

# 丁香精油对果蔬采后病原菌抑制效应研究

关文强<sup>1,2</sup>, 李淑芬<sup>1</sup>

(1. 天津大学化工学院 教育部绿色合成与转化重点实验室, 天津 300072

2. 国家农产品保鲜工程技术研究中心, 天津 300384)

**摘 要:** 从香辛料中提取出的精油具有良好的抑菌能力, 在果蔬天然防腐保鲜剂的开发应用研究中具有重要前景。以丁香为原料, 比较了超临界CO<sub>2</sub>萃取、水蒸汽蒸馏、直接加热水蒸馏所得丁香精油对果蔬采后主要病原菌的抑制效果。结果表明丁香精油对葡萄、冬枣、桃、蒜薹等果蔬采后主要病原菌具有良好的抑制效果, 600mg/L的丁香精油能够完全抑制葡萄灰霉菌、链格孢、冬枣青霉的生长, 500mg/L的丁香超临界提取精油对桃灰霉、蒜薹葱鳞灰葡萄孢抑菌率分别为79.3%、85.7%。在三种不同的提取方法中, 水蒸汽蒸馏的精油抑菌效果最好, 超临界CO<sub>2</sub>萃取次之, 直接加热水蒸馏稍差。

**关键词:** 丁香精油; 提取; 采后病原菌; 抑菌作用

## Inhibitory Effect of Clove Essential Oils on Growth of Postharvest Pathogen of Fruits and Vegetables

GUAN Wen-qiang<sup>1,2</sup>, LI Shu-fen<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory for Green Chemical Technology of State of Education Ministry, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China 2. National Engineering and Technology Research Center of Agricultural Products Freshness Protection, Tianjin 300384, China)

**Abstract:** Essential oils of several spices and herbs have shown strong antimicrobial activity and exhibited important prospect in exploitation of natural fungicides. This study has compared the inhibitory response of some important postharvest fungi to the clove essential oil extracted respectively by supercritical CO<sub>2</sub>, steam distillation and direct-water distillation. Clove essential oils showed apparent inhibitory effect on main pathogens to cause postharvest decay of grape, jujube, peach and garlic shoot. 600mg/L clove essential oil could wholly inhibit the growth of *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Penicillium expansum*. 500mg/L clove essential oil could inhibit the growth of *Botrytis cinerea* to cause decay of peach and garlic stem by 79.3% and 85.7%, respectively. Among the three extraction methods, the order of antimicrobial efficacy was steam distillation, supercritical CO<sub>2</sub> extraction, and direct-water distillation.

**Key words:** clove essential oils; extraction; postharvest pathogen; antimicrobial efficacy

中图分类号: TS201.6

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)12-0227-04

果蔬采后病害导致的巨大损失已成为全球性的问题, 在发达国家约有10%~20%的新鲜果品由于采后病害导致腐烂损失。而在缺乏贮运冷藏设备的发展中国家, 腐烂损失率则更高达40%~50%。目前, 控制果蔬采后病害的主要手段是冷藏结合化学杀菌剂。但化学杀菌剂对人类健康和环境的危害已成为全世界关心的问题<sup>[1,2]</sup>。因此, 开发天然防腐保鲜剂已成为当前农产品保鲜研究的一个热点。从中草药中提取出的精油具有良好的抑菌能力, 具有较高食用安全性, 被认为是开发天然防腐保鲜剂的重要原料<sup>[3,4]</sup>。

丁香为桃金娘科植物丁香(*Eugenia Cargophyllata* Thunb.)的干燥花蕾, 是我国传统的中草药, 用于治疗脾胃虚寒, 呃逆呕吐, 食少吐泻, 心腹冷痛, 肾虚阳痿等<sup>[3]</sup>。丁香还具有较强的抗菌作用, 研究表明丁香精油对一些植物病原真菌和食品中的病原细菌具有较强的抑制效果<sup>[5~9]</sup>, 但关于丁香精油对果蔬主要采后致病菌如葡萄主要致病菌灰霉、链格孢、枣青霉、桃灰霉、蒜薹葱鳞灰葡萄孢的抑制效应研究较少且不系统, 关于提取方法对丁香精油抑菌活性的影响也未见报道。本文主要系统研究丁香精油对果蔬主要致病菌的抑制效果,

