

陈皮精油对大肠杆菌的抑菌作用研究

段亮亮, 高杨楚楚, 刘宁, 张维敏, 商晋*

(陕西中医药大学公共卫生学院, 咸阳 712046)

摘要: **目的** 探讨陈皮精油对大肠杆菌的抑菌作用。**方法** 采用具有代表性的5年广陈皮(*Pericarpium citri reticulatae* 'Chachiensis', PCR-C)和模式大肠杆菌菌株(*Escherichia coli*, *E. coli*) ATCC25922进行相关研究, 采用水蒸气蒸馏法进行陈皮精油提取, 采用气相色谱与质谱联用仪分析精油具体化合物成分, 采用全波长酶标仪测定陈皮精油对*E. coli*的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC), 并结合*E. coli*生长曲线、生物膜形成、胞内大分子物质含量、脂肪酶活性变化, 探究其对大肠杆菌的抑菌机制。**结果** (1)陈皮中精油含量为7.42%, 包括46种挥发性化合物, 含量为976.93 mg/g, 其主要成分为单萜烯(13种, 927.72 mg/g, 94.96%), 且以D-柠檬烯(578.31 mg/g, 59.20%)含量最高; (2)陈皮精油对*E. coli*抑菌作用较强, 最小抑菌浓度为1.28 mg/mL (pH 7.5, 37 °C), 满足食品添加感官要求; (3)陈皮精油主要通过降低*E. coli*细胞脂代谢、三磷酸腺苷(5'-adenylate triphosphate, ATP)和生物膜合成, 以及延长细胞适应期和降低细胞生长繁殖, 来实现对*E. coli*的抑菌作用。**结论** 陈皮精油对*E. coli*的抑菌作用较为明显, 具有较好的应用前景。

关键词: 陈皮; 精油; 大肠杆菌; 抑菌作用

Study on the antibacterial effects of essential oil of dried tangerine peel on *Escherichia coli*

DUAN Liang-Liang, GAO Yang-Chu-Chu, LIU Ning, ZHANG Wei-Min, SHANG Jin*

(Shaanxi University of Chinese Medicine, College of Public Health, Xianyang 712046, China)

ABSTRACT: Objective To explore the antibacterial effects of essential oil of dried tangerine peel on *Escherichia coli*. **Methods** In this study, the representative 5-years-old *Pericarpium citri reticulatae* 'Chachiensis' (PCR-C) from Guangdong Province and model *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC25922 were selected for the relevant research. The essential oil of dried tangerine peel was extracted by steam distillation. The components of essential oil were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry, the minimum inhibitory concentration (MIC) of essential oil of dried tangerine peel against *E. coli* was determined by a full-wavelength microplate reader, and the antibacterial mechanism of essential oil of dried tangerine peel against *E. coli* was explored by analysis of changes of the *E. coli* growth curve, biofilm formation, concentration of intracellular macromolecular substance, and lipase activity. **Results** (1) The ratio of the essential oil of dried tangerine peel was 7.42%, which included 46 kinds of volatile compounds with a total content of 976.93 mg/g identified, the main component of essential oil was monoterpenes (13 species,

基金项目: 陕西省科技厅重点研究项目(2018SF-290)、陕西省科技厅自然科学基金基础研究项目(2019JQ-563)

Fund: Supported by the Key Research Projects of Shaanxi Provincial Department of Science and Technology (2018SF-290), and the Basic Research Project of Natural Science of Shaanxi Provincial Department of Science and Technology (2019JQ-563)

*通信作者: 商晋, 博士, 讲师, 主要研究方向为食品卫生与营养。E-mail: jinjin8404@sina.com

*Corresponding author: SHANG Jin, Ph.D, Lecturer, Shaanxi University of Chinese Medicine, College of Public Health, Shijidadao Road, Qindu District, Xianyang 712046, China. E-mail: jinjin8404@sina.com

927.72 mg/g, 94.96%), and *D*-limonene (578.31 mg/g, 59.20%) was the highest volatile component amongst all detected compounds. (2) Antibacterial effect of essential oil of dried tangerine peel on *E. coli* was obvious, and the minimum inhibitory concentration was 1.28 mg/mL (pH 7.5, 37 °C), which met the sensory requirements of food addition. (3) Essential oil of dried tangerine peel could inhibit *E. coli* mainly by reducing metabolism of cellular lipid, inhibiting cellular synthesis of 5'-adenylate triphosphate (ATP) and biofilm synthesis, prolonging the adaptation period of cells and reducing cellular growth and reproduction. **Conclusion** Antibacterial effect of essential oil of dried tangerine peel on *E. coli* is obvious, and it has good application prospects.

