

丁香和肉桂挥发油的提取、主要成分测定及其抗菌活性研究

李京晶, 籍保平*, 周峰, 李博
(中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083)

摘要: 本文采用水蒸汽蒸馏法提取丁香和肉桂的挥发油, 并对所得挥发油主要成分进行气相测定, 通过体外抗菌试验, 比较了这两种挥发油及其主要成分和目前常用化学防腐剂苯甲酸钠和山梨酸钾对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、沙门氏菌和志贺氏菌等 5 株食品中常见污染菌的抗菌作用。结果表明丁香油中丁香酚含量为 78.1%, 肉桂油中肉桂醛含量为 86.8%; 这两种挥发油及其主要成分丁香酚和肉桂醛的抗菌作用均强于两种化学防腐剂, 其中肉桂油与其主要成分肉桂醛表现出的抗菌活性最强, 最小抑菌浓度(MIC)为 200~1600mg/L; 仅为苯甲酸钠和山梨酸钾 MIC(6400~25600mg/L)的 1/64~1/16; 丁香油及其主要成分丁香酚的抗菌活性次之, MIC 为 800~1600mg/L, 相当于苯甲酸钠和山梨酸钾 MIC 的 1/16~1/8。

关键词: 挥发油; 水蒸汽蒸馏; 体外抗菌; MIC; 肉桂醛; 丁香酚

Study on Extraction of Two Essential Oils, Analysis of Major Components and Antimicrobial Activities

LI Jing-jing, JI Bao-ping*, ZHOU Feng, LI Bo
(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: In this study, we used steam distillation to extract clove and cinnamon essential oils. Components of the two essential oils were analyzed by GC. The antimicrobial effects of the plant oils were studied to inhibit five important foodborne pathogens: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* and *Shigella dysenteriae*, to be compared with sodium benzoate and potassium sorbate, the chemical preservatives commonly used now. The experimental results showed that the content of eugenol in clove is 78.1%, and that of cinnamaldehyde in cinnamon 86.8%. The antimicrobial effects of clove and cinnamon oils and their components are stronger than those of chemical preservatives. Cinnamon oil and cinnamaldehyde showed that the strongest antimicrobial effects with their MIC range from 200 to 1600mg/L, only 1/64~1/16 of the ranging of sodium benzoate and potassium sorbate (with their MIC ranging from 6400 to 25600mg/L). Clove oil and eugenol are most active against the foodborne pathogens (with their MIC ranging from 800 to 1600mg/L).

Key words: essential oils; steam distillation; antimicrobial test; MIC (minimum inhibition concentration); cinnamaldehyde; eugenol

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)08-0064-05

随着消费者对食品质量的日益重视, 寻求和开发新的高效低毒的天然食品防腐剂成为了各国食品科学研究的热点^[1]。许多植物挥发油由于其特殊的化学组成, 在很多研究中表现出了很好的抗菌活性, 成为新的特效低毒防腐剂的重要源泉^[2,3]。

丁香(*Flos caryophylli*)为桃金娘科植物丁香的干燥花蕾, 其性辛温, 丁香花蕾挥发油的主要成分为丁香酚

(eugenol), 具有消炎、杀菌、驱虫、镇痛等功效^[4,5]。肉桂(*Cortex Cinnamomi*)为樟科植物肉桂的干燥树皮, 其性辛甘、大热, 肉桂皮挥发油的主要成分为肉桂醛(cinnamaldehyde), 具有抗菌、消炎、镇静、止痛等功效^[4,5]。丁香和肉桂均是我国卫生部公布的药食兼用植物材料, 既能食用, 又是名贵中药^[6]。有很多报道表明丁香和肉桂的挥发油有抑菌防腐作用^[7,8], 试验方法多

