

植物精油抑制真菌及真菌毒素的研究进展

李燕君^{1,2}, 孔维军¹, 李梦华^{1,3}, 杨世海^{2*}, 杨美华^{1*}

1. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

2. 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118

3. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013

摘要: 真菌及真菌毒素极易污染食品、果蔬、中药材、农产品等基质使其霉败变质, 这不仅造成巨大的资源浪费和经济损失, 还会带来潜在的安全隐患, 严重威胁人们的身体健康和生命安全, 这一问题已引起全球性的广泛关注。研究者们竭力探索科学有效的策略和措施抑制或防止诸多基质的真菌和真菌毒素污染。化学合成抑菌剂备受欢迎, 但是同时存在残毒、公害、抗性等问题, 已被禁止使用。植物精油因具有抑菌活性强、抑菌谱广、高挥发性、生物降解性良好、在基质中低残留、无毒或低毒对人体相对安全、对环境友好等优点, 可作为潜在的新型绿色防霉抑菌剂。针对植物精油的分布、抑制真菌生长及真菌毒素合成的作用、抑菌广谱性、安全性评价、抑菌机制进行综述, 以期为研发天然、绿色抗真菌剂提供科学参考。

关键词: 植物精油; 真菌; 真菌毒素; 绿色抑菌剂; 安全性评价; 抑菌机制

中图分类号: R286.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)11-2011-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.11.031

Advance in study on plant essential oils for their inhibitory effects on fungal growth and mycotoxin synthesis

LI Yan-jun^{1,2}, KONG Wei-jun¹, LI Meng-hua^{1,3}, YANG Shi-hai², YANG Mei-hua¹

1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

2. College of Traditional Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

3. School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

Abstract: Fungi and mycotoxins contamination in food, fruits, and vegetables, Chinese herbal medicines and agricultural commodities has not only led to a huge waste of resources and economic losses, but also posed the potential threats for human's safety and health, which has been widely concerned in the world. The researchers are trying their best to look for the scientific and effective methods to control the fungi growth and mycotoxins production in these matrices. Although some synthetic chemicals have been usually used as fungicides, they were still prohibited owing to the disadvantages of residues, public hazards, drug resistance, and so on. Many plant essential oils (PEOs), because of their advantages including broad-spectrum antifungal activity, high volatility, short degradation period, minimal residues, non-toxicity or low toxicity, friendly to human and environment, have the attractive attention of scientific community towards the development of eco-friendly botanical fungicides. The paper reviewed the distribution of PEOs, together with their inhibitory effects on fungal growth and mycotoxins production, antifungal spectrum, safety assessment, and antifungal mechanism to provide the scientific evidences for developing effective green fungicides.

Key words: plant essential oils; fungi; mycotoxins; green fungicides; safety assessment; antifungal mechanism

食品、谷物、果蔬、中药材等基质, 在种植、空气、光照、微生物等多种物理、化学及生物因素的采收、加工、运输尤其是储藏过程中受温度、湿度、影响, 极易被曲霉属 *Aspergillus* Link. Fr.、青霉属

收稿日期: 2015-11-12

基金项目: 海南省重大科技项目 (ZDZX2013008)

作者简介: 李燕君 (1990—), 女, 硕士在读, 生药学研究。Tel: 13718838050 E-mail: aulyj1990@163.com

*通信作者 杨美华, 女, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事中药质量分析与安全性研究。

Tel: (010)57833277 E-mail: yangmeihua15@hotmail.com

杨世海, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事药用植物栽培与育种。Tel: (0431)84533358 E-mail: jlyangs@163.com

Penicillium Link. Fr. 和镰刀菌属 *Fusarium* Link. Fr. 多种真菌污染而出现发霉变质的现象^[1-2], 这一问题已引起全球性的关注。据联合国粮食及农业组织 (FAO) 统计, 每年有 10 亿吨的农业商品受到真菌及真菌毒素的污染^[3]。真菌 (fungi) 侵染农产品后, 在适宜的温度、湿度和足够的营养条件下开始萌发繁殖, 霉菌将不断地分解产品中的糖类、蛋白质、脂肪等成分使其营养物质损失, 这不仅影响农产品的质量和产量, 造成巨大的资源浪费和经济损失, 而且产生的次级代谢产物——真菌毒素 (mycotoxin) 严重威胁着人类的身体健康和生命安全。真菌毒素是由真菌产生的具有毒性的次级代谢产物, 常见的真菌毒素主要包括黄曲霉毒素 (AFs)、赭曲霉毒素 (OTA)、伏马毒素 (FB)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (DON)、玉米赤霉烯酮 (ZEA)、T-2 毒素 (T-2 toxin) 和展青霉素 (PAT) 等^[4-5]。真菌毒素一般具有极强的急性毒性和致畸性、致癌性、致突变性的“三致”作用, 还具有肾毒性、肝脏毒性、细胞毒性、胚胎毒性、神经毒性、遗传毒性、生殖毒性、基因毒性和免疫毒性等, 给人类的身体健康造成极大的威胁^[6]。

