

柠檬皮中柠檬苦素对黑曲霉的抑菌特性和机理

王辉^{1,2}, 曾晓芳^{1,2}, 冯卫华^{1,2}, 于立梅^{1,2}, 翟万京^{1,2}, 白卫东^{1,2}, 曾令钢³

(1. 仲恺农业工程学院轻工食品学院, 广东广州 510550)

(2. 广东省岭南特色食品工程中心, 广东广州 510225) (3. 广东中兴绿丰发展有限公司, 广东河源 517000)

摘要: 本研究以柠檬皮中柠檬苦素为原料, 对其抑制黑曲霉的抑菌活性、抑菌活性的稳定性和抑菌机理进行了研究。结果表明: 柠檬皮中柠檬苦素对黑曲霉的最小抑菌浓度 (MIC) 和最小杀菌浓度 (MFC) 分别为 625 $\mu\text{g/mL}$ 、5000 $\mu\text{g/mL}$; 对孢子萌发和菌丝生长抑制的半最大效应浓度 (EC_{50}) 分别为 311.03 $\mu\text{g/mL}$ 和 291.63 $\mu\text{g/mL}$ 。柠檬苦素对黑曲霉的抑菌活性在紫外光照下受到抑制; 在 pH 值为 6~7 时受到抑制; 金属离子 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 可增强其抑菌活性。在柠檬皮中柠檬苦素作用下, 黑曲霉的胞外碱性磷酸酶 (AKP) 活力、可溶性蛋白和菌丝体总糖含量发生很大变化; 扫描电子显微镜观察发现黑曲霉孢子发生了变形、破裂、溶出物附着的现象。因此, 柠檬苦素破坏了黑曲霉细胞壁和细胞膜的完整性, 造成大量内容物渗出, 影响了细胞正常代谢, 进而抑制了菌体细胞的生长繁殖。

关键词: 柠檬苦素; 黑曲霉; 抑菌活性; 抑菌稳定性; 抑菌机理

文章编号: 1673-9078(2019)01-97-102

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.1.014

Antifungal Properties and Mechanism of Limonin from Lemon Peel against *Aspergillus niger*

WANG Hui^{1,2}, ZENG Xiao-fang^{1,2}, FENG Wei-hua^{1,2}, YU Li-mei^{1,2}, ZHAI Wan-jing^{1,2}, BAI Wei-dong^{1,2},
ZENG Ling-gang³

(1. College of Light Industry and Food Technology Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510550, China) (2. Guangdong Engineering Center for Lingnan Specialty Food, Guangzhou 510225, China)

(3. Guangdong Zhongxinglyufeng Development Co. Ltd., Heyuan 517000, China)

Abstract: The antifungal activity, stability and mechanism of limonin from lemon peel against *Aspergillus niger* were investigated. The results showed that the minimal inhibitory concentration (MIC) and the minimal fungicidal concentration (MFC) of limonin from lemon peel on *Aspergillus Niger* were 625 $\mu\text{g/mL}$ and 5000 $\mu\text{g/mL}$ respectively, and the half-effective concentration (EC_{50}) on spore germination and mycelium growth were 311.03 $\mu\text{g/mL}$ and 291.63 $\mu\text{g/mL}$ respectively. The antifungal activity of limonin on *Aspergillus niger* was weakened under UV light and pH 6~7. Fe^{3+} and Fe^{2+} could enhance the antifungal activity. The limonin from lemon peel could greatly change extracellular alkaline phosphatase (AKP) activity, soluble protein and total sugar content of mycelium of *Aspergillus niger*. Therefore, limonin destroyed the integrity of cell wall and cell membrane of *Aspergillus niger*, resulting in a large amount of content exudation, affecting the normal metabolism of cells, thereby inhibiting the growth and reproduction of cells.

Key words: limonin; *Aspergillus niger*; antifungal activity; antifungal stability; antifungal mechanism

柠檬是芸香科柑橘属水果, 近年来我国柠檬的种植面积不断扩大、产量也逐渐增高。柠檬的果肉可以直接食用, 但果皮因呈现苦味, 而以提取柠檬精油、果胶、膳食纤维等进行利用为主^[1]。柠檬苦素及其类似物属三萜类物质是导致柠檬皮呈苦味的主要物质之一, 在柠檬果皮中含量丰富, 是植物中具有高度生物活性的次生代谢产物。已有研究表明, 柠檬苦素具有

