

# 山苍子油对霉菌抗菌性及其与黄曲霉产毒关系的研究

余伯良

(四川轻化工学院 自贡 643033)

**摘要** 采用平板法比较天然增香剂山苍子油与合成食用防腐剂苯甲酸钠、山梨酸钾对 8 种霉菌的抗菌效力。结果表明,在培养基 pH4.5 时山苍子油对多数霉菌的最低抑菌浓度为 1.77mg/ml,与山梨酸钾的抑菌强度相近,比苯甲酸钠强;但当培养基 pH5.5 以上时苯甲酸钠对霉菌几乎无效,山梨酸钾的抗菌效力也有减弱,而山苍子油受影响很小,其活性 pH 范围为 4.5~8.5。山苍子油用脂肪酸蔗糖酯乳化,其抗菌效力增强一倍。同时,从山苍子油与黄曲霉产毒关系的实验中发现,山苍子油对黄曲霉产生黄曲霉毒素有较强烈的抑制作用。

**关键词** 山苍子油,霉菌,抗菌性,抗菌效力,黄曲霉毒素

**分类号** Q93-936

山苍子油(Litsea cubeba oil)是从山苍子的鲜果、树皮及叶中提取的芳香精油<sup>[1]</sup>,含柠檬醛(60%~80%),甲基庚烯酮(2.5%),香茅醛(1.0%), $\alpha$ -蒎烯,蒎烯, $\alpha$ -蛇麻烯等,是我国 GB2760-86 规定为允许使用的食用香料<sup>[2]</sup>。笔者曾意外发现添加了山苍子精油的辣椒油和香辣酱,与同类产品相比具有非常突出的防霉防腐性能。

据有关文献报道,多种食用香料植物均有抑菌、抗菌作用<sup>[3]</sup>。特别是在香辛料精油的抗菌性研究(Knobloch 等,1989)及后来 Gocho (1992)针对源于植物的 26 种芳香族化合物的抗菌效果的研究中,均有所发现<sup>[4]</sup>。

1980 年,湖南省粮科所用山苍子油熏蒸贮藏粮防霉治虫试验获得成功<sup>[5]</sup>。本文就山苍子油对霉菌抗菌性及其与黄曲霉产毒关系进行较深入的研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

黑曲霉(*Aspergillus niger*);杂色曲霉(*Asp. versicolor*);桔青霉(*Penicillium citrinum*);总状毛霉(*Mucor racemosus*);禾谷镰刀霉(*Fusarium graminearum*);黑根霉(*Rhizopus*

*nigricans*)和米根霉(*Rh. oryzae*)来源于上海工业微生物研究所菌种站;黄曲霉(*Asp. flavus*)则是本院微生物实验室从霉变花生中分离得到的一株产毒菌株(用“花生察氏培养基”<sup>[6]</sup>,28℃培养 6d,薄层层析法<sup>[7]</sup>检测其黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>含量为 42.40mg/kg)。

### 1.2 试剂

山苍子油(购于秀山外贸公司,质量符合 ISO3214-1974E 标准,相对密度 0.885),苯甲酸钠(AR),山梨酸钾(AR),丙三醇(CP),脂肪酸蔗糖酯(简称蔗糖酯,重庆长江化工厂生产,食品级)。

### 1.3 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂(PDA 琼脂)培养基<sup>[8]</sup>;花生察氏培养基。

### 1.4 平板法测最低抑菌浓度(MIC)<sup>[9]</sup>

将山苍子油用丙三醇稀释成如下体积百分比浓度(%):7.0,6.0,5.0,4.0,3.0,2.0,1.0。苯甲酸钠、山梨酸钾先用 60℃ 无菌水溶解成 88.5g/100ml 的溶液,并以此作为“原液”;再将原液用无菌水分别稀释成如下体积百分比浓度(%):7.0,6.0,5.0,4.0,3.0,2.0,1.0。先把 8 种霉菌菌

1997-07-20 收稿

种在 PDA 琼脂上活化培养,然后分别挑取霉菌孢子制备悬浮液( $10^6$ 个孢子/ml;须在 24h 内使用)。

调节 PDA 琼脂培养基,使最终 pH 为 4.5,分装于 134 支试管中(每支 19ml)。灭菌后待降温至 60℃左右,分别吸取三种试剂不同浓度的稀释液 1ml 加入各自试管中,充分摇匀,于 50℃左右倒制平皿,每种 42 付。另外在 8 支 PDA 琼脂试管中各加入 1ml 丙三醇,摇匀后倒制平皿作对照。