目前, 人工合成杀菌剂如吡咯苯类、咪唑类、硫氰酸类等, 在控制农产品采后真菌及真菌毒素污染上取得了良好的效果, 但因其会引起显著残留且降解周期长、污染环境、抗性, 并有致癌、致畸性等问题, 其已逐渐被禁止使用^[7]。因此, 寻找化学杀菌剂的替代品就成为了亟待解决的问题之一。植物精油及其活性成分源于自然, 因其具有矫正异味、赋有香气、着色等特点作为天然调味料, 应用于食品行业已有悠久的历史, 能满足消费者对食品添加剂安全性的要求。植物精油及活性成分除在食品行业备受青睐外, 还具有抗真菌、抗细菌、抗病毒、抗氧化、杀虫等多方面的生物活性, 在食品、医药、农业、日化和生物农药等方面已经得到了广泛的关注^[8]。近年来, 有关植物精油及活性成分抑制真菌生长及真菌毒素产生, 用于农产品的抑菌防霉已成为国内外学者研究的热点。植物精油及其活性成分因具有较好的抗菌活性、抗菌广谱性、高挥发性、良好的生物降解性、低残留、对人体相对安全、对环境友好的特点, 能够弥补化学合成剂的一些弊端, 可作为天然绿色抑真菌剂的重要来源之一。本文就植物精油的分布, 抑制真菌生长及真菌毒素合成的活性、抑菌广谱性、安全性评价、抑菌机制进行综述, 以期研发天然、绿色抑真菌剂提供科学参考。

1 植物精油的概念及分布

植物精油 (plant essential oils, PEOs) 又称为香精油、挥发油, 是存在于芳香植物体中的一类具有挥发性、由相对分子质量较小且具有一定活性的简单化合物组成、可随水蒸气蒸馏, 且与水不能相互混溶的具有一定香味的, 在常温下能挥发的油状液体的总称^[9]。精油类化合物在植物中分布广泛, 含精油较为丰富的科属有松柏科、樟科、菊科、芸香科、姜科、伞形科、唇形科、禾本科、桃金娘科、马兜铃科、马鞭草科、毛茛科、百合科、夹竹桃科、石蒜科、蔷薇科、胡椒科、杜鹃科、木犀科等^[10]。精油在植物体内的分布随种类不同而有所差异, 有的从果实中提取, 有的则在花、叶片、根、茎、种子等器官中量较多, 还有分布于植物全株中, 且精油的成分和量随植物品种、季节、年龄、生长气候等的不同而差异明显。

2 植物精油及其活性成分的抑菌作用

2.1 植物精油抑制真菌生长和真菌毒素合成

近年来, 国内外有关植物精油抑制真菌生长及真菌毒素积累的研究较多, 见表 1。Rajaram 等^[11]研究发现藿香蓟精油能有效抑制寄生曲霉菌生长和 4 种黄曲霉毒素 (AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂) 的合成。在固态培养基中, 精油质量分数为 1.5 g/kg 时, 能够完全抑制寄生曲霉菌的生长; 在液态培养基中, 精油质量浓度为 0.75 g/L 时, 可完全抑制霉菌的生长, 且质量浓度为 0.5 g/L 时, 对黄曲霉毒素合成的抑制率高达 84%。Passone 等^[14]研究发现波尔多树精油接触法和熏蒸法的体积分数分别为 1.5 mL/L 和 2.0 mL/L 时, 能完全抑制炭黑曲霉的生长; 丁香精油接触法的体积分数为 1.5 mL/L 时, 能够完全抑制炭黑曲霉的生长, 熏蒸法的抑菌浓度因水分活度 (aw) 不同而有所差异; 在 aw 0.98、0.93 时, 2 种精油均能达到较好的抑菌作用, 其抑制率分别为 14.7% 和 78.5%, 二者在 OTA 的生物合成途径中具有抑制作用。Yamamoto-Ribeiro 等^[16]研究发现生姜精油对轮状镰刀菌的最小抑菌浓度为 2.5 mg/mL, 随着精油浓度的增大, 菌丝体的生物量在不断减少, 当质量浓度分别为 3.0、5.0 mg/mL 时, 可完全抑制 FB₂ 和 FB₁ 的生物合成。Marin 等^[17]研究发现在 aw 0.950、30 °C 时, 牛至、玫瑰草和香茅精油均能显著抑制 ZEA 的合成; 在 aw 0.995、30 °C 时, 肉桂、丁香、牛至、玫瑰草和香茅精油均能有效抑制 DON 的产生, 表明植物

表 1 具有抑制真菌生长及真菌毒素合成作用的植物精油
Table 1 PEOs with inhibiting fungi growth and mycotoxin synthesis

植物	来源科属	部位	抑制真菌	抑制真菌毒素	参考文献
藿香蓟 <i>Ageratum conyzoides</i>	菊科藿香蓟属	全草	寄生曲霉菌	AFs	11
来蒙 <i>Citrus aurantifolia</i>	芸香科柑橘属	叶子	黄曲霉菌	AFB ₁ 、AFG ₁	12
百里香 <i>Thymus vulgaris</i>	唇形科百里香属	全草	黄曲霉菌	AFB ₁ 、AFB ₂	13
波尔多 <i>Pëumus boldus</i>	蒙立木科 <i>Pëumus</i> 属	叶片	炭黑曲霉菌	OTA	14
丁子香 <i>Syzygium aromaticum</i>	木犀科丁香属	花蕾			
茴芹 <i>Pimpinella anisum</i>	伞形科茴芹属	果实	赭曲霉菌	OTA	15
生姜 <i>Zingiber officinale</i>	姜科姜属	根茎	轮状镰刀菌	FB ₁ 、FB ₂	16
牛至 <i>Common origanum</i>	唇形科牛至属	全草	禾谷镰刀菌	ZEA、DON	17
玫瑰草 <i>Cymbopogon martini</i>	禾本科香茅属	叶片	禾谷镰刀菌	ZEA、DON	17
丁香罗勒 <i>Ocimum gratissimum</i>	唇形科罗勒属	叶	扩展青霉菌	—	18
柠檬草 <i>Cymbopogon citratus</i>	禾本科香茅属	果皮	疣状青霉菌	—	19