收稿日期: 2005-02-26

基金项目: 天津市农业科学院院长基金项目(2004018)

作者简介: 关文强(1974-), 男, 助研, 博士生, 研究方向为天然产物提取及在农产品采后保鲜中的应用。

并比较不同方法提取的精油是否存在抑菌效果差异,为天然植物在果蔬保鲜上的应用提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 测试菌种

葡萄致病菌从玫瑰香葡萄上分离出灰霉菌、链格孢;冬枣青霉从冷藏3个月的病变冬枣分离;桃灰霉菌从冷藏四个月的大久保桃褐变病斑上分离;蒜薹葱鳞灰葡萄孢从霉变蒜薹上分离。

#### 1.1.2 原料

丁香(产地广西)购于天津市中药饮片厂。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 精油的提取

蒸馏:称取磨碎的丁香100g装入500ml圆底烧瓶,加入300ml蒸馏水充分湿润后浸泡1d,安装蒸馏冷却装置,分别采用往烧瓶通入和直接用电热套加热烧瓶的加热方法,加热至馏出液不再浑浊为止。收集的馏出液加氯化钠至饱和后用无水乙醚萃取,乙醚萃取液用无水硫酸钠除去水分后过滤到圆底烧瓶,圆底烧瓶置水浴锅50~70℃回收乙醚,其残留液即为精油。

超临界CO<sub>2</sub>萃取:HA221-50-06超临界萃取装置(江苏华安超临界萃取有限公司,萃取条件为30MPa,40℃)。

#### 1.2.2 抑菌实验方法

##### 1.2.2.1 菌落直径和抑菌率的测定

选皿底平坦,直径为90mm的洁净的培养皿。经干燥灭菌,在无菌操作的条件下,倒入PDA培养基,制成平板,待冷凝以后接入供试菌种。置26℃恒温培养箱培养,待菌丝长满培养皿时,用直径0.6mm打孔

器在上述菌落边缘切下带菌培养基。带毒培养基制备均在无菌条件下进行。每种药剂取3~5个梯度浓度,将计算好的一定量药剂加入40℃左右的PDA培养基中,充分振荡均匀后,倾入直径90mm的灭菌培养皿中。每浓度重复3次,以加入无菌水作为空白对照。待上述含毒培养基冷凝后,用接种针每皿一饼移入不同浓度的带毒培养基中,每个浓度做3个重复,置于26℃恒温培养箱中,待对照培养皿长满时测菌落直径。每个菌落按十字交叉法测量两次,以其平均数代表菌落的大小。抑菌率的计算公式如下:

纯生长量(mm)=菌落的平均直径-菌饼直径

抑菌率(%)=(对照纯生长量-处理纯生长量)/对照纯生长量×100

##### 1.2.2.2 孢子数的测定

取培养一定时间的病原菌培养基,用20ml加入0.5%吐温80的无菌水洗下孢子,然后用灭菌纱布过滤。将经一定稀释的孢子悬液用血球计数板在显微镜下计数,根据在显微镜下观察到的孢子数目换算出培养皿中总的孢子数。

## 2 结果与分析

### 2.1 丁香精油对葡萄灰霉菌抑制效果

灰霉菌是果蔬采后腐烂的主要致病菌,也是葡萄采后腐烂的主要致病菌,本试验研究了通过水蒸汽蒸馏、直接蒸馏、超临界CO<sub>2</sub>萃取方法提取的丁香精油对葡萄灰霉菌抑制效果的影响(表1)。

表1可以看出,丁香精油可以有效抑制葡萄灰霉菌的生长,随浓度的增加抑菌率显著增加,孢子数量降低。200mg/L不同提取方法所得丁香精油对灰霉菌有一定的抑制效果,400mg/L浓度时水蒸汽蒸馏和超临界提

表1 丁香精油对葡萄灰霉菌的抑制效果  
Table 1 Inhibitory effect of the clove oils on Botrytis cinerea infecting grape

