

砂糖橘精油化学组成及对指状青霉的抑菌活性

杨彦松

(湘潭大学化工学院, 湖南 湘潭 411105)

摘要: 采用水蒸气蒸馏法提取砂糖橘(*Citrus reticulata* Blanco)果皮精油, 并用GC-MS对其成分进行分析, 共鉴定出17种成分, 主要包括柠檬烯(77.99%)、 β -月桂烯(3.74%)、 β -水芹烯(2.78%)、罗勒烯(2.64%)、 β -芳樟醇(2.35%)、 α -蒎烯(1.60%)、正辛醇(1.54%)、癸醛(1.24%)、4-松油醇(1.10%)和4-十一烯(1.04%)等。测定不同添加量(0.16、0.31、0.63、1.25、2.50、5.00、10.00 $\mu\text{L/mL}$)砂糖橘精油对指状青霉孢子萌发和菌丝体生长的作用。结果表明: 低添加量($<2.5 \mu\text{L/mL}$)砂糖橘精油对指状青霉孢子萌发无影响甚至有促进作用, 对指状青霉菌丝体生长有轻微的抑制; 而高添加量(10 $\mu\text{L/mL}$)则显著抑制孢子萌发和菌丝体生长($P < 0.05$)。本实验表明砂糖橘精油在防治指状青霉具有一定作用。

关键词: 精油; GC-MS; 指状青霉; 抑菌活性; *C. reticulata* Blanco

Chemical Composition and Antifungal Activity against *Penicillium digitatum* of Essential Oil from *C. reticulata* Blanco

YANG Yan-song

(College of Chemical Engineering, Xiangtan University, Xiangtan 411105, China)

Abstract: Essential oil of Shatangju (*C. reticulata* Blanco) was extracted from the fruit peel by hydro-distillation and analyzed by GC-MS. As a result, 17 different components were identified. The major components were limonene (77.99%), followed by β -myrcene (3.74%), β -phellandrene (2.78%), ocimene (2.64%), β -linalool (2.35%), α -pinene (1.60%), 1-octanol (1.54%), decanal (1.24%), 4-terpineol (1.10%) and 4-undecene (1.04%). The antifungal activity of the essential oil at different concentrations (0.16, 0.31, 0.63, 1.25, 2.5, 5.0 $\mu\text{L/mL}$ and 10.0 $\mu\text{L/mL}$) against the spore germination and mycelia growth of *P. digitatum* was determined. Results showed that the oil at lower concentrations ($< 2.5 \mu\text{L/mL}$) had no obvious or even stimulatory effect on the spore germination of *P. digitatum*, but slightly inhibited the mycelia growth of *P. digitatum*. In contrast, the oil at a higher concentration (10 $\mu\text{L/mL}$) remarkably inhibited both the spore germination and mycelia growth of *P. digitatum*. This study indicates that Shatangju essential oil plays a positive role in controlling *P. digitatum*.

Key words: essential oil; GC-SM; *Penicillium digitatum*; antifungal activity; *C. reticulata* Blanco

中图分类号: S666.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)07-0125-04

真菌引起的侵染性病害是导致采后柑橘果实腐烂的主要原因^[1], 常见的有青霉病、绿霉病、黑腐病、蒂腐病、炭疽病、酸腐病等, 以指状青霉(*Penicillium digitatum*)引起绿霉病最为严重, 最高可造成10%~30%采后损失, 严重影响果实品质和商品价值^[2]。

由于化学杀菌剂对人体和环境造成的危害, 加之病原菌对化学杀菌剂抗性不断增强, 筛选天然杀菌剂逐渐成为柑橘采后病害控制研究的热点^[3]。其中, 植物精油因具有高效、安全无毒、不易诱导病原菌产生抗性等特点, 逐渐被人们关注并成功应用于柑橘果实采后青霉和绿霉病害的控制实践^[4-6]。

柑橘精油是最常见的植物精油之一, 主要存在于外果皮油胞, 含萜烯类、酯类、醇类、醛类和酮类等组分, 各组分

含量会因品种、果实发育阶段、栽培条件等不同而显示出差异^[7]。越来越多的研究表明, 柑橘精油对指状青霉等多种果蔬致病菌有显著的抑制作用, 是一种广谱的生物杀菌剂^[5,8-11]。

本研究拟以砂糖橘(*C. reticulata* Blanco)为材料, 通过GC-MS鉴定其精油组分, 并分析砂糖橘精油对指状青霉抑菌效果, 为开发柑橘精油提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与菌株