“—” 未提及植物精油对真菌毒素合成的抑制作用

“—” No given inhibition of PEOs on mycotoxins synthesis of fungi

精油对真菌毒素合成的抑制作用可能与水分活度和温度有一定的关系。

2.2 植物精油活性成分抑制真菌生长和真菌毒素合成

植物精油的化学成分较为复杂，一种精油中往往含有十多种至上百种化学成分，其中一些主要的化学成分可能决定植物精油的抑菌活性。袁媛等^[20]研究发现丁香酚可以有效抑制黄曲霉菌的生长及 AFs 的产生，柠檬醛和丁香酚均能有效抑制禾谷镰刀菌的生长及 DON 的积累，且将 2 种活性成分应用到染菌玉米中熏蒸培养，发现在玉米含水量为 21% 时，对 DON 合成的抑制率分别为 98.33% 和 95.64%。Luo 等^[21]研究发现月桂酸甘油酯对黑曲霉菌和灰绿青霉菌的最小抑菌浓度和最低杀菌浓度分别为 0.32、0.16 g/L 及 2.50、0.63 g/L，其抑菌作用显著高于食品防腐剂山梨酸钾和苯甲酸钠。张宽朝等^[22]采用天然肉桂醛、柠檬醛作为抑菌剂，比较牛津杯法、气体扩散法对黑曲霉生长的影响。结果显示，肉桂醛、柠檬醛作用于黑曲霉后，均具有明显的抑菌效果，黑曲霉菌丝体和孢子囊的形态结构均发生了变化，且柠檬醛作用要显著大于肉桂醛，2 种成分的气体扩散法抗黑曲霉效果均优于牛津杯法。研究发现，在抑制真菌活性方面具有开发潜力的植物精油成分主要包括醛类（肉桂醛、柠檬醛、橙花醛、香茅醛、茴香醛），酚类（麝香草酚、丁香酚、百里香酚、香芹酚），醇类（芳樟醇、香茅醇、

薄荷醇）和酮类（香芹酮、薄荷酮），均有较强地抑制真菌生长及真菌毒素合成的作用^[23-29]。

2.3 植物精油及其活性成分的广谱抑菌性

研究表明植物精油及其活性成分均具有广谱的抑菌活性，见表 2。Nacini 等^[30]研究发现药用植物野蔷薇、孜然、小茴香、松、白梭梭精油对 10 种不产毒镰刀菌（茄病镰刀菌、尖孢镰刀菌）和 11 种产毒镰刀菌（串珠镰刀菌、梨孢镰刀菌、木贼镰刀菌）多种真菌生长的完全抑菌浓度的平均值分别为 165.4 和 88.9 μg/mL、159 和 185.3 μg/mL、496.4 和 532.9 μg/mL、869.7 和 852.43 μg/mL、753.5 和 1 492.6 μg/mL。其中，野蔷薇对 11 种产毒菌显示出最好的抑制活性，孜然对 10 种不产毒镰刀菌真菌的抑菌效果最显著，小茴香和松的抑菌效果次之，白梭梭的抑菌活性最低。Kumar 等^[32]研究发现圣罗勒精油对黄曲霉菌的最小抑菌浓度为 0.3 μL/mL，且在此浓度下，将黑曲霉菌、尖孢镰刀菌、链格孢菌和烟曲霉菌等 13 种真菌接种在马铃薯培养基中，考察精油的抑菌广谱性。结果显示，圣罗勒精油对所有供试菌种均能显著地抑制其生长，除炭黑曲霉、牙枝状枝孢菌、*Aspergillus paradoxus* 和尖孢镰刀菌外，对其他菌种的抑制率达 100%。Morcia 等^[36]研究发现 5 种天然活性成分松油烯-4-醇、丁香酚、香芹酮、1,8-桉叶素、麝香草酚对镰刀菌属、曲霉菌属、青霉菌属等 10 种真菌的生长均具有抑制作用，但抑菌效力各有不同。

表 2 具有广谱抑真菌活性的植物精油及其活性成分

Table 2 PEOs and their components against broad-spectrum fungus

名称	科属/来源	抑制真菌	参考文献
野蔷薇 <i>Zataria multiflora</i>	蔷薇科蔷薇属	茄病镰刀菌、尖孢镰刀菌和串珠镰刀菌等 21 种真菌	30
孜然 <i>Cuminum cyminum</i>	伞形科孜然芹属		
小茴香 <i>Foeniculum vulgare</i>	伞形科茴香属	烟曲霉菌、尖孢镰刀菌和青霉菌等 19 种真菌	31
圣罗勒 <i>Ocimum sanctum</i>	唇形科罗勒属	黄曲霉菌、烟曲霉菌和尖孢镰刀菌等 13 种真菌	32
竹叶花椒 <i>Zanthoxylum alatum</i>	芸香科花椒属	黄曲霉菌、黑曲霉菌和桔青霉菌等 12 种真菌	33
百里香 <i>Thymus vulgaris</i>	唇形科百里香属	黄曲霉菌、尖孢镰刀菌和黑曲霉菌等 9 种真菌	34
百里香酚 (thymol)	百里香精油	黄曲霉菌、赭曲霉菌和桔青霉菌等 11 种真菌	35
薄荷醇 (menthol)	薄荷精油		
丁香酚 (eugenol)	丁香精油	禾谷镰刀菌、炭黑曲霉菌和青霉菌等 10 种真菌	36
香芹酮 (carvone)	香芹精油		
柠檬醛 (citral)	山苍子精油	黄曲霉菌、桔青霉菌和禾谷镰刀菌等 5 种真菌	37

