

食品包装安全研究

牛至精油微胶囊的制备及其抑菌效果研究

刘光发, 王建清, 赵亚珠

(天津科技大学, 天津 300222)

摘要:以海藻酸钠为壁材制备牛至精油微胶囊,通过正交试验优化了微胶囊的最佳制备工艺条件,并对其进行了结构表征和抑菌效果研究。结果表明,制备牛至微胶囊的最佳工艺条件为:海藻酸钠质量分数 2.5%、氯化钙质量分数 1.5%、壁芯比为 1:1、乳化剂为 0.2% 的吐温-80 和 0.1% 的单甘酯,在此条件下,微胶囊中牛至精油的包埋率为 60.48%,其内部为多孔结构,且抑菌效果良好,当其用量达到 0.02 g 时,对灰霉的抑菌圈直径达到 90 mm。

关键词:牛至精油;微胶囊;正交试验;抑菌效果

中图分类号: TB485.6; TS206 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-3563(2012)03-0019-04

Preparation and Antimicrobial Activity Study of Oregano Oil Microcapsule

LIU Guang-fa, WANG Jian-qing, ZHAO Ya-zhu

(Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300222, China)

Abstract: Oregano oil microcapsule was prepared by utilizing sodium alginate as wall materials. The technology of preparing oregano oil microcapsule was optimized by orthogonal experiment design, and its structural characterization and antimicrobial activity were also tested. The results showed that oregano oil microcapsule shows the best quality when the concentration of sodium alginate, calcium chloride, Tween-80 and monoglycerides were 2.5%, 1.5%, 0.2% and 0.1% respectively, and the ratio between wall and core materials was 1:1. The embedding rate was 60.48% under the condition. There are vesicular structures in the internal of the prepared oregano oil microcapsule, which showed obvious antimicrobial activity, and the inhibition zone diameter of *Botrytis cinerea* arrived at 90 millimeters when the addition amount of oregano oil microcapsule achieved 0.02 gram.

Key words: oregano oil; microcapsule; orthogonal experiment; antimicrobial activity

随着人们生活质量的不断提高,食品安全越来越受到人们重视,无化学药物毒害的防腐保鲜剂深受人们的青睐^[1]。牛至全草含挥发油,资料表明,牛至含有 30 多种抗菌化合物^[2]。国内外一些研究发现,牛至精油及其主要成分香芹酚和百里香酚具有非常强的杀菌作用^[3-6],并且香芹酚还对多种肿瘤有抑制作用^[7],将其作为一种安全的天然抑菌剂应用于食品保鲜,可以很好地解决长期以来大量使用化学防腐剂带来的食品安全问题。牛至精油挥发性较强,在贮存过程中极易损失,采用一定的工艺将其微胶囊化,可以有效地防止牛至精油的氧化和损失,实现其持久的抑

菌效果。笔者以牛至精油为芯材,海藻酸钠为壁材,采用锐孔-凝固法制备牛至精油微胶囊,并研究其对灰霉的抑制作用,为天然抑菌剂的开发应用提供一定的参考和借鉴。

1 实验

1.1 材料与仪器

材料:牛至精油(香芹酚质量浓度为 0.80 g/mL,百里香酚质量浓度为 0.03 g/mL),长沙格绿生物科技有限公司;海藻酸钠、氯化钙、无水乙醇均为分析

收稿日期:2011-11-17

基金项目:国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD30B02)

作者简介:刘光发(1986—),男,湖南常德人,硕士,天津科技大学助理实验师,主要研究方向为包装材料与包装技术。

通讯作者:王建清(1953—),男,湖南益阳人,天津科技大学教授、博士生导师,主要研究方向为包装材料与包装技术等。

纯;琼脂、吐温-80,天津市江天化工技术有限公司;灰霉,从自然腐烂草莓中分离。

仪器:752 型紫外分光光度计,上海光谱仪器有限公司;S361 电动搅拌器,本溪市微电厂;KH-600DB 超声波清洗器,昆山禾创超声仪器有限公司;VD-650 超洁净工作台,苏州净化设备有限公司;DHP-9052 电热恒温培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;UB100i 光学显微镜,重庆市奥浦光电技术有限公司;JSM-6380 扫描电镜,日本电子。

