

可可精油及其 Pickering 乳液的体外 抗氧化和抑菌活性

王艺潼^{1,2}, 王萍^{1*}, 徐飞², 张彦军^{2*}

(1. 东北林业大学林学院, 黑龙江哈尔滨 150040)

(2. 中国热带农业科学院香料饮料研究所, 国家重要热带作物工程技术研究中心, 海南省特色热带作物适宜性加工与品质控制重点实验室, 海南省热带香料饮料作物工程技术研究中心, 海南万宁 571533)

摘要: 为了有效的保护植物精油且控制其缓慢释放, 本文以可可精油为原料, 运用顶空固相微萃取质谱 (HS-SPME-GC-MS) 联用技术进行成分分析, 通过剪切超声方法制备以 OSA 淀粉为固体颗粒稳定剂的可可精油 Pickering 乳液, 并测定其抗氧化性及抑菌性。结果表明, 精油中萜烯类占 23.81%、酯类占 20.41%, 同时得到相对含量较高的组分为乙酸 6.64%、2,3-丁二醇 5.27% 和乙酸乙酯 4.64%。质量分数 5% 精油下乳液粒径为 0.47 μm , Pickering 乳液可以有效延缓精油的香气释放速率。可可精油经 OSA 淀粉包裹制备 Pickering 乳液后的抗氧化活性有所提高, 乳液在 24 h 后的 DPPH·清除能力明显高于 30 min 时, ABTS⁺清除能力在 12 h 达到最大值, 显著高于精油。此外, 可可精油及 Pickering 乳液对两种食源性致病菌均具有较强抑菌作用。将可可精油制备 Pickering 乳液后可以有效降低精油在加工过程中香气的释放, 提高其贮藏稳定性、抗氧化活性及抑菌活性, 这为可可精油的进一步扩大应用范围提供理论依据。

关键词: 可可精油; Pickering 乳液; 抗氧化性; 抑菌活性

文章编号: 1673-9078(2022)12-16-25

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.12.0505

Evaluation of the Antioxidant and Antibacterial Activity of Cocoa Essential Oil and Its Pickering Emulsion *in Vitro*

WANG Yitong^{1,2}, WANG Ping^{1*}, XU Fei², ZHANG Yanjun^{2*}

(1. Forestry College, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China) (2. Spice and Beverage Research Institute, CATAS/ National Center of Important Tropical Crops Engineering and Technology Research/ Key Laboratory of Processing Suitability and Quality Control of the Special Tropical Crops of Hainan Province/ Hainan Provincial Engineering Research Center of Tropical Spice and Beverage Crops, Wanning 571533, China)

Abstract: To protect plant essential oil aroma and control its release, cocoa essential oil was used as the raw material, and its components were analyzed using headspace solid-phase microextraction-mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS). Next, a Pickering emulsion of cocoa essential oil was prepared using OSA starch following the ultrasonic shearing method, and its antioxidant and bacteriostatic properties were examined. Terpenes and esters accounted for 23.81% and 20.41% of all components of the essential oil, respectively. Other components with high relative content were acetic acid (6.64%), 2,3-butanediol (5.27%), and ethyl acetate (4.64%). Particle size of the Pickering emulsion was 0.47 μm at an essential oil concentration of 5%, indicating that the preparation of a Pickering emulsion could effectively slow down the aroma

引文格式:

王艺潼, 王萍, 徐飞, 等. 可可精油及其 Pickering 乳液的体外抗氧化和抑菌活性[J]. 现代食品科技, 2022, 38(12): 16-25

WANG Yitong, WANG Ping, XU Fei, et al. Evaluation of the antioxidant and antibacterial activity of cocoa essential oil and its pickering emulsion *in vitro* [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(12): 16-25

收稿日期: 2022-04-23

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2020YFD1001204); 中央高校基本科研业务费 (1630142022007; 1630142022008)

作者简介: 王艺潼 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: wangyitong9705@163.com

通讯作者: 王萍 (1964-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 植物活性物质分离及功能特性, E-mail: wangping@nefu.edu.cn; 共同通讯作者: 张彦军 (1982-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 热带作物加工, E-mail: zhangyanjun0305@163.com

release of essential oils. The antioxidant activity of the Pickering emulsion of cocoa essential oil encapsulated in OSA starch was improved. The DPPH scavenging ability of the Pickering emulsion at 24 h was significantly higher than that at 30 min. The ABTS⁺ scavenging ability of the Pickering emulsion peaked at 12 h and was significantly higher than that of the essential oil. In addition, Cocoa essential oil and Pickering emulsion exhibited potent bacteriostatic effects on food-borne pathogens. Therefore, preparation of a Pickering emulsion of cocoa essential oil is a reliable method to reduce the aroma release of essential oil during processing as well as to improve its storage stability, antioxidant activity, and antibacterial activity. The present study provides a theoretical basis for further expanding the application scope of cocoa essential oil.

Key words: cocoa essential oil; Pickering emulsion; antioxidant; antibacterial activity

可可豆是可可作物 (*Theobroma cacao* L.) 的种子, 高含量的多酚类和黄酮类化合物使其具有抗氧化、预防心脑血管疾病等功能^[1]。可可豆中含有丰富的脂类物质, 约占种子干重的 50%。油脂作为可可豆的主要经济产物, 具有独特的理化性质, 其熔点约为 35~37 °C。前期研究表明, 通过超临界 CO₂ 从可可豆油脂中提取的可可精油主要含饱和脂肪酸, 棕榈酸、硬脂酸及油酸含量较多^[2]。可可油可以作为一种天然抗氧化剂, 并对人体炎症细胞产生影响, 同时还对牙周病原菌、李斯特菌等有抑制作用^[3], 而利用超临界 CO₂ 提取可可精油的功能活性研究较少。