KEY WORDS: dried tangerine peel; essential oil; *Escherichia coli*; antibacterial effect

0 引言

细菌是造成人类常见疾病和多发病,以及食品污染的主要危险因素,寻找具有抑菌作用的天然物质已成为目前的研究热点之一^[1]。陈皮(*Pericarpium citri reticulatae*)是芸香科植物橘(*Citrus reticulatae* Blanco)及其栽培变种成熟果皮的干燥产品,通常收藏3年以上的称为陈皮。陈皮品种主要包括以广东新会的茶枝柑(*C. reticulatae* 'Chachiensis')果皮为原料的广陈皮(即新会陈皮)、以重庆市大红袍(*C. reticulatae* 'Dahongpao')果皮为原料的川陈皮、以温州蜜柑(*C. reticulatae* 'Unshiu')果皮为原料的浙陈皮,以及以福建常州市福橘(*C. reticulatae* 'Tangerina')果皮为原料的建陈皮。不同品种中,广陈皮是地道药材,应用最为广泛^[2],具有抗菌消炎、平喘理气、止咳、抗癌等作用,其中抗菌消炎为其一项重要功能^[3]。前人研究表明精油作为新鲜柑橘皮重要成分,具有较好的抑菌作用^[4-6],然而精油作为陈皮的重要成分^[3],是否与其抑菌作用有关,相关研究少见报道。

大肠杆菌学名“大肠埃希菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)”,是一类与我们日常生活关系非常密切的细菌,是人体及动物肠道中的正常寄居革兰氏阴性短杆菌,有鞭毛及动力,为无芽孢的单个生物。大肠杆菌为兼性厌氧菌,生长温度范围是8~46 °C,最适生长温度为37 °C,该温度也为人体正常温度。其菌体抗原为“O”型抗原,鞭毛抗原为“H”型抗原,表面抗原为“K”型抗原,根据其抗原结构的差异被分为180多种血清型别,其中一部分在一定条件下引起疾病,如能够引起人体或动物胃肠道感染、尿道感染以及败血型感染等^[7]。针对其致病性,不同的国家和地区在不同的食品中均对*E. coli*规定了标准限量值,其是食品生产加工及保存过程中常见的质控菌^[8]。

基于此,本研究选取广陈皮,以*E. coli*标准菌种(ATCC 25922)为供试菌种,旨在分析陈皮精油对*E. coli*的抑菌作用。该研究对揭示陈皮的抑菌机制、提高食品安全性,以及开发新型、高效、安全的天然抗菌药物或食品抑菌剂均具有重要的理论参考意义。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 陈皮

广陈皮,新会茶枝柑(*C. reticulatae* 'Chachiensis')的干燥果皮,5年陈皮(2014年采摘)。

1.1.2 菌株

大肠埃希菌 ATCC25922 (*E. coli* ATCC25922),购于中国科学院微生物研究所。

1.1.3 试剂

LB (Luria Bertani)培养基(分析纯,上海博微生物科技有限公司);正己烷、甲醇(色谱纯,南京化学试剂股份有限公司);结晶紫(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);30%冰醋酸(分析纯,百爱生物科技山东有限公司);二甲基亚砜(methyl sulfoxide, DMSO, 色谱纯,德国WAK公司)。

标准品: α -侧柏烯(纯度 $\geq 99.0\%$)、 α -蒎烯(纯度 $\geq 99.0\%$)、对伞花烃(纯度 $\geq 99.0\%$)、芳樟醇(纯度 $\geq 97.0\%$)、癸醛(纯度 $\geq 98.0\%$)、紫苏醛(纯度 $\geq 96.0\%$)、乙酸橙花醇酯(纯度 $\geq 98.0\%$)、十六酸甲酯(纯度99%)、亚油酸甲酯(纯度 $\geq 98.0\%$)、亚麻酸甲酯(纯度 $\geq 99.0\%$)、香芹酚(纯度99%)、2-甲氧基-4-乙炔基苯酚(纯度 $\geq 98.0\%$)、正十六酸(纯度 $\geq 99.0\%$)(美国Sigma-Aldrich公司); α -蒎品烯、 β -反式-罗勒烯、 α -松油醇、百里香酚、氧化石竹烯(2000 $\mu\text{g/mL}$)、正构烷烃混合标准溶液[各物质质量浓度1000 $\mu\text{g/mL}$,溶剂二氯甲烷:二硫化碳=85:15 (V:V)](德国默克公司)。

1.2 仪器与设备

6890NGC/5975BMS 气相色谱与质谱联用仪(美国Agilent公司);HP-5MS Phenyl Methyl Siloxane 毛细管柱(30 m \times 0.25 mm, 0.25 μm , 美国J&W Scientific公司);HYM-200B 台式恒温摇床(广州沪瑞明仪器有限公司);伯乐680 全波长酶标仪(美国Bio-Rad公司);UV1900 紫外分光光度计(上海佑科鑫贝西公司);CJ-WATER/潮景超纯水机(东莞思佰康环保科技有限公司);Clevenger-type apparatus 挥发油提取器(江苏荣力普科学仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 陈皮精油提取方法

根据 Clevenger-type apparatus 蒸馏法进行陈皮精油提取^[9], 称取 25 g 陈皮粉碎后过 100 目筛, 将陈皮置于挥发油提取器中, 加入体积约 10 倍的水 40 °C 溶胀 1 h, 之后进行提取 3~4 h 至油量不再增加, 以备分析。

