

柑橘精油成分分析及对灰葡萄孢菌的抑制作用

张金磊, 陈兴煌*

(福建农林大学食品科学学院, 福建福州 350000)

摘要: 该研究采用水蒸气蒸馏法和有机溶剂浸提法提取温州特早熟蜜橘橘皮精油, 利用气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 技术分析橘皮精油组成成分。以从福州周边果园收集草莓病果分离所得灰葡萄孢为研究对象, 研究两种精油抑菌性能。结果显示: 蒸馏油共鉴定出 39 种成分, 醛类 6 种, 烯萜类 20 种, 醇类 9 种, 酯类 2 种, 酮类 1 种, 有机酸 1 种; 浸提法精油共鉴定出 25 种成分, 烯萜类 20 种, 醇类 3 种, 烷烃类 2 种。柠檬烯为精油主要成分, 水蒸气蒸馏法含量为 82.37%, 浸提法含量为 85.25%。其次为 γ -松油烯 (7.78%, 6.08%)、 β -月桂烯 (2.56%, 2.06%)、 α -蒎烯 (1.35%, 1.04%)。两种精油对灰葡萄孢最低抑菌体积分数分别为 2.5% 和 5%。体外抑菌实验表明, 精油能够通过抑制灰葡萄孢的菌丝、生长量、孢子萌发率、细胞透过性, 诱导细胞死亡。草莓抑菌实验表明柑橘精油能够抑制灰葡萄孢在草莓果实上的生长, 减缓果实的腐烂进程。其中, 蒸馏油优于浸提油的抑菌效果。

关键词: 柑橘精油; 气相色谱-质谱联用 (GC-MS); 草莓; 灰葡萄孢; 抑菌活性

文章编号: 1673-9078(2022)01-315-323

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.1.0477

Analysis of Components in Citrus Essential Oils and Their Anti-fungal Effects against *Botrytis cinerea*

ZHANG Jinlei, CHEN Xinghuang*

(College of Food Science Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350000, China)

Abstract: Citrus essential oils were separately extracted from the peel of the Wenzhou extra-early-maturing mandarin orange by steam distillation and organic solvent extraction. Components of the orange peel essential oils were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The antifungal performance of the steam-distilled and solvent-extracted essential oils against *Botrytis cinerea* isolated from diseased strawberry fruits collected from orchards around Fuzhou city was investigated. The results indicated that a total of 39 components were identified in the steam-distilled essential oils: six aldehydes, 20 terpenes, nine alcohols, two esters, one ketone, and one organic acid; 25 components were identified in the solvent-extracted essential oils: 20 terpenes, three alcohols, and two alkanes. Limonene showed the highest contents in both essential oils, with contents of 82.37% and 85.25% in the steam-distilled and solvent-extracted essential oils, respectively, followed by γ -terpinene (7.78% and 6.08%, respectively), β -myrcene (2.56% and 2.06%, respectively), and α -pinene (1.35% and 1.04%, respectively). The minimum inhibitory volume fractions of the steam-distilled and solvent-extracted essential oils against *B. cinerea* were 2.5% and 5%, respectively. Results of an *in vitro* antifungal experiment showed that the essential oils induced cell death by suppressing the growth of *B. cinerea* hyphae and reducing the mycelial biomass, spore germination rate, and cell permeability of *B. cinerea*. An antifungal activity experiment performed using strawberries further demonstrated that the citrus essential oils inhibited the growth of *B. cinerea* on strawberry fruits and delayed fruit decay; the steam-distilled essential oils exhibited better antifungal effects than the solvent-extracted essential oils.

Key words: citrus essential oil; gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); strawberry; *Botrytis cinerea*; antifungal activity

引文格式:

张金磊,陈兴煌.柑橘精油成分分析及对灰葡萄孢菌的抑制作用[J].现代食品科技,2022,38(1):315-323

ZHANG Jinlei, CHEN Xinghuang. Analysis of components in citrus essential oils and their anti-fungal effects against *Botrytis cinerea* [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(1): 315-323

收稿日期: 2021-05-06

作者简介: 张金磊 (1995-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 农产品加工贮藏, E-mail: slfhyx@163.com

通讯作者: 陈兴煌 (1961-), 男, 副教授, 研究方向: 农产品贮藏与加工,

E-mail: chenxhjd@126.com

草莓 (*Fragaria ananassa* Duch.) 果实柔软多汁, 芳香馥郁, 含有多种对人体有益的营养物质, 素有“水果皇后”之称^[1,2]。随着人们健康意识、经济水平的提高, 对于草莓的需求逐年增加。而草莓果皮薄嫩, 含水量高, 极易受到病原菌侵染, 引起腐烂。采后主要

病害包括灰霉病、青霉病、软腐病和炭疽病,其中尤以灰霉病造成的损失最为严重^[3]。

灰霉病是由病原真菌灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*) 侵染所致,属于低温高湿型病害,4℃以上灰葡萄孢即可萌发,7~20℃可产生大量孢子^[4]。目前,对于果蔬灰霉病防治主要通过品种选育,田间管理,合理密植,适时采收,喷施化学药剂等措施降低果实带菌率和发病率,其中喷施农药是主要手段^[5]。

但是,近年来由于对化学杀菌剂的使用不够科学合理,灰葡萄孢对啞霉胺、啞菌环胺、腐霉利、异菌脲等多种杀菌剂普遍产生抗性,世界范围内多有报道,新形态的灰葡萄孢菌不断被发现^[6-8]。由于新产品迭代较慢,农产品残留剂量问题,以及人们食品安全意识的提高,环境保护的需要,化学杀菌剂的使用受到了严格限制。因此,全球趋势正在转向寻找更安全、更环保的替代方法来控制采后病害和腐烂^[9]。

