

肉桂醛抑制黄曲霉机理初探

戴向荣¹, 蒋立科¹, 罗 曼^{2,*}

(1. 安徽农业大学生命科学学院, 安徽 合肥 230036

2. 暨南大学生命科学技术学院生物医学工程系, 广东 广州 510632)

摘 要: 肉桂油为新发现的天然抗菌防腐香精油, 其有效成分为肉桂醛。本研究采用肉桂醛抑制黄曲霉生长过程, 并通过测定不同抑制方式下孢子提取液光密度、丙二醛值的变化, 初步揭示该醛抑菌防腐的生物化学机理, 为其在食品上的抗菌防腐应用提供科学依据。结果发现肉桂醛的不同浓度、抑制方式毒化黄曲霉细胞孢子提取液的 OD_{260nm} 、 OD_{280nm} 值都增大, 丙二醛(MDA)值也均上升, 表明肉桂醛能通过损伤黄曲霉细胞质膜而进入细胞, 使胞内大分子空间结构改变并且有序的新陈代谢被破坏, 导致抑制黄曲霉的生长。

关键词: 肉桂醛; 黄曲霉; OD ; 丙二醛

Preliminary Study of Cinnamaldehyde Inhibition on *Aspergillus flavus*

DAI Xiang-rong¹, JIANG Li-ke¹, LUO Man^{2,*}

(1. College of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China;

2. Department of Biomedical Engineering, College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Cinnamon oil is a new natural antifungal essential oil, and its effective compound is cinnamaldehyde. In this study, cinnamaldehyde was used to inhibit *A. flavus* and to determine the values of UV spectrophotometry and malondialdehyde by different inhibition means. The results preliminary revealed the biochemistry mechanism of cinnamaldehyde inhibition on *A. flavus* so as to provide the scientific basis for its application on antifungal and antiseptic effects on food. The values of OD_{260nm} , OD_{280nm} and malondialdehyde of *A. flavus* spore extracting solutions were found increasing in different cinnamaldehyde concentrations and inhibition ways. This indicated that cinnamaldehyde can enter the *A. flavus* cell by damaging its cell membrane, so as to change its biomacromolecules spatial structures, destroy its ordered metabolism and inhibit the *A. flavus* growth.

Key words: cinnamaldehyde; *Aspergillus flavus*; OD value; malondialdehyde

中图分类号: Q935 TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)01-0036-05

袁萍等^[1]于2001年报道肉桂油具有较好抗菌性, 并与山苍子油抗菌性作了比较, 二者抗菌性不相上下, 为在粮油及食品上的防腐保质研究提供了重要参考。肉桂(cinnamon)为樟科植物肉桂(*Cinnamomum cassia* Prel.)的干燥枝皮或干皮, 又名桂皮、大桂、牡桂、紫桂、玉桂等。它既是食用香料, 又是名贵中药。肉桂含挥发油(称肉桂油或桂皮油), 除抗菌的主要成分肉桂醛(cinnamaldehyde)外, 还含少量桂皮酸、乙酸桂皮酯、乙酸苯丙酯、肉桂醇及香豆素等^[2]。张文娟^[3]对其肉桂醛抗黄曲霉等8种真菌感染进行了研究, 表明该醛不仅具有明显抗黄曲霉等真菌的作用, 且经一定浓度肉桂醛作用后观察到细胞超微结构发生明显变化(如细胞器消失, 胞壁、胞浆等均发生凝固、变性等)。目前, 对

于其该醛抗菌性除了形态结构变化作了一定的技术性推测, 其具体生化机理尚未见报道。

本研究以肉桂醛作为天然抗菌抑制剂, 对该醛采用不同浓度和毒化方式观察该醛对黄曲霉生长的抑制过程, 并从生化方面探讨该醛对黄曲霉细胞孢子内大分子所产生 OD_{260nm} 、 OD_{280nm} 值和脂质过氧化的影响, 揭示其相关的生理生化机理, 为其开发应用提供理论依据和技术参数。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 菌种