1.3.2 陈皮精油气相色谱-质谱联用法分析

采用气相色谱-质谱联用法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)进行具体陈皮精油化学成分分析, 方法同王坚等^[9]的方法。保留指数采用正构烷烃计算。定性定量采用标准品比对, 并结合质谱库特征离子比对进行精油成分分析, 对无标准品的化合物, 则根据具有相同官能团或者相似碳原子数的化合物来进行定量。

1.3.3 陈皮精油对大肠杆菌抑菌作用分析

参照杨春雪等^[10]的方法, 略作修改, 进行陈皮精油对大肠杆菌的抑菌作用分析。将陈皮精油溶解于 DMSO 备用。采用 LB 培养基 37 °C、120 r/min 培养 *E. coli* 24 h, 进行大肠杆菌接种。陈皮精油在 LB 培养基中的质量浓度梯度为 0.0025、0.0050、0.0100、0.0200、0.0400、0.0800、0.1600、0.3200、0.6400、1.2800、2.5600、5.1200、10.2400 mg/mL, 设置无陈皮精油的 DMSO 溶剂组和空白(CK, 采用无菌水)两个对照组, 38 °C 培养 24 h, 全波长酶标仪测定菌液 OD₆₀₀, 确定陈皮精油对 *E. coli* 的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。

1.3.4 陈皮精油对大肠杆菌生长曲线的影响

取 *E. coli* ATCC25922 于 LB 培养基中 37 °C、120 r/min 培养 24 h, 稀释至 1×10^7 cfu/mL。菌液按 1% (V:V) 的接种量转接至不同陈皮精油质量浓度(0.0025、0.0050、0.0100、0.0200、0.0400、0.0800、0.1600、0.3200、0.6400、1.2800、2.5600 mg/mL) 的 LB 培养基中, 设置 DMSO 和 CK 两个对照组, 37 °C、120 r/min 培养。每 2 或 4 h 取样, 全波长酶标仪测定 OD₆₀₀。

1.3.5 陈皮精油对大肠杆菌生物膜形成的影响

采用 VASUDEVAN 等^[11]的方法, 略作修改, 进行陈皮精油对大肠杆菌生物膜形成的影响研究。菌液接种至含不同质量浓度陈皮精油(0.0025、0.005、0.01、0.02、0.04、0.08、0.16、0.32、0.64 mg/mL) 的 LB 培养基中, 接种量 1%, 设置 DMSO 和 CK 两个对照组。充分混匀后, 转入无菌 96 孔板, 37 °C 静置培养 24 h, 测定 OD₆₀₀ 及 OD₅₇₀, 计算相对值(OD₅₇₀/OD₆₀₀)。

1.3.6 陈皮精油对细胞外 DNA、RNA 等大分子物质含量的影响

根据 CHEN 等^[12]的方法, 进行胞外大分子物质吸光度值测定, 根据数值差异反映细胞生物膜通透性。

1.3.7 陈皮精油对大肠杆菌脂肪酶活性的影响

参照 YANG 等^[13]的方法进行大肠杆菌脂肪酶活性的测定。

1.3.8 数据分析

用 Microsoft Excel 2017 记录数据, 用 SPSS 20.0 进行数据统计分析, 采用方差分析(analysis of variance, ANOVA)

($P=0.05$)进行相关数据的差异显著性比较。

2 结果与分析

2.1 陈皮精油成分分析

采用水蒸气蒸馏法获得陈皮精油的提取率为 7.42%, 高于以往文献报道(2%~3%)^[14-15], 这可能由于相较于其他陈皮种类, 广陈皮精油含量更为丰富^[9]。另外, 以往主要采用的是新鲜果皮^[14-15], 而本研究中陈皮为干燥的柑橘果皮, 除去了大量水分, 有助于提升精油提取率。

陈皮精油中共检出挥发性化合物 46 种, 其中单萜烯(13 种, 927.72 mg/g)含量最为丰富, 其次为酯类、倍半萜烯、醇类、醛类、酚类以及酮、醚、酸等其他化合物(表 1), 这与前人研究结论基本一致^[16-17]。单萜烯中 *D*-柠檬烯、 γ -蒎品烯、对伞花烃 3 种物质占总挥发性化合物的 82.56%, 为主要化合物, 特别是 *D*-柠檬烯含量高达 578.31 mg/g, 占总挥发化合物的 59.20%, 该结果与何静等^[16]、李勇慧等^[17]的研究基本一致, 这些研究均表明 *D*-柠檬烯的含量最高。此外, 前人表明精油中醇、醛、酮、酸、醚、酯、酚等含氧化合物是柑橘精油香味的主要来源^[18], 这类呈味物质在本次研究中检出量较低, 总量少于 5%。

2.2 陈皮精油对大肠杆菌抑菌作用的影响

如图 1 所示, 当陈皮精油质量浓度升高(0~10.2400 mg/mL)时, 对 *E. coli* ATCC25922 生长繁殖抑制作用增强。当陈皮精油质量浓度为 1.2800 mg/mL 时, 对 ATCC25922 生长完全抑制, 与质量浓度 0.6400 mg/mL 组差异显著($P<0.05$), 且在精油添加量大于 1.2800 mg/mL 时, 培养液澄清透明, 菌体均未生长, 因此, 陈皮精油对 *E. coli* ATCC25922 的 MIC 为 1.2800 mg/mL。同时, CK 与 DMSO 未表现出组间差异($P>0.05$), 说明 DMSO 添加量 1% 时对大肠杆菌生长无影响。