精油因其丰富的功效已被广泛应用各个行业, 但因其自身性质, 存在着易挥发、水溶性差、化学性质不稳定、气味强烈、不便于贮藏和运输等缺陷, 在应用过程中往往达不到预期的效果^[4]。可可精油和其它精油一样, 易受空气、温度、光线等因素的影响发生氧化变质, 精油的疏水性同样导致其在应用上存在很多限制。Pickering 乳液制备技术可以有效保护精油, 很好地弥补植物精油的缺陷, 并缓慢发挥精油自身功能作用。纤维素、大豆蛋白及乳清蛋白等作为天然大分子颗粒乳化剂虽然有良好的包埋性及水溶性, 但是由于自身性质不稳定限制了这些稳定剂的使用。辛烯基琥珀酸淀粉酯 (Octenyl Succinate Anhydrate Starch, 简称 OSA 淀粉) 作为一种最常见的改性淀粉颗粒被较多应用为稳定剂, 淀粉进行酯化改性后具有疏水性, 可以吸附在油水界面, 提高乳液稳定性, 乳化性、成膜性和水溶性极佳, 应用范围较广。Shah 等^[5]以壳聚糖-三聚磷酸纳米颗粒为乳化剂, 制备以玉米油为油相的 Pickering 乳液并负载姜黄素, 对乳液体系抗氧化特性进行研究, 姜黄素 Pickering 乳液抗氧化能力高于姜黄素自身。Sun 等^[6]以辛烯基琥珀酸淀粉钠为颗粒乳化剂, 稳定肉桂精油制备 Pickering 乳液, 表明其对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌以及金黄色葡萄球菌均有抑制作用。

因此, 本研究选取可可精油为原料, 通过 HS-SPME-GC-MS 联用分析精油成分, 测定油脂理化特性值。利用 OSA 淀粉包裹可可精油制备 Pickering 乳液后, 通过光学显微镜观察其形态。研究乳液对精油香气释放保

护作用。以 DPPH 和 ABTS⁺ 的清除能力评价其抗氧化活性; 选取大肠杆菌和金黄色葡萄球菌为研究对象, 探究可可精油及其 Pickering 乳液抑菌活性, 以期为可可资源的开发与利用提供理论依据, 为可可精油的功能性应用提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

可可, 中国热带农业科学院香料饮料研究所 (2020 年 3 月); 辛烯基琥珀酸淀粉, 源叶生物科技有限公司; DPPH 试剂、ABTS 试剂、奎诺二甲基丙烯酸酯, 美国 Sigma 公司; 大肠杆菌 (ATCC8739)、金黄色葡萄球菌 (ATCC6538), 广东环凯微生物科技有限公司; 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

7890B-5977B 型气质联用仪, 美国安捷伦; DK-98-ILA 型电热恒温水浴锅, 天津市泰斯特仪器有限公司; FJ200-SH 型数显高速分散均质机, 上海标本模型厂; JY92-2D 型超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; MasterSizer 3000 型粒径分析仪, 英国 Malvern 公司; UV-2700 型紫外-可见分光光度计, 苏州岛津公司; HR50-IIA2 型生物安全柜, 中国青岛海尔; DNP-9162BS-III 型电热恒温保温箱, 上海新苗医疗器械制造有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 可可精油的 HS-SPME-GC-MS 分析

1.3.1.1 萃取头老化

使用萃取头萃取三种热带特色作物精油挥发性成分前, 先将萃取头老化。老化条件为: 250 °C 老化 5 min。

1.3.1.2 顶空固相微萃取条件

参考文献^[7]的方法, 稍作修改。取 5 mL 精油, 放入 15 mL 带有聚四氟乙烯硅橡胶垫的萃取瓶中, 盖紧瓶盖后, 放入 70 °C 水浴震荡加热 20 min 至温度平衡。然后将 SPME 针管穿过样品瓶垫, 伸出纤维头, 顶空萃

取。当气相色谱仪达到稳定状态后,将 SPME 穿过进样口隔垫 40 mm,伸出纤维头解析 5 min。

1.3.1.3 GC-MS 条件

GC 条件:色谱柱 DB-WAX 毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm) 弹性石英毛细管柱;起始温度 40 °C,保持 2 min,以 3 °C/min 的速率升至 75 °C,再以 1.5 °C/min 的速率升至 140 °C,最后以 10 °C/min 的速率升到 230 °C,保持 15 min;载气为氦气;流速为 1 mL/min。

MS 条件:电子轰击离子源(EI);电子能量为 70 eV;离子源温度为 230 °C;四级杆温度为 150 °C;检测模式:30~450 u。按照 GC-MS 谱库(NIST 14, Mainlib, Replib)进行检索,结合文献报道进行分析。

1.3.2 可可精油理化特性

可可精油的酸价、碘值、过氧化值和皂化值分别参照 GB/T 5009.229-2016^[8]、GB/T 5532-2008^[9]、GB/T 5009227-2016^[10]和 GB/T 5534-2008^[11]。

1.3.3 可可精油 Pickering 乳液制备

准确称取一定质量的 OSA 淀粉,按照一定比例加入去离子水,在 85 °C 下充分搅拌 0.5 h 后,冷却降温至 50 °C,制备质量分数为 2.5%淀粉溶液。取体积分数 5%的可可精油逐滴加入到淀粉乳液中,使最终体积为

10 mL。在相同温度下,利用高压剪切搅拌机搅拌 3 min,转速为 10 000 r/min 条件下制备初乳液。在超声功率 300 W 条件下超声 7 min,得到 Pickering 乳液。评价指标为乳液粒径 $D_{[4,3]}$ (μm)。

1.3.4 可可精油 Pickering 乳液粒径测定

取适量的 Pickering 乳液,用蒸馏水稀释 100 倍后室温(25±1) °C 下,通过马尔文激光粒度仪测定乳液平均粒径 $D_{[4,3]}$ (μm)。折射率为 1.46 和 1.33,测粒径时每个样品测定 9 次,每次间隔 10 s^[12]。

1.3.5 光学显微镜观察

取 10 μL 乳液滴至载玻片,盖上盖玻片,使用正立荧光显微镜放大 100 倍进行观察,以评估液滴大小以及聚集状态。

1.3.6 Pickering 乳液缓释性

样品贮藏于常温常压下,通过 EN 测定贮藏过程中精油及其乳液香气强度的变化。实验参照文献^[13]所描述方法测定。检测条件:载气为纯净空气;流速 150 mL/min;样品量 50 μL;容器体积 10 mL;加热温度 50 °C;加热时间 300 s;进样温度 60 °C;进样体积 1 500 μL;数据延迟时间 180 s;数据采集时间 90 s。每个样品均进行 5 次平行试验,电子鼻传感器特性如表 1 所示。

表 1 电子鼻传感器特性

Table 1 Electronic nose sensor characteristics

序号	传感器名称	响应物质类型
1	T30/1	对有机化合物敏感,如:极性化合物、氯化氢等
2	T70/2	对芳香化合物敏感,如:甲苯、二甲苯等
3	P30/2	对于有机化合物敏感,如氯化氢、酮等
4	LY2/AA	对有机化合物敏感,如丙酮、乙醇、氨
5	LY2/gCT	对碳氢化合物敏感,如丙烷、丁烷等