收稿日期: 2006-11-29

基金项目: 国家发改委、农业部中试项目(农计函[2004]514)

作者简介: 戴向荣(1979-), 男, 硕士研究生, 研究方向为生物物理化学。E-mail: daixiangrong0904@126.com

*通讯作者: 罗曼(1963-), 女, 教授, 博士, 研究方向为生物物理化学。E-mail: txiongglu@jnu.edu.cn

黄曲霉(*Aspergillus flavus*, *A. flavus*)菌株由本校蒋立科教授从档案中筛选并由中国科学院微生物研究所真菌室齐祖同研究员鉴定。

1.1.2 试剂

肉桂醛 Sigma公司; 丙二醛(MDA)试剂盒 南京建成生物技术责任有限公司; Tris-HCl 缓冲液; 0.9%的NaCl溶液; 0.1%的Tween-20溶液。

1.1.3 培养基

PDA培养基。

1.1.4 仪器

UV-1600 紫外可见光光度计; 恒温水浴锅; 加液器; 恒温箱; 超净工作台。

1.2 方法

1.2.1 黄曲霉菌悬液制备

用接种环挑取4~5环培养5d左右的黄曲霉孢子于10 ml带无菌玻璃珠的无菌水中制成均匀的孢子悬液(调整孢子的浓度约为 10^6 cell/mol)。

1.2.2 不同浓度肉桂醛的抑菌实验

在灭过菌含PDA培养基的培养皿中, 分别接入黄曲霉孢子悬液各100 μ l。用甘油将肉桂醛稀释成梯度浓度(0.0~5.0 μ l/ml), 然后用移液枪吸取300 μ l稀释的不同浓度肉桂醛滴到灭过菌的直径为1 cm的小滤纸片上, 将蘸有不同浓度肉桂醛的滤纸片放入已经接种的培养皿中央, 盖上培养皿盖子, 28℃恒温箱培养3~4d, 每种浓度重复10个, 观察并测量每个浓度下抑制圈直径的平均大小。

1.2.3 空气毒化扩散所培养孢子提取液的光密度测定

取浓度为 10^6 个/ml的黄曲霉孢子悬液100 μ l, 均匀涂布于含PDA固体培养基的培养皿上, 将浸入1ml甘油稀释的各个浓度的肉桂醛(其中肉桂油浓度为: 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 μ l/ml)的滤纸片用透明胶贴入培养皿盖的中央, 盖上培养皿于28℃下培养3d后(此时平板上分为抑制圈内外两种情况), 用消过毒的小刀将抑制圈内的培养基切下后放置在空的培养皿上。在每个培养皿中用10ml 0.9% NaCl(含1%吐温)溶液洗孢子, 离心, 弃上清液(重复2~3次), 每个培养皿的孢子集中在一个小离心管经离心收集孢子, 用液氮和石英砂研磨破碎, 再在每个研钵中加4ml Tris-HCl缓冲液洗出破碎的孢子, 经离心, 取上清液, 于280nm和260nm下分别测定OD值。

1.2.4 液体毒化方式孢子提取液的光密度测定

取浓度为 10^6 个/ml的黄曲霉孢子悬液100 μ l, 均匀涂布于含PDA固体培养基的培养皿上, 26~28℃的恒温箱培养3~4d。再在每个培养皿中用10ml 0.9% NaCl

(含1%吐温)溶液洗培养的孢子, 离心, 去上清液(重复2~3次), 每个培养皿的孢子集中在小离心管中, 每支离心管加入1ml经甘油稀释的不同浓度的肉桂醛(其浓度分别为0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 μ l/ml), 每隔1h混匀一次, 共毒化18h离心, 收集孢子, 加液氮用研磨破碎孢子, 再加入4ml Tris-HCl缓冲液浸提30min, 离心, 于280nm和260nm下分别测定OD值。