前人研究表明不同植物精油的抑菌作用不同, 如辛夷精油对 *E. coli* 的 MIC 为 0.10%~0.20%, 艾蒿精油的 MIC 为 0.40%~0.80%, 黄花蒿精油的 MIC 为 0.20%~0.40% (pH、温度等因素会影响抑菌效果)^[11,14]。本研究中陈皮精油对 *E. coli* 的 MIC 为 1.2800 mg/mL (pH 7.5, 37 °C, MIC \approx 0.12%), 相较于其他植物精油, 陈皮精油的抑菌效果较好。另一方面, 柑橘皮精油对其他微生物也有一定的抑菌作用, 如对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和酵母菌等也有一定的抑制作用, 然而相较于这些微生物 (MIC, 0.78~3.125 μ L/mL, 0.08%~0.31%)^[5], 陈皮精油对 *E. coli* 的抑菌效果 (MIC \approx 0.12%) 相对较为敏感^[5,19]。MIC 浓度条件下, 精油中主要呈香物质 *D*-柠檬烯 (<1%, V:V)、芳樟醇 (<0.125%, V:V)、柠檬醛 (<0.06%, V:V) 会给食品带来较好的嗅觉体验^[19], 可见陈皮精油在作为天然食品香精使用的同时, 也可以达到抑制 *E. coli* 的作用。

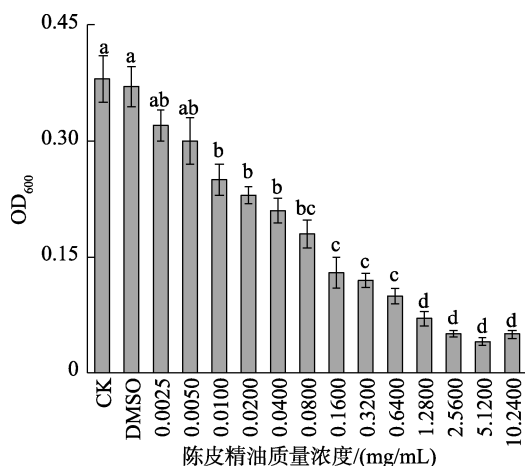
表1 陈皮精油中的挥发性化合物成分
Table 1 Volatile compound compositions of tangerine peel essential oil

化合物	保留指数	定性定量离子(<i>m/z</i>)	含量/(mg/g)	百分率/%
α -侧柏烯	926	77, 91, 92, 93, 94	11.53±1.50	1.18±0.15
α -蒎烯	933	77, 91, 92, 93, 94	33.91±2.98	3.47±0.29
玟烯	948	39, 41, 91, 93	0.39±0.04	0.04±0.01
桉烯	973	77, 79, 91, 93	2.54±0.18	0.26±0.02
β -蒎烯	976	69, 79, 93	26.17±3.66	2.68±0.37
β -月桂烯	991	41, 69, 93	29.99±4.80	3.07±0.48
α -水芹烯	1005	92, 93, 136	1.23±0.12	0.13±0.01
α -蒎品烯	1018	93, 121, 136	3.08±0.24	0.32±0.02
对伞花烃	1026	120, 134, 135	102.91±11.15	10.53±1.11
<i>D</i> -柠檬烯	1033	93, 134, 137	578.31±55.13	59.20±5.51
β -反式-罗勒烯	1049	41, 91, 93	0.93±0.10	0.10±0.01
γ -蒎品烯	1059	81, 137	125.31±9.22	12.83±0.92
异松油烯	1089	32, 93, 121	11.45±1.49	1.17±0.15
单萜烯(13种)	-	-	927.72±91.57	94.96±9.16
古巴烯	1378	164, 205	0.85±0.12	0.09±0.01
β -葑澄茄油烯	1392	105, 120, 161	0.64±0.06	0.07±0.01
石竹烯	1422	41, 69, 93	3.48±0.37	0.36±0.04
α -石竹烯	1456	69, 93, 133	0.37±0.03	0.04±0.01
<i>D</i> -吉玛烯	1484	91, 119, 161	0.22±0.03	0.02±0.001
α -蛇床烯	1498	81, 93, 105	1.19±0.20	0.12±0.02
α -金合欢烯	1511	69, 93, 107	5.29±0.56	0.54±0.06
(+)- δ -葑澄茄烯	1526	134, 161, 204	1.03±0.09	0.11±0.01
倍半萜烯(8种)	-	-	13.06±1.69	1.34±0.17
芳樟醇	1101	55, 71, 93	0.59±0.06	0.06±0.01
4-松油醇	1179	54, 153	2.27±0.27	0.23±0.03
对伞花烃-8-醇	1188	43, 91, 135	0.68±0.06	0.07±0.001
α -松油醇	1192	41, 79, 81	1.82±0.25	0.19±0.03
顺式香芹醇	1221	41, 84, 109	2.12±0.25	0.22±0.03
β -香茅醇	1230	55, 69, 82	0.35±0.03	0.04±0.001
反式香芹醇	1234	41, 84, 109	0.76±0.06	0.08±0.01
醇(7种)	-	-	8.58±0.51	0.88±0.05
癸醛	1207	41, 43, 57	1.27±0.17	0.13±0.02
紫苏醛	1276	67, 68, 79	0.67±0.10	0.07±0.01
α -甜橙醛	1758	41, 55, 93	6.59±0.56	0.67±0.06
醛(3种)	-	-	8.54±0.94	0.87±0.09
乙酸香茅醇酯	1355	43, 69, 81	0.21±0.02	0.02±0.001
乙酸橙花醇酯	1366	41, 43, 69	0.22±0.03	0.02±0.001