1.3.7 可可精油及其 Pickering 乳液抗氧化活性

1.3.7.1 可可精油及其乳液 DPPH·清除能力

DPPH·清除能力参考文献^[14],略作改动。将 2 mL 不同浓度精油及等含油量 Pickering 乳液添加到 2 mL 0.2 mmol/L DPPH·-乙醇溶液中并立即搅拌。将混合物在室温下避光,静置 30 min;将同浓度乳液试管中放置 24 h 进行释放后,再添加 DPPH·-乙醇溶液静置 30 min,用紫外分光光度计记录 517 nm (A_i) 处的吸光度;对照组 (A_j) 用 4 mL 无水乙醇代替 0.2 mmol/L DPPH·,空白组 (A_k) 用 2 mL 正己烷(精油)或相同浓度淀粉乳(Pickering 乳液)代替样品,测定吸光值,每组样品平行测定 3 次取平均值。Trolox 用作阳性对照。根据公式(1)计算清除率(B , %):

$$B = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_k}\right) \times 100\% \quad (1)$$

1.3.7.2 可可精油及其乳液 ABTS⁺清除能力测定

参考文献^[15]测定 ABTS⁺清除率,有修改。通过将 ABTS (7.4 mmol/L) 与过硫酸钾 (2.6 mmol/L) 混合,并在室温下黑暗中静置 12~16 h 产生 ABTS⁺,获得储备液。使用前将 ABTS⁺储备液用乙醇稀释至在 734 nm 波长下吸光度为 0.70±0.02。将 100 μL 不同浓度的精油及等含油量 Pickering 乳液等分试样加入 ABTS⁺乙醇混合液中放置 6 min;将同浓度乳液试管中放置 12 h 进行释放后,再添加 ABTS⁺乙醇混合液静置 6 min 后于 734 nm 处测量其吸光度 A_1 。正己烷代替精油或蒸馏水代替 Pickering 乳液测得 A_0 ,无水乙醇代替 ABTS⁺工作液测得 A_2 ,每组样品平行测定 3 次取平均值。Trolox 用作阳性对照。根据公式(2)计算清除率(C , %):

$$C = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100\% \quad (2)$$

1.3.8 可可精油及其 Pickering 乳液抑菌活性测定

选取两种食源性致病菌为研究对象,分别为大肠杆菌

菌(革兰氏阴性菌)和金黄色葡萄球菌(革兰氏阳性菌)。

1.3.8.1 滤纸片法测定抑菌活性

滤纸用打孔器制成直径 6 mm 的小圆纸片,高压灭菌后备用。在超净台中将培养皿灭菌后倒入 10~15 mL 培养基,冷却凝固后备用。无菌移液枪吸取 100 μL 10⁶ CFU/mL 菌悬液与培养基表面,涂布均匀。用无菌镊子夹取浸透精油及等含油量 Pickering 乳液 10 min 的滤纸片,每个固体平板均匀贴三片,其中一片为生理盐水做空白对照。滤纸片之间保持一定距离,放置 37 °C 恒温培养箱中培养 24 h,游标卡尺测量抑菌圈直径,结果取平均值。

1.3.8.2 抑菌率测定

采用二倍稀释法^[6],将精油溶解于吐温 80 的水溶液中,配制浓度 10 mg/mL 精油溶液后进行倍比稀释,等含油量 Pickering 乳液用水稀释,二者作为实验组,相同浓度吐温 80 和水(替代精油)或蒸馏水(替代乳液)的溶液作为空白组,不添加样品作为对照组。每组实验重复三次。将大肠杆菌和金黄色葡萄球菌在斜面培养基上活化后,用生理盐水将菌种配成 10⁶ CFU/mL 的菌悬液,震荡均匀。在每个实验组中用无菌移液枪接菌悬液 100 μL,37 °C 恒温培养 2 h。通过紫外分光光度计 600 nm 波长下测定溶液浊度判断菌种抑制率。根据公式(3)计算抑制率(E, %):

$$E = \frac{OD_1 - OD_0}{OD_2} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

OD₁——实验组;

OD₀——空白组;

OD₂——对照组。

1.4 数据处理

所有实验均进行 3 次重复,数据最后以平均值±标准差表示。采用 SPSS 21.0.1 中的单因素分析方法对实验中数据进行显著性分析, *p*<0.05 为显著相关,采用 Origin 2019 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 可可精油成分分析

可可精油 CG-MS 化学成分总离子流图见图 1, 分析结果见表 2。

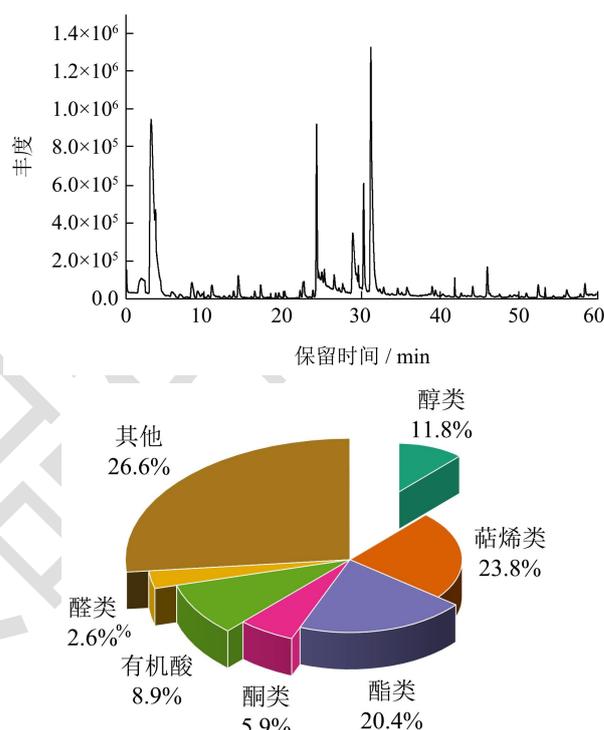


图 1 可可精油总离子流图和成分占比图

Fig.1 Total ion current diagram and composition ratio diagram of cocoa essential oil