精油作为一类天然食品添加剂,广泛应用于医药、香精香料、调味品等诸多方面^[10];对真菌、细菌、病虫害等均具有抑杀作用,鉴于植物精油优良的抑菌抗氧化特性,有望取代或替代传统抑菌剂及杀菌剂^[11]。柑橘精油被美国食品和药品管理局(FDA)认定为“一般认为安全(GRAS)的食品添加剂”^[12]。关于其抑菌研究多有见报道^[13,14],如Tao等^[15]的结果显示椴柑精油处理能够通过导致细胞质丢失和菌丝体变形来改变意大利青霉(*Penicillium italicum*)和指状青霉(*Penicillium digitatum*)菌丝结构;通过改变胞外电导率、细胞成分的释放以及总脂质含量对细胞产生毒性,导致菌体凋亡。Chutia等^[16]研究了柑橘精油对5种植物病原真菌的影响,发现在2 mL/100 mL的精油中,尖芽镰孢菌(*Fusarium oxysporum*)和稻长蠕孢(*Helminthosporium oryzae*)孢子形成率仅为0.5%和0.25%,链格孢菌(*Alternaria alternata*)、水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)、新月弯孢霉(*Curvularia lunata*)的孢子的形成完全被抑制。

本研究以从福州地区分离的草莓灰霉病菌为研究对象,选用特早熟温州蜜橘皮精油对灰葡萄孢的抑制作用及抑菌机理进行探讨,以期对草莓灰霉病害的绿色防控提供一定的理论依据。

1 材料及方法

1.1 材料及试剂

材料:柑橘(特早熟温州蜜桔),9成熟,采自福建永安,当日(12 h内)运回,取皮,50℃干燥,粉碎,过40目筛,装袋于-20℃冰箱备用;草莓采自福

州荆溪芳香草莓园,8~9成熟;本实验室分离、鉴定所得灰葡萄孢菌种。

试剂:马铃薯葡萄糖培养基(PDB)、马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA),生化试剂,上海博微生物;活性白土,食品级,巩义龙腾水处理;其它常用化学试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器设备

ZHWY-2102C 恒温培养振荡器,上海智城分析仪器制造有限公司;DHP-9162 恒温培养箱,太仓市科教器材厂;6890 气相色谱-质谱联用仪,美国Agilent公司;SpectraMax i3x 多功能酶标仪,美国Molecular Devices。

1.3 试验方法

1.3.1 精油提取

1.3.1.1 水蒸气蒸馏

参照王会全等^[17]的方法略有改动。取柑橘粉50 g于圆底烧瓶,加0.3% NaCl溶液,至料液比1:8,采用精油提取器加热蒸馏2 h,收集冷凝管油水混合物,加入经干燥的无水硫酸钠搅拌,静置,抽滤,将滤液存储于棕色瓶保存至-20℃冰箱待用。

1.3.1.2 有机试剂萃取

参照张钟等^[18]的方法略有改动。称取柑橘粉50 g于三角烧瓶,加入正己烷,料液比1:6,超声波处理30 min,避光静置2 h,真空抽滤,将抽滤液转移至圆底烧瓶,用旋转蒸发器于38℃旋蒸,回收有机试剂,待抽提液转变为油状物,体积不再减少,即为混有微量正己烷的精油混合物,经脱蜡,脱色^[19]即得柑橘精油。

1.3.2 精油成分分析

色谱条件:色谱柱为Rtx-5 MS(30 m×0.25 mm,0.25 μm),载气为高纯氦气(99.9%),流速为1 mL/min,分流比为40:1,进样口温度为220℃,柱温从50℃以3℃/min升温至220℃,然后保持2 min,进样量0.2 μL。

质谱条件:传输线温度220℃,EI电子源,电子能量70 eV,离子源温度230℃,m/z扫描范围29~400。

1.3.3 精油对菌丝生长的抑制

参照马江锋等^[20]方法略有改动。将10 mL不同浓度精油储备液分别加入到90 mL PDA培养基混匀,使终体积浓度分别为0.156%、0.312%、0.625%、1.25%、2.5%,以添加10 mL无菌水组为对照,倾注平板,冷却,接种9 mm菌柱于培养皿中央,置与25℃恒温培养,每日测量菌落直径,每个浓度平行处理3次。

$$\text{菌丝抑制生长百分率}/\% = \frac{\text{对照组直径} - \text{处理组直径}}{\text{对照组直径}} \times 100\%$$

1.3.4 精油对菌体生物量的影响

参照马江锋等^[20]方法略有改动。90 mL PDB 培养基中加入 10 mL 不同体积分数精油储备液, 混匀, 使精油终体积分数分别为 0.156%、0.312%、0.625%、1.25%、2.5%, 以添加 10 mL 无菌水组为对照。每个处理接种 1 mL 孢子悬浮液 (10^8 cfu/mL) 25 °C 震荡培养 5 d, 过滤收集菌丝, 蒸馏水洗涤 3 次, 于 65 °C 烘干至恒重, 每处理平行处理 3 次。

$$\text{菌丝生长抑制率}/\% = \frac{\text{对照组质量} - \text{处理组质量}}{\text{对照组质量}} \times 100\%$$

1.3.5 精油对菌体孢子萌发率的影响

参照马江锋等^[20]方法略有改动。PDB 培养基中加入不同浓度精油储备液, 接种 200 μ L 孢子悬浮液 (10^7 cfu/mL) 混匀, 使精油终体积分数分别为 0.156%、0.312%、0.625%、1.25%、2.5%, 25 °C 震荡培养 12 h, 血球计数板镜检计数, 以孢子出芽为依据。重复 3 次, 取均值。

$$\text{萌发率}/\% = \text{出芽孢子数} / \text{镜检孢子数} \times 100\%$$

1.3.6 精油抑菌活性测定

采用 96 孔版微量稀释法^[21]测定柑橘精油对灰葡萄孢的最低抑菌体积浓度 (MIVF)。具体方法: 向第 1 孔加入 100 μ L 20% 精油储备液, 100 μ L PDB 培养基, 进行二倍稀释使得第 1~7 孔精油浓度为 10%~0.156%, 第 8 孔加 100 μ L PDB 作为生长对照, 1~8 孔接种 100 μ L 浓度为 10^6 cfu/mL 孢子悬浮液, 终体积 200 μ L, 混匀。第 9 孔加入 200 μ L PDB 作为空白。25 °C 恒温培养, 每 24 h 进行观察菌落生长状态, 72 h 肉眼观察无菌丝生长即为 MIVF。