3 植物精油及活性成分的安全性评价

在寻找和筛选植物精油及其活性成分进而研发绿色抑真菌剂时, 必须基于其有效成分不仅具有较强的抑真菌作用, 而且还应具有较高的使用安全性, 应避免有毒抑真菌成分对基质造成二次污染, 需不断建立和健全植物精油及有效抑真菌成分的毒理学分析和安全性评价, 为抑真菌剂的安全使用提供有力保障。毒理学分析的方法主要有: 急性经口毒性、急性皮肤刺激、多次皮肤刺激和眼刺激实验等, 其中, 急性经口毒性实验最为常用。近些年, 国内外就植物精油的安全性评价做了大量研究, 见表 3。Singh 等^[38]研究发现木橘精油对黄曲霉菌有较强的抑制作用, 并以 ig 的形式对小鼠进行毒性实验, 结果显示该精油对小鼠经口急性毒性的半数致死量

(LD₅₀) 高达 23 659.93 mg/kg, 根据急性毒性分级标准, 属实际无毒级别^[49]。张有林等^[39]研究发现百里香精油对黑曲霉菌有抗菌活性, 且急性毒性实验显示精油对小鼠的最大无作用灌注量为 17.5 g/kg, 表明在正常使用的剂量范围内, 百里香精油不会对人类产生毒性。吴亚妮等^[46]研究发现迷迭香精油的 2 种活性成分马鞭草烯酮和 1,8-桉叶油对小鼠急性毒性的 LD₅₀ 分别为 8.088 g/kg 和 7.220 g/kg, LD₅₀ 的 95% 可信限分别为 6.983~9.843 g/kg 和 5.173~8.124 g/kg, 且其均大于 5.000 g/kg, 属于实际无毒; 1,8-桉叶油的质量分数低于 3.5% 对小鼠的急性皮肤刺激度均为 0, 属于无刺激; 二者质量分数在 50% 内, 对小鼠急性眼刺激实验显示属于无刺激性。

表 3 植物精油及活性成分的安全性评价

Table 3 Evaluation on safety limit of PEOs and their components

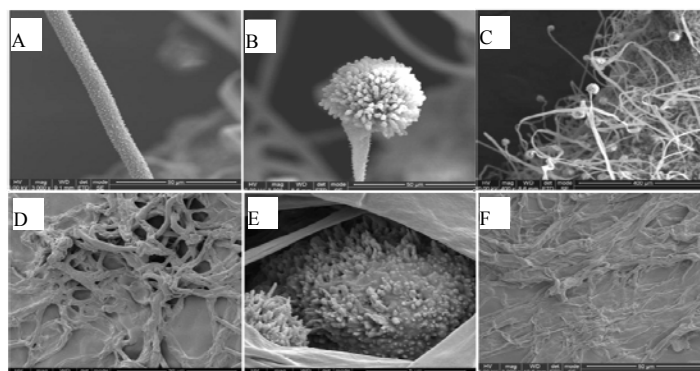
精油/活性成分	科属/来源	评价方法	实验对象	LD ₅₀ /(g·kg ⁻¹)	毒性级别	参考文献
木橘 <i>Aegle marmelos</i>	芸香科木橘属	经口急性毒性	小鼠	23.660	实际无毒	38
百里香 <i>Thymus vulgaris</i>	唇形科百里香属	经口急性毒性	小鼠	17.500	实际无毒	39
丁香 <i>Eugenia caryophyllata</i>	桃金娘科丁香属	经口急性毒性	小鼠	5.523	实际无毒	40
肉桂 <i>Cinnamomum cassia</i>	樟科樟属	经口急性毒性	小鼠	5.038	实际无毒	41
山苍子 <i>Litsea cubeba</i>	樟科木姜子属	经口急性毒性	大鼠	4.000	低毒	42
香茅 <i>Cymbopogon citratus</i>	禾本科香茅属	经口急性毒性	小鼠	3.500	低毒	43
薄荷 <i>Mentha haplocalyx</i>	唇形科薄荷属	经口急性毒性	小鼠	2.000	低毒	44
印楝素 (azadirachtin)	印楝精油	经口急性毒性	大鼠	13.000	实际无毒	45
马鞭草烯酮 (verbenone)	迷迭香精油	经口急性毒性	小鼠	8.088	实际无毒	46
1,8-桉叶油 (1,8-cineole)		经口急性毒性	小鼠	7.220	实际无毒	
丁香酚 (eugenol)	丁香精油	经口急性毒性	小鼠	3.000	低毒	47
肉桂醛 (cinnamaldehyde)	肉桂精油	经口急性毒性	大鼠	2.220	低毒	48

