

用香料抑制黄曲霉毒素的产生

本文研究了在米粉玉米浆(RC)培养基中的黑胡椒、肉桂、薄荷、小茴香、生姜和丁香对黄曲霉(*Aspergillus flavus*)生长和产生黄曲霉毒素的作用。经鉴定,前5种香料能抑制黄曲霉毒素的产生,而不能抑制菌丝的生长。浓度在0.1%以上的丁香则既能完全抑制菌丝的生长,也能抑制黄曲霉毒素的产生。使用5%和10%的小茴香和薄荷时,就不产生黄曲霉毒素。使用10%的黑胡椒和生姜时,黄曲霉毒素的产生减少100%,浓度较高的肉桂、薄荷、小茴香和生姜能促进菌丝体的生长。

食品中可能有毒性很高的和致癌性的霉菌毒素存在,人们广泛地研究了各种方法以便抑制霉菌毒素特别是黄曲霉毒素的产生^[1],对于能限制黄曲霉生长和产生黄曲霉毒素的天然化合物的兴趣正在不断增长^[2],现在已经知道某些香料的精油具有抗菌活性^[3],据报道,肉桂能抑制寄生曲霉(*A. parasiticus*)在酵母浸膏蔗糖培养基和葡萄干面包上的生长和产生黄曲霉毒素,而对产生黄曲霉毒素的抑制作用比对菌丝生长的抑制更强^[4]。

本文的目的是测试黑胡椒、生姜、小茴香、薄荷、肉桂和丁香等六种香料在25°C的不同浓度下对黄曲霉M93在米粉玉米浆培养基上生长和产生黄曲霉毒素的作用。

材料和方法

1. 微生物

黄曲霉M93是由设在华盛顿的美国食品和药物管理局提供的。以前的试验已证明此菌是黄曲霉毒素的高产菌^[5],菌种用Dox琼脂培养基保存,转接至马铃薯、葡萄糖、琼脂(PDA)^[6]平皿上,于28°C培养7天。

2. 培养基

由5%米粉+4%玉米浆按 Bullerma-

nn^[7]配制成(RC)培养基,(不加琼脂),以前的研究^[5]已证明此培养基比酵母浸膏蔗糖培养基(YES)更适于黄曲霉毒素的产生。

3. 培养技术

取250毫升锥形烧瓶,各装50毫升RC培养基,另将黑胡椒、生姜、小茴香、薄荷、肉桂和丁香等六种香料磨成粉末,按四种浓度(0.1%、0.5%、5%和10%,w/v)分别加入烧瓶中,以单装RC培养基的烧瓶为对照,于121°C杀菌15分钟,从PDA培养基上培养7天的菌种,各取直径1厘米的2环接入锥形瓶,在25°C培养(静置)6天后,将培养基过滤,测定pH,整个研究过程都用25°C温度,因为这是产生黄曲霉毒素的最适温度^[8]。

4. 玉米浆的制备

按Ligette and Koffler^[9]法制成。

5. 黄曲霉毒素的分析

菌丝体和培养基过滤液中的黄曲霉毒素是按以前介绍的方法^[7,10]分别测定的,萃取液经真空浓缩后,用硅胶G作薄层层析,先在乙醚中展层,再在2%甲醇/氯仿中展层^[11],黄曲霉毒素的谱带用甲醇萃取后以分光光度计法^[11]分析,黄曲霉毒素B₁和B₂按B₁的消光系数算作黄曲霉毒素B, G₁和G₂以G₁的消光系数算作G。