1.3.7 精油对细胞膜透性影响

参照马江锋等^[20]方法略有改动。7 mL 离心管加入 3.6 mL 无菌 PBS, 200 μ L 孢子悬浮液 (10^7 cfu/mL), 200 μ L 精油储备液, 使精油终体积分数分别为 0.156%、0.312%、0.625%、1.25%、2.5%, 对照添加 200 μ L 无菌水, 25 °C 恒温震荡培养 24 h, 10000 \times g, 4 °C 离心 30 min, 酶标仪测定上清液 260 nm 波长处的吸光度值。

1.3.8 精油对草莓灰霉病发生的影响

参照 Bi^[22]选择红颜草莓为研究对象, 75% 乙醇浸泡 1 min, 捞出沥除多余液体于超净工作台自然晾干。将所有果实分为 6 组, 每组 20 个果实, 在超净工作台, 每个草莓用打孔器打成直径 3 mm、深 5 mm 的孔, 接种 15 μ L 菌液 (孢子含量为 6×10^5 cfu/mL), 室温定植 12 h, 5 组分别添加 15 μ L 体积分数分别为 0.156%、

0.312%、0.625%、1.25%、2.5% 含有蒸馏油的精油储备液, 以接种 15 μ L 无菌水作为对照, 置于无菌聚乙烯盒 (5.6 L)。25 °C 培养 10 d, 以损伤接种处长出菌丝为标准, 观察创口真菌生长状况。

1.4 数据处理与分析

采用 SPSS 20.0 对数据进行分析, 应用一般线性模型单变量最小显著性差异法进行处理间差异分析, 单因素方差分析进行个体差异分析, $p < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 柑橘精油化学组分

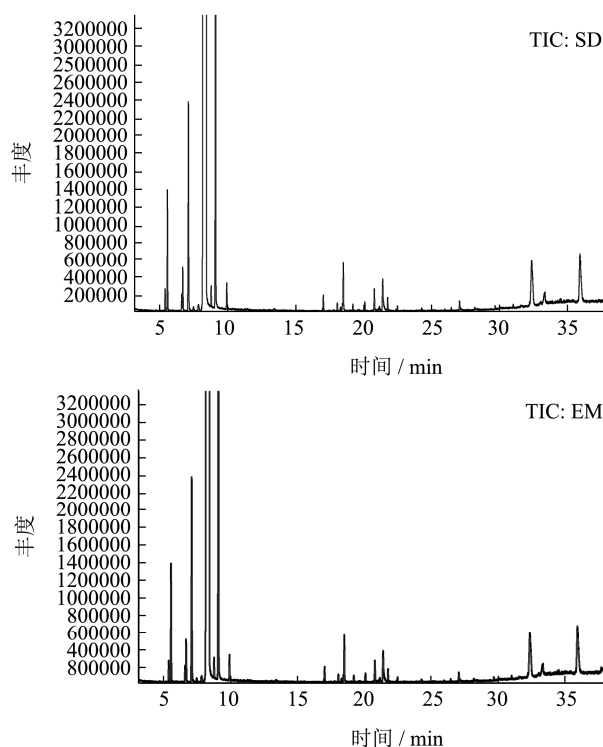


图1 柑橘精油总离子流图

Fig.1 Total ion chromatogram of citrus essential oil

由表 1 可知蒸馏油共鉴定出 39 种成分, 醛类 6 种, 烯萜类 20 种, 醇类 9 种, 酯类 2 种, 酮类 1 种, 有机酸 1 种, 烯萜类占总量的 98.15%。浸提油共鉴定出 25 种成分, 烯萜类 20 种, 醇类 3 种, 烷烃类 2 种, 未检测出醛类物质, 其中烯萜类占总量的 97.38%。两种精油主要成分均为柠檬烯、 γ -松油烯, 其中蒸馏油柠檬烯含量为 82.37%, 浸提油为 85.25%, γ -松油烯在两者中的含量占比分别为 7.78% 和 6.08%。这与陈潘等人^[23]的研究结果柠檬烯(91.52%)、 γ -松油烯(3.85%)等萜类化合物为柑橘皮精油的主要成分大体上相吻合, 其次为 β -月桂烯、 α -蒎烯。其中柠檬烯含量最高,