抗氧化、抗病毒、抗肿瘤、抗癌、抑菌等多种生理活性功能^[2]。

黑曲霉是一种常见的霉菌, 是食品工业上发酵和生产酶制剂的主要菌种, 但也会造成食物、谷物和果蔬的霉腐变质和其他工业器材霉变^[3]。具有抑制黑曲霉活性的天然物质有很多。李长平等^[4]发现源于凡纳滨对虾血蓝蛋白化学合成肽段具有抗黑曲霉活性, 马欢欢等^[5]从传统东北酸菜中分离筛选了对黑曲霉具有良好抗性的乳酸菌。然而, 针对柠檬苦素对黑曲霉的抑菌活性、稳定性和机理的研究尚未有报道, 但有一些柠檬苦素对于其他微生物的抑菌作用研究可供借

投稿日期: 2018-08-27

基金项目: 广东省科技计划项目 (2014A070713035; 2015A020224041; 2015A020209186; 2015YT02H049); 广州市科技计划项目 (201704020028)

作者简介: 王辉(1979-), 女, 讲师, 研究方向: 食品微生物

鉴。李彪等^[6]发现柚子皮中柠檬苦素对小麦纹枯病原菌等农作物病害病原菌具有抑制活性, Amit Vikram 等^[7]发现了柠檬苦素干扰大肠杆菌生物膜的形成和附着的方式。本研究在前期试验中发现, 柠檬苦素对黑曲霉有较强的抑菌作用。因此, 本文以黑曲霉作为研究对象, 探讨柠檬皮中的柠檬苦素对黑曲霉的抑菌活性以及 pH 值、紫外光、Fe²⁺和 Fe³⁺对抑菌活性的影响, 并通过研究柠檬苦素对黑曲霉胞外 AKP 酶、可溶性蛋白和菌丝体总糖含量的影响, 以及通过扫描电子显微镜观察黑曲霉微观形态进一步探讨柠檬苦素对黑曲霉的抑菌机理。为开发柠檬苦素作为天然抑菌剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 原料与试剂

柠檬皮粉, 由广东中兴绿丰发展有限公司提供; 供试菌种: 黑曲霉 (*Aspergillus niger*), 由仲恺农业工程学院轻工食品学院微生物实验室保藏; 马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基、马铃薯葡萄糖液体 (PDB) 培养基, 广东环凯微生物科技有限公司; 柠檬苦素标准品, 济宁天之蓝生物科技有限公司; 碱性磷酸酶试剂盒, 上海酶联生物科技有限公司; 考马斯亮蓝-G250、蒽酮, 北京索莱宝科技有限公司; 福林试剂, Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo; 石油醚、二氯甲烷及无水乙醇, 惠普化工仪器有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

JEOL-6360LV 型扫描电子显微镜, 日本电子株式会社; JFD-320 型冷冻干燥仪, 日本电子株式会社; JFC-1600 型离子溅射仪, 日本电子株式会社; DDS-18A 型精密数字式电导率仪, 上海日岛科学仪器有限公司; SW-CJ-1FD 型净化工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; PYX-280S-A 型生化培养箱, 韶关市科力实验仪器有限公司; UV759 型紫外分光光度计, 上海横摇科技有限公司; DSX-280 型手提式压力蒸汽灭菌器, 上海申安医疗器械厂; THZ-82 型冷冻水浴恒温振荡器, 金坛市中大仪器厂; XHRE-52A 型旋转蒸发仪, 郑州豫华仪器制造有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 柠檬皮中柠檬苦素的提取和柠檬苦素溶液制备

据课题组前期研究, 将柠檬皮粉与 80%乙醇以 1:40 (W/V) 60 °C 恒温振荡浸提 120 min 得到浸提液。

将浸提液 60 °C 下真空浓缩后, 以 1:1 (V/V) 比例加入二氯甲烷重复萃取 5 次。将萃取液于 40 °C 下真空旋转蒸发得到柠檬苦素结晶, -18 °C 保藏。使用前用适量 15%乙醇溶解制成所需浓度的柠檬苦素溶液。

1.2.2 菌种活化和孢子悬浮液的制备

将保存在-20 °C 的黑曲霉菌种在 PDA 培养基上活化两次后, 用无菌生理盐水将孢子从斜面洗脱, 用麦氏比浊管使孢子悬浮液浓度调整为 10⁸ CFU/mL, 4 °C 冰箱保藏, 备用。