6. 菌丝体的干重

按Swaminathan and Koehler^[12]法测定。

结果

所研究的六种香料对黄曲霉M93的菌丝生长和产生黄曲霉毒素的影响列于表1中。

丁香是所用香料中活性最强的一种,在浓度超过0.1克/100毫升时,即能完全抑制菌丝体的生长和黄曲霉毒素的产生。而在0.1克/

不同浓度的六种香料对黄曲霉M93菌丝生长和产生黄曲霉毒素的作用

表 1

香料	香料的浓	最终 ^b	菌丝干重	黄曲霉毒素						黄曲霉毒素总量 ^a
	度克/ 100毫升	pH	克/50毫升	培养液中(微克/50毫升)			菌丝体中(微克)			
				B	G	总量	B	G	总量	
丁香	0	5.0	2.01	93.0	27.9	120.9	1016.0	101.1	1117.1	100
	0.1	4.7	1.01	45.1	7.7	52.8	75.0	38.8	1113.8	13.5
	0.5	4.2	不生 长	—	—	—	—	—	—	0
	5.0	4.2		—	—	—	—	—	0	
	10.0	4.2		—	—	—	—	—	0	
肉桂	0	5.0	2.01	93.0	27.9	120.9	1016.0	101.1	1117.1	100
	0.1	5.2	0.83	80.2	17.8	98.0	418.4	98.1	516.5	49.6
	0.5	5.5	1.02	76.1	17.7	93.8	252.5	96.7	349.2	35.8
	5.0	5.5	1.83	49.4	11.9	61.3	176.7	88.6	265.3	26.4
	10.0	5.0	2.80	14.5	5.6	20.1	53.5	24.2	77.7	7.9
薄荷	0	5.0	2.01	93.0	27.9	120.9	1016.0	101.1	1117.1	100
	0.1	7.5	2.03	69.8	23.2	93.0	434.9	48.7	483.6	46.6
	0.5	8.0	2.06	33.3	21.1	54.3	147.4	22.2	169.6	18.1
	5.0	7.5	2.28	—	—	—	—	—	—	0
	10.0	6.5	2.26	—	—	—	—	—	—	0
小茴香	0	5.0	2.01	93.0	27.9	120.9	1016.0	101.1	1117.1	100
	0.1	6.5	1.45	69.5	17.9	87.4	781.3	107.1	888.4	78.8
	0.5	6.0	1.56	62.7	12.4	75.1	395.8	29.4	425.2	40.4
	5.0	5.5	1.61	—	—	—	—	—	—	0
	10.0	5.2	2.48	—	—	—	—	—	—	0
生姜	0	5.0	2.01	93.0	27.9	120.9	1016.0	101.1	1117.1	100
	0.1	6.5	2.13	89.4	25.9	115.3	653.1	58.7	421.8	59.5
	0.5	6.5	2.25	85.6	20.9	106.5	395.8	29.5	125.3	43.0
	5.0	6.0	2.82	69.2	20.0	89.2	174.9	20.5	695.4	23.0
	10.0	5.0	3.01	—	—	—	—	—	—	—
黑胡椒	0	5.0	2.01	93.0	27.9	120.9	1016.0	101.1	1117.1	100
	0.1	7.5	1.63	94.8	24.6	119.4	300.1	55.8	355.9	38.4
	0.5	7.3	1.64	41.7	23.2	64.9	217.9	11.8	229.7	23.8
	5.0	7.3	1.78	15.4	—	15.4	117.9	—	117.9	10.8
	10.0	7.1	1.92	—	—	—	—	—	—	0

a 以对照试样的百分率表示。

b 最初pH=4.2, 每次以双份样品做实验一二未检出。

100 毫升浓度下, 对菌丝体的生长和产生的黄曲霉毒素, 可分别减为50%和13%。

肉桂在0.1%和0.5%浓度时, 菌丝体的生长分别减少 60%和 50%, 但使用 10%的肉桂时, 菌丝体的生长增加到对照的140%。

RC培养基中添加肉桂的量从0.1%上升到 10%, 则产生黄曲霉毒素的量减少了 51%到 93%。

使用0.1%~5%的小茴香时, 霉菌的生长降为70~80%, 但用量增到10%时, 则促进菌丝体的生长。在两种较低的浓度下, 小茴香对产生黄曲霉毒素的抑制作用要比较高浓度时的抑制作用小得多, 例如, 小茴香的浓度在0.1%和0.5%时, 产生的黄曲霉毒素分别减少约23%

和60%, 而在 5 %和10%浓度时, 则完全抑制了黄曲霉毒素的产生。

薄荷对菌丝体生长和产生黄曲霉毒素的影响与小茴香相似, 在使用最高浓度(5%~10%)时, 薄荷对菌丝体的生长有一定的促进作用(12.5%), 但薄荷浓度在0.5%以上时, 即无黄曲霉毒素检出。在使用前三种浓度时, 培养基的pH升到了碱性范围。

用不同量的生姜处理的培养物, 菌丝体的重量都高于对照者, 生姜浓度到10%时, 菌丝体重量约达150%, 生姜用量在0.1%~5%时, 产生的黄曲霉毒素减少41%~77%, 生姜用量更多(10%)时, 则完全抑制了黄曲霉毒素的产生。

黑胡椒在0.1%, 0.5%, 5%和10%浓度时, 产生的黄曲霉毒素分别减少62%, 76%, 89%和100%, 但对菌丝体的生长没有这样显著的抑制作用, 在所用的浓度下, 菌丝体的重量只减少5%~20%。