1.2.5 丙二醛(MDA)的测定

根据试剂盒提出的操作过程进行测定: (1)黄曲霉孢子预处理。按照上述1.2.4所述孢子用含1% Tween-20的生理盐水反复洗涤, 于3000r/min离心收集孢子, 用液氮破碎后, 再用4倍体积0.15mmol/L Tris-HCl(pH7.2)的缓冲液洗涤研钵并提取, 加相当于细胞破碎液2倍体积的无水乙醇(约0.5ml)在旋涡混匀器上充分混匀30s; 再加相当于细胞破碎液的2倍体积的氯仿(约0.5ml)于旋涡混匀器上混匀1min, 然后于3000~4000r/min离心8min。此时液体分三层, 上层为MDA抽提液, 中层为AFS蛋白沉淀物, 下层为氯仿层。用分液漏斗取上清液。(2)测定光密度。严格按照试剂盒说明书操作, 并按下式计算MDA:

$$\text{组织中MDA含量(nmol/mg)} = \frac{\text{测定管光密度} - \text{测定空白管光密度}}{\text{标准管光密度} - \text{标准空白管光密度}}$$

$$\times \text{标准品浓度(10nmol/ml)} \div \text{蛋白含量(mg/ml)}$$

1.2.6 蛋白含量的测定

依据该试剂盒所叙原理“凡分子中含有两个氨基甲酰基(-CONH₂)的化合物能与碱性溶液作用, 形成紫色复合物, 这一反应称为双缩脲反应, 蛋白质分子中有许多肽键(-CONH-)都能起此反应, 各种蛋白显色程度基本相同”及试剂的配制规则操作: [试剂1]配制。用时将粉剂加蒸馏水至100ml; [试剂2]配制。用时将粉剂加蒸馏水至200ml。待试剂1与试剂2完全溶解后充分混合即成双缩脲试剂。蛋白标准液浓度为50g/L。

蛋白质含量的测定所加试剂按表1操作, 加完试剂即混匀, 37℃水浴10min, 流水冷却至室温后, 于波长540nm处用1cm空白管调零, 测定各管OD值, 并计算。

表1 蛋白质含量测定所加试剂

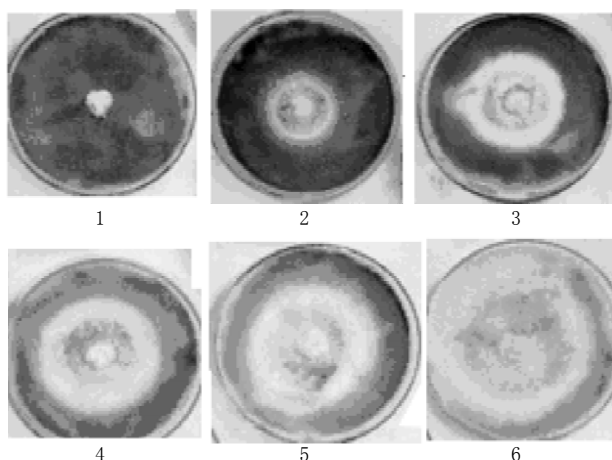
Table 1 Reagent to determine protein content			
加入物(ml)	空白管	标准管	测定管
蒸馏水	0.05		
标准品		0.05	
样品			0.05
双缩脲试剂	2.5	2.5	2.5

$$\text{蛋白含量(mg/ml)} = \frac{\text{测定管OD值}}{\text{标准管OD值}} \times \text{蛋白标准浓度(mg/ml)}$$

2 结果与分析

2.1 不同浓度肉桂醛的抑菌效果的比较

不同浓度肉桂醛抑制黄曲霉生长的效果(图1)和抑菌圈直径大小(表2)表明,随着肉桂醛浓度的增大,抑菌圈的直径逐渐增大,抑菌效果越明显,说明肉桂醛的抑菌效果与该醛剂量不仅存在对应关系,并且当该撤去醛再继续将培养物保存该培养环境下,5d后仍无菌斑出现,也反映这种抑菌效果并不是对代谢途径中相关酶活性的抑制,而是该醛和相关酶发生了不可逆结合,甚至可能是改变了相关酶空间结构所致。