浓度	C K	200mg/L			400mg/L			600mg/L		
		a	b	c	a	b	c	a	b	c
菌落直径(cm)	9.0	4.6	5.5	6.4	0.6	2.6	0.6	0.6	0.6	0.6
抑菌率(%)	0	52.4	41.7	31.0	100	76.2	100	100	100	100
孢子数(个)	$3.0 \times 10^6$	$0.5 \times 10^6$	$0.4 \times 10^6$	$0.4 \times 10^6$	0	$0.1 \times 10^6$	0	0	0	0

注:a:水蒸汽蒸馏;b:直接加热水蒸馏;c:超临界萃取。

表2 丁香精油对葡萄链格孢的抑制效果  
Table 2 Inhibitory effect of the clove oils on Alternaria alternate infecting grape

浓度	C K	200mg/L			400mg/L			600mg/L		
		a	b	c	a	b	c	a	b	c
菌落直径(cm)	7.0	7.7	7.5	7.7	4.7	7.8	7.0	0.6	0.6	0.6
抑菌率(%)	0	0	0	0	35.9	0	0	100	100	100
孢子数(个)	$2.0 \times 10^6$	$0.3 \times 10^6$	$1.0 \times 10^6$	$0.9 \times 10^6$	$0.06 \times 10^6$	$0.1 \times 10^6$	$0.3 \times 10^6$	0	0	0

注:a:水蒸汽蒸馏;b:直接蒸馏;c:超临界萃取。

表3 丁香精油对冬枣青霉的抑制效果  
Table 3 Inhibitory effect of the clove oils on *Penicillium expansum* infecting jujube

浓度	C K	200mg/L			400mg/L			600mg/L		
		a	b	c	a	b	c	a	b	c
菌落直径(cm)	7.3	5.8	4.7	4.5	1.1	2.0	1.2	0.6	0.6	0.6
抑菌率(%)	0	22.4	38.8	41.8	92.5	79.1	91.0	100	100	100
孢子数(个)	$2.78 \times 10^9$	$1.89 \times 10^9$	$2.08 \times 10^9$	$2.11 \times 10^9$	$1.5 \times 10^7$	$1 \times 10^7$	$4 \times 10^6$	0	0	0

注: a: 水蒸汽蒸馏; b: 直接蒸馏; c: 超临界萃取。

取丁香精油抑菌率达100%, 而直接蒸馏所得丁香精油抑菌率仅76.2%。600mg/L浓度时所有丁香精油对葡萄灰霉菌均有完全的抑制作用, 此时菌丝不能生长、孢子没有萌发。因此, 三种提取方法所得精油以水蒸汽蒸馏精油抑菌效果最好, 其次为超临界萃取, 直接蒸馏丁香精油抑菌效果最低。

## 2.2 丁香精油对葡萄链格孢菌抑制效果

链格孢也是引起葡萄采后腐烂的主要致病菌, 通过水蒸汽蒸馏、直接蒸馏、超临界萃取方法提取的丁香精油培养14d后对葡萄链格孢的抑制效果见表2。

与灰霉菌相比, 葡萄链格孢在PDA培养基上生长速率较慢, 26℃下培养14d对照培养皿内菌丝还没有长满, 但200mg/L时丁香精油对菌丝的生长都起到了刺激作用, 比对照生长更快, 14d时长满培养皿。400mg/L的水蒸汽蒸馏丁香精油对链格孢的抑制率为35.9%, 而其他两种精油不能抑制菌丝的生长。但200mg/L和400mg/L的丁香精油均可抑制链格孢的产孢数量, 均低于对照。不管提取方式如何, 600mg/L浓度的丁香精油均可完全控制葡萄链格孢的菌丝生长和孢子萌发。

## 2.3 丁香精油对冬枣青霉菌抑制效果

冬枣是我国近年来发展较快的水果, 风味好, 价格高, 但贮藏过程中容易失水、变红、出现红色凹陷斑。本试验从冷藏近4个月的冬枣病变果蒂处分离出青霉, 并研究了培养14d后不同提取方法的丁香精油对其抑制效应。

从表3中可以看出, 同方法提取的丁香精油对枣青霉生长抑制能力与对灰霉菌和链格孢的抑制能力一致, 顺序为水蒸汽蒸馏、超临界萃取、直接蒸馏。600mg/L的丁香精油完全抑制了枣青霉的菌丝生长和孢子萌发。