表 2 可可精油成分表

Table 2 Analysis of cocoa essential oil components

序号	保留时间/min	英文名称	中文名称	相对含量/%
1	3.266	Ethyl Acetate	乙酸乙酯	4.64±0.04
2	3.821	4-hydroxy-2-butanone	4-羟基-2-丁酮	3.35±0.03
3	5.937	1,3,5-Cycloheptatriene	环庚三烯	4.04±0.04
4	8.448	1-Butanol, 3-methyl-, acetate	乙酸异戊酯	3.37±0.03
5	9.19	3-Carene	3-薷烯	3.22±0.03
6	9.811	α-Pinene	α-水芹烯	3.14±0.03
7	10.996	D-Limonene	柠檬烯	2.82±0.03
8	13.751	Benzene, 1-methyl-3-(1-methylethyl)-	邻异丙基甲苯	2.07±0.02
9	14.353	Acetoin	3-羟基-2-丁酮	2.40±0.02
10	16.422	2-Heptanol	2-庚醇	1.73±0.02
11	17.193	Propanoic acid, 2-hydroxy-, ethyl ester	2-羟基丙酸乙酯	1.97±0.02

续表 2

序号	保留时间/min	英文名称	中文名称	相对含量/%
12	18.453	Cyclohexasiloxane, dodecamethyl-	十二甲基环六硅氧烷	1.13±0.10
13	19.092	3-acetoxy-2-butanone	3-乙酰基-2-丁酮	1.58±0.01
14	19.506	2-Nonanone	2-壬酮	2.12±0.02
15	20.22	Pyrazine, trimethyl-	2,3,5-三甲基吡嗪	2.06±0.02
16	22.195	Octanoic acid, ethyl ester	辛酸乙酯	1.55±0.01
17	22.562	Isobutyl isothiocyanate	异硫氰酸异丁酯	1.42±0.01
18	22.684	1,3-Dioxolane, 2-ethyl-2,4,5-trimethyl-	2,4,5-三甲基-2-乙基-1,3-二氧戊环	1.59±0.01
19	23.841	Cyclohexene, 4-ethenyl-4-methyl-3-(1-methylethenyl)-1-(1-methylethyl)-, (3R-trans)-	2-异丙烯-1-乙基-3-甲基-3-(1-甲乙基)-1-乙基环己烯	1.51±0.01
20	24.301	Pyrazine, tetramethyl-	2,3,5,6-四甲基吡嗪	1.87±0.02
21	24.95	Acetic acid	乙酸	6.64±0.06
22	26.539	Benzaldehyde	苯甲醛	2.62±0.02
23	27.621	2,3-Butanediol, diacetate	2,3-丁二乙酸酯	1.26±0.01
24	28.9	2,3-Butanediol	2,3-丁二醇	5.27±0.05
25	29.614	3-Methyl-2-(trimethylsilyloxy)benzoic acid trimethylsilyl ester	1,15-二氢十六甲基八硅氧烷	1.75±0.02
26	30.282	Ethanol, 2-(1-methylethoxy)-	乙二醇异丙基乙醚	1.82±0.02
27	31.185	Acetic acid, methyl ester	甲基乙酸酯	2.81±0.02
28	32.821	Butyrolactone	4-羟基丁酸	2.21±0.02
29	34.607	Acetophenone	苯乙酮	2.16±0.02
30	35.783	Humulene	α -石竹烯	2.65±0.02
31	38.999	Aromandendrene	(+)-香橙烯	2.19±0.02
32	39.412	Naphthalene, decahydro-4a-methyl-1-methylene-7-(1-methylethylidene)-, (4aR-trans)-	β -蒎烯	1.97±0.02
33	41.857	Cyclooctasiloxane, hexadecamethyl-	十六甲基-环辛基硅氧烷	1.05±0.01
34	42.685	Methyl salicylate	邻羟基苯甲酸甲酯	1.50±0.01
35	44.151	Benzeneacetic acid, ethyl ester	苯乙酸乙酯	1.89±0.02
36	45.995	Acetamide, N-(2-phenylethyl)-	N-(2-苯乙基)乙酰胺	1.62±0.01
37	50.959	3,7,11,15-Tetramethylhexadec-2-ene	3,7,11,15-四甲基十六烷-2-烯	2.27±0.02
38	52.464	Phenylethyl Alcohol	苯乙醇	2.47±0.02
39	53.348	Cyclononasiloxane, octadecamethyl-	十八甲基-环硅氧烷	1.36±0.03
40	56.084	Ethanone, 1-(1H-pyrrol-2-yl)-	2-乙酰基吡咯	2.68±0.02
41	57.824	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	植醇	2.34±0.02
42	58.407	Phenol	苯酚	2.04±0.02

从可可精油中总共分离检测到 42 种挥发性化学成分, 利用质谱信息与标准库 NIST14 分别对各色谱峰进行初步检索及相关文献参考进行定性分析, 确定挥发性物质名称及相对含量。可可精油成分定性数据显示, 保留时间在 3.27~58.60 min 范围内, 萜烯类占 23.81%, 酯类占 20.41%, 醇类占 11.81%。可可精油中主要成分为乙酸乙酯 (RC: 4.64%)、乙酸 (RC: 6.64%)、2,3-丁二醇 (RC: 5.27%), 保留时间分别为 RT: 3.27 min, RT: 28.90 min 和 RT: 24.95 min。本实验结果与刘梦

娅等^[17]研究结果相似, 3-羟基-2-丁酮 (奶香)、2-壬酮 (杏仁味)、乙酸乙酯 (花香气味) 等物质存在于加纳可可脂中, 本实验所制备可可精油中含有上述物质的同时, 还存在吡咯以及苯乙酮等其他物质。

2.2 可可精油油脂特性分析

可可精油油脂特性分析结果如表 3 所示。由表 3 可知, 实验结果和各项指标均符合《NY/T 751-2017 绿色食品食用植物油》。酸价可作为油脂质量劣变的指

标,其决定了甘油三酯水解产生的游离脂肪酸的数量。在光、热或脂肪酶的作用下,脂质分子释放出游离脂肪酸会影响油脂的稳定性^[18]。可可精油酸价最小0.21 mg KOH/g,在食用植物油国家标准中,植物原油的AV值须低于4 mg/g。

过氧化值是油和脂肪氧化酸败最广泛使用的指标之一。它是脂质氧化初始阶段形成的过氧化物和氢过氧化物浓度的量度。随着时间的推移,油中氧化物含量的增加也会导致酸值升高。可可精油过氧化值为0.19 mmol/kg之间,结果远低于国家标准20 mmol/kg。