1.2.3 柠檬苦素对黑曲霉的抑制活性

1.2.3.1 最小抑菌浓度 (MIC) 及最小杀菌浓度 (MFC) 的测定

分别加入 1 mL PDB 培养基至 10 支无菌试管。吸取 1 mL 质量浓度为 40000 µg/mL 的柠檬苦素溶液加入 1 号试管, 采用倍半浓度稀释法依次稀释至 9 号试管。10 号试管加入 1 mL 15%乙醇溶液, 混匀后吸取 1 mL 弃去。在 1~8 号试管和 10 号试管中加入 1 mL 含黑曲霉孢子浓度为 10⁷ CFU/mL 的 PDB 培养基, 使 1~8 号试管中柠檬苦素质量浓度为 10000 µg/mL~78.125 µg/mL。9 号试管为空白对照, 不含菌液。10 号试管为菌液对照组, 不含柠檬苦素。28 °C 培养 2 d 后, 以 1~8 号试管中仍保持澄清的最低柠檬苦素浓度为柠檬苦素对黑曲霉的 MIC。MIC 试验后, 分别在无菌生长的试管中各取 100 µL 溶液涂布于 PDA 平板培养基, 28 °C 培养 5 d 后, 以无菌生长的最低柠檬苦素浓度为其 MFC。

1.2.3.2 孢子萌发抑制率的测定

在置于培养皿中央的凹玻片中分别加入 50 µL 黑曲霉孢子悬液和 50 µL 不同质量浓度的柠檬苦素提取液, 使柠檬苦素最终质量浓度分别为 2500 µg/mL、1250 µg/mL、625 µg/mL、312.5 µg/mL、156.25 µg/mL、78.13 µg/mL, 28 °C 培养, 以 15%乙醇为溶剂对照。当溶剂对照组的孢子萌发率达 70%~80%时, 用显微镜观察每个玻片 100 个孢子的萌发数, 记录。用下列公式计算孢子萌发率和抑制率。以柠檬苦素浓度的对数值作为横坐标, 孢子萌发抑制率为纵坐标, 计算柠檬苦素对黑曲霉孢子萌发的毒力方程和半最大效应浓度 EC₅₀^[8]。

$$\text{孢子萌发率}/\% = \frac{\text{萌发孢子数}}{\text{总孢子数}} \times 100\%$$

$$\text{孢子萌发抑制率}/\% = \frac{\text{对照组萌发率} - \text{处理组萌发率}}{\text{对照组萌发率}} \times 100\%$$

1.2.3.3 菌丝生长抑制率的测定

调整每个 PDA 平板培养基中柠檬苦素溶液的最终质量浓度分别为 2500 µg/mL、1250 µg/mL、625

$\mu\text{g/mL}$ 、 $312.5 \mu\text{g/mL}$ 、 $156.25 \mu\text{g/mL}$ 、 $78.13 \mu\text{g/mL}$ ，以 15%乙醇溶液为溶剂对照。从已培养 3 d 的黑曲霉菌落边缘取直径为 4 mm 的菌饼，接种于含柠檬苦素的 PDA 平板培养基中央，菌丝面朝下， 28°C 培养 3 d 后，用十字交叉法测量菌落直径。以柠檬苦素质量浓度的对数值作为横坐标，菌丝生长抑制率为纵坐标，计算柠檬苦素对黑曲霉菌丝的毒力方程和半最大效应浓度 EC_{50} [9]。

菌落直径/mm=测量菌落平均值-打孔器直径

菌丝生长抑制率/%= $\frac{\text{对照组菌落直径}-\text{处理组菌落直径}}{\text{对照组菌落直径}} \times 100\%$

1.2.4 不同理化因素对柠檬苦素抑制黑曲霉活性的影响

1.2.4.1 抑菌圈测定

在含黑曲霉孢子浓度为 10^6 CFU/mL 的平板培养基上打 3 个直径为 6 mm 的小孔，分别加入 85 μL 柠檬苦素溶液、15%乙醇、无菌水， 28°C 培养箱中培养 48 h。用游标卡尺以十字交叉法测量其抑菌圈直径。

1.2.4.2 不同 pH 值对柠檬苦素抑制黑曲霉活性的影响

配制不同 pH 值的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液，与质量浓度为 10000 $\mu\text{g/mL}$ 的柠檬苦素溶液以 3:1 的比例混合，制成 pH 值分别为 2、4、6、7、8、10 的柠檬苦素样液后按照“1.2.4.1”测定抑菌圈直径。

1.2.4.3 紫外光照对柠檬苦素抑制黑曲霉作用的影响

将质量浓度为 10000 $\mu\text{g/mL}$ 的柠檬苦素溶液分别放置于 8 W 紫外灯下照射处理，柠檬苦素溶液与紫外灯距离 40 cm，分别照射 10 min、30 min、60 min、90 min、120 min 后按照“1.2.4.1”测定抑菌圈直径。