砂糖橘(*C. reticulata* Blanco)果实于2011年12月中旬购自学校附近商店。

收稿日期: 2012-01-09

基金项目: 湖南省教育厅科学研究项目(08C891)

作者简介: 杨彦松(1980—), 男, 实验师, 硕士, 研究方向为生物化工。E-mail: Yansong_yang@163.com

指状青霉(*P.digitatum*)分离于有明显症状的腐烂柑橘果实,已通过形态学和分子生物学鉴定,现保存于湘潭大学生物与食品工程系。

1.2 仪器与设备

HP-5MS型石英毛细管柱(30m×0.25mm, 0.25μm)、2010QP-Plus气相色谱-质谱联用仪(GC-MS) BL-220电子天平 日本岛津公司; SPX-250B-D生化培养箱 上海博迅实业有限公司; Eclipse600光学显微镜 尼康仪器(上海)有限公司。

1.3 方法

1.3.1 砂糖橘精油提取

选取无机械损伤、无病虫害和成熟度相同的新鲜砂糖橘果实,将果皮放置40℃烘箱中干燥后,粉碎呈直径为6mm左右的块状。称取80g砂糖橘果皮粉末,按料水比1:7的比例加入约600mL左右蒸馏水,采用水蒸气蒸馏法萃取2h,将所得精油用过无水Na₂SO₄干燥后置于4℃冰箱,密封避光保存备用。

1.3.2 精油成分的测定

气相色谱条件:载气为氦气,柱流量为1.2mL/min,进样口温度:250℃;分流比200:1,检测器温度220℃。升温程序为:起始温度为40℃,保持1min,然后以3℃/min升到70℃,保持1min,然后以5℃/min升到220℃保持10min;进样量为1μL。质谱条件:接口温度为220℃;离子源温度200℃;电子轰击(EI)离子源;电子能量70eV;质量扫描范围 m/z 5~450。将各组分质谱图与NIST107和NIST21质谱库中参照物质进行比对,取相似度大于80%并参照文献[8-11]进行鉴定,各组成相对百分含量采用峰面积归一化法确定。

1.3.3 砂糖橘精油对指状青霉孢子萌发的影响^[10]

将一定量的精油添加到马铃薯葡萄糖肉汤(PDB)液体培养基,使精油最终添加量为0.16、0.31、0.63、1.25、2.5、5、0μL/mL,振荡混匀,从中汲取20μL滴到载玻片上,每个处理重复3次;接种培养3d的指状青霉菌孢子,密封于培养皿中,底层加湿润的滤纸片(已灭菌)保湿,25℃培养1d后显微镜下观察孢子萌发情况,统计3个视野,每个视野30个孢子左右,结果取平均值,以未添加精油的PDB培养液作为空白对照(CK)。孢子萌发率以萌发孢子的数量与观察的孢子总数的百分比表示。

1.3.4 砂糖橘精油对指状青霉菌丝体生长的影响

采用液体培养法^[8],在锥形瓶中加入19mL的PDB液体培养基,灭菌后加入精油使其最终添加量为0.16、0.31、0.63、1.25、2.50、5.00、10.00μL/mL,每一锥形瓶中加入400μL孢子悬浮液(5×10^8 CFU/mL)和200μL 1%吐温-80,加无菌水至总体积为20mL,28℃振荡培养48h后抽滤,真空干燥箱中干燥至质量不变,称其菌丝体干质量。以未添加精油、接种孢子悬浮液的PDB培养基(含

200μL 1%吐温-80)为空白对照,每一质量浓度梯度3次重复,结果取平均值。抑制率计算公式为:

$$\text{抑制率}/\% = \frac{m_c - m_t}{m_t} \times 100$$

式中: m_c 表示空白对照菌丝体质量/g; m_t 表示精油处理后的菌丝体质量/g。

1.4 数据分析

每组重复3次,采用常规的分析方法来标注标准差,数据分析采用SPSS16.0统计分析软件,ANOVA来分析显著性差异($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 砂糖橘精油的组成

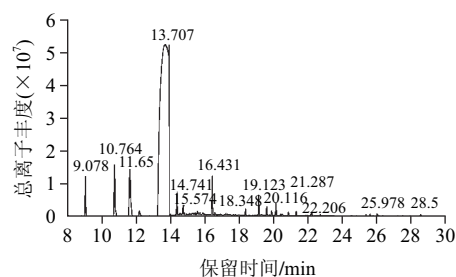


图1 砂糖橘果皮精油中挥发物的GC-MS总离子流色谱图

Fig.1 Total ion current chromatograph of volatile compounds from *C. reticulata* Blanco