1号至6号分别是肉桂醛浓度为0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 μl/ml 时产生的抑菌圈。

图1 不同浓度肉桂醛的抑菌效果

Fig.1 Effects of different contents cinnamaldehyde inhibition on *A.flavus*

表2 不同浓度肉桂醛抑菌圈大小

Table 2 Circle sizes of different contents cinnamaldehydes			
肉桂醛浓度 (μl/ml)	抑菌圈大小 (cm)	肉桂醛浓度 (μl/ml)	抑菌圈大小 (cm)
0	0	3.0	3.85
1.0	2.3	4.0	4.65
2.0	3.5	5.0	7.65

2.2 空气扩散毒化方式孢子提取液的光密度测定

采用空气扩散毒化方式对孢子提取液所测光密度结果(图2)表明,随着肉桂醛浓度的增大,不论是280nm还是260nm处的光密度都逐渐增大。通常蛋白质的最大吸收峰在280nm处,但发现蛋白质在260nm处也有少量吸收,且相当于核酸的1/10;核酸的最大吸收峰在260nm处。提示了一些蛋白质空间严密的结构损坏而呈伸展状态,使一些对紫外光敏感基团裸露,另一方面OD_{260nm}的上升,提示了可能为DNA对RNA转录及翻译系统合成增强,从而加快蛋白质合成使其那些因该醛作用而降低功能的蛋白。

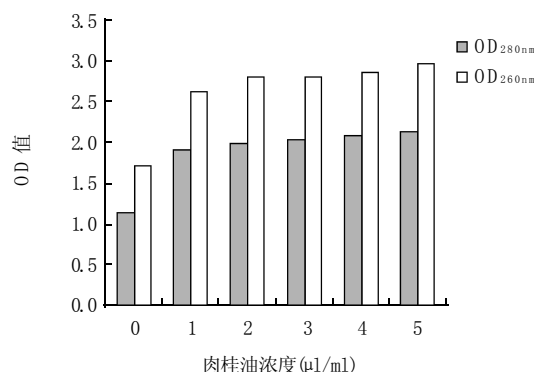


图2 空气扩散毒化方式OD值与肉桂醛浓度关系

Fig.2 Relationship between OD value and cinnamaldehyde contents by gas diffused way

2.3 液体毒化组孢子提取液的光密度测定

对液体毒化方式所得孢子提取液的光密度(图3)测定表明,随着肉桂醛浓度的增大,280nm处的光密度呈现微弱下降,260nm处的光密度则呈逐渐增大的趋势。

与对照组相比,对实验组两种毒化方式制备提取液所测OD值与肉桂醛浓度对应关系(图3)表明,空气毒化组无论是OD_{260nm}还是OD_{280nm}较相应液体毒化组大,反映气体媒介传质效果比液体媒介好。

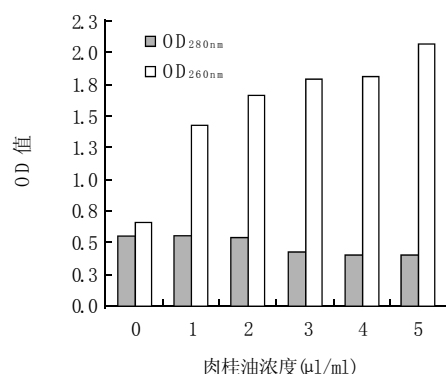


图3 液体毒化方式OD值与肉桂醛浓度关系

Fig.3 Relationship between OD value and cinnamaldehyde contents by liquid diffused way

2.4 丙二醛(MDA)的测定

肉桂醛毒化后细胞内外液的MDA含量变化(图4)表明,随着肉桂醛毒化浓度的增加,不论是细胞外液还是细胞内液,丙二醛含量都呈现逐渐增大趋势,并且细胞内液的丙二醛含量明显低于细胞外液。