碘值用于确定精油的脂肪酸不饱和程度,碘值越高不饱和脂肪酸含量越高,也可以用来评估油脂在工业应

用中的稳定性。可可精油碘值最小为24.01 g/100 g oil,这与之前研究可可精油不饱和脂肪酸结果一致^[2]。

皂化值是评估油中三酰基甘油脂肪酸链长的效方法,精油的皂化值越高,游离脂肪酸含量越高而相对分子量越低^[19]。较低的皂化值表明低分子量三酰基甘油含量非常高,也可以在一定程度上反应油脂的纯度。可可精油皂化值为175.31 mg KOH/g,与香草兰精油^[20]等其他精油相比,可可精油纯度较高且分子量较小。Atolani等^[21]在*C. sinensis*种子油中也观察到了精油不饱和脂肪酸的高比例与碘和皂化值的趋势相关,与本研究结果相似。

表3 可可精油油脂特性值

Table 3 Characteristic values of cocoa essential oil

	酸价/(mg KOH/g)	过氧化值/(mmol/kg)	碘值/(g/100 g oil)	皂化值/(mg KOH/g)
可可精油	0.21±0.03	0.19±0.08	24.01±0.22	175.31±0.98

2.3 乳液微观结构观察

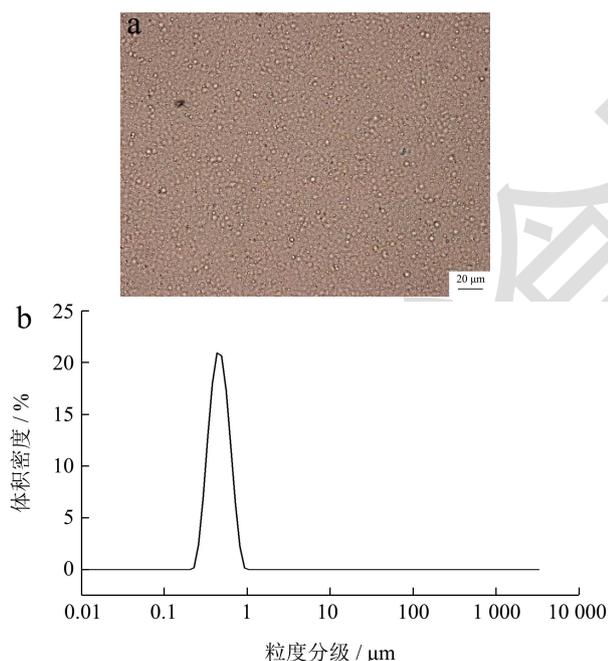


图2 可可精油 Pickering 乳液显微镜图 (a) 和粒度分布图 (b)

Fig.2 Microscope (a) and particle size distribution (b) of

Pickering emulsion of cocoa essential oil

在100×光学显微镜可以明显观察到可可精油制备出 Pickering 乳液具有较小且均匀的液滴颗粒,如图2a所示。同时从粒度分布图也可以看出,可可精油 Pickering 乳液呈正态分布,分布范围小且集中,粒径大小主要集中于0.20~1.06 μm,平均粒径 $D_{[4,3]}$ 为0.47 μm。

2.4 Pickering 乳液缓释性分析

Pickering 乳液的缓释性和稳定性直接关系到精油

的释放效果,因此本实验用电子鼻分析可可精油以及 Pickering 乳液14 d内对于T30/1等五种传感器响应值变化,结果如图3所示。

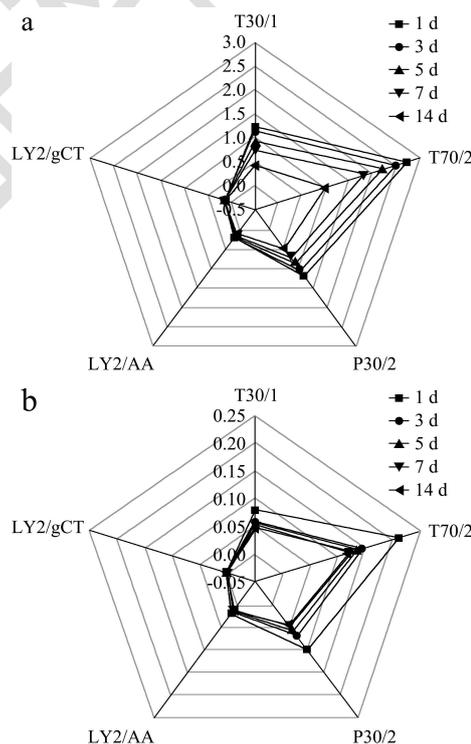


图3 可可精油及其 Pickering 乳液传感器响应雷达图

Fig.3 Radar plots of cocoa essential oils and Pickering emulsion sensor responses

注:数字表示不同时间样品对各传感器响应值。a为可可精油14 d内气味释放速率图,b为可可精油 Pickering 乳液14 d内气味释放速率图。

每一种感应器代表一种化学物质气味,如表1所示。检测值越接近零,说明该种气味越小;检测结果

绝对值越大时,说明气味越大^[22]。对比图 3a 与图 3b 可知,香气释放量发生明显变化。贮藏期相同的乳液中香气释放量为精油的 1/10 左右。表明未用 OSA 淀粉包裹的精油在 14 d 内贮藏过程中不稳定,香气释放明显。可可精油在贮藏期间香气变化最大部分对应的传感器为 T30/1、T70/2 和 P30/2,而 Pickering 乳液变化趋势明显减小,T70/2 传感器在 1~3 d 内变化较大,对比表 1 可知,芳香类物质变化较为明显。