讨论

一般认为某些香料的香精油具有拮抗微生物的活性, 但对微生物某个特定过程的作用则至今未有阐述^[4,13], 香精油中的醌类对过氧化物酶和霉菌中的其他酶类有强烈的抑制作用。

在所研究的六种香料中, 丁香是唯一具有杀霉菌活性的香料, 此结果与 Bullerman 等人^[15]的相同, 根据 Merory^[16]的研究, 丁香含有14%~20%的挥发油, 其中95%是丁子香酚, 由此得出结论^[15], 丁子香酚是该香精油中的主要抗霉菌成分。除此之外, 丁香还含有香草醛^[17], 它与丁子香酚一起^[18]起着杀霉菌的作用。

所研究的其他五种香料则有拮抗黄曲霉毒素产生的作用而不是杀霉菌的作用。

我们的结果同以前的报道^[4,15,19]一样, 肉桂对菌丝体的生长虽无抑制作用^[15]但对黄曲霉毒素的产生是种有效的抑制剂, 肉桂含有0.5%~1.0%的挥发油, 它由约8%的丁子香酚, 肉桂酸和75%的肉桂醛组成^[16], 这三种物质特别是肉桂醛起着抑制作用^[15], 在所研究的香料中, 肉桂是唯一不能100%抑制黄曲霉毒素产生的香料。

薄荷油含有50%~78%的游离萜烯醇, 5%~20%的酯类、L-萜烯、薄荷酮、桉树脑和非萜烯等成分^[17], 这些成分中的萜烯类及其氧化衍生物^[18], 可能是薄荷中对产生黄曲霉毒素起抑制作用的成分, 在这方面有报道^[13], D-萜烯—桔子油的主要成分^[20,21]—对寄生曲霉(*A.parasiticus*)产生黄曲霉毒素有抑制作用, 桔子油中萜烯类的氧化衍生物可能属于此类作用^[22]。而薄荷中的戊酸^[17]对黄曲霉毒素的产生可能也有抑制作用^[23]。

小茴香中存在的枯名醛和三聚乙醛^[17]对

黄曲霉毒素的产生可能起着抑制作用。

生姜对产生黄曲霉毒素的抑制作用可能是由于存在的挥发油(1%~3%)和姜酚(0.5%~1.5%)^[17], 姜酚包含数种同系的酚类。与此类似, Swaminathan and Koehler^[12]从马铃薯中分离出一种寄生曲霉(*A.parasiticus*)的抑制剂, 并推断该化合物即为天然酚类。生姜也含有一些萜烯类^[17], 并与萜烯^[13]一样具有抑制作用。但是, 高浓度的生姜对霉菌生长的促进作用可能是由于淀粉和粘质被用作霉菌生长的碳源。

黑胡椒中存在的香精油(1%~2%)含有萜烯、双萜烯、非萜烯和佳味碱, 可能是对产生黄曲霉毒素起抑制作用的成分。

值得注意的是薄荷和小茴香在高于0.5%的浓度时, 抑制了黄曲霉毒素的产生, 该浓度比生姜或黑胡椒抑制黄曲霉毒素的产生所需的浓度(10%)要低得多。

根据 Masimango et al^[19]的见解, 如果一种化合物能比对照的少产生50%的黄曲霉毒素, 即可认为该化合物是种有效的抑制剂。因此, 试验中所用的六种香料在一定用量下均可认为产生黄曲霉毒素的有效抑制剂, 从廉价、安全和有效地控制食品中黄曲霉毒素的污染出发, 这六种香料都是可以采用的配料, 因为它们本来就是调味品^[24]。氯化汞和硫脲等杀霉菌剂因为有毒, 不能用于食品^[25], 据我们所知, 黑胡椒、薄荷、小茴香和生姜等四种香料还是首次被研究用于控制黄曲霉(*A.flavus*)菌丝体的生长和黄曲霉毒素的产生。

参考文献

- [1] Nduka U, Cassity TR, Chipley JR(1977) Can J Microbiol 23:1580
- [2] Buchanan RL, Fletcher AM(1978) J Food Sei 43:654
- [3] Frazier WC(1967) Food Microbiology. 2Ed, McCraw-Hill Book Company, New York
- [4] Bullerman LB(1974) J Food Sci 39:1163
- [5] Mabrouk SS, El-Shayeb NMA(1978) Abst XII Intern. Cong-Microbiol. Munich p 168