在每个平皿底部外面用记号笔画一个“+”字,并编号。相同浓度同一试剂的两个平皿分别接种 4 种实验菌。对照组也涂菌。28℃培养 48h,观察结果,以完全没有菌生长的最低试剂浓度为该试剂的 MIC。(做三次平行实验,以两次或三次相同结果的为准)

1.5 山苍子油与黄曲霉产毒关系的实验

参照“培养皿中荧光反应法”<sup>[6]</sup>,首先做山苍子油是否抑制黄曲霉产毒的定性实验:将花生察氏培养基溶化,分别放入 15 支试管中(每支 19ml),待降温至 60℃左右,各自加入 1ml 用丙三醇稀释的不同浓度的山苍子油(分别含油 5.0%、4.0%、3.0%、2.0%、1.0%),每种浓度加 3 管。作对照的 3 支试管仅加入 19ml 培养基和 1ml 丙三醇。各试管摇匀,缓缓倾入硅藻土薄层平皿。接种黄曲霉,28℃培养 6d,置于 125W 紫外灯下观察(滤光片波长 365nm),如果菌丝体上显现亮蓝紫色荧光则表明有毒素产生。选取实验组中具代表性的一个平皿及对照样本,用薄层层析法分别测定培养基中的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 含量。

2 结果与讨论

2.1 山苍子油与合成防腐剂的 MIC 值比较

MIC 越低,表明相应试剂抗菌效力越强。从表 1 可知,山苍子油对多数霉菌的 MIC 为 1.77mg/ml,苯甲酸钠为 2.21mg/ml,山梨酸钾为 1.33mg/ml。山苍子油的抗菌效力比山梨酸钾略低,比苯甲酸钠强。

2.2 pH 值对山苍子油抗菌效力的影响

表1 三种试剂最低抑菌浓度 单位:mg/ml

菌 种	山 苍 子 油	苯 甲 酸 钠	山 梨 酸 钾
黄曲霉	2.21	2.66	1.77
黑曲霉	1.77	2.21	1.33
杂色曲霉	1.77	2.21	1.33
桔青霉	1.77	2.21	1.77
总状毛霉	1.77	2.21	1.33
禾谷镰刀霉	2.21	2.66	1.77
黑根霉	1.77	2.66	1.33
米根霉	1.77	2.21	1.33

注:培养基pH4.5

调节 PDA 琼脂培养基 pH,使最终 pH 值分别为 3.5、4.5、5.5、6.5、7.5、8.5、9.5,然后用比三种试剂 MIC 低一个浓度梯度的稀释液,对表 1 前五种霉菌进行测定。结果表明,在培养基 pH5.5 和以上时,苯甲酸钠对实验的五种霉菌几乎无效,山梨酸钾的抗菌性随 pH 上升也有所降低,而山苍子油受 pH 影响很小,其 pH 活性范围在 4.5~8.5 之间。图 1 以黄曲霉为例,说明 pH 值对三种试剂抗菌效力的影响。

2.3 蔗糖酯对山苍子油抗菌效力的影响

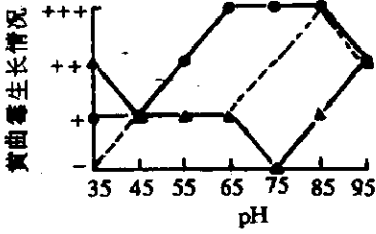


图1 pH 值对三种试剂抗菌效力的影响

—▲—山苍子油 —●—苯甲酸钠 - - - - -山梨酸钾

注:“-”表示肉眼看不到菌丝,无霉斑;“+”表示能看到稀少的菌丝或发芽孢子,无霉斑;“++”表示能看到较多的菌丝或出现霉斑;“+++”则指试样表面几乎全部被菌丝及孢子覆盖或出现许多霉斑。

山苍子油用于食品特别是饮料、汤料等非油性液体或半固体食品需事先乳化。用蔗糖酯乳化较好,不仅无毒,而且能防止精油损失,改善保藏性<sup>[10]</sup>。本实验按常规方法乳化。测定不同浓度的山苍子油乳化液的 MIC,结果显示,经乳化后山苍子油的 MIC 值明显降低。对表 1 前五种霉菌中除黄曲霉外的四种霉菌,其 MIC 均