这与王会全等^[17]的结果柠檬烯 (84.22%)、萜品烯 (6.55%)、 β -月桂烯 (1.67%)、 α -蒎烯 (1.13%) 相吻

合。两种方法所得精油成分组成存在的差异,可能是由于提取方法及纯化过程中的处理方式不同而造成。

表 1 柑橘精油化学成分

Table 1 Chemical constituents of citrus essential oils

编号	出峰时间/min	保留指数/RI	中文名	英文名	分子式	相对含量/%	
						SD	EM
1	4.94	814	2-己烯醛	trans-2-hexenal	C ₆ H ₁₀ O	0.03	-
2	7.06	902	α -侧柏烯	α -thujene	C ₁₀ H ₁₆	0.28	0.17
3	7.22	948	α -蒎烯	α -pinene	C ₁₀ H ₁₆	1.35	1.04
4	8.22	969	α -水芹烯	α -phellandrene	C ₁₀ H ₁₆	0.18	-
5	8.28	943	β -蒎烯	β -pinene	C ₁₀ H ₁₆	0.57	-
6	8.67	958	β -月桂烯	β -myrcene	C ₁₀ H ₁₆	2.56	2.06
7	8.93	958	α -罗勒烯	α -ocimene	C ₁₀ H ₁₆	0.16	-
8	9.22	998	松油烯	α -terpinene	C ₁₀ H ₁₆	0.23	0.38
9	9.74	1018	柠檬烯	limonene	C ₁₀ H ₁₆	82.37	85.25
10	9.92	976	β -罗勒烯	(Z)- β -ocimene	C ₁₀ H ₁₆	0.16	0.13
11	10.15	998	γ -松油烯	γ -terpinene	C ₁₀ H ₁₆	7.78	6.08
12	10.34	1059	辛醇	1-octanol	C ₈ H ₁₈ O	0.02	-
13	10.65	1052	异松油烯	terpinolene	C ₁₀ H ₁₆	0.48	0.53
14	10.87	1082	芳樟醇	linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	0.57	-
15	10.93	1104	壬醛	nonanal	C ₉ H ₁₈ O	0.04	-
16	11.24	1140	反式-1-甲基-4-(1-甲基 乙烯基)环己-2-烯-1-醇	(+)-p-mentha-2,8-dien-1-ol	C ₁₀ H ₁₆ O	0.02	-
17	11.78	1125	香茅醛	citronellal	C ₁₀ H ₁₈ O	0.06	-
18	12.21	1137	4-萜烯醇	terpinen-4-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	0.13	0.06
19	12.43	1143	α -萜品醇	alpha-terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	0.26	0.78
20	12.63	1204	癸醛	decanal	C ₁₀ H ₂₀ O	0.18	-
21	12.88	1206	(1R,5S)-rel-香芹醇	(-)-cis-carveol	C ₁₀ H ₁₆ O	0.02	-
22	13.00	1179	香茅醇	citronellol	C ₁₀ H ₂₀ O	0.08	-
23	13.72	1207	紫苏醛	dl-perillaldehyde	C ₁₀ H ₁₄ O	0.10	-
24	14.63	1377	δ -榄香烯	(+/-)- δ -elemene	C ₁₅ H ₂₄	0.21	-
25	14.78	1302	乙酸香茅酯	dl-citronellol acetate	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	0.03	-
26	14.93	1352	乙酸橙花酯	neryl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	0.06	-
27	15.18	1221	(-)- α -蒎烯	α -copaene	C ₁₅ H ₂₄	0.16	0.10
28	15.28	1398	β -榄香烯	beta-elemene	C ₁₅ H ₂₄	0.57	0.08
29	15.52	1402	十二醛	lauryl aldehyde	C ₁₂ H ₂₄ O	0.02	-
30	15.78	1494	β -石竹烯	β -caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	0.06	0.04
31	15.91	1431	大香叶烯	(1E,4E)-germacrene B	C ₁₅ H ₂₄	0.07	-
32	16.23	1579	α -石竹烯	α -caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	0.09	0.03
33	16.57	1339	葑烯茄油萜	β -cubebene	C ₁₅ H ₂₄	0.14	-
34	16.72	1444	(4R,5R)-5-己基-4-甲基 二氢咪喃-2(3H)-酮	(4R,5R)-5-hexyldihydro -4-methyl-2(3H)-furanone	C ₁₁ H ₂₀ O ₂	0.03	-
35	16.80	1458	金合欢烯	(E,E)- α -farnesene	C ₁₅ H ₂₄	0.6	0.48
36	17.06	1469	Δ -杜松烯	(+)-delta-cadinene	C ₁₅ H ₂₄	0.13	0.16
37	17.38	1522	榄香醇	elemol	C ₁₅ H ₂₆ O	0.02	-

续表 1

编号	出峰时间/min	保留指数/RI	中文名	英文名	分子式	相对含量/%	
						SD	EM
38	18.65	1601	杜松脑	juniper camphor	C ₁₅ H ₂₆ O	0.03	-
39	21.70	1968	棕榈酸	palmitic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	0.02	-
40	7.59	943	莜烯	(+)-camphene	C ₁₀ H ₁₆	-	0.10
41	9.38	1042	P-伞花烃	P-cymene	C ₁₀ H ₁₄	-	0.17
42	12.52	1214	正十二烷	dodecane	C ₁₂ H ₂₆	-	0.08
43	16.15	1419	(-)-异喇叭烯	(-)-isolekene	C ₁₅ H ₂₄	-	0.03
44	16.48	1502	γ-芹子烯	γ-selinene	C ₁₅ H ₂₄	-	0.43
45	16.64	1469	β-芹子烯	β-selinene	C ₁₅ H ₂₄	-	0.22
46	16.87	1440	β-杜松烯	β-cadinene	C ₁₅ H ₂₄	-	0.04
47	17.24	1419	(-)-α-古芸烯	(-)-α-gurjunene	C ₁₅ H ₂₄	-	0.03
48	18.39	1626	桉叶油醇	γ-eudesmol	C ₁₅ H ₂₆ O	-	0.10

2.2 精油对菌丝生长的抑制

由图 2 可知精油对菌丝生长有较好的抑制效果，蒸馏油与浸提油两种处理之间存在显著差异 ($p < 0.05$)，蒸馏油抑菌效果显著优于浸提油。浓度 0.156%~0.625% 不同处理相同浓度组间差异未达到显著水平 ($p > 0.05$)，即浓度低于 0.625% 时两种精油对于菌丝的影响无差异。具体原因可能是固体培养环境下，精油与菌丝不能完全接触，灰葡萄孢菌丝为多核有隔菌丝，精油中对菌丝细胞壁起主要作用的是柠檬烯，细胞壁是柠檬烯的首要靶点，柠檬烯浓度未达一定限度，对细胞壁、细胞膜造成的破坏有限^[24]，精油其它成分对于内容物不能达到相应效果所致。

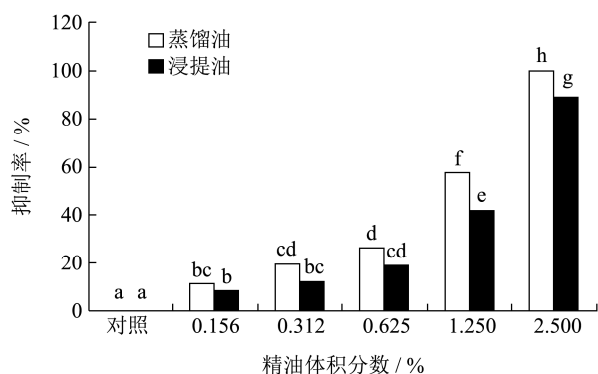


图 2 柑橘精油对致病菌菌丝的抑制率 (n=3)