(下转第8页)

- [3] Peggy, L.P., Nutrition in infancy and childhood.102-1103.1977.
- [4] Györsy, P., Am.J. Clin. Nutr. 24:970. 1971.
- [5] Bezkorovaing, A., et al, Ibid.7:1428-32. 1979.
- [6] FAO of the united Nation, Amino-Acid Content of Foods and Biological data on Protein.133-135.1970.
- [6a] 中国医学科学院 卫研所编: 食物成分表, 人民卫生出版社.1976.
- [7] Miller, S., et al, Proc.Soc.Exptl.Biol. Med.77:96. 1951.
- [8] Mauron, J., et al, Arch.Biochem.Biophys.59:433.1955.
- [9] Forsum, E., et al, Nutrition Reports International.6:815-20. 1979.
- [10] Posti, L.P., et al, Composition of Foods-Diary and egg products-Raw, Processed, Prepared, USDA Agriculture Handbook.8-1.Washington, D.C.77,107, 1976.
- [11] Food and Nutrition Board, Dietary Fat and Human Health, Pub. 1147.6, 1981.
- [12] Fomon, S.T., Infant Nutrition, Philadelphia.1976.
- [13] Watking, J.B., et al, Pediatrics. Clin.N. Am.20:501, 1974.
- [14] Areekul, S., et al, J.Med.Associ.Thailand.2:81-84.1978.
- [15] Macy, I.G., et al, Human milk and Cow's milk in human nutrition. In milk, The mammary gland and its secretion.2:265-304, 1961.
- [16] Sarrinen, U.M., et al, J.Pediatr.91:36-39, 1977.
- [17] WHO Tech.Rep.ser.No.532. Trace Elements in Human Nutrition.1973.
- [18] Tinanoff, N., et al, J. Dentistry for Children.1:53-55, 1978.
- [19] Bulldn, J.J., et al, Brit. Med. J.1:69, 1972
- [20] Antia, A.u., et al, Arch. Dis. Child.43: 459.1968.
- [21] Roger, H.J., et al, Infect. Immun. 7: 445-556.1973
- [22] Barlow, B., et al, J. Pediat. Surg.50:29-35.1974.
- [23] Ford, J.E., et al, J. Pediatr. 90:29-35. 1977.
- [24] Smoczyński, S., Nutr. Abstr & Revs. 9:671, 1980.

徐宗鹄

(上接第16页)

- [6] Shotwell OL, Hesseltine CW, Stubblefield RD, Sorenson WG(1966) Appl Microbiol 14:425
- [7] Bullerman LB(1974) J Milk Food Technol 1 37:1
- [8] Mabrouk SS, El-Shayeb NMKA (1979) Abst. 6th Intern. Symp. on Animal, Plant and Microbial Toxins. Toxicon 17:110
- [9] Ligette RW, Koffler H (1948) Bacteriol Rev. 12:297
- [10] Saito M, Ohtsubo K, Umedo U, Enomoto M, Kurato H, Udagawa S, Sakabe F, Ichinoe M(1971) Jap J Exp Med 41:1
- [11] Nabney J, Nesbitt BF (1965) Analyst 90:115
- [12] Swaminathan B, Koehler PE (1976) J Food Sci 41:313
- [13] Alderman GG, Marth EH(1976) Z Lebensmittel Unters Forsch 160:353
- [14] Marazella JC, Liguori L (1958) J Am Pharm Assoc Sci Ed 47:250
- [15] Bullerman LB, Lieu Fy, Sally AS(1977) J Food Sci 42:1107
- [16] Merory J(1960) Food Flavorings, Composition, Manufacture and Use. Avi Publications Company, Westport p 114
- [17] Claus EP(1962) Pharmacology. 4th Ed. Lea & Febiger
- [18] Campbell N (1967) Schmidt's Organic Chemistry. 8th Ed. Oliver & Boyd, Edinburgh and London
- [19] Masimango N, Ramaut JL, Remacle J (1978) Rev Farm Indust Alim 33:116
- [20] Braverman JBS (1949) Citrus Products. Interscience Publishing
- [21] Kirchner JG (1961) Oils in Peel Juice Sac, and Seed. In Sinclair WB(ed) The Orange. University of California
- [22] Subba MS, Soumithri TC, Rao RS(1967) J Food Sci 32:225
- [23] Schultz DL, Lendecke LO(1977) J Food Protec 40:304

陈葆新