1.2 方法

1.2.1 牛至精油微胶囊的制备

采用锐孔-凝固法制备微胶囊,其制备过程是通过针管对精油、海藻酸钠和乳化剂的混合溶液进行造粒,微粒化后进入凝固浴 CaCl_2 溶液中,固化形成微胶囊。首先精确称取一定量海藻酸钠,加热搅拌下溶于一定量的蒸馏水中,形成海藻酸钠溶液,加入不同量的牛至精油和乳化剂,45℃ 超声振荡 30 min,然后采用 200 mL 的注射器施加恒定的压力,将乳化液以一定的液面距(450 mm)滴入 CaCl_2 溶液中,充分固化 45 min,分离出牛至精油微胶囊,并且用蒸馏水反复冲洗 2 次,洗去表面残留的 CaCl_2 ,干燥,收集。

1.2.2 微胶囊包埋率的测定

采用无水乙醇将牛至精油稀释成一系列的体积浓度,采用紫外分光光度计测定其在一定波长下的吸光度值,以体积浓度 $X(\mu\text{L}/\text{mL})$ 对吸光度 Y 进行线性回归,得回归方程 $Y=0.023\ 6X+0.006\ 3$, $R^2=0.997\ 6$ 。

称取 0.1 g 微胶囊,研碎于 10 mL 无水乙醇中,浸泡 24 h,使牛至精油充分释放,取乙醇稀释定容,测定其吸光度值,代入牛至精油标准曲线中,经计算可得到包入微胶囊的牛至精油量。

$$\text{微胶囊包埋率}(\%)=(W_c/W_o)\times 100\%$$

式中: W_c 为被包裹入微胶囊的精油量; W_o 为加入的精油总量。

1.2.3 微胶囊工艺正交试验

采用正交试验设计,以海藻酸钠质量分数、 CaCl_2 质量分数、壁芯比、乳化剂配比为考虑因素,每个因素选择 4 个水平,采用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验对牛至精油微胶囊制备的条件进行优化,设计正交试验见表 1。

1.2.4 牛至精油微胶囊的结构表征

1) 牛至精油微胶囊表面结构的扫描电镜观察。
将粘有双面胶的样品台粘少量的微胶囊,喷金后观察

表 1 正交试验因素水平表
Tab.1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平	因素			
	A	B	C	D
	海藻酸钠质量分数/%	壁芯比	CaCl_2 质量分数/%	乳化剂配比
1	1.5	1:0.5	1.0	0.1%吐温-80+0.1%单甘酯
2	2.0	1:1	1.5	0.1%吐温-80+0.2%单甘酯
3	2.5	1:1.5	2.0	0.2%吐温-80+0.1%单甘酯
4	3.0	1:2	2.5	0.2%吐温-80+0.2%单甘酯

微胶囊的表面结构。

2) 牛至精油微胶囊内部结构的扫描电镜观察。
将微胶囊置于玻璃板上,用刀片反复切割,然后粘于样品台上,喷金后观察其断面的内部结构。

1.2.5 牛至精油微胶囊对灰霉的抑菌效果研究

参考蒋益虹^[8]的方法,制备浓度为 10^7 cfu/mL 的灰霉菌悬液,用无菌移液器吸取经活化、并调整好菌液浓度的菌悬液 100 μL ,加入到已倒好培养基的培养皿中,用自制经干热灭菌的玻璃涂布器,将菌悬液涂布均匀。用无菌移镊子将牛至精油微胶囊放入培养皿中央,平行做 3 个皿。霉菌在培养箱中 28℃ 恒温培养 48 h,十字交叉法量抑菌圈直径,取平均值。