4 植物精油及活性成分的抑真菌作用机制

4.1 对真菌细胞壁和细胞膜的影响

罗曼等^[50]研究发现柠檬醛质量浓度为 0.5 mg/L 时, 黄曲霉菌液的实验组电解质渗出率为 18.8%, 对照组为 12.3%, 提高 32.8%, 当柠檬醛达 2 mg/L 时, 菌液电解质渗出率为 40% 以上, 结果表明柠檬醛能通过损伤黄曲霉菌的质膜, 使其失去选择通透性而进入细胞内对其他细胞器产生影响。戴向荣等^[51]研究发现肉桂醛在不同浓度和抑制方式下, 毒化黄曲霉细胞孢子, 其提取液的 260 和 280 nm 的吸光度 (A_{260} 、 A_{280}) 值都会增大, 丙二醛 (MDA) 值也均上升, 表明肉桂醛首先通过破坏黄曲霉菌细胞的质膜, 再使胞内大分子空间结构改变、新陈代谢紊乱, 从而抑制黄曲霉菌的生长。Manso 等^[52]通过扫描电镜观察肉桂精油对黄

曲霉菌超微结构的影响。由图 1 可知, 黄曲霉的分生孢子梗呈现线性、饱满管状的规则结构 (图 1-A), 分生孢子梗顶端产生近球形顶囊, 表面密集若干小孢子, 分生孢子头呈现典型的球状结构 (图 1-B), 单个菌丝体有序生长且清晰可辨, 孢子梗顶端有大量规则完整的分生孢子头 (图 1-C); 而当肉桂精油量为 10 μ L 时, 分生孢子梗表面出现凸起、凹陷、褶皱、萎蔫、变扁平的现象, 甚至出现孢子梗相互粘连在一起, 形成不规则的团聚状 (图 1-D), 分生孢子头缩小并模糊, 结构变形失去完整性 (图 1-E); 当精油量为 30 μ L 时, 菌丝体完全黏合在一起, 单个的菌丝体几乎很难辨别出来, 分生孢子也被完全抑制 (图 1-F)。结果表明, 肉桂精油能使黄曲霉细胞壁和细胞膜出现异常, 进而抑制黄曲霉菌的生长。



A~C-黄曲霉超微结构 D~F-肉桂精油引起的黄曲霉菌超微结构的变化

A~C-ultrastructure of yellow aspergillus D~F-influence of cinnamon essential oil on ultrastructure of yellow aspergillus

图 1 肉桂精油对黄曲霉菌超微结构的影响

Fig. 1 Effect of cinnamon essential oil on ultrastructure of yellow aspergillus

4.2 对真菌细胞核酸和蛋白质的影响

Luo 等^[53-54]研究发现当柠檬醛质量浓度达到 1.5 mg/L 以上时, 对黄曲霉菌造成致死性 DNA 损伤, 不能被细胞内修复系统所修复, 使核 DNA 产生不可逆损伤, 并通过显微多道分光光度分析系统、显微激光散射技术、超分辨显微图像分析技术和单细胞凝胶电泳分析技术, 在完整的细胞、亚细胞和分子水平上揭示了柠檬醛首先是通过改变黄曲霉菌细胞壁、质膜、线粒体膜的选择通透性而损伤细胞, 进入细胞后, 使菌丝体 DNA、RNA、脂类和蛋白质等生物合成受到抑制, 使有关基因不能表达, 进而使其失去对代谢的调节控制以及自我复制的正常进行, 最后导致细胞死亡。

4.3 对真菌细胞能量代谢影响及其他作用

田俊等^[55]以细胞膜和线粒体为作用靶标研究

了苜蓿子精油对黄曲霉菌的抗菌作用机制。研究发现苜蓿子精油作用于线粒体后, 抑制线粒体脱氢酶活性, 显著减少细胞内 ATP 的合成, 使细胞不能正常进行能量代谢, ATP 酶在水解反应中, 将线粒体内大量氢离子泵入至线粒体膜的间隙, 从而造成线粒体膜电位的异常; 精油作用导致线粒体的功能损伤, 进而导致线粒体内活性氧 (ROS) 的累积, ROS 通过氧化细胞内的生物大分子或介导凋亡引起黄曲霉菌死亡。罗曼等^[56]研究发现柠檬醛处理组黄曲霉菌细胞线粒体出现形态不规则、结构无序、表面粗糙的现象; 线粒体氧化还原酶琥珀酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶的活性 (以 $NADP^+$ 或 NAD^+ 为辅酶时) 以及线粒体呼吸速率均较对照组明显降低。结果表明柠檬醛一方面通过减少真菌细胞能量的合成和利用, 同时还通过降低 NADPH 合成量而减少还原力,