## 2.4 丁香精油对桃灰霉和蒜薹葱磷灰葡萄孢抑制效应

桃在冷藏过程中主要问题有冷害、褐腐等, 经对冷藏4个月的大久保桃褐腐病斑分离、纯化并经反接证明, 灰霉菌是桃褐腐病的病原菌。另外, 蒜薹贮藏过程中, 葱磷灰葡萄孢是引起蒜薹腐烂的重要致病菌。因此, 研究了丁香精油对这两种病原菌的抑制效应。

由图1可以看出随精油浓度的提高, 抑菌效果增加。而且丁香精油对蒜薹葱磷灰葡萄孢的抑制效果好于桃灰霉菌。500mg/L时抑菌率分别为79.3%、85.7%,

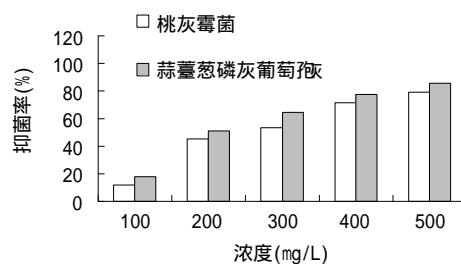


图1 丁香直馏精油对桃和蒜薹主要致病菌的抑制效果

Fig.1 Inhibitory effect of clove oil on postharvest pantheon of peach and garlic shoot

尚不能完全抑制两种病原菌的生长。

## 2.5 丁香精油的抑菌和杀菌效应比较

为了证明丁香精油对病原真菌是杀死还是抑制, 将对葡萄灰霉菌和链格孢完全抑制的处理(600、800mg/L)培养皿中的菌落移入没有加精油的PDA培养皿中, 菌落不再生长, 说明该条件已经杀死灰霉菌和链格孢。而同样操作条件下, 枣青霉仍然生长, 而且随原处理浓度增高, 转到未加精油的PDA培养皿中的青霉生长减慢, 说明600、800 mg/L丁香精油尚不能杀死枣青霉, 只是起到抑制作用。

## 3 结论与讨论

### 3.1 丁香精油的抑菌效果与机理

大量研究表明, 从香辛料中提取出的精油对微生物具有较强的抑制作用, 是研究天然防腐剂的重要来源<sup>[10]</sup>。酚类物质是香辛料精油抗菌的主要活性成分<sup>[11]</sup>, 其中丁香酚是丁香精油主要的抑菌成分, 含量一般在60%以上。丁香酚通过使细胞膜中的蛋白质变性、与细胞膜中的磷脂反应破坏细胞膜的透性, 从而抑制微生物的生长, 500mg/L的丁香酚可以完全抑制革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌的生长<sup>[7]</sup>。

本实验表明, 丁香精油对果蔬贮藏过程中的主要致病真菌菌丝生长和孢子萌发具有较强的抑制效应。不管提取方式如何, 600mg/L时丁香精油可以杀死葡萄灰霉菌、链格孢, 并完全抑制枣青霉的生长, 500mg/L时对蒜薹葱磷灰葡萄孢和桃灰霉菌抑菌率分别为85.7%、79.3%。但200mg/L的丁香精油对葡萄链格孢的菌丝生长有一定的刺激作用, 其机理尚需进一步研究。

### 3.2 提取方法对丁香精油抑菌效果的影响

不同提取方法和处理条件对提取物的生物活性影响较大。本文实验表明不同提取方式对丁香精油的抑菌效应有明显的影响,其中水蒸汽蒸馏抑菌效果最好,超临界萃取次之,直接加热水蒸馏稍差。主要原因可能是不同提取方法提取的精油中主要活性成分丁香酚含量不同。直接蒸馏方法提取时,温度过高导致部分丁香酚被氧化,超临界提取时,丁香油中含有较高的其他脂溶性物质,而水蒸汽蒸馏时温度稳定且不超过100℃,因此,不同提取方式所得精油中的成分含量不同(待发表)。丁香精油中各种成分与抑菌关系尚需进一步研究。