收稿日期: 2006-04-24

*通讯作者

作者简介: 李京晶(1977-), 女, 硕士研究生, 研究方向为功能食品。

是采用滤纸片法^[9]和倾注法^[10],但滤纸片法受很多因素影响(如固体培养基表面水分含量及厚度等),使结果的不确定性增大;倾注法可在对大量E0s抗菌活性筛选时使用。为了考察液体环境下的抗菌活性,本实验采用微量肉汤稀释法进行抑菌试验,定量测定了丁香、肉桂及其主要成分丁香酚和肉桂醛的MIC,并与目前常用食品防腐剂苯甲酸钠和山梨酸钾的抗菌效果进行了对比,从而为天然植物防腐剂开发和应用提供更多理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料和试剂

丁香(*Flos caryophylli*)、肉桂(*Cortex Cinnamomi*) 北京市同仁堂药店;肉桂醛(*cinnamaldehyde*)、丁香酚(*eugenol*) Sigma公司;M-H琼脂(*Mueller-Hinton Agar*, MHA)、M-H肉汤(*Mueller-Hinton Broth*, MHB) 北京奥博星生物技术责任有限公司;无水乙醇(色谱纯) 天津市津科精细化工研究所;刃天青 Sigma公司。

1.1.2 仪器

GC-14C气相色谱分析仪 日本岛津公司(*Shimadzu*);氢火焰离子检测器(FID);DM-1701石英毛细弹性管柱(30m × 0.25mm i.d. × 0.25μm) 迪马DIKMA公司;5μl微量进样器 上海安亭微量进样器厂。

1.1.3 菌种

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)AS1.89、大肠杆菌(*Escherichia coli*)AS1.90、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)AS1.1849、沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)AS1.1174、志贺氏菌(*Shigella dysenteriae*)AS1.1869,以上菌种均购自中科院微生物所。

1.2 方法

1.2.1 挥发油的提取

分别对丁香和肉桂原料进行粉碎,各取粉末200g于5L的三口圆底烧瓶中,加入十倍量蒸馏水(M/V),浸泡1h,加热料液采用水蒸汽蒸馏法提取挥发油^[11],蒸馏提取3h以上,加热提取过程中随时收集挥发油,提取结束后,合并挥发油,用无水硫酸钠进行脱水后移入棕色样品瓶中,于4℃冰箱中保存备用。

1.2.2 气相测定

1.2.2.1 气相色谱条件

载气(N₂):15.6ml/min;分流比:1:20;燃气(H₂):45ml/min;助燃气(空气):450ml/min;尾气流速:40ml/min;

进样口温度:250℃;FID检测器温度:250℃;进样量:1μl;

(1) 肉桂油程序升温:初始100℃,以4℃/min的

速度升至150℃,保持3min,再以4℃/min的速度升至210℃,保持5min;

(2) 丁香油程序升温:初始100℃,以6℃/min的速度升至150℃,保持5min,再以4℃/min的速度升至210℃,保持5min。

1.2.2.2 气相样品溶液配制

以色谱纯乙醇为溶剂,准确配制样品溶液:丁香油溶液1020mg/L,肉桂油溶液475mg/L。

1.2.3 抗菌试验

1.2.3.1 药品制备

分别取丁香和肉桂挥发油适量,用0.22μm的微孔过滤器过滤除菌,并用经灭菌处理的含1% Tween-80的蒸馏水配制成系列浓度药液:12800、6400、3200、1600、800mg/L等;

分别用灭菌蒸馏水配制苯甲酸钠和山梨酸钾系列浓度药液:102400、51200、25600、12800、6400mg/L等。

1.2.3.2 菌液制备

将5种供试菌种分别接种于若干M-H琼脂斜面上,于37℃培养24h,进行菌种活化。

活化后的细菌做十倍系列稀释^[12],并活菌计数。用M-H肉汤将细菌分别配制成5 × 10⁵CFU/ml浓度的细胞悬浮液。

1.2.3.3 抗菌试验方法

采用微量稀释法测定最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC),即能抑制细菌生长的最低浓度^[13]。

具体方法:首先在96孔细胞培养板中每孔加入0.25g/L刃天青2μl;其次按照从低到高的顺序每孔加入100μl药液,并排三孔加同浓度药液作平行;然后每孔中加入100μl菌液进行接种,于37℃培养24h。