为0.89mg/ml,抗菌效力增强一倍。对照组的蔗糖酯在此浓度下也有微弱的抑菌作用。山苍子油与蔗糖酯结合抗菌效力增强,可能与协同作用及山苍子油的分散度提高有关。

#### 2.4 山苍子油与黄曲霉产毒的关系

从表2可见,加入山苍子油浓度为0.45mg/ml、0.89mg/ml的培养基,其菌丝生长情况与对照组的相近,但它们的荧光反应都较对照组的为弱,说明山苍子油有抑制黄曲霉产毒的作用。其中添加了0.89mg/ml山苍子油的实验皿具有代表性,其荧光反应较弱(即受抑制较强)。此样本及对照组的样本,分别用薄层层析法测定黄曲霉毒素 $B_1$ 含量。重复一次,取平均值,列于表2。未加山苍子油的对照样本中黄

曲霉毒素 $B_1$ 含量为37.71mg/kg,而添加了山苍子油的样本,其毒素含量仅为5.05mg/kg,明显少于对照组。

由于山苍子油具有特殊风味,不可能广泛用作食品的天然防腐剂。但山苍子油对霉菌的强抗菌性及抑制黄曲霉毒素产生的功能,使它不失为那些需要柠檬果香味的食品,特别是易受霉菌及黄曲霉毒素污染的花生、玉米等食品的良好天然防腐剂。

#### 参 考 文 献

- [1] 陈煜强,刘幼君. 香料产品开发与应用. 上海:上海科学技术出版社,1994,229.
- [2] 凌关庭,王亦芸,唐述潮,编. 食品添加剂手册(上册). 北京:化学工业出版社,1989,104.
- [3] 林进能,等,编著. 天然食用香料生产与应用. 北京:轻工业出版社,1991,28~34.
- [4] 宁正祥,王若峰,谭龙飞. 食品与发酵工业,1995,6: 72~75.
- [5] 刘学华,肖恒成,陈淑珍等. 粮油仓储科技通讯,1995,2: 27~30.
- [6] 居乃斌. 黄曲霉毒素. 北京:轻工业出版社,1980, 141~142.
- [7] 刘福岭,戴行钧,编著. 食品物理与化学分析方法. 北京:轻工业出版社,1987,443~450.
- [8] 周德庆,主编. 微生物学实验手册. 上海:上海科学技术出版社,1986,277.
- [9] 周邦靖,编著. 常用中药的抗菌作用及其测定方法. 重庆:科学技术出版社重庆分社,1987.
- [10] 张万福,编译. 食品乳化剂. 北京:轻工业出版社, 1993,586.

表2 山苍子油与黄曲霉产毒的关系

浓度 mg/ml	2.21	1.77	1.33	0.89	0.45	对照组
菌丝生 长情况	-	+	++	+++	+++	+++
荧光 强弱	○	○	+·	+	++	+++
黄曲霉 毒素 $B_1$ (mg/kg)	/	/	/	(5.26 4.84)	/	(38.47 36.95)

注:表示菌丝生长情况的符号含义如图1说明。表示荧光强弱的符号:“○”为无荧光,“+、++、+++”为强度依次递增。毒素重复测定值于括号内。所有数据均为小数点后3位4舍5入,取小数点后2位。

## ANTIBIOTIC ACTIVITIES OF LITSEA CUBEBA OIL ON MOULDS AND EFFECT OF LITSEA CUBEBA OIL ON AFLATOXIN PRODUCTION

Yu Boliang

(Sichuan Institute of Light Industry and Chemical Technology, Zigong 643033)

**Abstract** The antibiotic activities of litsea cubeba oil (nature flavor enhancer), sodium benzoate and potassium sorbate (chemical food preservatives) on eight kinds of moulds were compared by the plating method. The minimum antibiotic concentration of litsea cubeba oil is

1.77 mg / ml in the medium at a pH of 4.5 and its antibiotic property was similar to that of potassium sorbate but better than that of sodium benzoate. In the medium above a pH of 5.5, sodium benzoate was almost ineffective and potassium sorbate less effective on the moulds while litsea cubeba oil was slightly affected, with its active pH range being from 4.5 to 8.5. litsea cubeba oil was twice as effective as before when it was emulsified with sucrose fatty acid ester. The effect of litsea cubeba oil on aflatoxin production was also studied, the result shows that the ability of *Aspergillus flavus* to produce aflatoxin was strongly inhibited by litsea cubeba oil.

**Key words** Litsea cubeba oil, Moulds, Antibiotic property, Antibiotic activity, Aflatoxin