测试MDA的量常常可反映机体脂质过氧化程度,可间接反映出细胞损伤的程度。脂质过氧化通常是由氧自由基攻击生物膜中的许多不饱和脂肪酸引发所产生的,并因此形成脂质过氧化物(RCOO⁻)。从图5可看出实验组胞外液MDA的含量远远地大于对照组;而实验组胞内液MDA的含量虽较对照组有明显增大,但

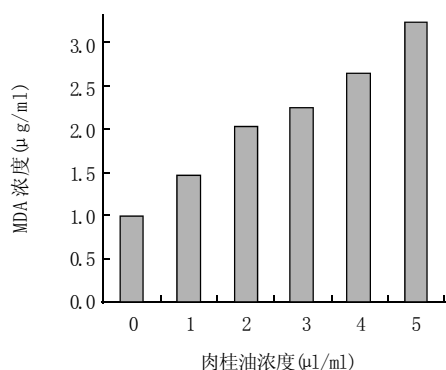


图4 肉桂醛毒化的黄曲霉孢子的胞内液MDA含量与浓度的关系

Fig.4 Relationship between *A.flavous* intracellular MDA and cinnamaldehyde contents

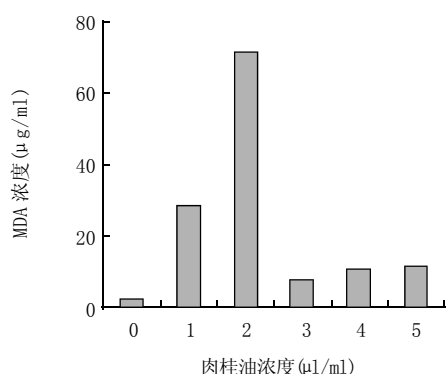


图5 肉桂醛毒化的黄曲霉孢子的胞外液MDA含量与浓度的关系

Fig.5 Relationship between *A.flavous* extracellular MDA and cinnamaldehyde contents

增加的幅度远不如实验组的胞外液。这一结果一方面说明细胞膜的脂质过氧化程度要比细胞内膜系统的脂质过氧化要大得多,另一方面表明在细胞膜上首先发生脂质过氧化的变化,并将脂质过氧化物释放到细胞外。提示了肉桂醛首先与细胞膜作用引发膜的脂质过氧化而导致膜损伤。实验组胞内液MDA含量高于对照组,说明对照组产生的自由基量少。这一结果反映由于该醛进入细胞内后膜脂质过氧化干扰了有序级联反应或由于线粒体内膜上氧化还原系统的破坏,降低了自由基的清除能力,致使自由基含量的增高。

3 讨论

3.1 肉桂醛抑菌作用的剂量效应

由上述实验结果可以看出,随着肉桂醛浓度的增大,其抑制黄曲霉生长的抑菌圈的直径也逐渐增大。这表明肉桂醛抑制黄曲霉作用的大小依赖于剂量,当达到一定浓度后可以杀死菌体,黄曲霉生长被完全抑制,呈现出该醛首先破坏菌物表面结构,使细胞表面形态结构失去对周围物质选择性通透性的吸收和转运。这种破坏性对整个细胞表面形态均有普遍性,其范围大小与该醛

剂量相关。

3.2 两种不同毒化方式的比较

从图3可看出,液体毒化组OD值大小与香精油浓度的相关性比空气毒化组好,这可能与液体媒介的传质过程均匀性有关。280nm处的OD值在空气毒化组呈上升趋势,而在液体毒化组虽幅度不大,但总体呈下降趋势。这种差异主要由于液体毒化方式下孢子所处特殊环境有直接关系。第一,肉桂醛的胁迫通过破坏基因正常表达而影响蛋白质合成;第二,该醛可能是与代谢途径中关键酶活性部位结合,而使某些代谢途径阻断或使相关酶蛋白改变了空间结构而减小了活性;第三,通过该醛影响质膜,破坏膜的选择通透性,影响了营养的吸收与转运,干扰了正常的代谢。基于上述原因,孢子内因活性蛋白质总量减少而使得280nm处的OD值减少的作用远比因构象变化而使OD值增大的作用要大得多,故表现出对OD值减少的综合效应。肉桂醛对蛋白质大分子构象变化和其聚集状态的影响虽从280nm处的紫外吸收情况无法反映出,但260nm处的紫外吸收情况也同样说明肉桂醛的这种作用。