结果判断:刃天青本身为蓝色,当孔中有细菌生长则呈红色。

2 结果与分析

2.1 挥发油提取

观察提取过程可以看出,蒸馏初始时挥发油大量馏出,此后不久,挥发油馏出速率下降,一段时间后,随着蒸馏的继续,挥发油量基本上不再增加。分析原因认为在0.5~1h内,原料充分浸润、溶胀,油水分离,挥发油与蒸汽形成共沸而快速挥发,3h之内96%以上的挥发油已经提取出来,但随时间推移,料液中油类组分的减少,油水比相应降低,共沸点升高,挥发油馏出量减少。本试验记录了肉桂挥发油的提取过程(图1),肉桂油在1h内出油速度很快,1~2h出油速度减缓,到2h时80%的肉桂挥发油馏出,3h后馏出油量

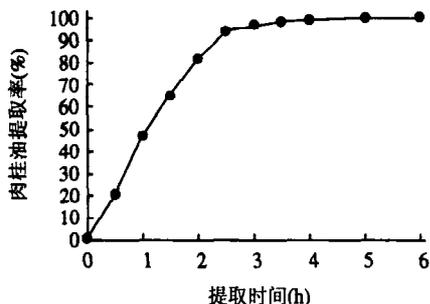


图1 肉桂油水蒸汽蒸馏提取率的测定

Fig.1 Distillation rate of cinnamon essential oil

表1 水蒸汽蒸馏挥发油物理性质

Table 1 The physical properties of two essential oils extracted by steam distillation

名称	得率(%)	颜色	密度
丁香油	12.0~14.0	白色	> 1.0
肉桂油	1.5~2.0	淡黄色	> 1.0

基本上没有较大的增加。经水蒸汽蒸馏得到的丁香和肉桂挥发油的得率及观察到的物理性质见表1。

2.2 气相测定

2.2.1 色谱条件的选择

香辛料植物挥发油属于挥发性有机物且其极性为弱极性, 根据相似相溶原理, 本实验采用DM-1701中极性柱, 其固定相是聚二甲基硅氧烷。所用检测器是氢火焰离子化检测器(FID), 可用来分析植物挥发油类含碳、氢的有机物, 其优点是灵敏度高、响应快、线性范围宽、定量准确。由于植物挥发油组成成分复杂, 本文中我们采用程序升温进行气相测定。

2.2.2 标准曲线的绘制

以色谱纯乙醇为溶剂, 精确配置丁香酚系列标准溶液: 123、246、492、1230、2460mg/L; 肉桂醛系列标准溶液: 66、132、264、528、1056mg/L。

精密吸取各浓度标准溶液1μl测定色谱峰面积, 以标准对照品浓度(mg/L)为横坐标, 峰面积积分为纵坐标分别作图, 得回归方程为:

丁香酚: $y=293.63x - 7654.6$ $r=0.9999$, 在123~4920mg/L范围内线性关系良好;