Fig.2 Inhibition rate citrus essential oil against pathogenic bacteria (n=3)

注：不同字母表示各试验组两两比较差异显著 ($p < 0.05$)。

图 3~5 同。

2.3 精油对菌体生物量的影响

由图 3 可知精油对菌体生长量的抑制效果，随精

油含量增加，抑制效果增强。浓度 0.156%~0.625% 时，两种处理同一浓度组间及同一处理不同浓度组间均存在显著差异 ($p < 0.05$)，浓度 1.25% 和 2.5% 时两种精油处理间及处理内不存在差异 ($p > 0.05$)，但经蒸馏油处理实验组的菌丝生长量低于浸提油处理实验组菌丝量。浓度 0.312% 时蒸馏油对灰葡萄孢生长量的抑制率已经达到了 90.71%，浸提油的抑制率仅为 25.19%，浓度 0.625% 时，蒸馏油已经完全抑制，浸提油的抑制率为 80.74%。相较于固体环境对菌丝的影响，液体环境下精油对于菌丝生长的影响更为显著，可能是液体环境供氧量降低、精油能够与菌丝充分接触，柠檬烯迅速破坏细胞壁、细胞膜，其它多种抑菌成分进入胞内对菌体产生影响，而蒸馏油独有物质能够使细胞周期受阻、细胞核破碎，减缓灰葡萄孢的转录翻译速率，进而影响生长繁殖^[25,26]，致蒸馏油更早达到完全抑制。

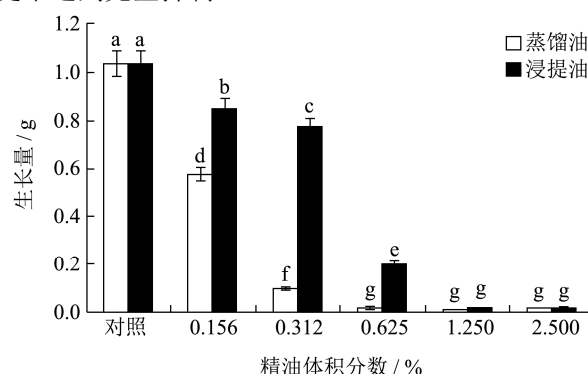


图 3 柑橘精油处理下致病菌生长量变化 (n=3)

Fig.3 Changes of citrus essential oil on mycelial biomass of pathogenic bacteria (n=3)

2.4 精油对菌体孢子萌发率的影响

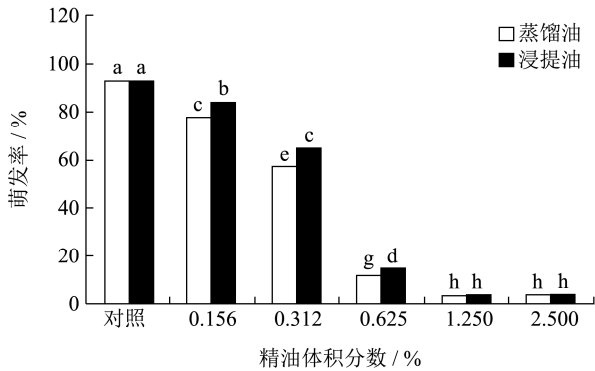


图4 柑橘精油对灰葡萄孢孢子萌发率的影响(n=3)

Fig.4 Effect of citrus essential oil on the germination rate of *Botrytis cinerea* spores (n=3)

由图4可知柑橘精油对灰葡萄孢孢子萌发率有一定的抑制作用，各处理组与对照的差异均达到显著水平 ($p < 0.05$)。蒸馏油与浸提油处理浓度为 0.156%~0.625%时，同一浓度不同处理组间存在显著差异 ($p < 0.05$)，相较于对菌丝生长量的影响，相同浓度，对于孢子的抑制作用更弱，可能与孢子活性较低、抗逆境能力较强相关。蒸馏油的效果始终优于浸提油，

表2 柑橘精油对灰葡萄孢的 MIVF

Table 2 MIVF of citrus essential oil against *Botrytis cinerea*

处理	时间/h	浓度/%							
		10	5	2.5	1.25	0.625	0.312	0.156	0
蒸馏油	24						+	+	+
	48					++	+++	+++	+++
	72				+	+++	+++	+++	+++
浸提油	24							+	+
	48				+	+	++	+++	+++
	72			+	++	+++	+++	+++	+++

注：微量+，半孔++，满孔+++。

2.6 精油对细胞膜透性影响

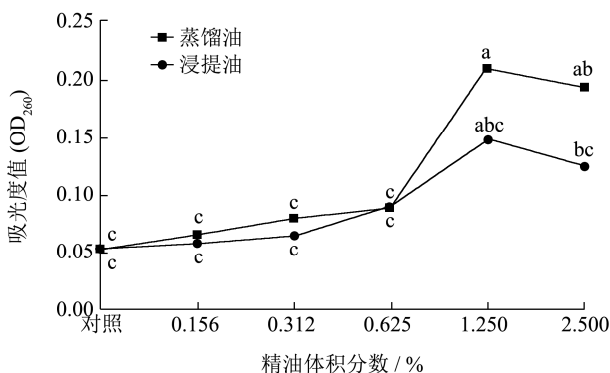


图5 柑橘精油对核酸外泄影响(n=3)

Fig.5 Effect of citrus essential oil on nucleic acid release of pathogenic bacteria (n=3)

由图5可知对于细胞外的核酸含量，随柑橘精油

可能与其含有更高含量对孢子产生影响物质（如 2-己烯醛、罗勒烯等）有关^[27]。浓度为 1.25%时，蒸馏油和浸提油萌发率分别为 3.43%和 4.04%，抑制率均达到了 95%以上。由此说明，柑橘精油对灰葡萄孢菌的重要繁殖体有影响。