2 结果与讨论

2.1 微胶囊工艺条件的正交试验结果

微胶囊工艺条件对牛至精油包埋率的影响结果见表 2。极差 R 越大,说明该因素的效应越大,影响牛至精油包埋率的因素依次为 B,A,C,D,即壁材与芯材的比例对牛至精油微胶囊包埋率影响最大,其次为海藻酸钠质量分数、 CaCl_2 质量分数、乳化剂配比。通过正交试验得出的最佳因素水平为 $A_3B_2C_2D_3$,即牛至精油微胶囊化的最佳工艺为:海藻酸钠质量分数为 2.5%,壁材海藻酸钠与芯材牛至精油的质量比为 1:1,乳化

表 2 L₁₆ (4⁵) 正交试验结果

Tab.2 L₁₆ (4⁵) orthogonal experiment result

试验号	列号					包埋率/%
	A	B	C	D	E	
	海藻酸钠质量分数/%	m _{壁材} : m _{芯材}	CaCl ₂ 质量分数/%	乳化剂配比/%	空列	
1	1	1	1	1	1	51.20
2	1	2	2	2	2	59.34
3	1	3	3	3	3	59.87
4	1	4	4	4	4	58.25
5	2	1	2	3	4	52.25
6	2	2	1	4	3	60.24
7	2	3	4	1	2	58.45
8	2	4	3	2	1	57.86
9	3	1	3	4	2	52.76
10	3	2	4	3	1	61.35
11	3	3	1	2	4	60.55
12	3	4	2	1	3	62.05
13	4	1	4	2	3	51.98
14	4	2	3	1	4	59.56
15	4	3	2	4	1	60.75
16	4	4	1	3	2	58.97
K ₁	228.66	208.188	230.96	231.26		y=57.84
K ₂	228.8	240.492	234.388	229.728		
K ₃	236.708	239.62	230.048	232.44		
K ₄	231.26	237.128	230.032	232		
k ₁	57.165	52.047	57.740	57.815		
k ₂	57.200	60.123	58.597	57.432		
k ₃	59.177	59.905	57.512	58.110		
k ₄	57.815	59.282	57.508	58.000		
R	2.012	8.076	1.089	0.678		
较好水平	A3B2C2D3					
主次顺序	B>A>C>D					

剂为 0.2%吐温-80 和 0.1%单甘酯,CaCl₂ 质量分数为 1.5%。依据此优化工艺条件进行 3 次重复试验,得到的微胶囊的平均包埋得率为 60.48%。

方差分析见表 3,结果表明:壁芯比在 $\alpha=0.01$ 水

表 3 方差分析表

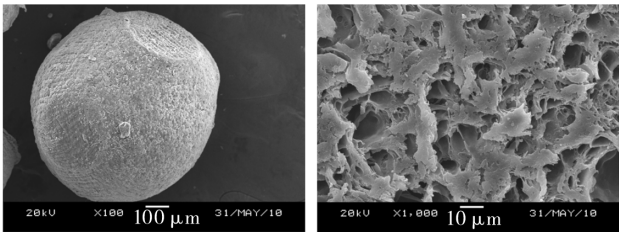
Tab.3 Analyses of variance

方差来源	偏差平方和	自由度	方差	F 值	F 临界值	显著性
A	10.619	3	3.540	3.627	$F_{0.05}(3,3)=9.280$	* *
B	180.432	3	60.144	61.623		
C	3.206	3	1.069	1.095	$F_{0.01}(3,3)=29.500$	
D	1.061	3	0.354	0.363		
E	2.929	3	0.976	1		
总和	198.25	15				