1.2.4.4 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 对柠檬苦素抑制黑曲霉活性的影响

配制浓度为 1 mmol/L 与 10 mmol/L 的氯化铁、硫酸亚铁溶液，与质量浓度为 10000 $\mu\text{g/mL}$ 柠檬苦素溶液以 1:9 (V/V) 的比例混合均匀后分别于室温下避光孵育 0 h、0.5 h、1 h、6 h、12 h 后按照“1.2.4.1”测定抑菌圈直径。

1.2.5 柠檬苦素抑制黑曲霉的机理研究

1.2.5.1 柠檬苦素对黑曲霉胞外碱性磷酸酶 (AKP) 活力的影响

参考蓝蔚青等 [10] 的方法并略作修改。将黑曲霉孢子悬液接种于 PDB 培养基，加入柠檬苦素使其最终浓度为 MIC，于 28°C 下 150 r/min 振荡孵育 0 h、2 h、4 h、6 h、8 h、10 h 后，以转速 1000 r/min 离心 10 min，取上清液按照碱性磷酸酶 (AKP) 试剂盒方法测定其 AKP 活力。在 520 nm 波长下测定 OD 值。以加入等量 15%乙醇作为对照。

1.2.5.2 柠檬苦素对黑曲霉胞外可溶性蛋白含量的影响

将黑曲霉孢子悬液接种于 PDB 培养基，加入柠檬苦素使其最终浓度为 MIC 后， 28°C 恒温培养，分别于 0 h、8 h、16 h、24 h、32 h、40 h 移取孢子悬浮液，1000 r/min 离心 10 min，取上清液 0.1 mL，采用考马斯亮蓝 G-250 比色法 [11] 测定蛋白质的含量。以加入等量 15%乙醇作为对照。

1.2.5.3 黑曲霉菌丝体总糖的测定

将黑曲霉孢子悬液接种于 PDB 培养基， 28°C 下 150 r/min 振荡培养 5 d 后，加入柠檬苦素提取液使其最终浓度为 0 $\mu\text{g/mL}$ 、156.25 $\mu\text{g/mL}$ 、312.5 $\mu\text{g/mL}$ 、625 $\mu\text{g/mL}$ 、1250 $\mu\text{g/mL}$ 、2500 $\mu\text{g/mL}$ ，继续振荡培养 3 d 后，过滤得黑曲霉菌丝，用蒸馏水冲洗菌丝数遍后用滤纸吸干。得到待测菌丝后，按照蒽酮比色法 [12] 测定菌丝含糖量。以加入等量 15%乙醇作为对照。

$$\text{总糖}/\% = \frac{A \times V}{V_s \times W \times 10^6} \times 100\% \quad (5)$$

式中：A 为在标准曲线上查得的含糖量， μg ；V 为总体积，mL； V_s 为测定取样体积，mL；W 为样品质量，g。

1.2.5.4 菌丝体和孢子的扫描电子显微镜观察

取 100 μL 10^6 CFU/mL 的黑曲霉孢子悬浮液涂布在 PDA 平板培养基上， 28°C 恒温培养 48 h 后，用打孔器制得直径为 4 mm 的菌饼，将菌饼倒置在含有 2 倍 MIC 柠檬苦素的 PDA 培养基上， 28°C 培养 48 h。用无菌的镊子将平板上的菌丝刮下后，经固定、脱水、干燥、喷金后镜检 [5]。以 15%乙醇处理的菌液作为对照。

1.3 数据的统计与分析

每个测定均重复三次，结果表示为平均值 $\pm$ 标准偏差。应用 SPSS 22.0 软件 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 中的 One-Way ANOVA 对所有数据进行方差分析，利用邓肯氏多重比较对差异显著性进行分析。

2 结果与讨论

2.1 柠檬皮中柠檬苦素对黑曲霉的抑制活性

2.1.1 柠檬苦素对黑曲霉的 MIC 和 MFC

经试管法和平板法试验测定，柠檬苦素对黑曲霉的 MIC 为 625 $\mu\text{g/mL}$ ，MFC 为 5000 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.1.2 柠檬苦素对黑曲霉菌丝生长和孢子萌发的影响

由表 1 可知，柠檬苦素抑制黑曲霉孢子萌发的 EC_{50} 值较小，但柠檬苦素质量浓度对数值与菌丝生长

率具有更好的线性关系。由图1得,随柠檬苦素浓度升高,其对黑曲霉孢子萌发抑制率显著上升($p<0.05$)。菌丝抑制率在柠檬苦素浓度较低($\leq 156.25 \mu\text{g/mL}$)时,抑制率随浓度显著提高($p<0.05$);但随浓度升高,抑制率无显著变化($p>0.05$)。当柠檬苦素浓度为 $1250 \mu\text{g/mL}$ 时,黑曲霉孢子萌发抑制率和菌丝抑制率分别为 91.06% 和 60.14% ,基本抑制了孢子的萌发,可见柠檬苦素对黑曲霉孢子萌发具有更好的抑制作用。