2.5 最小抑菌浓度测定

由表2可知72h后蒸馏油浓度1.25%处理组有微量菌丝生长，浓度2.5%组未生长，MIVF为2.5%；浸提油浓度2.5%处理组有微量菌丝，5%处理组未生长，MIVF为5%。柠檬烯为柑橘精油主体物质，有研究表明2mg/mL柠檬烯处理灰葡萄孢即可达到完全抑制^[28]，认为柠檬烯为精油主要抑菌物质，浸提油具有更高的柠檬烯含量，但其抑菌活性弱于蒸馏油，具体原因可能是蒸馏油成分的丰富性及其中含有多种与柠檬烯相当的抑菌物质及较高含量具有强效抑菌性能的含氧化合物（醇、醛）及各物质的协同增效作用相关^[25,29]，如有研究表明芳樟醇、己烯醛等物质，其抑菌活性是柠檬烯的10~1000倍左右^[30]。

浓度升高含量升高。蒸馏油浓度为1.25%、2.5%时260nm波长处吸光值显著高于对照 ($p < 0.05$)，而0.156%、0.312%、0.625%实验组与对照的差异未达到显著水平 ($p > 0.05$)，表明浓度0.625%以上会导致细胞透性明显增强，进而引起核酸外泄。浸提油各浓度处理实验组之间不存在显著差异 ($p > 0.05$)，但随精油处理浓度升高，核酸泄漏量整体呈上升趋势。对于细胞膜透性的影响，蒸馏油的效果整体优于浸提油，可能与蒸馏油含有较高含量的β-榄香烯及多种含氧化合物有关，如有研究表明β-榄香烯能促进细胞膜磷脂酰丝氨酸外翻、细胞核破碎^[25,31]。

2.7 精油对草莓灰霉病发生的影响

图6和图7反映了损伤接种实验各浓度处理组发病率 and 果实创口真菌生长情况。由图6可知精油处理

组与对照的发病率均存在显著差异 ($p < 0.05$), 发病率介于 80%~95%, 浓度 0.625% 时发病率为仅为 21.1%。由图 7 可观察到随蒸馏油浓度升高, 创口处真菌菌丝生长受到的抑制作用增强, 萼片处均有菌丝生长, 且随处理浓度增高花萼处菌丝生长有减少趋势。浓度 1.25% 处理组几乎未发生真菌长出菌丝现象, 浓度 2.5% 处理组损伤处菌丝完全未生长, 达到完全抑制。具体原因可能与柑橘精油抑制菌体生长、某些物质能够促进草莓果实相关抗病基因的表达有关^[32]。

由图 7 可以观察到浓度 2.5% 精油处理组草莓颜色较其余组明显偏淡, 这种高浓度精油处理达到较好的抑菌效果, 影响果实色度的现象与萨仁高娃^[33]的结果相类似, 究其原因可能是高浓度精油对细胞造成毒性, 加剧了果实无氧呼吸, 促进了果实软化腐烂所致。