平上极显著,海藻酸钠质量分数、CaCl₂ 质量分数和乳化剂配比对牛至精油包埋率的影响不显著。

2.2 牛至精油微胶囊的结构分析

在最佳工艺条件下制备的牛至精油微胶囊的扫描电镜见图 1。牛至精油微胶囊表面结构的扫描电



a 微胶囊外部结构 b 微胶囊内部结构

图 1 牛至精油微胶囊的结构

Fig. 1 The structure of oregano oil microcapsule

镜图见图 1a,从图中可以看出:针管锐孔法制备的微胶囊产品粒径较大,粒度大致分布在之间 1.0~1.5 mm 之间,外观近似球状,表面不太光滑,但是没有裂纹,说明此方法制备的微胶囊具有良好的包埋性能。牛至精油微胶囊内部结构的扫描电镜图见图 1b,可以看到:切开的微胶囊内部为网状的多孔结构,牛至精油嵌在多孔结构中,被壁材海藻酸钠很好地包裹。

2.3 牛至精油微胶囊的抑菌效果

采用抑菌圈法评价牛至精油微胶囊的抑菌效果。抑菌圈实验判定标准:抑菌圈的直径大于 20 mm,极敏;15~20 mm,高敏;10~15 mm,中敏;7~9 mm,低敏;小于 7 mm,不敏感^[9]。不同量的牛至精油微胶囊对灰霉的抑菌效果随着时间的变化趋势见图 2,微胶

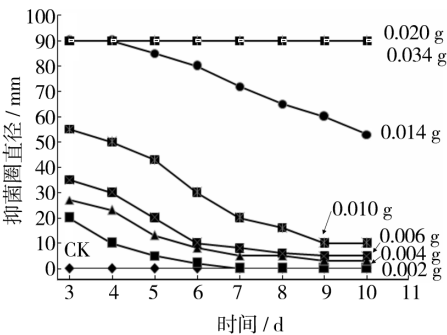


图 2 牛至精油微胶囊抑菌圈直径随时间的变化

Fig. 2 Inhibition zone diameters of different amounts of oregano oil microcapsule versus time

囊对灰霉的抑菌效果随着时间的延长逐渐减弱,随着微胶囊用量的增加而增强。当微胶囊的用量为0.002 g 时,微胶囊表现出一定的抑菌效果,在第 3 天时,抑

菌圈直径为 20 mm(极敏),但是随着时间的延长,抑菌圈直径逐渐减小,到第 7 天时,抑菌圈直径几乎减为 0(仅微胶囊上没有灰霉生长),这是由于牛至微胶囊使用量太少,不足以有效抑制灰霉的生长。随着微胶囊用量的不断增加,抑菌效果越来越明显,而且抑菌效果越持久。当微胶囊的使用量达到一定剂量时,其缓慢释放的牛至精油中的酚类物质进攻微生物的细胞膜或细胞壁,导致了微生物细胞膜功能受到影响,细胞内容物外泄^[10],同时牛至精油中各组分的共同作用也会造成微生物细胞壁、细胞膜和细胞器结构上的不可逆的损伤^[11],最终导致微生物死亡。当微胶囊用量达到 0.02 g 及以上时,可以完全抑制培养皿内霉菌的生长,抑菌圈直径始终保持为 90 mm,见图 3,远远超出一般抗菌剂的抑菌效果。

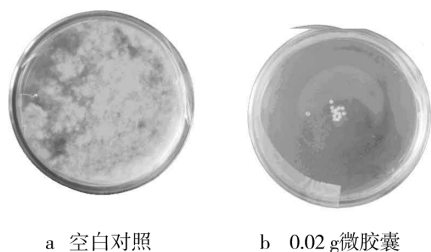


图 3 第 3 天时牛至微胶囊的抑菌效果
Fig. 3 Pictures of antimicrobial activity of oregano oil microcapsule on the third day