表1 柠檬苦素对黑曲霉的毒力回归方程和 EC_{50}

Table.1 Virulence regression equation and EC_{50} of limonin

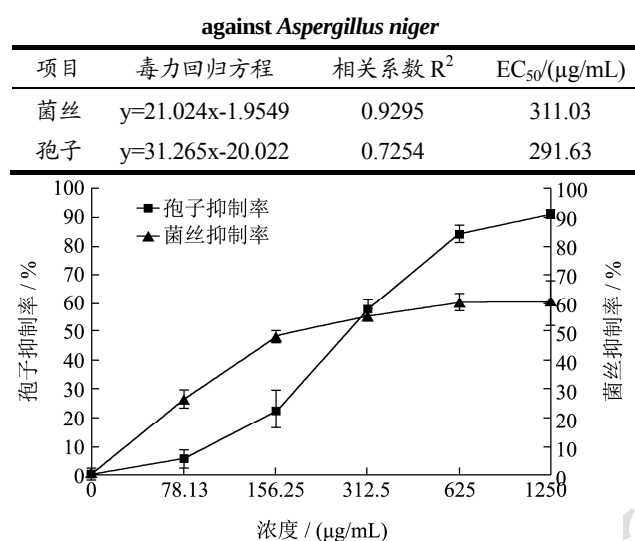


图1 柠檬苦素对黑曲霉的菌丝和孢子萌发的抑制率

Fig.1 Inhibition rate of limonin on mycelium and spore germination of *Aspergillus niger*

2.2 不同理化因素对柠檬苦素抑制黑曲霉活性的影响

由图2可知,偏酸和偏碱的环境下,柠檬苦素对黑曲霉抑菌活性较高;pH值为6和7时,抑菌活性显著低于其他pH值下的抑菌活性($p<0.05$)。可能是因为,柠檬苦素本身的pH值接近4,其酸碱环境改变使柠檬苦素成分变性,抑菌活性受到影响。但在强酸和碱性条件下,黑曲霉的生长受到抑制,从而抑菌圈直径也较大。当紫外光照时间 $\geq 30 \text{ min}$ 时,抑菌活性显著降低($p<0.05$);照射时间为 120 min 时,柠檬苦素对黑曲霉的抑菌圈直径为对照组的 84.31% 。由图2同时可知, Fe^{3+} 能显著提高柠檬苦素的抑菌活性($p<0.05$),且浓度越高、作用时间越长,增强效果越显著; Fe^{2+} 对柠檬苦素抑菌活性也存在一定的促进作用,作用时间到达 12 h 时,抑菌效果增强更明显,且低浓度的更佳。而目前已有研究发现, Fe^{3+} 对茺白乙醇提取物的抑制细菌活性有抑制作用^[13], Fe^{2+} 对黄水的抑菌活性有促

进作用^[14]。分析本试验结果的原因可能是柠檬苦素与 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 生成的螯合物具有更强的抑菌活性。