表 1(续)

化合物	保留指数	定性定量离子	含量/(mg/g)	百分率/%
2-甲胺基苯甲酸甲酯	1411	77, 104, 165	13.11±2.23	1.34±0.22
十六酸甲酯	1927	87, 101, 143	0.13±0.01	0.01±0.001
亚油酸甲酯	2097	95, 96, 109	0.23±0.02	0.02±0.01
亚麻酸甲酯	2104	79, 80, 95	0.11±0.01	0.01±0.002
酯(6 种)	-	-	13.99±2.09	1.43±0.21
百里香酚	1290	91, 207, 222	0.32±0.03	0.03±0.003
香芹酚	1297	91, 135, 150	1.17±0.10	0.12±0.01
对百里香酚	1306	91, 207, 222	0.82±0.07	0.08±0.01
2-甲氧基-4-乙烯基苯酚	1317	107, 135, 150	0.21±0.02	0.02±0.002
酚(4 种)	-	-	2.52±0.38	0.26±0.038
反式-氧化柠檬烯	1139	27, 43, 67	0.90±0.15	0.09±0.02
氧化石竹烯	1587	41, 43, 79	0.46±0.05	0.05±0.005
(+)-香芹酮	1246	91, 105, 107	1.62±0.15	0.17±0.01
正十六酸	1968	41, 60, 73	0.18±0.02	0.02±0.001
百里香酚甲醚	1236	77, 107, 122	0.40±0.04	0.04±0.01
其他(5 种)	-	-	3.56±0.31	0.37±0.03
总含量(46 种)	-	-	976.93±99.43	100.00±10.57

注: -表示无。



注: 不同小写字母表示样本间差异显著, $P < 0.05$, 图 3、4 同。

图 1 不同质量浓度陈皮精油对 *E. coli* ATCC25922 的抑菌作用($n=3$)

Fig.1 Antibacterial effects of different mass concentrations of essential oil of dried tangerine peel on *E. coli* ATCC25922 ($n=3$)

2.3 陈皮精油对大肠杆菌生长曲线的影响

如图 2 所示, CK 组与 DMSO 组大肠杆菌生长曲线基

本重合, 曲线呈 S 形, 且可以看出典型的迟滞期、对数期、平稳期, 说明 DMSO 作为陈皮精油的促溶剂, 对 *E. coli* ATCC25922 的生长无影响。此外, 随着陈皮精油剂量的增加, 大肠杆菌达到平稳期的 OD₆₀₀(细胞数量)逐渐降低, 当精油质量浓度大于 0.1600 mg/mL 时, 迟滞期明显增长, 当大于 1.2800 mg/mL 时, 无典型生长曲线, 完全抑制了细胞生长。微生物的生长繁殖需要大量的三磷酸腺苷 (5'-adenylate triphosphate, ATP)^[20], 陈皮精油同样可能通过抑制 *E. coli* 细胞 ATP 的合成来抑制其生长繁殖, 然而具体机制还有待于进一步研究。

2.4 陈皮精油对大肠杆菌生物膜形成的影响

CK 与 DMSO 组间无差异(图 3, $P > 0.05$), 表明 1% 的 DMSO 对 *E. coli* ATCC25922 的生物膜合成无影响。当陈皮精油的质量浓度大于 0.0100 mg/mL 时, OD₅₇₀/OD₆₀₀ 显著低于 CK, 表现出对 ATCC25922 生物膜形成的显著抑制, 并且随着精油质量浓度的升高, 对 ATCC25922 的生物膜形成抑制作用增强(图 3)。前人研究表明柑橘皮精油中高含量 D-柠檬烯的抑菌作用主要体现在其能够改变细胞膜的结构, 特别是对磷脂双分子层结构的改变, 改变了细胞膜原有的功能^[21-22], 本研究结果与此保持一致。