肉桂醛: $y=262.72x + 93.918$ $r=0.9999$, 在66~1056mg/L范围内线性关系良好。

2.2.3 气相谱图、主要成分含量及保留时间

利用实验室现有仪器设备, 对丁香油和肉桂油进行了气相测定, 如图2、3。由图可看出两种挥发油的主要成分基本上实现了基线分离, 满足了对主要成分的测定要求。

挥发油中主要成分是以保留时间定性, 多点外标法定量, 积分参数为峰面积。肉桂和丁香挥发油的主要

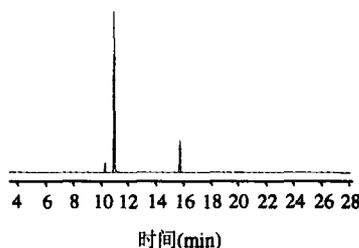


图2 丁香油气相色谱图

Fig.2 Gas chromatogram of clove essential oil

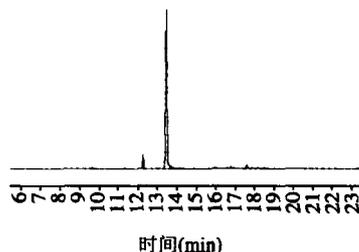


图3 肉桂油气相色谱图

Fig.3 Gas chromatogram of cinnamon essential oil

成分、化学结构式、保留时间及百分含量见表2。

表2 主要成分结构、含量及保留时间表

Table 2 Structure, concentration and retain time of major components

挥发油	主要成分	结构式	主要成分含量(%)	保留时间(min)
丁香油	丁香酚	图4a	78.1	11.015
肉桂油	肉桂醛	图4b	86.8	13.495

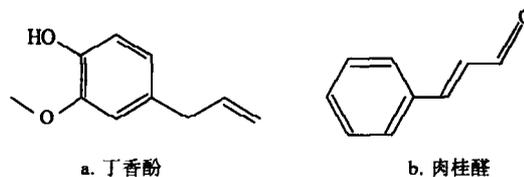
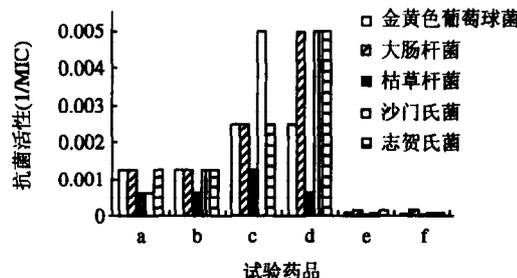


图4 两种挥发油主要成分结构式

Fig.4 The structure formula of two components of EOs

2.3 抗菌试验

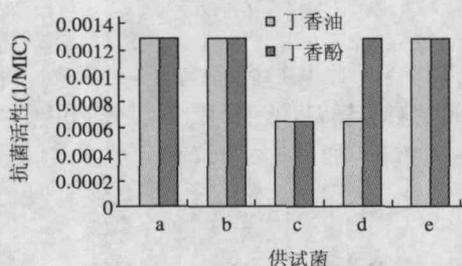


试验药品: a: 丁香油 b: 丁香酚 c: 肉桂油 d: 肉桂醛 e: 苯甲酸钠 f: 山梨酸钾
抗菌活性(1/MIC): 用最小抑菌浓度(MIC)的倒数表示。

图5 两种挥发油及主要成分与常用食品防腐剂的抗菌活性

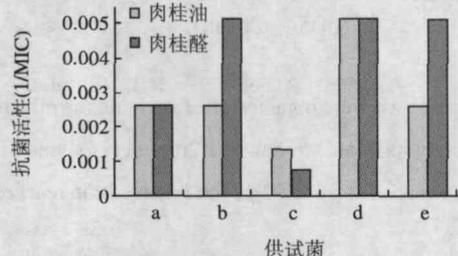
Fig.5 Comparison of the antimicrobial activity of two essential oils and their major components and common food preservatives

经过大量的抗菌试验,并对试验结果进行了多次重复验证,试验结果表明,肉桂挥发油与其主要成分肉桂醛表现出的抗菌活性最强, MIC 为 200 ~ 1600mg/L, 仅为苯甲酸钠和山梨酸钾 MIC 的 1/64 ~ 1/16; 丁香油及其主要成分丁香酚的抗菌活性次之, MIC 为 800 ~ 1600 mg/L, 相当于苯甲酸钠和山梨酸钾 MIC 的 1/16 ~ 1/8; 苯甲酸钠和山梨酸钾的 MIC 为 6400 ~ 25600 mg/L, 抗菌效果较差。图 5 采用最小抑菌浓度的倒数为抗菌活性指标, 直观地表现了试验药品的抗菌活性。



供试菌: a:金黄色葡萄球菌, b:大肠杆菌, c:枯草芽孢杆菌, d:沙门氏菌, e:志贺氏菌; 抗菌活性(1/MIC): 用最小抑菌浓度(MIC)的倒数表示。

图6 丁香油与丁香酚抗菌活性比较
Fig.6 Comparison of the antimicrobial activity of Clove essential oil and eugenol



供试菌: a:金黄色葡萄球菌, b:大肠杆菌, c:枯草芽孢杆菌, d:沙门氏菌, e:志贺氏菌; 抗菌活性(1/MIC): 用最小抑菌浓度(MIC)的倒数表示。