表1 砂糖橘精油的化学组成

Table 1 Chemical composition of essential oil from *C. reticulata* Blanco

序号	保留时间/min	化合物名称	Kovat指数	含量/%
1	9.078	α -蒎烯(α -pinene)	948	1.60
2	10.764	β -水芹烯(β -phellandrene)	964	2.78
3	11.650	β -月桂烯(β -myrcene)	958	3.74
4	13.707	柠檬烯(<i>D</i> -limonene)	1018	77.99
5	14.741	罗勒烯(ocimene)	1027	2.64
6	15.355	4-十一烯(4-undecene)	1105	1.04
7	15.574	正辛醇(1-octanol)	1059	1.54
8	16.431	β -芳樟醇(β -linalool)	1082	2.35
9	16.571	壬醛(nonanal)	1104	0.31
10	18.348	艾薇醛(evertal)	1196	0.60
11	19.123	4-松油醇(4-terpineol)	1137	1.10
12	19.582	α -松油醇(α -terpineol)	1143	0.46
13	20.116	癸醛(decanal)	1204	1.24
14	21.287	胡椒酮(piperitone)	1235	0.21
15	22.206	丙酸香茅酯(citronellyl propionate)	1428	0.14
16	25.978	古巴烯(copaene)	1221	0.31
17	28.500	α -金合欢烯(α -farnesene)	1483	0.14
总量				98.19

砂糖橘果皮精油的提取率约为2.4%,其挥发性化学成分总离子流色谱图见图1。将总离子流图中各峰质谱扫描后得到质谱图,经计算机质谱数据系统检索

(NIST107 和 NIST21 质谱库), 结合保留指数及相关文献资料^[8-11], 共检测出含量大于0.02%的组分20种, 鉴定出组分17种, 具体化学成分如表1所示。砂糖橘精油鉴定出的17种组分占精油总量的98.19%。其主要组成依次为柠檬烯(77.99%)、 β -月桂烯(3.74%)、 β -水芹烯(2.78%)、罗勒烯(2.64%)、 β -芳樟醇(2.35%)、 α -蒎烯(1.60%)、正辛醇(1.54%)、癸醛(1.24%)、4-松油醇(1.10%)、4-十一烯(1.04%)、艾薇醛(0.60%)、 α -松油醇(0.46%)、壬醛(0.31%)、古巴烯(0.31%)、胡椒酮(0.21%)、丙酸香茅酯(0.14%)和 α -金合欢烯(0.14%)。将精油各类组分分类比较可知, 烯烴类占的比例最高, 达90.24%, 其次分别为醇类(5.45%)、醛类(2.15%)、酮类(0.21%)和酯类(0.14%)。

2.2 砂糖橘精油对指状青霉孢子萌发的影响

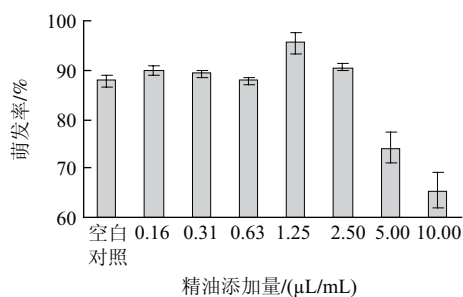


图2 砂糖橘精油对指状青霉孢子萌发的影响

Fig.2 Effect of essential oil from *C. reticulata* Blanco on spore germination of *P. digitatum*

由图2可知, 低添加量(0.16~0.63 $\mu\text{L/mL}$)砂糖橘精油对指状青霉孢子萌发无明显作用, 其孢子萌发率与空白对照组(87.75%)无明显差异。1.25 $\mu\text{L/mL}$ 能显著促进指状青霉孢子的萌发, 孢子萌发率为95.5%, 显著高于空白对照组的87.75% ($P < 0.05$)。随着添加量进一步增加, 指状青霉的孢子萌发又开始受到抑制, 当添加量为10.00 $\mu\text{L/mL}$ 时, 孢子萌发率仅为65.5%, 显著低于空白对照组 ($P < 0.05$)。