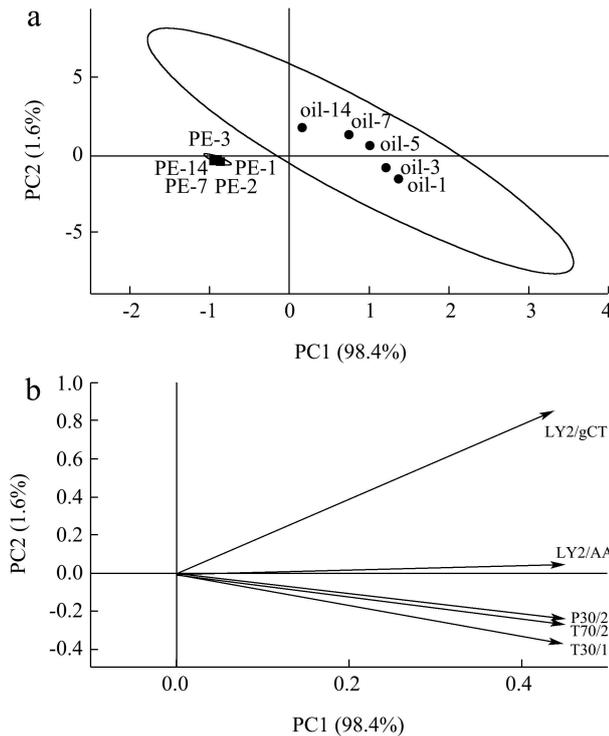


图 4 贮藏期间可可精油及其 Pickering 乳液 PCA 得分和载荷图
Fig.4 PCA scores and loading diagrams of cocoa essential oil and Pickering emulsions under storage times

注:图 4a 为可可精油及其 Pickering 乳液 PCA 得分图,图 4b 为 PCA 载荷图。

将主成分分析 (PCA) 应用于可可精油及其 Pickering 乳液样品贮藏 14 d 电子鼻所得数据矩阵中,可以简化数据从而得到样品间或样品与变量之间的关系,其中 PCA 累计贡献量越大,越能更好地反应各个指标的信息^[23]。图 4a 与 4b 均显示,第一主成分 (PC1) 贡献率为 98.4%,第二主成分 (PC2) 贡献率为 1.6%,表明待测样品各自聚为一类、可较高区分且量个主成分包含了挥发性成分的全部信息,能够反应样品气味的整体信息^[24]。可可精油贮藏 1~3 d 时,得分多聚集在 PC1 负半轴,与传感器 T30/1、P30/2、T70/2 相关性较大;可可精油在 5~14 d 时,得分全部为正,与传感器 LY2/gCT 和 LY2/AA 相关。可可精油及其 Pickering 乳液能够较好按各自特性聚为一类,说明将精油制备成乳液后,二者风味相互独立,14 d 内 Pickering 乳液样

品距离较近,并与 14 d 内贮存精油样品距离较远,说明使用 OSA 淀粉稳定精油制备乳液后对精油气味的封闭效果更好,这为精油的贮藏及保护提供了依据。

2.5 可可精油及其 Pickering 抗氧化活性

2.5.1 DPPH·清除能力测定

可可精油及其 Pickering 乳液对 DPPH·清除率变化如图 5 所示。可可精油在 30 min 对 DPPH·清除率大于其 Pickering 乳液,保持随浓度增加抑制率增大趋势。而在 24 h 后,观察到 Pickering 乳液 DPPH·清除能力显著高于 30 min ($p < 0.05$),其中可可精油 Pickering 乳液在 24 h 的 DPPH·清除能力显著高于可可精油和乳液 30 min,达到最大值。当可可精油为 10 mg/mL 时,清除率达最高为 23.59%;其等含油量 Pickering 乳液 30 min 清除率最高为 18.34%,而 Pickering 乳液在 24 h 后清除率最高可达 74.76%。产生此现象的原因可能是由于经 OSA 淀粉包裹精油制备 Pickering 乳液后有助于提高精油的水溶性,提高精油与自由基接触作用;30 min 时乳液抗氧化能力较差是由于此时精油被淀粉包裹,不能完全释放, Pickering 乳液呈现随时间缓慢释放效果,从而在 24 h 时,抗氧化能力最强。

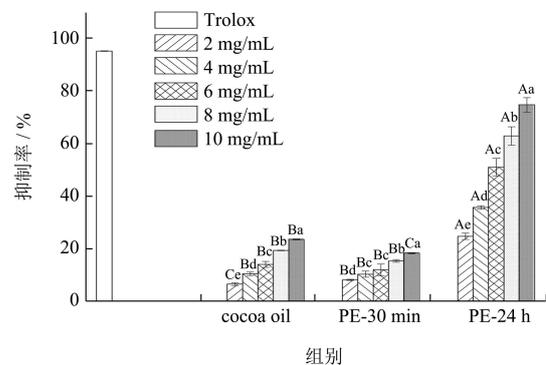


图 5 可可精油及 Pickering 乳液对 DPPH·清除率
Fig.5 Inhibition rate of DPPH· by cocoa essential oils and Pickering emulsion

注:A~C 表示不同样品同一浓度之间的差异,a~e 表示同种样品不同浓度之间的差异,不同字母代表差异显著 ($p < 0.05$)。

2.5.2 ABTS⁺清除能力

如图 6 所示,可可精油在 6 min 对 ABTS⁺清除率大于其 Pickering 乳液,同样保持随浓度增加抑制率增大趋势。而在 12 h 后,观察到 Pickering 乳液对 ABTS⁺清除能力显著高于乳液 6 min ($p < 0.05$)。其中可可精油 Pickering 乳液在 12 h 对 ABTS⁺清除率显著高于 6 min 且达到最大值。可可精油对 ABTS⁺清除能力显著低于其他两种精油,可可精油 Pickering 乳液在 6 min 时的清除率最低,而当 12 h 时,其对 ABTS⁺清除率相较于 6 min 显著增加且明显超过可可精油

($p < 0.05$)。可可精油浓度为 5 mg/mL 时,对 ABTS⁺清除率最高达 24.91%, 等含油量 Pickering 乳液 6 min 时清除率最高为 14.16%; Pickering 乳液在 12 h 时,清除率最高达 44.13%。

可可中的酚类物质和黄酮类物质在许多研究都被报道为具有抗氧化、抗自由基和抗癌特性的生物活性化合物^[25]。抗氧化活性取决于酚类化合物中羟基的氢原子的移动性。而对于超临界 CO₂ 萃取出可可精油的抗氧化性未见报道。提取后的可可精油仍含有多种未被破坏的活性物质, 占比最多为萜烯类化合物 (23.15%), 如 α -石竹烯 (2.65%) 和柠檬烯 (2.82%) 等发挥抗氧化功效, 酚类和萜烯类成分的协同作用也是可可精油抗氧化性较高的主要原因。王莹等^[26]表明不饱和脂肪酸同样具有抗氧化能力, 根据之前的研究^[18]表明, 可可精油中含有 35.34% 不饱和脂肪酸。