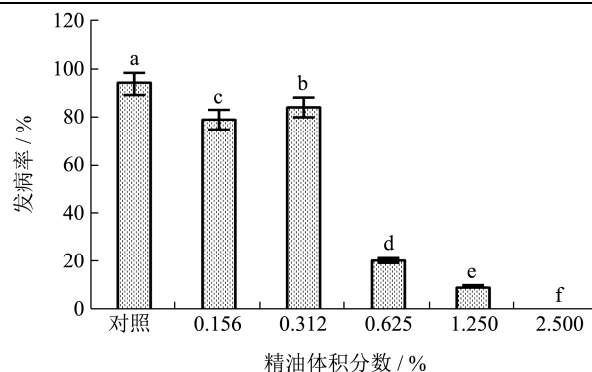


图 6 损伤接种实验草莓发病率

Fig.6 Incidence rate of strawberry in injury inoculation experiment

注: 不同字母表示各浓度处理两两比较差异显著 ($p < 0.05$)。

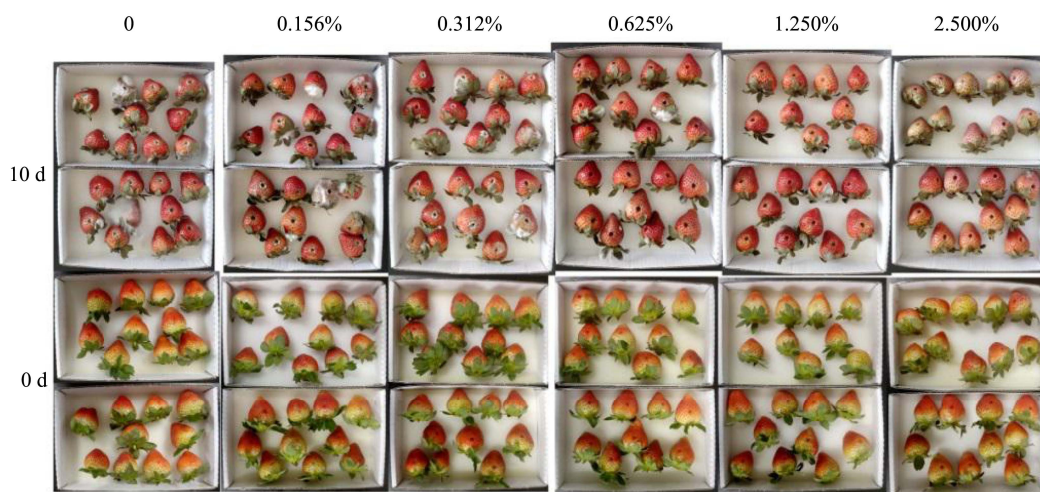


图 7 精油对灰葡萄孢活体抗菌实验

Fig.7 Antibacterial experiment of essential oil on *Botrytis cinerea* in vivo

3 结论

采用水蒸气蒸馏法所得精油共鉴定出 39 种成分, 除烯萜类化合物外, 含有醇、醛、酮、酸、酯在内的多种含氧化合物; 有机试剂浸提法所得精油共鉴定出 25 种成分, 主要为烯萜类、烃类、醇类化合物。共有主要成分为柠檬烯 (limonene)、 γ -松油烯 (γ -Terpinene)、 β -月桂烯 (β -myrcene)、 α -蒎烯 (α -Pinene), 总含量均达到精油组分的 97% 以上。其中, 柠檬烯为最主要成分, 蒸馏油柠檬烯含量为 82.37%, 浸提油为 85.25%。抑菌实验结果表明两种精油对灰葡萄孢均具有较好的抑制效果, 其中蒸馏油 MIVF 为 2.5%, 浸提法精油 MIVF 为 5%。体外抑菌实验表明, 精油能够通过抑制灰葡萄孢的菌丝、生长量、孢子萌发率、细胞透过性产生影响, 诱导细胞凋亡, 且蒸馏油的效果优于浸提法精油。草莓抑菌实验表明柑橘精油能够有效抑制灰葡萄孢在草莓果实上的生

长, 但过高浓度精油处理会对草莓品质产生负面影响。

参考文献

- [1] Velde F V, Grace M H, Pirovani M É, et al. Impact of a new postharvest disinfection method based on peracetic acid fogging on the phenolic profile of strawberries [J]. Postharvest Biology and Technology, 2016, 117: 197-205
- [2] Mehmet M Ö, Haydar H. The strawberry (*Arbutus unedo* L.) fruits: chemical composition, physical properties and mineral contents [J]. Journal of Food Engineering, 2007, 78(3): 1022-1028
- [3] Feliziani E, Romanazzi G. Postharvest decay of strawberry fruit: etiology, epidemiology, and disease management [J]. Journal of Berry Research, 2016, 6(1): 47-63
- [4] 张国珍, 钟珊. 草莓灰霉病研究进展 [J]. 植物保护, 2018, 44(2): 1-10
ZHANG Guozhen, ZHONG Shan. Advances in strawberry

- gray mold [J]. Plant Protection, 2018, 44(2): 1-10
- [5] Gianfranco R, Joseph L S, Erica F, et al. Integrated management of postharvest gray mold on fruit crops [J]. Postharvest Biology and Technology, 2016, 113: 69-76
- [6] Dolores F O, Alejandra V F, Alejandro P G, et al. First report of fenpyrazamine resistance in *Botrytis cinerea* from strawberry fields in Spain [J]. Plant Health Progress, 2018, 19(1): 45
- [7] Scott D, Cosseboom, Kelly L, et al. Within-season shift in fungicide resistance profiles of *Botrytis cinerea* in California strawberry fields [J]. Plant Disease, 2018, 103(1): 59-64
- [8] Kamaruzzaman M, Hao F, Wu M, et al. Gray mold of strawberry (*Fragaria ananassa*) caused by a rare pink-colored isolate of *Botrytis cinerea* in China [J]. Australasian Plant Pathology, 2018, 47
- [9] Adina A B, Mona E P. Trends in prolonging the post-harvest life of strawberries - a review [J]. The Annals of the University of Dunarea de Jos of Galati. Fascicle VI. Food Technology, 2018, 42(1): 9-16
- [10] Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, et al. Biological effects of essential oils - a review [J]. Food and Chemical Toxicology, 2007, 46(2): 446-475
- [11] Reyes-Jurado F, Navarro-Cruz A R, Ochoa-Velasco C E, et al. Essential oils in vapor phase as alternative antimicrobials: a review [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2020, 60(10): 1641-1650
- [12] Callaway T R, Carroll J A, Arthington J D, et al. Citrus Products and Their Use against Bacteria: Potential Health and Cost Benefits [M]. Nutrients, Dietary Supplements, and Nutraceuticals. Humana Press, 2011
- [13] Abdel-Aziz M M, Emam T M, Elsherbiny E A. Effects of mandarin (*Citrus reticulata*) peel essential oil as a natural antibiofilm agent against *Aspergillus niger* in onion bulbs [J]. Postharvest Biology and Technology, 2019, 156
- [14] Guo J, Gao Z, Li G, et al. Antimicrobial and antibiofilm efficacy and mechanism of essential oil from citrus Changshan - huyou Y. B. chang against *Listeria monocytogenes* [J]. Food Control, 2019, 105: 256-264
- [15] Tao N, Jia L, Zhou H. Anti-fungal activity of citrus reticulata blanco essential oil against *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum* [J]. Food Chemistry, 2014, 153: 265-271
- [16] Chutia M, Deka Bhuyan P, Pathak M G, et al. Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India [J]. LWT - Food Science and Technology, 2008, 42(3): 777-780
- [17] 王会全,刘鑫,吴英祥,等.柑橘果皮精油提取工艺及成分分析研究[J].食品研究与开发,2018,39(21):92-99
- WANG Huiquan, LIU Xin, WU Yingxiang, et al. The study on essential oil extraction technology and component analysis of citrus peel [J]. Food Research and Development, 2018, 39(21): 92-99
- [18] 张钟,杨宏娟.有机溶剂法提取化州橘叶精油工艺研究[J].包装与食品机械,2014,32(3):10-13,62
- ZHANG Zhong, YANG Hongjuan. Study on organic solvent extraction technology of essential oil from exocarpium citrus grandis, pummelo peel leaf [J]. Packaging and Food Machinery, 2014, 32(3): 10-13, 62
- [19] 范刚,杨子玉,董曼,等.一种甜橙精油脱色保香方法[P].湖北: CN105176682A, 2015-12-23
- FAN Gang, YANG Ziyu, DONG Man, et al. Method for decolorization and fragrance preservation of sweet orange essential oil [P]. Hubei: CN105176682A, 2015-12-23
- [20] 马江锋,曾红.小茴香挥发油对红枣黑斑病菌的抑菌活性及其作用机制的初步研究[J].西北农业学报,2016,25(3):450-457
- MA Jiangfeng, ZENG Hong. Antifungal activity and preliminary mechanism of essential oil from *Foeniculum vulgare* mill on *Alternaria tenuissima* [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2016, 25(3): 450-457
- [21] Eduardo L, Farias T C, Ferreira S B, et al. Antibacterial activity and time-kill kinetics of positive enantiomer of α -pinene against strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* [J]. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2018, 18(11): 917-924
- [22] Bi Y, Tian S, Zhao J, et al. Harpin induces local and systemic resistance against *Trichothecium roseum* harvested Hami melons [J]. Postharvest Biology and Technology, 2005, 38(2): 183-187
- [23] 陈潘,席斌,高雅琴,等.4种精油组成成分及总抗氧化活性分析研究[J].中国调味品,2020,45(11):60-66
- CHEN Pan, XI Bin, GAO Yaqin, et al. Analysis of composition and total antioxidant activity of four essential oils [J]. China Condiment, 2020, 45(11): 60-66
- [24] 童志超,徐艳群,李栋,等.草莓叶主要挥发性物质的测定及其对草莓球腔菌的抑菌效果[J].核农学报,2021,35(2):498-507
- TONG Zhichao, XU Yanqun, LI Dong, et al. Determination of main volatile substances in strawberry leaves and its inhibition effects on *Mycosphaerella fragariae* (Tul) Lindau [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2021, 35(2): 498-507
- [25] 崔佳韵,梁建芬.柑橘属植物果皮精油抑菌作用研究进展[J].粮油食品科技,2018,26(1):35-39