3 结论

以海藻酸钠为壁材,采用锐孔-凝固法制备牛至精油微胶囊的最佳工艺条件为:海藻酸钠质量分数为 2.5%,壁材海藻酸钠与芯材牛至精油的质量比为 1:1,乳化剂为 0.1%吐温-80 和 0.2%单甘酯,CaCl₂ 质量分数为 1.5%。按此条件制备的微胶囊中牛至精油的包埋率为 60.48%,其内部为多空结构,可以很好地包裹牛至精油。抑菌实验结果明,牛至精油微胶囊具有良好的缓释抑菌效果,当微胶囊用量达到 0.02 g 时,可以完全抑制培养皿内灰霉的生长,抑菌圈直径达到 90 mm。

参考文献:

[1] 王建清,赵亚珠,金政伟,等.牛至精油涂膜瓦楞纸箱对草莓保鲜效果的研究[J].食品科技,2011,36(2):26-30.
WANG Jian-qing, ZHAO Ya-zhu, JIN Zheng-wei, et al. Study on Fresh-keeping Effect of Strawberry Stored in Corrugated Box Coated with Oregano Oil[J]. Food Sci-

ence and Technology, 2011, 36(2): 26-30.
[2] 何兰花. 新型植物抗生素——牛至油[J]. 饲料研究, 2003(12): 24-25.
HE Nan-hua. New Plant Antibiotics-oregano Oil[J]. Feed Research, 2003(12): 24-25.
[3] DOMAN H J D, DEANS S G. Antimicrobial Agents from Plants: Antimicrobial Activity of Plant Volatile Oils[J]. Journal of Applied Microbiology, 2000, 88(2): 308-316.
[4] PASTER N, MENASHEROV M, RAVID U, et al. Antifungal Activity of Oregano and Thyme Essential Oils Applied as Fumigants Against Fungi Attacking Stored Grain[J]. Food Protect, 1995, 58(1): 81-85.
[5] 王新伟,刘欢,魏静,等.牛至油、香芹酚、柠檬醛和肉桂醛抑菌作用研究[J].食品工业,2010(5):13-15.
WANG Xin-wei, LIU Huan, WEI Jing. Antibacterial Effects of Oregano Ossential Oil, Carvacrol, Citral and Cinnamaldehyde[J]. Food Industry, 2010(5): 13-15.
[6] 王建清,赵亚珠,金政伟,等.牛至精油涂膜瓦楞纸板的制备及抑菌活性研究[J].包装工程,2010,31(23):1-3.
WANG Jian-qing, ZHAO Ya-zhu, JIN Zheng-wei, et al. Preparation of Corrugated Board Coated with Oregano Oil and Study on Its Antimicrobial Activity [J]. Packaging Engineering, 2010, 31(23): 1-3.
[7] 殷清华,庄英帆.香芹酚对肝细胞癌 HepG2 细胞凋亡的诱导作用及其分子机制[J].2011,19(15):1555-1560.
YIN Qing-hua, ZHUANG Ying-zhi. Molecular Mechanisms Involved in Carvacrol-induced Apoptosis in Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line HepG2 [J]. World Chinese Journal of Digestology, 2011, 19(15): 1555-1560.
[8] 蒋益虹.荷叶抑菌活性成分的研究[D].杭州:浙江大学,2007.
JIANG Yi-hong. Study on Antimicrobial Components in Lotus Leaves[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2007.
[9] 胡忆雪,姚雷,黄健,等.茶树油对 3 种痤疮致病菌的抑制作用研究[J].上海交通大学学报(农业科学版),2011,29(1):88-92.
HU Yi-xue, YAO Lei, HUANG Jian, et al. Antimicrobial Activity of Tea Tree Oil Against Acne Bacterias[J]. Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Science), 2011, 29(1): 88-92.
[10] DENYER S P, HUGO W B. Mechanisms of Action of Chemical Biocides[M]. Oxford: Oxford Blackwell Seientifie Publieation, 1991.
[11] RSOOLIL I, REZAEI M B, ALLAMEH A. Growth Inhibition and Morphological Alterations of Aspergillus Niger by Essential Oils from Thymus Eriocalyx and Thymus X-porlock [J]. Food Control, 2006, 17(5): 359-364.