图7 肉桂油与肉桂醛抗菌活性比较
Fig.7 Comparison of the antimicrobial activity of cinnamon essential oil and trans-cinnamaldehyde

由图 6 可知, 丁香油和丁香酚除对沙门氏菌的抑制效果略有差别外, 对另外 4 株试验菌的抗菌活性相当, 其中对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和志贺氏菌的抗菌效果相同, MIC 均为 800mg/L; 对枯草芽孢杆菌抗菌效果较之略差, MIC 均为 1600mg/L。由气相测定结果可知, 丁香酚是丁香油的主要成分(占 78.1%), 且表现出相似的抗菌活性, 表明丁香酚是丁香油中起抗菌作用的主要物质, 同时, 丁香油中还含有其它抗菌成分, 使总抗菌效果相当于丁香酚。

由图 7 可以看出, 肉桂油和肉桂醛对金黄色葡萄球菌和沙门氏菌表现出的抗菌作用相同, MIC 分别为 400 和 200mg/L; 对大肠杆菌和志贺氏菌作用不同, 肉

桂油对大肠杆菌和志贺氏菌的 MIC 均为 400mg/L; 肉桂醛对这两种菌的 MIC 为 200mg/L, 由此说明肉桂油中的其它成分对这两株菌表现出的总抗菌活性比肉桂醛的差; 但对枯草芽孢杆菌的抗菌情况正好相反, 肉桂油的 MIC 为 800mg/L, 肉桂醛的 MIC 为 1600mg/L, 这可能是由于在对枯草芽孢杆菌抗菌过程中, 肉桂油的某种成分与肉桂醛协同作用的结果, 也可能是肉桂油中还含有对该菌作用较强的其它抗菌成分, 这还有待于进一步研究。

3 讨论

在确定提取时间时, 若提取时间过短, 高沸点的成分还没有蒸馏出来, 则提取不完全, 若提取时间过长, 则会增大能耗, 加大成本, 所以提取时间选取 3 ~ 4 h 为宜。

挥发油的气味, 是其品质优劣的重要标志。提取出来的挥发油, 与空气及光线接触会逐渐氧化变质, 使挥发油的比重增加, 颜色变深, 并形成树脂状物质, 失去原有香味。因此, 制备出来的挥发油应立即用无水硫酸钠除水, 并用棕色瓶将其密封低温保存, 防止挥发油氧化及光敏反应。

本试验建立了丁香油和肉桂油主要成分的气相色谱检测方法。该方法灵敏度高、测定速度快、操作简单, 在本实验室的实验条件下切实可行。在此检测方法下, 挥发油中各组分得到充分有效的分离, 达到了对其中主要成分测定的要求。

本实验只作了对挥发油中主要成分的定性定量测定, 没有进一步通过气质联用对挥发油的所有成分进行检测, 如在今后的研究中有进一步确定挥发油组分的需要, 可在此气相测定条件下进行气质分析。

丁香和肉桂挥发油及其主要成分对 5 株试验菌的抑制效果明显强于常用食品防腐剂苯甲酸钠、山梨酸钾。其中, 肉桂挥发油与肉桂醛的 MIC (200 ~ 1600mg/L) 仅为苯甲酸钠和山梨酸钾 MIC (6400 ~ 25600mg/L) 的 1/64 ~ 1/16, 抗菌活性最强; 丁香油及其主要成分丁香酚的抗菌活性次之, MIC (800 ~ 1600mg/L) 是苯甲酸钠和山梨酸钾 MIC 的 1/16 ~ 1/8。

在倡导绿色健康的今天, 食品防腐剂正向着安全、营养、无公害的方向发展, 对新型天然食品防腐剂的研究倍受关注, 作为天然防腐剂, 香辛料植物挥发油具有广阔的应用开发前景。但是目前其作用机理、抗菌谱和可应用的范围等研究还不很清楚, 这将是本实验室下一步研究的重点。

参考文献:

- [1] 徐宝才. 天然食品防腐剂的研究进展[J]. 江苏食品与发酵, 2001, (2):