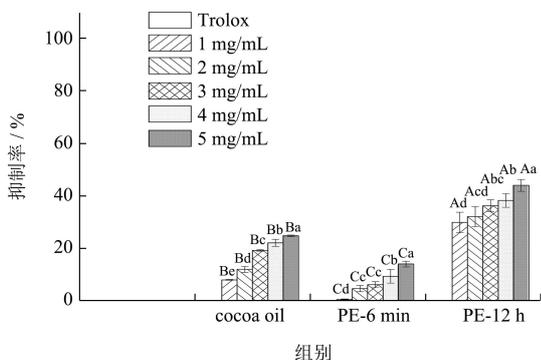


图 6 可可精油及 Pickering 乳液对 ABTS⁺清除率

Fig.6 Inhibition rate of ABTS⁺ by cocoa essential oils and Pickering emulsion

注: A~C 表示不同样品同一浓度之间的差异, a~e 表示同种样品不同浓度之间的差异, 不同字母代表差异显著 ($p < 0.05$)。

2.6 可可精油及其 Pickering 抑菌活性

2.6.1 抑菌圈试验结果

通过表 4 可知, 比较可可精油及其 Pickering 乳液的抑菌圈直径, 发现 Pickering 乳液对两种供试菌的直径明显小于未包埋精油对两种菌的直径, 但差异不显著 ($p < 0.05$)。产生此现象的原因, 可能是由于介于两相之间紧密的固体颗粒界面层阻碍了精油与供试菌的相互作用, 从而造成 Pickering 乳液抑菌活性相对较低^[13]。对比两种致病菌抑制效果, 可可精油及其 Pickering 乳液对金黄色葡萄球菌具有最好的抑菌性, 抑菌圈直径分别为 10.86 mm 和 8.03 mm。

在可可精油中, α -石竹烯、3-葑烯、D-柠檬烯等发挥抑菌作用^[27]。与大肠杆菌 (革兰氏阴性菌) 相比, 金黄色葡萄球菌 (革兰氏阳性菌) 对可可精油及其 Pickering 乳液表现出相对更高的敏感性。根据 Ahmed^[28]

研究, 这可能归因于微生物细胞壁结构差异, 革兰氏阴性菌细胞壁周围的脂多糖会限制疏水化合物的扩散, 而疏水分子可以通过厚的肽聚糖层进入革兰氏阳性菌的细胞膜。

表 4 可可精油及其 Pickering 乳液的两种致病菌抑菌圈直径 (mm)

Table 4 Diameter (mm) of two pathogenic bacteria inhibition zones of cocoa essential oil and Pickering emulsion

菌种	可可精油	Pickering 乳液
大肠杆菌	8.87±1.35 ^{Aa}	7.22±0.59 ^{Aa}
金黄色葡萄球菌	10.86±1.08 ^{Aa}	8.03±0.59 ^{Ba}

注: 大写字母表示不同样品同一菌种之间的差异, 小写字母表示同种样品不同菌种之间的差异, 不同字母代表差异显著 ($p < 0.05$)。

2.6.2 抑菌率测定

由图 7a 可知, 随着可可精油浓度的增加, 其对大肠杆菌的抑制率持续高于可可精油 Pickering 乳液, 二者呈现显著性差异 ($p < 0.05$)。当可可精油最高浓度为 10 mg/mL 时, Pickering 乳液对大肠杆菌抑制率为 52.17%, 此时可可精油抑制率为 65.07%。对大肠杆菌来说, 可可精油的半抑制浓度即 IC₅₀ 为 6.70 mg/mL, Pickering 乳液的 IC₅₀ 为 9.46 mg/mL。

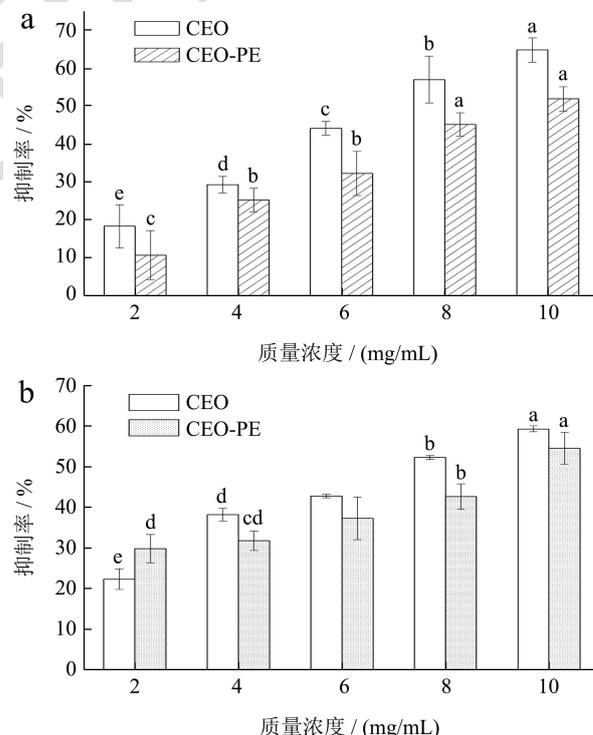


图 7 可可精油及其 Pickering 乳液对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制

Fig.7 Inhibition of *E. coli* and *S. aureus* by cocoa essential oils and Pickering emulsion

由图 7b 可知, 当可可精油浓度为 2 mg/mL 时, Pickering 乳液对金黄色葡萄球菌抑制率显著高于精油

($p < 0.05$), 二者抑制率分别为 22.35% 和 29.85%; 随着可可精油浓度增加, Pickering 乳液抑制率逐渐低于可可精油。对金黄色葡萄球菌来说, 可可精油的 IC_{50} 为 7.18 mg/mL, Pickering 乳液的 IC_{50} 为 11.07 mg/mL。根据 Huang^[15] 研究可知, 将精油转化为 Pickering 乳液可提高其抑菌活性, 可能的原因是纯精油的水溶性低, 不易与细胞膜相互作用, 但乳液可以携带精油中的活性物质破坏细胞膜, 进一步影响生物活性。由于乳液具有一定缓释效果, 本研究中 Pickering 乳液的抑菌效果略小于精油, 差异显著 ($p < 0.05$)。