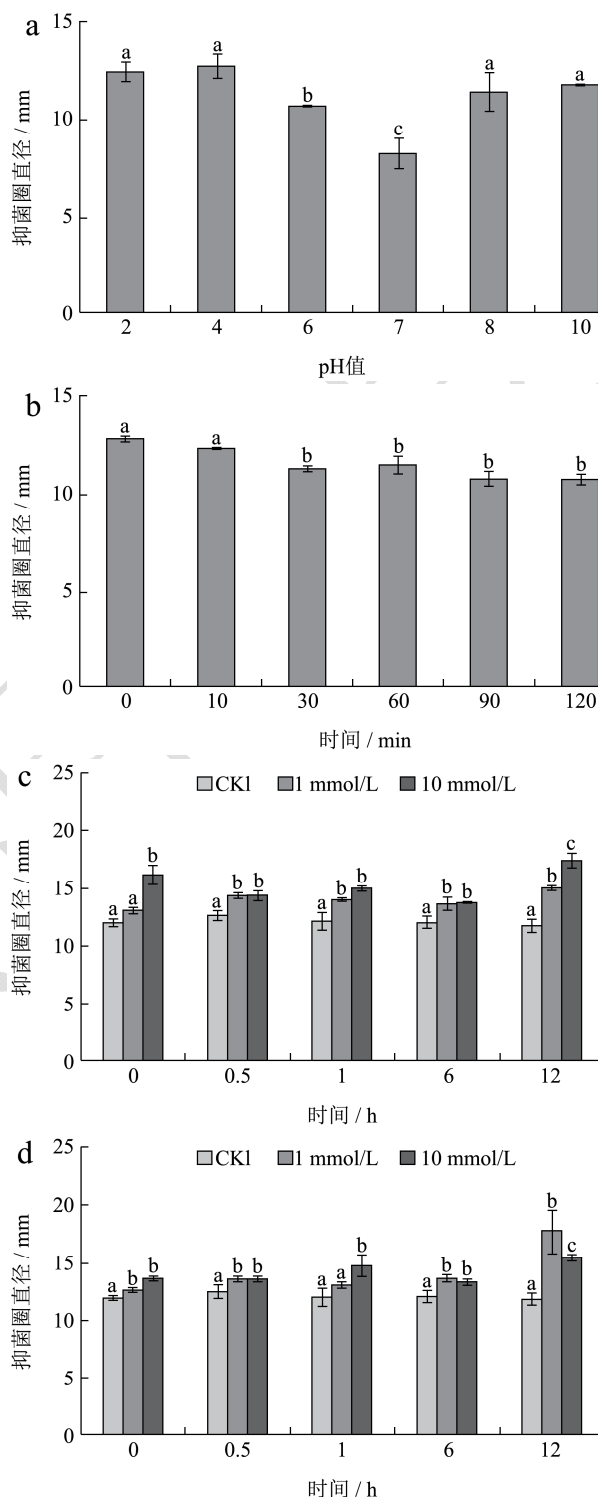


图2 不同因素对柠檬苦素抑制黑曲霉活性的影响

Fig.2 Effects of different factors on inhibition of *Aspergillus niger* by limonin

注: a~d 分别为 pH、紫外光、 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} ; c、d 中同一时间小写字母不同表示差异显著, $p<0.05$ 。

2.3 柠檬皮中柠檬苦素抑制黑曲霉的机理

2.3.1 柠檬苦素对黑曲霉细胞壁完整性的影响

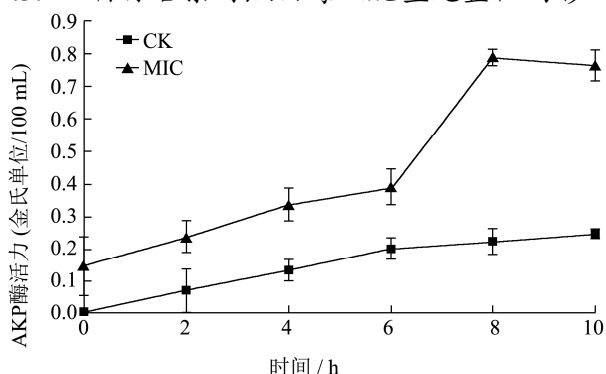


图3 柠檬苦素对黑曲霉细胞壁的影响

Fig.3 Effect of lemonoids on the cell wall of *Aspergillus niger*

碱性磷酸酶(AKP)位于菌体细胞的细胞壁和细胞膜之间,通常情况下不向外分泌,只有当菌体细胞壁的完整性发生改变后,才会释放到菌体细胞体外。因此,菌液中 AKP 含量的变化可以反映出抑菌剂对菌体细胞壁的完整性是否有破坏作用^[15]。由图3可知,CK组和经1倍MIC柠檬苦素处理后的菌液中的AKP活力均很快上升,但经柠檬苦素处理的黑曲霉培养液上清液中AKP活力明显高于CK组,且在6h后MIC组有大量AKP渗透到细胞外。说明CK组15%乙醇对黑曲霉细胞壁的完整性有一定的破坏作用;但柠檬苦素对黑曲霉细胞壁的破坏作用更强,且8h后对细胞壁的破坏作用已基本完成。