不可逆地抑制核酸、蛋白质、脂类及糖的合成而导致细胞死亡。

4.4 对真菌产毒基因表达的影响

真菌毒素的产生与真菌中产毒基因的调控无疑是密不可分的,如 AFs 的生物合成共涉及到 21 步酶促反应,参与其合成的绝大多数基因聚集于某特定基因簇中,其中包括黄 AFs 生物合成途径调节基因 (aflatoxin biosynthetic pathway regulatory gene, aflR),该基因为其他参与黄曲霉毒素合成的基因表达所必需,而一旦 aflR 基因被中断,可抑制其他 AFs 合成相关基因的表达,进而影响黄曲霉的产毒能力。Jermnak 等^[57]研究了白桦精油的活性成分丁香酸甲酯对寄生曲霉菌产毒基因的抑制作用。在不同精油浓度条件下培养菌株后,检测了 aflR、pksA 和 omtA 基因的 mRNA 表达水平。结果显示随着丁香酸甲酯浓度的增大, aflR、pksA 和 omtA 基因转录的抑制率也不断升高。Yaguchi 等^[58]研究了植物精油的 2 种活性成分早熟素 II 和胡椒酮对禾谷镰刀菌产毒基因的抑制作用,采用 RT-PCR 法分析检测了 Tri4、Tri5、Tri6、Tri10 产毒基因的 mRNA 表达水平。结果显示,与对照组相比,早熟素 II 加入培养基后, Tri4、Tri5 基因的转录在供试时间内均被显著抑制, Tri6、Tri10 基因的转录在 48 和 96 h 也呈现显著抑制;当胡椒酮的体积分数为 300 或 1 000 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 时,能够显著抑制 4 种基因的转录。

5 结语

我国丰富的植物资源为寻找、筛选、提取和研究植物精油及其活性抑菌成分,开发新型、安全绿色的防霉抑菌剂提供了足够的原料基础。植物精油及其活性成分源于天然,不仅能有效抑制真菌生长及真菌毒素合成,而且具有高挥发性、生物降解性良好、基质中低残留、对环境友好的特点,且其 LD₅₀ 值较高,对其安全使用提供了有力保障,植物精油及其活性成分已被《美国联邦法规》划定为“一般认为安全 (GRAS)”的范畴,提倡将其应于食品基质中进行抑菌防腐^[59-60]。我国《食品安全国家标准食品添加剂使用标准》也已将中国肉桂油、丁香叶油、罗勒油、山苍子油、生姜油、姜黄油、香叶油、迷迭香油、八角茴香油和肉桂醛、柠檬醛、大茴香醛、香叶醇、香茅醇、橙花醇、丁香酚、百里香酚、香芹酚、薄荷酮等列入允许使用的食品天然香料名单^[61],也就是说在正常使用的剂量范围内,植物精油及其活性成分不会对人类身体健康和生命安全造

成威胁。因此,植物精油及其活性成分能够代替化学合成药剂进行抑菌防霉,可作为新型绿色防霉抑菌剂的重要来源之一。近年来,有关植物精油及其活性成分抑制真菌生长及真菌毒素合成,已经越来越成为了国内外学者研究的热点。虽然,目前将植物精油作为抑菌剂应用于食品、药品、农作物中进行抑菌防霉尚处于研究的起步阶段,但随着大多数化学类防腐抑菌剂的应用越来越受到限制,以天然活性抑真菌成分为原料的植物源抑真菌剂产品必定会受到国内外市场的青睐。坚信凭借着坚实的科研基础和良好的生产工艺,以植物精油及活性成分作为原料的天然抑真菌剂必展现出巨大的开发潜力和广阔的应用前景。

参考文献

- [1] Abdin M Z, Ahmad M M, Javed S. Advances in molecular detection of *Aspergillus*: an update [J]. *Arch Microbiol*, 2010, 192(6): 409-425.
- [2] 李燕君,孔维军,胡一晨,等.植物源抑真菌剂在中药材养护中的应用前景及展望[J].*中国中药杂志*, 2015, 40(17): 43-50.
- [3] Bhat R, Rai R V, Karim A A. Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns [J]. *Compr Rev Food Sci F*, 2010, 9(1): 57-81.
- [4] 冯旭,孔维军,杨美华,等.中药中真菌毒素检测方法的最新研究进展[J].*世界科学技术—中医药现代化*, 2012, 14(5): 1944-1952.
- [5] 江曙,杨美华,段金廛,等.伏马菌素对中药材的污染及其防治技术体系的研究[J].*中草药*, 2009, 40(12): 2015-2018.
- [6] 李俊媛,万丽,杨美华.真菌毒素限量标准及其在中药中的研究进展[J].*中草药*, 2011, 42(3): 602-609.
- [7] 杨海莹,张应龙,丁新丽,等.植物精油在控制真菌及其毒素方面的应用进展[J].*粮食与饲料工业*, 2014 (5): 23-26.
- [8] 胡林峰,许明录,朱红霞.植物精油抑菌活性研究进展[J].*天然产物研究与开发*, 2011, 23(2): 384-391.
- [9] 周晓薇,王静,顾镍,等.植物精油对果蔬防腐保鲜作用研究进展[J].*食品科学*, 2010, 31(21): 427-430.
- [10] 王巨媛,翟胜.植物精油应用进展及开发前景展望[J].*江苏农业科学*, 2010(4): 1-3.
- [11] Rajaram P P, Mansingraj S N. Antia toxigenic and antioxidant activity of an essential oil from *Ageratum conyzoides* [J]. *J Sci Food Agric*, 2010, 90(4): 608-614.
- [12] Razzaghi-Abyaneh M, Shams-Ghahfarokhi M, Rezaee M B, et al. Chemical composition and antiaflatoxigenic activity of *Carum carvi* L., *Thymus vulgaris* and *Citrus*