3 结论

可可精油中萜烯类占比最高 23.81%, 同时还含有较高含量的酯类和醇类; 主要成分为乙酸, 占比 6.64%, 乙酸乙酯和 2,3-丁二醇相对含量较高。可可精油油脂特性值的各项指标均符合《NY/T 751-2017 绿色食品食用植物油》。以 OSA 淀粉制备 Pickering 乳液粒径最小可达 (0.47 ± 0.01) μm , 光学显微镜观察乳液液滴小且均一, 将精油制备乳液后可以有效延缓香气释放。可可精油及其 Pickering 乳液均具有较强清除自由基能力, 二者对 DPPH· 清除能力高于 ABTS⁺; 相比较于精油, Pickering 乳液放置 24 h 后的 DPPH· 清除能力最高。同时, 可可精油及其 Pickering 乳液均具有较强抑菌活性, 精油抑菌活性显著高于 Pickering 乳液 ($p < 0.05$), 同时二者均对金黄色葡萄球菌抑制作用高于大肠杆菌。

参考文献

- [1] Kim J, Lee K W, Lee H J. Chapter 42 - Cocoa (*Theobroma cacao*) Seeds and Phytochemicals in Human Health [M]. PREEDY V R, WATSON R R, PATEL V B. Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention. San Diego: Academic Press, 2011: 351-360
- [2] 王艺潼, 张彦军, 徐飞, 等. 辛烯基琥珀酸淀粉-可可精油 Pickering 乳液制备及稳定性研究[J]. 食品科学技术学报, 2021, 39(6): 87-97
- [3] Bubonja-Sonje M, Giacometti J, Abram M. Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols [J]. Food Chemistry, 2011, 127(4): 1821-1827
- [4] Formagio A S N, Vilegas W, Volobuff C R F, et al. Exploration of essential oil from *Psychotria poeppigiana* as an anti-hyperalgesic and anti-acetylcholinesterase agent: Chemical composition, biological activity and molecular docking [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2022, 296: 115220
- [5] Shah B R, Zhang C, Li Y, et al. Bioaccessibility and antioxidant activity of curcumin after encapsulated by nano and Pickering emulsion based on chitosan-tripolyphosphate nanoparticles [J]. Food Research International, 2016, 89: 399-407
- [6] Sun H, Li S, Chen S, et al. Antibacterial and antioxidant activities of sodium starch octenylsuccinate-based Pickering emulsion films incorporated with cinnamon essential oil [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 159: 696-703
- [7] Spadaccino G, Frabboni L, Petrucci F, et al. Essential oil characterization of *Prunus spinosa* L., *Salvia officinalis* L., *Eucalyptus globulus* L., *Melissa officinalis* L. and *Mentha x piperita* L. by a volatilomic approach [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2021, 202: 114167
- [8] GB 5009.229-2016, 食品安全国家标准 食品中酸价的测定 [S]
- [9] GB/T 5532-1995, 动植物油脂 碘值的测定 [S]
- [10] GB 5009.227-2016, 食品安全国家标准 食品中过氧化值的测定 [S]
- [11] GB/T 5534-2008, 动植物油脂 皂化值的测定 [S]
- [12] Liu Z, Shen R, Yang X, et al. Characterization of a novel konjac glucomannan film incorporated with Pickering emulsions: Effect of the emulsion particle sizes [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 179: 377387
- [13] Zhu H, Zhang Y, Tian J, et al. Effect of a new shell material - Jackfruit seed starch on novel flavor microcapsules containing vanilla oil [J]. Industrial Crops and Products, 2018, 112: 47-52
- [14] Yi F, Wu K, Yu G, et al. Preparation of Pickering emulsion based on soy protein isolate-gallic acid with outstanding antioxidation and antimicrobial [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2021, 206: 111954
- [15] Huang K, Liu R, Zhang Y, et al. Characteristics of two cedarwood essential oil emulsions and their antioxidant and antibacterial activities [J]. Food Chemistry, 2021, 346: 128970
- [16] He Q, Zhang L, Yang Z, et al. Antibacterial mechanisms of thyme essential oil nanoemulsions against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus*: Alterations in membrane compositions and characteristics [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2022, 75: 102902
- [17] 刘梦娅, 刘建彬, 何聪聪, 等. 加纳可可脂与可可液块中挥发性成分分析 [J]. 食品科学技术学报, 2015, 33(1): 69-74
- [18] 洪启迪, 董文江, 梅丽宝, 等. 基于热诱导的绿咖啡油氧化过程解析及活性成分变化规律研究 [J]. 热带作物学报, 2021, 42(11): 3327-3338

- [19] Wu H, Shi J, Xue S, et al. Essential oil extracted from peach (*Prunus persica*) kernel and its physicochemical and antioxidant properties [J]. LWT - Food Science and Technology, 2011, 44(10): 2032-2039
- [20] Wang Y, Li B, Zhu L, et al. Octenyl succinic acid starch-stabilized vanilla essential oil pickering emulsion: preparation, characterization, antioxidant activity, and storage stability [J]. Foods, 2022, 11(7): 987
- [21] Atolani O, Adamu N, Oguntoye O S, et al. Chemical characterization, antioxidant, cytotoxicity, Anti-*Toxoplasma gondii* and antimicrobial potentials of the *Citrus sinensis* seed oil for sustainable cosmeceutical production [J]. Heliyon, 2020, 6(2): e3399
- [22] 李芸,黄凌云.醋酸乙烯-乙烯乳液用于低气味环境友好高性能涂料[J].涂料工业,2012,42(8):51-53
- [23] Wani T A, Masoodi F A, Dar M M, et al. Subcritical treatment of olive oil: Minor phenolic composition and antioxidant properties of the solvent extracts [J]. LWT, 2021, 147: 111584
- [24] 朱红梅,田建文,张彦军,等.菠萝蜜种子淀粉制备的香草兰精油微胶囊的风味品质分析[J].食品工业科技,2017,38(22): 253-258
- [25] Schinella G, Mosca S, Cienfuegos-Jovellanos E, et al. Antioxidant properties of polyphenol-rich cocoa products industrially processed [J]. Food Research International, 2010, 43(6): 1614-1623
- [26] 王莹,全飞飞,薛刚,等.迷迭香脂溶性提取物在花生油中抗氧化性能研究[J].中国粮油学报,2021,36(12):72-77
- [27] 高永生,金斐,朱丽云,等.植物精油及其活性成分的抗菌机理[J].中国食品学报,2022,22(1):376-388
- [28] Oun A A, Shin G H, Kim J T. Multifunctional poly (vinyl alcohol) films using cellulose nanocrystals/oregano and cellulose nanocrystals/cinnamon Pickering emulsions: Effect of oil type and concentration [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 194: 736-745