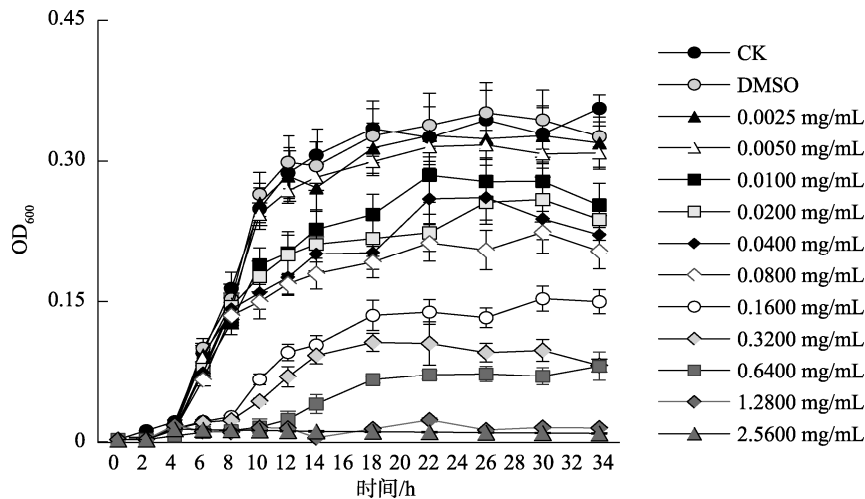


图 2 不同质量浓度陈皮精油对 *E. coli* ATCC25922 生长曲线的影响($n=3$)

Fig.2 Effects of different mass concentrations of essential oil of dried tangerine peel on the growth curves of *E. coli* ATCC25922 ($n=3$)

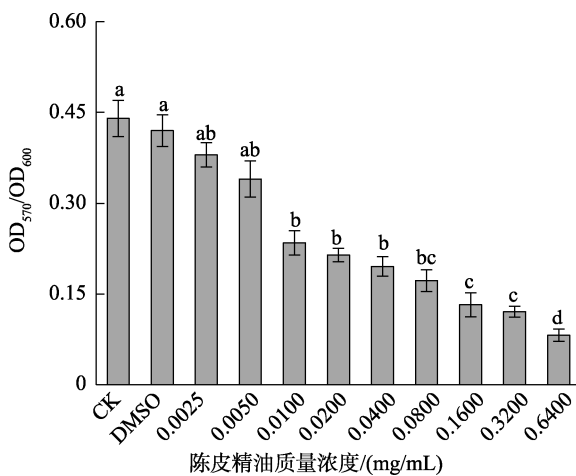


图 3 不同质量浓度陈皮精油对 *E. coli* ATCC25922 生物膜的影响($n=3$)

Fig.3 Effects of different mass concentrations of essential oil of dried tangerine peel on the biofilm of *E. coli* ATCC25922 ($n=3$)

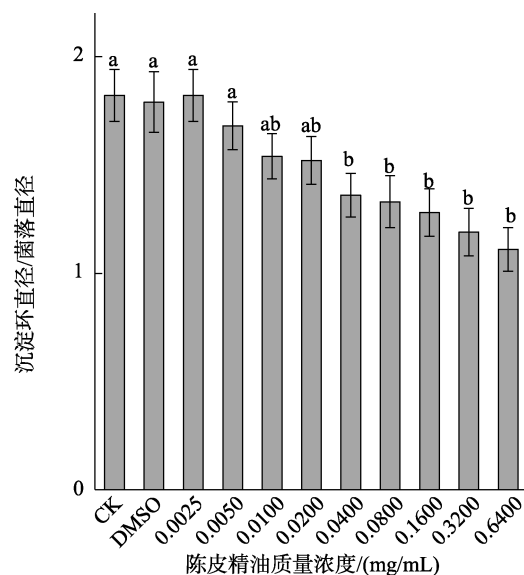


图 4 不同质量浓度陈皮精油对 *E. coli* ATCC25922 脂肪酶活性的影响($n=3$)

Fig.4 Effects of different mass concentrations of essential oil of dried tangerine peel on the lipase activities of *E. coli* ATCC25922 ($n=3$)

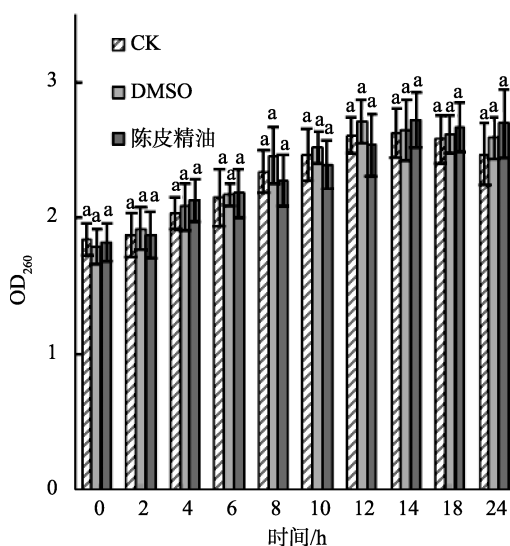
2.5 陈皮精油对大肠杆菌脂肪酶活性的影响

CK 组与 DMSO 组脂肪酶活性差异不显著(图 4, $P>0.05$), DMSO 对 ATCC25922 脂肪酶活性无影响。随着陈皮精油质量浓度的升高, 其对大肠杆菌脂肪酶活性的抑制作用加强, 当精油质量浓度达到 0.0400 mg/mL 时, 对大肠杆菌脂肪酶活性下降显著(图 4, ANOVA, $P<0.05$), 而较低质量浓度 0.0025 与 0.0050 mg/mL 对脂肪酶活性无影响。这说明当陈皮精油质量浓度大于 0.0400 mg/mL 能够抑制 *E. coli* ATCC25922 脂类物质的合成与代谢, 进而影响细胞生物膜的合成和结构。