2.3 砂糖橘精油对指状青霉菌丝体生长的影响

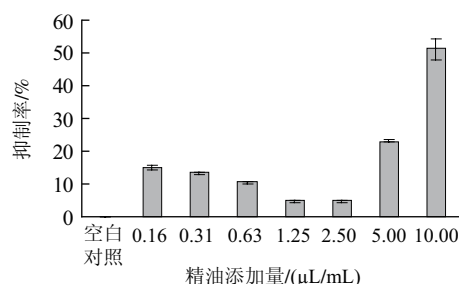


图3 砂糖橘精油对指状青霉菌丝体生长的影响

Fig.3 Effect of essential oil from *C. reticulata* Blanco on mycelium growth of *P. digitatum*

由图3可知, 低添加量(0.16~0.63 $\mu\text{L/mL}$)砂糖橘精油对指状青霉菌丝体生长有轻微的抑制作用。随着精油添加量增加到1.25~2.50 $\mu\text{L/mL}$ 范围内, 这种抑制作用又逐渐减弱。当添加量为1.25 $\mu\text{L/mL}$ 和2.50 $\mu\text{L/mL}$ 时, 抑制率均为4.70%, 显著低于0.16 $\mu\text{L/mL}$ 时的抑制率14.93% ($P < 0.05$)。随着添加量进一步增加, 指状青霉菌丝体生长又受到显著抑制。当添加量为5.00 $\mu\text{L/mL}$ 和10.00 $\mu\text{L/mL}$ 时, 抑制率分别为22.95%和55.16%。

3 讨论与结论

与其他柑橘品种类似, 砂糖橘精油组分主要烯烴类为主, 达90.24%。但本研究中柠檬烯、 β -芳樟醇等组分含量与以往的报道存在较大差别, 出现这一结果可能与不同品种、不同果实发育阶段、不同栽培条件等有关^[12-15]。

前人研究指出, 低添加量下, 柑橘精油往往对指状青霉抑制作用不明显甚至起到促进作用, 随着添加量增加, 又会逐渐抑制指状青霉的生长, 且抑制孢子萌发和菌丝体生长的添加量差别较大^[11,16-18]。本研究结果也表明, 低添加量(0~0.63 $\mu\text{L/mL}$)砂糖橘精油对指状青霉孢子萌发无明显作用, 当添加量为1.25 $\mu\text{L/mL}$ 时, 孢子萌发受到诱导, 随着添加量进一步增加到10.00 $\mu\text{L/mL}$, 孢子萌发又受到抑制; 低添加量(0~2.50 $\mu\text{L/mL}$)砂糖橘精油对指状青霉菌丝体抑制作用不明显, 而高添加量(10.00 $\mu\text{L/mL}$)砂糖橘则显著抑制指状青霉菌丝体的生长。出现这种现象可能与砂糖橘精油的组成有关。如前所述, 砂糖橘精油含柠檬烯、 β -月桂烯、 β -水芹烯、罗勒烯、 β -芳樟醇、 α -蒎烯、正辛醇、癸醛、4-松油醇、4-十一烯、艾薇醛、 α -松油醇和壬醛等组分。其中, β -芳樟醇和 α -松油醇等被公认为可抑制指状青霉生长, 而柠檬烯、 α -蒎烯和 β -月桂烯等则对指状青霉无明显作用甚至可加速它们的生长^[9,11,19-21]。低添加量砂糖橘精油中, 柠檬烯等促进指状青霉生长的芳香成分可能占主导地位, 掩盖了抑菌成分的作用; 随着精油添加量增加, β -芳樟醇和 α -松油醇等抑菌成分含量逐渐增加, 其作用强于促进指状青霉生长的芳香成分, 表现出对指状青霉的抑制。此外, 指状青霉孢子和菌丝体利用自身的酶催化系统将植物精油中某些成分转化为其他物质, 从而降低可能造成的毒害也是很重要的原因之一^[16,22]。

砂糖橘精油组成以烯烴类为主, 占90.24%, 含有 β -芳樟醇和 α -松油醇等抑菌组分; 较高添加量(10.00 $\mu\text{L/mL}$)砂糖橘精油能显著抑制指状青霉孢子萌发和菌丝体生长。综上, 砂糖橘果皮精油是一种潜在的抑制柑橘指状青霉的生物杀菌剂。

参考文献:

- [1] 田世平, 范青. 控制果蔬采后病害的生物学技术[J]. 植物学通报, 2000, 17(3): 211-217.
- [2] 龙超安, 邓伯勋, 何秀娟. 柑橘青、绿霉病高效拮抗菌34-9的筛选及其特性研究[J]. 中国农业科学, 2005, 38(12): 2434-2439.
- [3] SHARMA N, TRIPATHI A. Fungitoxicity of the essential oil of *Citrus sinensis* on post-harvest pathogens[J]. World J Microb Biot, 2006, 22(6): 587-593.
- [4] TRIPATHI P, DUBEY N K, BANERJI R, et al. Evaluation of some essential oils as botanical fungitoxicants in management of post-harvest rotting of citrus fruits[J]. World J Microb Biot, 2004, 20(3): 317-321.
- [5] du PLOOY W, REGNIER T, COMBRINCK S. Essential oil amended coatings as alternatives to synthetic fungicides in citrus postharvest management[J]. Postharvest Biol Technol, 2009, 53(3): 117-122.
- [6] SÁNCHEZ-GONZÁLEZ L, CHÁFER M, CHIRALT A, et al. Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on *Penicillium italicum*[J]. Carbohydr Polym, 2010, 82(2): 277-283.
- [7] FISHER K, PHILLIPS C. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer?[J]. Trends Food Sci Tech, 2008, 19(3): 156-164.
- [8] CACCIONI D R, GUIZZARDI M, BIONDI D M, et al. Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*[J]. Int J Food Microb, 1998, 43(1/2): 73-79.
- [9] STANGE R R, MIDLAND S L, SIMS J J, et al. Differential effects of citrus peel extracts on growth of *Penicillium digitatum*, *P. italicum*, and *P. expansum*[J]. Physiol Mol Plant P, 2002, 61(5): 303-311.
- [10] SHARMA N, TRIPATHI A. Effects of *Citrus sinensis*(L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem[J]. Microbiol Res, 2008, 163(3): 337-344.
- [11] DROBY S, EICK A, MACARISIN D, et al. Role of citrus volatiles in host recognition, germination and growth of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*[J]. Postharvest Biol Technol, 2008, 49(3): 386-396.
- [12] TAO Nengguo, LIU Yuejin, ZHANG Miaoling. Chemical composition and antimicrobial activities of essential oil from the peel of bingtang sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) [J]. Int J Food Sci Tech, 2009, 44(7): 1281-1285.
- [13] VEKIARI S A, PROTOPAPADAKIS E E, PAPADOPOULOU P, et al. Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves and peel of a Cretan lemon variety[J]. J Agric Food Chem, 2002, 50(1): 147-153.
- [14] 单杨, 李忠海. 固相微萃取/气相色谱-质谱法分析温州蜜桔精油挥发性成分[J]. 食品科学, 2006, 27(11): 421-424.
- [15] 周海燕, 乔宇, 潘思秩. 锦橙和宫川果汁香气成分比较研究[J]. 食品科学, 2007, 28(1): 291-295.
- [16] WOLKEN W A, TRAMPER J, van der WERF M J. Toxicity of terpenes to spores and mycelium of *Penicillium digitatum*[J]. Biotechnol Bioeng, 2002, 80(6): 685-690.
- [17] HALL D J, FERNANDEZ Y J. *in vitro* evaluation of selected essential oils as fungicides against *Penicillium digitatum* Sacc[J]. Proc Fla State Hort, 2004, 117: 377-379.
- [18] SCORA K M, SCORA R W. Effect of volatiles on mycelium growth of *Penicillium digitatum*, *P. italicum*, and *P. ulaiense*[J]. J Basic Microb, 1998, 38 (5/6): 405-413.
- [19] ECKERT J W, RATNAYAKE M. Role of volatile compounds from wounded oranges in induction of germination of *Penicillium digitatum* conidia[J]. Phytopathology, 1994, 84: 746-750.
- [20] SINGH P, SHUKLA R, PRAKASH B, et al. Chemical profile, antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis*(L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, *DL*-limonene[J]. Food Chem Toxicol, 2010, 48(6): 1734-1740.
- [21] DAFERERA D J, ZIOGAS B N, POLISSIOU M G. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*[J]. J Agric Food Chem, 2000, 48(6): 2576-2581.
- [22] BADEE A Z M, HELMY S A, MORSY N F S. Utilisation of orange peel in the production of α -terpineol by *Penicillium digitatum* (NRRL 1202) [J]. Food Chem, 2011, 126(3): 849-854.