果胶酶产生菌 ZH-g 的原生质体形成与再生研究

朱宏莉¹, 宋纪蓉^{2,*}, 张嘉¹, 杨彬彬³, 徐抗震², 黄洁², 杨明琰²
 (1. 西北大学生命科学学院, 陕西 西安 710069; 2. 西北大学化工学院, 陕西 西安 710069;
 3. 陕西赛德高科生物股份有限公司, 陕西 西安 710054)

摘要: 本文通过研究酶浓度、酶的作用时间、菌龄、菌体预处理等不同因素对原生质体形成与再生的影响, 得出了果胶酶产生菌 ZH-g 原生质体制备和再生的最佳条件: 加入 0.6 μg/ml 的氨苄青霉素进行菌体预处理, 选用对数生长期的菌株, 以 1.2 mg/ml 溶菌酶 37 °C 保温处理 2 h, 原生质体形成率为 92%, 再生率达 50.7%。

关键词: 果胶酶; 细菌; 原生质体制备; 原生质体再生

Study on Protoplast Formation and Regeneration of Pectinase Producing Bacterial ZH-g

ZHU Hong-li¹, SONG Ji-rong^{2,*}, ZHANG Jia¹, YANG Bin-bin³, XU Kang-zhen²,
 HUANG Jie², YANG Ming-yan²
 (1. Institute of Life Science, Northwest University, Xi an 710069, China;
 2. Institute of Chemistry Engineering, Northwest University, Xi an 710069, China;
 3. Shaanxi Scidoor Hi-Tech Biology Co. Ltd., Xi an 710054, China)

Abstract: The optimum conditions for preparation and regeneration of ZH-g protoplast were obtained after studying the effects of different factors on them. Under this circumstance- treating strains in log phase with concentration of 1.2mg/ml lysozyme for 2 hours, after pretreatment on the cells with 0.6μg/ml ampicillin, the protoplast formation is up to 92%, and regeneration reaches 50.7%.

Key words: pectinase; bacterial; protoplast formation; protoplast regeneration

中图分类号: Q93

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)08-0068-04

收稿日期: 2005-09-30

* 通讯作者

基金项目: 陕西省教委基金资助项目(00JK138)

作者简介: 朱宏莉(1971-), 女, 讲师, 博士, 主要从事应用微生物方面的研究。

- 26-28; (3): 1-3.
- [2] 张秀云, 余有本, 唐应芬. 天然防腐剂综述[J]. 饮料工业, 2001, 4(4): 1-5.
- [3] 肖丽平, 李临生, 李利东. 抗菌防腐剂()天然抗菌防腐剂[J]. 日用化学工业, 2002, 32(2): 78-81.
- [4] 郑虎占, 董泽宏, 余靖. 中药现代研究与应用[M]. 学苑出版社, 1997. 1-4, 1871-1876.
- [5] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海科学技术出版社, 1985. 13-15, 890-897.
- [6] 关于进一步规范保健食品原料管理的通知. 卫生部2002年公布.
- [7] K Vrinda Menon, S R Garg. Inhibitory effect of clove oil on *Listeria monocytogenes* in meat and cheese[J]. Food Microbiology, 2001, 18: 647-650.
- [8] Stecchini ML, Sarais I, Giavedoni P. Effect of essential oils on *Aeromonas hydrophila* in a culture medium and in cooked pork[J]. Food Protection, 1993, 56(5): 406-409.
- [9] Wilkinson J M, Hipwell M, Ryan T, et al. Bioactivity of *Backhousia citriflora*: antibacterial and antifungal activity[J]. Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51: 76-81.
- [10] Negi P S, Jayaprakasha G K, Jagan Rao Mohan L, et al. Antibacterial activity of turmeric oil: a byproduct from curcumin[J]. Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47: 4297-4300.
- [11] 中华人民共和国药典(一部)(附录XD)[M]. 2000.
- [12] 周邦靖. 常用中药的抗菌作用及其测定方法[M]. 科学技术出版社重庆分社, 1987. 289-314.
- [13] M Valero, M C Salmerón. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth[J]. Food Microbiology, 2003, 85: 73-81.