2.6 陈皮精油对细胞外 DNA、RNA 等大分子物质含量的影响

如图 5 所示, 随着大肠杆菌的生长繁殖, 陈皮精油组与 CK 及 DMSO 并无显著差异($P>0.05$), 说明陈皮精油对细胞外 RNA、DNA 等大分子含量(以 OD_{260} 表示)无显著影响($P>0.05$)。该结果与前人研究结果有所差异。前人报道新鲜的柑橘皮精油可使细胞膜去极化, 细胞核酸、蛋白质外露, 细胞内 ATP 合成减少, 细胞成分泄漏, 细胞膜通透性增加^[23]。本研究中陈皮精油对 *E. coli* 胞外 DNA、RNA

等大分子物质含量影响并不显著($P>0.05$) (图 5), 这说明细胞膜通透性并未被显著影响。这种差异可能因为新鲜果皮和陈皮精油化合物成分不同。精油中微量的含氧单萜、*E*-香芹醇^[6]、芳樟醇^[24]等能够增加细胞膜通透性, 表现出比萜烯类(如 *D*-柠檬烯)更强抑菌活性^[6,24-26]。如 AMBROSIO 等^[4]表明当新鲜柑橘皮精油中含氧化合物较高而萜烯化合物含量(0.08%~0.13%)较低时, 具有更强的抑菌活性。可能由于这类含氧化合物如醇、醛、酯、酚等物质含量在陈皮精油中检出均较低($<1.5\%$, 表 1), 因此并未表现出对细胞膜通透性的显著影响。



注: 同一时间标注不同小写字母的具有显著性差异($P<0.05$)。

图 5 陈皮精油对 *E. coli* ATCC25922 胞外 DNA、RNA 等大分子物质含量的影响($n=3$)

Fig.5 Effects of essential oil of dried tangerine peel on the content of extracellular DNA, RNA and other macromolecular substances of *E. coli* ATCC25922 ($n=3$)

3 结 论

本研究选用 5 年广陈皮及模式菌株 *E. coli* ATCC25922 来研究陈皮精油对大肠杆菌的抑菌作用。采用 Clevenger-type apparatus 蒸馏法进行陈皮精油提取, 提取率为 7.42%, 其中 *D*-柠檬烯、 γ -萜品烯、对伞花烃 3 种物质占总检出量 82.56%, 为主要化合物, 特别是 *D*-柠檬烯占比高达 59.20%。陈皮精油主要通过降低脂代谢、降低生物膜合成、降低 ATP 合成、抑制生长繁殖来达到对 *E. coli* 的抑制作用。陈皮精油对 *E. coli* 的 MIC 为 1.28 mg/mL, 该质量浓度即会赋予食品较好的感官体验, 同时能够达到抑菌防腐的目的。本研究结果对陈皮的进一步应用, 开发新型、高效、安全的天然食品抗菌剂均提供了一定的理论基础。