- aurantifolia* essential oils [J]. *Food Control*, 2009, 20(11): 1018-1024.
- [13] Kohiyama C Y, Ribeiro M M Y, Mossini S A G, *et al.* Antifungal properties and inhibitory effects upon aflatoxin production of *Thymus vulgaris* L. by *Aspergillus flavus* Link [J]. *Food Chem*, 2015, 173: 1006-1010.
- [14] Passone M A, Girardi N S, Etcheverry M. Evaluation of the control ability of five essential oils against *Aspergillus* section *Nigri* growth and ochratoxin A accumulation in peanut meal extract agar conditioned at different water activities levels [J]. *Int J Food Microbiol*, 2012, 159(3): 198-206.
- [15] Soliman K M, Badea R I. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi [J]. *Food Chem Toxicol*, 2002, 40(11): 1669-1675.
- [16] Yamamoto-Ribeiro M M G, Grespan R, Kohiyama C Y, *et al.* Effect of *Zingiber officinale* essential oil on *Fusarium verticillioides* and fumonisin production [J]. *Food Chem*, 2013, 141(3): 3147-3152.
- [17] Marín S, Velluti A, Ramos A J, *et al.* Effect of essential oils on zearalenone and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* in non-sterilized maize grain [J]. *Food Microbiol*, 2004, 21(3): 313-318.
- [18] Nguéfac J, Tamgue O, Dongmo J B L, *et al.* Synergistic action between fractions of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against *Penicillium expansum* [J]. *Food Control*, 2012, 23(2): 377-383.
- [19] Nguéfac J, Dongmo J B L, Dakole C D, *et al.* Food preservative potential of essential oils and fractions from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against mycotoxigenic fungi [J]. *Int J Food Microbiol*, 2009, 131(2): 151-156.
- [20] 袁媛, 邢福国, 刘阳. 植物精油抑制真菌生长及毒素积累的研究 [J]. *核农学报*, 2013, 27(8): 1168-1172.
- [21] Luo C Y, Zeng Z L, Gong D M, *et al.* Evaluation of monolaurin from camphor tree seeds for controlling food spoilage fungi [J]. *Food Control*, 2014, 48: 488-494.
- [22] 张宽朝, 魏练平, 沈浩, 等. 肉桂醛、柠檬醛抑制黑曲霉生长的比较研究 [J]. *中国微生态学杂志*, 2011, 23(2): 141-143.
- [23] Hua H, Xing F, Selvaraj J N, *et al.* Inhibitory Effect of Essential Oils on *Aspergillus ochraceus* growth and ochratoxin A production [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e108285.
- [24] Kim E, Park I K. Fumigant antifungal activity of *Myrtaceae* essential oils and constituents from *Leptospermum petersonii* against three *Aspergillus* species [J]. *Molecules*, 2012, 17(9): 10459-10469.
- [25] Jeršek B, Poklar Ulrih N, Skrt M, *et al.* Effects of selected essential oils on the growth and production of ochratoxin A by *Penicillium verrucosum* [J]. *Arh Hig Rada Toksiko*, 2014, 65(2): 208-208.
- [26] 王娣, 谢海伟, 曹珂珂, 等. 麝香草酚抑菌活性及其影响因素研究 [J]. *食品工业科技*, 2012, 33(14): 96-99.
- [27] Manganyi M C, Regnier T, Olivier E I. Antimicrobial activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* isolates and their biofilms [J]. *S Afr J Bot*, 2015, 99: 115-121.
- [28] 蒋小龙, 寸东义, 杨晶焰. 香茅精油, 香茅醛, 香茅醇对储粮霉菌和害虫抑制与熏杀效果的试验研究 [J]. *郑州粮食学院学报*, 1994, 15(1): 39-47.
- [29] Dambolena J S, López A G, Cánepa M C, *et al.* Inhibitory effect of cyclic terpenes(limonene, menthol, menthone and thymol) on *Fusarium verticillioides* MRC 826 growth and fumonisin B₁ biosynthesis [J]. *Toxicon*, 2008, 51(1): 37-44.
- [30] Naeini A, Ziglari T, Shokri H, *et al.* Assessment of growth-inhibiting effect of some plant essential oils on different *Fusarium* isolates [J]. *J Mycol Med*, 2010, 20(3): 174-178.
- [31] Kedia A, Prakash B, Mishra P K, *et al.* Antifungal and antiaflatoxigenic properties of *Cuminum cyminum* (L.) seed essential oil and its efficacy as a preservative in stored commodities [J]. *Int J Food Microbiol*, 2014, 168: 1-7.
- [32] Kumar A, Shukla R, Singh P, *et al.* Chemical composition, antifungal and antiaflatoxigenic activities of *Ocimum sanctum* L. essential oil and its safety assessment as plant based antimicrobial [J]. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48(2): 539-543.
- [33] Prakash B, Singh P, Mishra P K, *et al.* Safety assessment of *Zanthoxylum alatum* Roxb. essential oil, its antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activity and efficacy as antimicrobial in preservation of *Piper nigrum* L. fruits [J]. *Int J Food Microbiol*, 2012, 153(1): 183-191.
- [34] Kumar A, Shukla R, Singh P, *et al.* Assessment of *Thymus vulgaris* L. essential oil as a safe botanical preservative against post harvest fungal infestation of food commodities [J]. *Innov Food Sci Emerg*, 2008, 9(4): 575-580.
- [35] Abbaszadeh S, Sharifzadeh A, Shokri H, *et al.* Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi [J]. *J Mycol Med*, 2014, 24(2): e51-e56.
- [36] Morcia C, Malnati M, Terzi V. *In vitro* antifungal activity