- CUI Jiayun, LIANG Jianfen. Research progress on antibacterial effect of citrus peel essential oil [J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2018, 26(1): 35-39
- [26] Xu Y, Tong Z, Zhang X, et al. Unveiling the mechanisms for the plant volatile organic compound linalool to control gray mold on strawberry fruits [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(33)
- [27] 李倩,赵颖,朱晓嫻,等.天然产物抑制黄曲霉生长及其产毒的研究进展[J].河南工业大学学报(自然科学版),2021,42(1): 132-140
- LI Qian, ZHAO Ying, ZHU Xiaoman, et al. Research progress of natural products' inhibition on the growth and aflatoxin synthesis of *Aspergillus flavus* [J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2021, 42(1): 132-140
- [28] 叶肖辰皓,姜珊珊,焉炳飞,等.柚皮挥发油化学成分及对灰葡萄孢菌的抑菌活性[J].天然产物研究与开发,2020,32(1): 47-56
- Ye Xiaochenhao, JIANG Shanshan, YAN Bingfei, et al. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from citrus maxima againgist *Botrytis cinerea* [J]. Natural Product Research and Development, 2020, 32(1): 47-56
- [29] 张晓平,邵骏菁,马大龙,等.天然药物抗肿瘤活性成分及其作用机制研究进展[J].药学报,2019,54(11):1949-1957
- ZHANG Xiaoping, SHAO Junjing, MA Dalong, et al. Research on antitumor active components and mechanisms of natural products [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2019, 54(11): 1949-1957
- [30] 王佳宇,胡文忠,管玉格,等.柠檬烯抑菌机理及其在果蔬保鲜中应用的研究进展[J].食品工业科技,2021,14:414-419
- WANG Jiayu, HU Wenzhong, GUAN Yuge, et al. Research progress on the bacteriostatic mechanism of limonene and its application in fruit and vegetable preservation [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 14: 414-419
- [31] 李艺. β -榄香烯对人乳腺癌 MCF-7 细胞株体内外生长的影响及机制研究[D].合肥:安徽中医药大学,2020
- LI Yi. Effect of β -elemene on the growth of human breast cancer MCF-7 cell line *in vivo* and *in vitro* and its mechanism [D]. Hefei: Anhui University of Chinese Medicine, 2020
- [32] 韩艳丽,陈岑,李静,等.茶树精油对草莓果实采后灰霉病发生的影响[J].新疆农业大学学报,2019,42(4):249-260
- HAN Yanli, CHEN Cen, LI Jing, et al. Effects of tea tree oil treatment on grey mold disease in postharvest strawberry fruit [J]. Journal of Xinjiang Agricultural University, 2019, 42(4): 249-260
- [33] 萨仁高娃.百里香精油与海藻酸盐复合涂膜防控鲜切水果食源性病原微生物作用机制的研究[D].大连:大连理工大学, 2020
- Sarren Gaowa. Study on prevention and control mechanism of foodborne pathogens on fresh-cut fruits by thyme oil-alginate-based coating [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2020

(上接第 263 页)

- [27] 阚建全,谢笔钧.食品化学[M].北京:中国农业大学出版社, 2008
- KAN Jianquan, XIE Bijun. Food Chemistry [M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2008
- [28] 涂勇刚,赵燕,王丹,等.糖类对蛋清蛋白凝胶强度的影响[J].食品工业科技,2013,4:72-75
- TU Yonggang, ZHAO Yan, WANG Dan, et al. Effects of carbohydrates on gel strength of egg white protein [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 4: 72-75
- [29] 王晨莹.糖基化蛋清蛋白的制备、性质及其在纳米颗粒中的应用[D].无锡:江南大学,2019
- WANG Chenying. Preparation, properties and application of glycosylated egg white protein in nanoparticles [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019
- [30] 雷明辉,叶劲松,张铭容,等.谷氨酰胺转氨酶对鸡蛋蛋白热凝固性的影响[J].食品工业科技,2015,36(13):143-149
- LEI Minghui, YE Jinsong, ZHANG Mingrong, et al. Effect of transglutaminase on the thermosetting property of egg protein [J]. Food Industry Science and Technology, 2015, 36(13): 143-149
- [31] 卞君杰.TG 酶对蛋白乳化特性的影响及在肌原纤维蛋白复合凝胶中的作用[D].扬州:扬州大学,2016
- BIAN Junjie. The effect of TG enzyme on protein emulsifying properties and its role in myofibrillar protein composite gel [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2016