2.3.2 柠檬苦素对黑曲霉细胞膜完整性的影响

2.3.2.1 柠檬苦素对黑曲霉胞外可溶性蛋白的影响

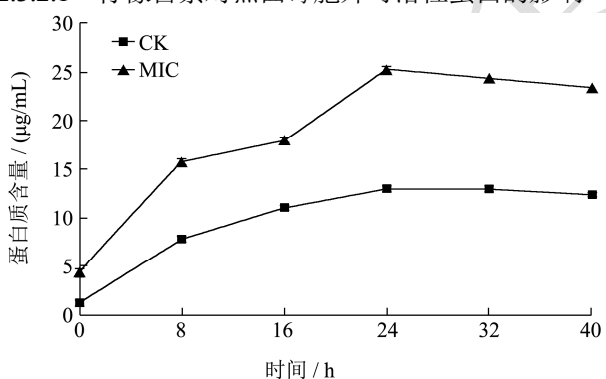


图4 柠檬苦素对黑曲霉胞外可溶性蛋白质的影响

Fig.4 Effect of limonin on extracellular soluble protein of *Aspergillus niger*

细胞膜有保护菌丝体细胞,与周围环境进行物质交换、分泌、排泄、免疫等生理功能,与菌体生长代谢有着密切的关系。真菌细胞膜是植物活性物质的重要作用靶位,植物抑菌活性物质能改变菌体细胞膜的稳定性,导致细胞膜结构受损,内含物外渗,从而达到杀菌或抑菌的效果^[10]。何梦影等^[16]研究表明,某些抑菌物质能有效抑制霉菌胞内蛋白质的合成,从而对

菌丝的生长产生抑制作用;同时也会导致菌体细胞内物质外渗,使菌丝体的可溶性蛋白含量降低,菌体自身的解毒能力下降,导致菌体生长不良。由图4可知,黑曲霉菌液中的蛋白质含量整体呈逐渐上升趋势,经柠檬苦素处理的黑曲霉菌液中蛋白质含量较对照组高;说明柠檬苦素在作用初期开始已经对黑曲霉细胞膜造成破坏,可能膜上和膜内蛋白均流出。在作用时间为24h后,胞外可溶性蛋白变化趋于稳定,说明此时对细胞膜的破坏作用已基本完成。

2.3.2.2 柠檬苦素对黑曲霉菌丝体总糖含量的影响

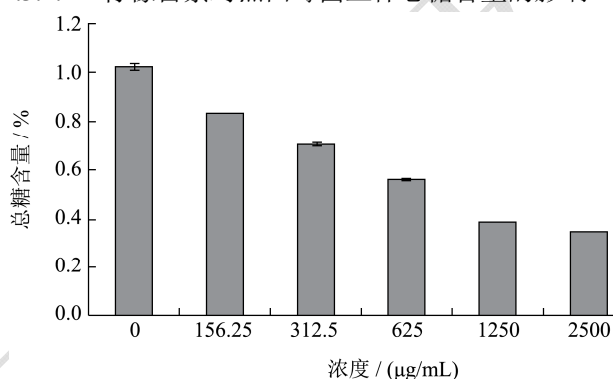


图5 不同浓度柠檬苦素对黑曲霉菌丝体总糖含量的影响

Fig.5 Effects of lemonoids on total sugar content of *Aspergillus niger*

糖原在许多生长代谢途径中起着核心作用^[16],总糖含量明显下降会影响霉菌的生长代谢,从而达到抑菌目的。由图5可知,随柠檬苦素处理浓度的增大,黑曲霉菌丝体总糖含量呈现显著下降的趋势($p<0.05$),质量浓度 $>1250 \mu\text{g/mL}$ 时,菌丝体总糖含量变化趋于平稳,质量浓度为 $2500 \mu\text{g/mL}$ 时,菌丝体总糖含量仅为未加入柠檬苦素处理时的1/3。进一步说明柠檬苦素可以破坏黑曲霉细胞膜,使菌体内含物外渗,同时,破坏性随柠檬苦素浓度增大而增强。

2.3.3 扫描电子显微镜观察柠檬苦素对黑曲霉孢子的影响

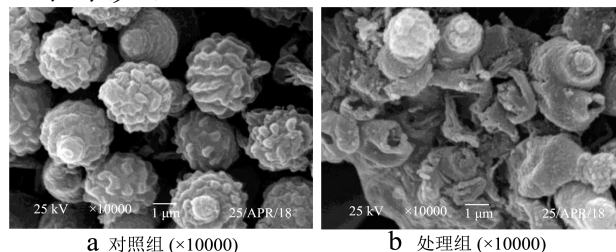


图6 黑曲霉扫描电子显微镜图

Fig.6 Scanning electron microscopy (SEM) of *Aspergillus niger*

由图6可知,经柠檬苦素处理后的黑曲霉孢子形态与对照组相比发生较为明显的变化。未经柠檬苦素处理黑曲霉孢子形态完整、规则而饱满,皱褶清晰且规则;而经2倍MIC柠檬苦素处理过的黑曲霉孢子有