- of terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1,8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens [J]. *Food Addit Contam A*, 2012, 29(3): 415-422.
- [37] 余伯良, 罗惠波. 柠檬醛抗真菌及抑制黄曲霉产毒的试验报告 [J]. 食品科技, 2002(4): 47-49.
- [38] Singh P, Kumar A, Dubey N K, *et al.* Essential oil of *Aegle marmelos* as a safe plant-based antimicrobial against postharvest microbial infestations and aflatoxin contamination of food commodities [J]. *J Food Sci*, 2009, 74(6): M302-M307.
- [39] 张有林, 张润光, 钟玉. 百里香精油的化学成分, 抑菌作用, 抗氧化活性及毒理学特性 [J]. 中国农业科学, 2011, 44(9): 1888-1897.
- [40] 马松涛, 刘冬恋, 兰小平, 等. 丁香挥发油对小鼠的半数致死量测定 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2010, 12(5): 67-68.
- [41] 刘冬恋, 马松涛, 曾仁勇, 等. 肉桂挥发油对小鼠的半数致死量测定 [J]. 西南国防医药, 2010, 20(5): 481-482.
- [42] Luo M, Jiang L K, Zou G L. Acute and genetic toxicity of essential oil extracted from *Litsea cubeba* (Lour.) Pers [J]. *J Food Prot*, 2005, 68(3): 581-588.
- [43] Costa C A R A, Bidinotto L T, Takahira R K, *et al.* Cholesterol reduction and lack of genotoxic or toxic effects in mice after repeated 21-day oral intake of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil [J]. *Food Chem Toxicol*, 2011, 49(9): 2268-2272.
- [44] 张方舟, 王益, 颜文君, 等. 上下法与传统急性毒性法测定薄荷油 LD₅₀ 的试验研究 [J]. 河南科技大学学报: 医学版, 2013, 30(4): 268-270.
- [45] Rajashekar Y, Bakthavatsalam N, Shivanandappa T. Botanicals as grain protectants [J]. *Psyche: A J Entomo*, 2012, 2012: 1-13.
- [46] 吴亚妮, 王越, 黄健, 等. 2 种化学型迷迭香精油安全性分析 [J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2010, 147(2): 147-150.
- [47] Zin W A, Silva A G L S, Magalhães C B, *et al.* Eugenol attenuates pulmonary damage induced by diesel exhaust particles [J]. *J Appl Physiol*, 2012, 112(5): 911-917.
- [48] Jakheta V, Patel R, Khatri P, *et al.* Cinnamon: a pharmacological review [J]. *J Adv Sci Res*, 2010, 1(2): 19-23.
- [49] GB 15193. 3-2014 食品安全国家标准急性经口毒性试验 [S]. 2014.
- [50] 罗曼, 蒋立科, 邹国林. 柠檬醛致黄曲霉孢子丧失萌发力的机制 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2002, 18(2): 227-233.
- [51] 戴向荣, 蒋立科, 罗曼. 肉桂醛抑制黄曲霉机理初探 [J]. 食品科学, 2008, 29(1): 36-40.
- [52] Manso S, Cacho-Nerin F, Becerril R, *et al.* Combined analytical and microbiological tools to study the effect on *Aspergillus flavus* of cinnamon essential oil contained in food packaging [J]. *Food Control*, 2013, 30(2): 370-378.
- [53] 罗曼, 邹国林, 蒋立科. 柠檬醛抑制黄曲霉生长相关机理的研究 [J]. 武汉大学学报: 理学版, 2001, 47(6): 745-751.
- [54] Luo M, Jiang L K, Huang Y X, *et al.* Effects of citral on *Aspergillus flavus* spores by quasi-elastic light scattering and multiplex microanalysis techniques [J]. *Acta Bioch Bioph Sin*, 2004, 36(4): 277-283.
- [55] Tian J, Ban X, Zeng H, *et al.* The mechanism of antifungal action of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) on *Aspergillus flavus* [J]. *PLoS One*, 2012, 7(1): e30147.
- [56] 罗曼, 蒋立科. 柠檬醛损伤黄曲霉线粒体生化机理的研究 [J]. 微生物学报, 2002, 42(2): 226-231.
- [57] Jermnak U, Yoshinari T, Sugiyama Y, *et al.* Isolation of methyl syringate as a specific aflatoxin production inhibitor from the essential oil of *Betula alba* and aflatoxin production inhibitory activities of its related compounds [J]. *Int J Food Microbiol*, 2012, 153(3): 339-344.
- [58] Yaguchi A, Yoshinari T, Tsuyuki R, *et al.* Isolation and identification of precocenes and piperitone from essential oils as specific inhibitors of trichothecene production by *Fusarium graminearum* [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(3): 846-851.
- [59] Prakash B, Kedia A, Mishra P K, *et al.* Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agric-food commodities-Potentials and challenges [J]. *Food Control*, 2015, 47: 381-391.
- [60] da Cruz Cabral L, Pinto V F, Patriarca A. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods [J]. *Int J Food Microbiol*, 2013, 166(1): 1-14.
- [61] GB 2760-2014 食品安全国家标准食品添加剂使用标准 [S]. 2014.