-Anisaldehyde exerts its antifungal activity against *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* by disrupting the cell wall integrity and membrane permeability [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2020, 30(6): 878-884.
- [19] QU S, YANG K, CHEN L, et al. Cinnamaldehyde, a promising natural preservative against *Aspergillus flavus* [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2895.
- [20] LASRAM S, ZEMNI H, HAMDI Z, et al. Antifungal and antiaflatoxinogenic activities of *Carum carvi* L., *Coriandrum sativum* L. seed essential oils and their major terpene component against *Aspergillus flavus* [J]. Industrial Crops and Products, 2019, 134: 11-18.
- [21] HU Y, ZHANG J, KONG W, et al. Mechanisms of antifungal and anti-aflatoxinogenic properties of essential oil derived from turmeric (*Curcuma longa* L.) on *Aspergillus flavus* [J]. Food Chemistry, 2017, 220: 1-8.
- [22] 张笑薇. 没食子酸和百里香酚协同对鲜切番茄表面主要致病菌的杀菌效应及其杀菌机制[D].广州:华南理工大学,2021.
- [23] ALJAAFARI M N, ALKHOORI M A, HAG-ALI M, et al. Contribution of aldehydes and their derivatives to antimicrobial and immunomodulatory activities [J]. Molecules, 2022, 27(11): 3589.
- [24] FERLING I, DUNN J D, FERLING A, et al. Conidial melanin of the human-pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* disrupts cell autonomous defenses in amoebae [J]. mBio, 2020, 11(3): e00862-20.
- [25] 李倩,赵颖,乔苏瑞,等. 二氢杨梅素抑制黄曲霉菌生长的机制[J].食品科学,2022,43(13):8-14.
- [26] GUAN N, LIU L. Microbial response to acid stress: mechanisms and applications [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(1): 51-65.
- [27] GARCIA-RUBIO R, DE OLIVEIRA H C, RIVERA J, et al. The fungal cell wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species [J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 10.
- [28] LI Q, ZHAO Y, ZHU X, et al. Antifungal efficacy of paeonol on *Aspergillus flavus* and its mode of action on cell walls and cell membranes [J]. Food Science & Technology, 2021, 149: 111985.
- [29] 朱晓嫒. 邻香兰素抑制黄曲霉作用研究[D].郑州:河南工业大学,2021.
- [30] 方策. 香芹酚对黄曲霉生长和产毒抑制机理初探及应用[D].济南:山东师范大学,2020.