3.3 肉桂醛通过阻断新陈代谢途径影响菌体生长

图1及OD_{260nm}、OD_{280nm}的测定结果均反映该醛抑制菌体生长是通过抑制某些代谢途径的关键酶,阻断了生长过程一系列生化级联反应,从而减少生命过程所需能量及生长过程中生物合成所需碳素和氮素、还原力。最终导致孢子不能正常萌发,不能生长成菌落。充分表明了菌体内代谢不能正常进行。因此,该醛具有抑菌性。

3.4 肉桂醛通过脂质过氧化作用损伤质膜

机体通过酶系统与非酶系统产生氧自由基,后者能攻击生物膜中的不饱和脂肪酸引发脂质过氧化作用,并因此形成脂质过氧化物。例如:酮基、羟基、羰基、醛基(丙二醛MDA)、氢过氧基或内过氧基以及新的氧自由基等。脂质过氧化作用不仅把活性氧转化成活性化学剂,即非自由基性的脂类分解产物,而且通过链式或链式支链反应,放大活性氧的作用。因此,初始的一个活性氧能导致很多脂类分解产物的形成,这些分解产物中,一些是无害的,另一些则能引起细胞代谢及功能障碍,甚至死亡。氧自由基不但通过生物膜中许多不饱和脂肪酸的过氧化引起细胞损伤,而且还能通过脂质过氧化物的分解产物引起细胞损伤。因而测定MDA的量常常可反映机体内脂质氧化的程度,并间接地反映出细胞损伤的情况。实验数据还表明:经该醛毒化作用后,黄曲霉孢子的蛋白质分子的质膜和分子内部都受到了损伤,而细胞膜上缺少线粒体对自由基无清除系统,因此使其膜上自由基浓度高于线粒体系统。对孢

子的萌发起到了抑制的作用,看来这一破坏机制,主要作用是通过膜的损伤而导致了细胞内大分子拥挤系统生物学功能的破坏。

综上所述,肉桂醛具有与山苍子油主要抑菌成分柠檬醛类似的抑菌功能,不仅能抑制孢子萌发,还抑制菌丝体生长和孢子的产生。 OD_{260nm} 、 OD_{280nm} 的提高表明,该醛使细胞内对紫外光敏感的大分子(如蛋白质、核酸等)的空间结构改变,使其失去了生物活性而破坏了正常的有选择性的物质吸收、转运和代谢途径。因此,开展对该醛作用机制及安全性进一步研究,对促进不同地域粮油储运、加工中的抗菌保质具有重要意义。

参考文献:

- [1] 袁萍,王国亮,龚复俊,等. 3种植物香精油对霉菌的抑制作用[J]. 武汉植物学研究, 2001, 19(6): 521-523.
- [2] 肖凯军,李琳,祀远,等. 肉桂的利用及天然精油的开发[J]. 中国油脂, 2000, 25(5): 52-54.
- [3] 张文娟. 内桂醛抗黄曲霉作用及超微结构观察的研究[J]. 北京医科大学学报, 1995, 27(5): 374.
- [4] 罗曼,蒋立科,吴子健. 柠檬醛对黄曲霉质膜损伤机制的初步研究[J]. 微生物学报, 2001, 41(6): 723-729.
- [5] 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.
- [6] HILIL P, EVANS C S, VENESS R G. Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil [J]. Letters in Applied Microbiology, 1997, 24: 269-275.
- [7] GILL A O, HOLLEY R A. Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(10): 5750-5755.