### 3.3 丁香精油在果蔬保鲜中的应用前景

我国是植物资源大国,尤其是在中草药的抑菌效果的研究应用方面较多,开发天然防腐保鲜剂具有较大的潜力<sup>[4]</sup>。精油除了具有良好的抑菌能力外,一个典型特点还在于气态时具有较强的生物活性,可以作为使用方便的熏蒸剂用于农产品的贮藏保鲜。另外,有研究报道天然精油可以提高植物对病原菌的抵抗能力<sup>[2]</sup>、抑制蔬菜中的过氧化物酶活性<sup>[12]</sup>。研究表明丁香精油对部分果蔬具有明显的保鲜效果<sup>[13,14]</sup>。因此丁香精油在农产品贮藏保鲜方面具有良好的应用前景。本文实验表明丁香本文仅研究了丁香精油对几种果蔬病原菌的抑制效应,关于其对果品蔬菜得保鲜效果尚需进一步研究。

总的来看,丁香精油将是研究开发农产品天然保鲜剂的重要来源,未来的研究应确定精油在果蔬保鲜中的最佳应用方式。同时,还应采用现代化学分析手段分析精油主要化学成分,确定精油的构效关系,为仿生合成天然防腐剂提供借鉴。

#### 参考文献:

- [1] Wilson C L, Wisniewski M E. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: An emerging technology[J]. Annu Rev Phytopatho, 1989, 27: 425-441.
- [2] Pramila Tripathi, NK Dubey. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables[J]. Postharvest Biology and Technology, 2004, 32: 235-245.
- [3] 林进能. 天然食用香料生产与应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1991.
- [4] 余世望, 范青生, 肖小年, 等. 60种食药两用中药抗菌防腐作用研究[J]. 天然产物研究与开发, 1997, 9(4): 61-67.
- [5] 吴传茂, 吴周和. 丁香提取液的抑菌作用研究[J]. 湖北工学院学报, 2000, 15(1): 43-45.
- [6] 周柏玲, 杨丽莉. 丁香和桂皮提取物对果蔬病原菌抑制效果. 保鲜与加工, 2003, 3(6).
- [7] Maria Blaszyk, Richard A Holley. Interaction of monolaurin, eugenol and sodium citrate on growth of common meat spoilage and pathogenic organisms[J]. International Journal of Food Microbiology, 1998, 39: 175-183.
- [8] Wendakoon C N, Sakaguchi M. Combined effect of sodium chloride and clove on growth and biogenic amine formation of *Enterobacter aerogenes* in mackerel muscle extract[J]. J Good Prot, 1993, 56: 410-413.
- [9] Beatriz I Vazquez, C Fente, C M Franco, et al. Inhibitory effects of eugenol and thymol on *Penicillium citrinum* strains in culture media and cheese[J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 67: 157-163.
- [10] Bhargava MC, Meena B L. Effect of some spice oils on the eggs of *Coryscephalonica Stainton*[J]. Insect-Environment, 2001, (7): 1, 43-44.
- [11] A Velluti, V Sanchis, A J Ramos, et al. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B<sub>1</sub> production by *Fusarium proliferatum* in maize grain[J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 89: 145-154.
- [12] AG Ponce, CE del Valle, SI Roura. Natural essential oils as reducing agents of peroxidase activity in leafy vegetables[J]. Lebensm Wiss. u Technol, 2004, 37: 199-204.
- [13] 宋义忠, 孔秋莲, 孟宪军, 等. 丁香提取物对花椰菜保鲜效果的研究[J]. 上海蔬菜, 2003(2): 40-41.
- [14] 毛琼, 宋晓岗, 罗宗铭. 中草药提取物保鲜水果的效果研究[J]. 食品科学, 1999, (5): 54-56.



## 英国开发出生物降解 BOPP 膜新品

近日, 英国 Innovia 薄膜公司宣布开发出生物降解 BOPP 膜新产品。

据介绍, Innovia 公司开发的镀金属纤维素薄膜 NatureFlex, 具有高阻隔性和生物降解性, 并具有扭结包装要求的高表面光泽。其高刚性牌号 NatureFlex E944, 特点为尺寸稳定性好, 对湿气敏感性低。除厚度为 35 微米的 Propafresh TG18 多孔 BOPP 膜外, 该公司还正在开发涉及聚合物新配方的薄膜, 适用于要求长保质期的新鲜食品包装。其牌号 G1835 的特点是比标准共挤 BOPP 膜透气率高。