明显的萎缩、破裂、变形;并可见大量的溶出物。这与柠檬苦素对黑曲霉细胞壁、细胞膜的影响部分结果一致。综上,柠檬苦素会破坏黑曲霉的细胞壁、细胞膜的完整性,造成内容物外泄,从而使黑曲霉生长受到抑制。

3 结论

3.1 柠檬苦素抑制黑曲霉的最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MFC)分别是 625 $\mu\text{g/mL}$ 和 5000 $\mu\text{g/mL}$ 。柠檬苦素对黑曲霉的孢子萌发有较强的抑制作用,并能抑制菌丝生长,较高浓度柠檬苦素对黑曲霉的孢子萌发具有更强的抑制作用。因此,将柠檬皮中柠檬苦素经过提取、纯化,应用于黑曲霉的防腐具有实际意义。柠檬苦素在酸碱环境下,抑菌活性较强;紫外光对柠檬苦素抑制黑曲霉的活性有一定的抑制作用; Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 可以提高柠檬苦素的抑菌活性,因此,可以采取适当避光处理将柠檬苦素应用在 pH 较低和较高,以及 Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 含量丰富的食品中作为防腐剂。

3.2 进一步对柠檬苦素对黑曲霉抑菌机理的研究发现,经柠檬苦素处理的黑曲霉的细胞壁和细胞膜内含物发生了大量泄露。通过扫描电子显微镜对黑曲霉的观察也发现,经过柠檬苦素处理的黑曲霉孢子形态变形、破裂,外部附有大量溶出物。因此可知,柠檬苦素通过破坏黑曲霉的细胞壁和细胞膜,使细胞破损,造成内容物渗出,从而扰乱了细胞的正常代谢,抑制菌体细胞的生长繁殖。

参考文献

- [1] 丁心,戴添基,任嘉平.柠檬加工与应用现状研究[J].农业与技术,2017,37(13):33-34
DING Xin, DAI Tian-ji, REN Jia-ping. Research on processing and application of lemon [J]. Agriculture and Technology, 2017, 37(13): 33-34
- [2] 晏敏,周宇,贺肖寒,等.柑橘籽中柠檬苦素及类似物的生物活性研究进展[J].食品与发酵工业,2018,44(2):290-296
YAN Min, ZHOU Yu, HE Xiao-han, et al. Research progress on the bioactivity of limonin and analogues in Citrus [J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(2): 290-296
- [3] 李科静.大米中霉菌的微波杀菌工艺及机理研究[D].吉林:吉林大学,2015
LI Ke-jing. Studies on microwave sterilization process and mechanism of molds in rice [D]. Jilin: Jilin University, 2015
- [4] 李长平,杨俊,黄河,等.源于凡纳滨对虾血蓝蛋白化学合成肽段的抗黑曲霉活性[J].中国水产科学,2018,25(1):189-194
LI Chang-ping, YANG Jun, HUANG He, et al. Anti-*aspergillus niger* activities on the chemical synthesis peptides derived from hemocyanin in shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2018, 25(1): 189-194
- [5] 马欢欢,林洋,吕欣然,等.96孔板法筛选抗黑曲霉性乳酸菌及抑菌机理研究[J].食品工业科技,2017,38(12):171-175
MA Huan-huan, LIN Yang, LYU Xin-ran, et al. Screening and inhibition mechanism of lactic acid bacteria against *Aspergillus niger* using 96-well microtiter plates [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(12): 171-175
- [6] 李彪,施蕊,熊智,等.柚子皮中柠檬苦素提取工艺及其抑菌活性研究[J].食品工业科技,2012,33(5):198-200
LI Biao, SHI Rui, XIONG Zhi, et al. Study on extraction and antibacterial activities of limonin in peel of *Citrus maxima* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(5): 198-200
- [7] Amit Vikram, Guddadarangavahally K, Jayaprakasha, Palmy R, et al. Limonin 7-methoxime interferes with *Escherichia coli* biofilm formation and attachment in type 1 pili and antigen 43 dependent manner [J]. Food Control, 2012, 26(2)
- [8] 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):144-149,75
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): 144-149, 75
- [9] Qiu M, Wu C, Ren G, et al. Effect of chitosan and its derivatives as antifungal and preservative agents on postharvest green Asparagus [J]. Food Chemistry, 2014, 155(15): 105-111
- [10] 蓝蔚青,车旭,谢晶,等.复合生物保鲜剂对荧光假单胞菌的抑菌活性及作用机理[J].中国食品学报,2016,16(8):159-165
LAN Wei-qing, CHE Xu, XIE Jing, et al. Antibacterial activity and mechanism of composite biological preservatives against *Pseudomonas fluorescens* [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016, 16(8): 159-165

(下转第 244 页)