参考文献

- 王书平, 吴涛, 陆玉建. 几种芳香植物精油的抑菌活性研究[J]. 安徽农学通报, 2018, 24(2): 20-24.
WANG SP, WU T, LU YJ. Study on antimicrobial activity of several kinds of aromatic essential oil [J]. Anhui Agric Sci Bull, 2018, 24(2): 20-24.
- 国家药典委员会. 中国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia: Volume I [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020.
- 余祥英, 陈晓纯, 李玉婷, 等. 不同产地和不同贮藏年限陈皮的化学成分研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(12): 3809-3817.
YU XY, CHEN XC, LI YT, et al. Research progress on the chemical composition of *Citri Reticulatae* of different regions and different storage time [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(12): 3809-3817.
- AMBROSIO C, DIAZ-ARENAS GL, AGUDELO L, et al. Chemical composition and antibacterial and antioxidant activity of a *Citrus* essential oil and its fractions [J]. Molecules, 2021, 26(10): 2888.
- 陈红丽, 郭青云, 钟八莲, 等. 甜橙精油分子蒸馏组分的成分分析及其抗菌活性研究[J]. 保鲜与加工, 2017, 17(2): 95-100.
CHEN HL, GUO QY, ZHONG BL, et al. Chemical composition and antimicrobial activities of sweet orange essential oil prepared by molecular distillation [J]. Storage Process, 2017, 17(2): 95-100.
- GUIMARÃES AC, MEIRELES LM, LEMOS MF, et al. Antibacterial activity of terpenes and terpenoids present in essential oils [J]. Molecules, 2019, 24(13): 2471.
- STOLL BJ, PUOPOLO KM, HANSEN NI, et al. Early-onset neonatal sepsis 2015 to 2017, the rise of *Escherichia coli*, and the need for novel prevention strategies [J]. JAMA Pediatr, 2020, 174(7): e200593.
- SOROUR HK, GABER AF, HOSNY RA. Evaluation of the efficiency of using *Salmonella Kentucky* and *Escherichia coli* O119 bacteriophages in the treatment and prevention of salmonellosis and colibacillosis in broiler chickens [J]. Lett Appl Microbiol, 2020, 71(4): 345-350.
- 王坚, 陈鸿平, 刘友平, 等. 不同贮藏年限新会陈皮挥发油成分动态变化规律研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(12): 2831-2834.
WANG J, CHEN HP, LIU YP, et al. Chemical variability of essential oils in Xinhui *Pericarpium citri reticulatae* stored in different years [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2013, 24(12): 2831-2834.
- 杨春雪, 汪业菊, 谢明杰. 秦皮素抑菌活性及其机制研究[J]. 免疫学杂志, 2012, 28(8): 703-705.
YANG CX, WANG YJ, XIE MJ. Antibacterial activity of fraxetin and its mechanism [J]. Immunol J, 2012, 28(8): 703-705.
- VASUDEVAN P, NAIR MKM, ANNAMALAI T, et al. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation [J]. Vet Microbiol, 2003, 92(1-2): 179-185.
- CHEN CZ, COOPER SL. Interactions between dendrimer biocides and bacterial membranes [J]. Biomaterials, 2002, 23(16): 3359-3368.
- YANG Q, ANH NDQ, BOSSIER P, et al. Norepinephrine and dopamine increase motility, biofilm formation, and virulence of *Vibrio harveyi* [J]. Front Microbiol, 2014, 5: 584.
- KE L, WEIHUI D, WEI H, et al. Extraction of 'Gannanzao' orange peel essential oil by response surface methodology and its effect on cancer cell proliferation and migration [J]. Molecules, 2019, 24(3): 499.

- [15] 靳佳佳, 韦杰. 柑橘精油研究进展[J]. 南方园艺, 2019, 30(2): 53–57.
JIN JJ, WEI J. The review of the study of essential oil from *Citrus* [J]. South Hortic, 2019, 30(2): 53–57.
- [16] 何静, 陈谷, 何倩娴, 等. 广陈皮精油的特异性分析[J]. 现代食品科技, 2020, 36(2): 224–231.
HE J, CHEN G, HE QX, *et al.* Specificity analysis of essential oil from *Pericarpium citri reticulatae* ‘Chachiensis’ [J]. Mod Food Sci Technol, 2020, 36(2): 224–231.
- [17] 李勇慧, 耿惠敏, 李双双. 四种柑橘类果皮精油成分分析[J]. 现代食品科技, 2019, 35(4): 264–272.
LI YH, GENG HM, LI SS. Analysis of the composition of essential oils from four *Citrus* peels [J]. Mod Food Sci Technol, 2019, 35(4): 264–272.
- [18] LIN X, CAO S, SUN J, *et al.* The chemical compositions, and antibacterial and antioxidant activities of four types of *Citrus* essential oils [J]. Molecules, 2021, 26(11): 3412.
- [19] FISHER K, PHILLIPS CA. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* *in vitro* and in food systems [J]. J Appl Microbiol, 2006, 101(6): 1232–1240.
- [20] FARHAT N, HAMMES F, PREST E, *et al.* A uniform bacterial growth potential assay for different water types [J]. Water Res, 2018, 142: 227–235.
- [21] GUPTA A, JEYAKUMAR E, LAWRENCE R. Strategic approach of multifaceted antibacterial mechanism of limonene traced in *Escherichia coli* [J]. Sci Rep-UK, 2021, 11(1): 1–15.
- [22] WANG R, VEGA P, XU Y, *et al.* Exploring the anti-quorum sensing activity of a *D*-limonene nanoemulsion for *Escherichia coli* O157:H7 [J]. J Biomed Mater Res A, 2018, 106(7): 1979–1986.
- [23] SONG X, LIU T, WANG L, *et al.* Antibacterial effects and mechanism of mandarin (*Citrus reticulata* L.) essential oil against *Staphylococcus aureus* [J]. Molecules, 2020, 25(21): 4956.
- [24] GUO F, LIANG Q, ZHANG M, *et al.* Antibacterial activity and mechanism of linalool against *Shewanella putrefaciens* [J]. Molecules, 2021, 26(1): 245.
- [25] ESPINA L, SOMOLINOS M, LORÁN S, *et al.* Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes [J]. Food Control, 2011, 22(6): 896–902.
- [26] DE SEL, FARIAS TC, FERREIRA SB, *et al.* Antibacterial activity and time-kill kinetics of positive enantiomer of α -pinene against strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* [J]. Curr Top Med Chem, 2018, 18(11): 917–924.

(责任编辑: 于梦娇 郑 丽)

作者简介



段亮亮, 博士, 讲师, 主要研究方向为
食品卫生与营养。
E-mail: liangliangsa1@163.com



商 晋, 博士, 讲师, 主要研究方向为
食品卫生与营养。
E-mail: jinjin8404@sina.com