

白柚果成熟度對其果皮精油組成與抗菌效果之影響

李金燕、左艷芳、陳怡君、趙育漳*

中華醫事科技大學 食品營養系

摘要

本研究主要探討白柚果成熟度對其果皮萃取之精油組成影響，並比較其對革蘭氏陽性及格蘭氏陰性的抗菌效果。結果顯示，未熟果之精油萃取率高於熟成果，分別為 1.87% 及 1.10 %。白柚果皮之精油主要為萜烯類化合物，其中以檸檬烯(Limonene)，未熟果與成熟果依次為 78.79% 及 76.81%，且 sabinene, β -pinene, neral, geranial 及 γ -elemene 也顯著受成熟度影響($p < 0.05$)。比較抑菌圈大小，結果顯示，成熟度對於抑菌活性並沒有顯著性差異。但白柚精油對黴菌較細菌有較高抑菌活性，且對革蘭氏陽性菌的抑菌活性高於格蘭氏陰性菌。

關鍵字：白柚精油、成熟度、抑菌活性

Effect of maturity on the antimicrobial activity in essential oil of *Citrus grandis* (L.) Osbeck peel

Cin-Yen Lee, Yen-Fang Chou, Yi-Chun Chen and Yu-Chang Chao*

Abstract

The influence of maturity of Mato Peiyu fruit (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) on the composition of essential oil and its antimicrobial effect were investigated in this study. The result showed that yield of essential oil of the immature fruit was higher than mature fruit, 1.87% and 1.10%, respectively. Terpene compounds were the principal composition of essential oil, and the level of limonene was 78.79% in immature fruit comparing 76.81% in mature fruit. And sabinene, β -pinene, neral, geranial and γ -elemene significant were also influenced by maturity ($p < 0.05$). Comparison of inhibition zone of essential oils, the results showed that the maturity did not significantly affect their antimicrobial

activity. However, the essential oil had a higher antimicrobial activity to mold than to bacteria. Moreover, the essential oil did not have any inhibit effect to Gram-negative bacteria.

keywords: antimicrobial activity, *citrus grandis*, essential oil, maturity

壹、前言

精油因廣泛對微生物具抗菌能力，因此俱有作為天然的食品保存劑的潛能(Baratta et al., 1998)，而柑橘類外果皮精油也被報導具有抗氧化及抗菌功能(Mokbel & Hashinaga, 2006)，Gorinstein 等人比較三種柑橘類水果的果肉與果皮之抗氧化能力，發現果皮高於果肉，認為俱有商業應用的價值(Gorinstein et al., 2001)。研究指出柑橘外果皮精油主要含有 84%以上的 limonene，能有抑制 *Aspergillus niger* 生長，並具熱安定性，對水果或穀物的保存俱有潛在的應用性(Sharma & Tripathi, 2008)。*Aspergillus* 菌屬能夠廣泛生長在有機物上，經常是引起食物腐敗的原因，在動物飼料或人的食物中生長，對健康造成危害(Barios et al., 1997)。又有研究指出，文旦具有廣效的抗真菌能力，並可在較低濃度下，完全抑制黃麴毒素 B₁ (Singh et al., 2010)。同時精油長期的使用能抑制牙菌斑的產生(Stoeken et al., 2007)。跟據研究指出會產生牙菌斑的細菌有許多，例如 *Streptococcus mutans*、*Streptococcus sanguis*、*Lactobacillus casei* 及 *Actinomyces viscosus* 等細菌皆能引起牙菌斑，其中 *Streptococcus mutans* 為主要病原菌(Loesche, 1986)。白柚為柑橘類水果中果實較大之水果，可達 1.5 公斤以上，因田間管理的需要，皆需要有疏果處理。此外，果皮外表受傷造成賣相不佳時，也須於予廢棄，因此所產生的廢果造成環境的問題。白柚果皮含豐富的精油及多元酚類化合物等生理活性化合物，如何利用這些廢果，是具有研究價值。本研究主要是比較未成熟白柚的廢果之精油組成，並探討其抑菌效果與抗氧化能力，以作為進一步應用的參考。

貳、材料與方法

一、樣本製備 (Sample preparation)

白柚採自佳里地區，分為未成熟與成熟果，未成熟果是結果後五個月之果實，重量約 275 g，柚皮約重 40~60 g。成熟果是結果九個月之果實，重量約 1500~2500 g，

柚皮約重 140 ~ 240 g。果皮主要是外果皮(flavedo)和部分中果皮(albedo)，水果經洗淨後，由外而內平均取樣厚度約 3~5 mm，-30℃ 冷凍儲藏直至分析。

二、菌株(Microorganisms)

本研究所使用得微生物包括革蘭氏陽性菌：*Streptococcus sanguis* (ATCC 49295)、*Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478)、*Streptococcus mutans* (ATCC 25175)、*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)、*Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228)。格蘭氏陰性菌：*Escherichia coli* (ATCC 25922)、*Salmonella enterica subsp.* (ATCC 14028)、*Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 17802)。黴菌：*Aspergillus niger* (NY7S91)、*Candida albicans* (AFA2501)、*Candida tropicalis* (EU1S17)。

三、精油萃取(Extraction of essential oil)

冷凍白柚皮經粉碎，其粒度約 0.5 mm-1 mm，秤取 500 g 添加 4 L 去離子水，置於 5 L 圓底玻璃瓶內以 Clevenger-type 裝置進行蒸餾，以 15℃ 冷卻水循環冷凝，進行 90 分鐘萃取。萃取之精油添加無水硫酸鈉，去除水分，將過濾後之精油以褐色密封瓶保存於 4℃ 備用。

四、GC 分析條件(Determination of essential oil)

白柚精油使用氣相層析儀 (Shimadzu GC-14, Japan)，配有火焰離子偵測器 (FID)，分離管柱為 HP-101 (50m × 0.2mm i.d., 0.2μm film) 進行分析。攜帶氣體為氦氣，流速為 1.0 mL/min，分流比為 80:1，注入口溫度為 250℃，偵測器溫度為 250℃，注射量為 1 μL。分析條件為初溫 40℃，維持 10min，再以 2℃/min，升溫至 240℃，維持 30min。

五、精油之 GC-MS 分析(GC-MS analysis of essential oil)

白柚精油成份分析是使用 HP 6890N GC-MS，配 Agilent MSD (Folsom, CA, U.S.A.) 進行分析。分離管柱為 HP-5 MS capillary column (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25μm film)，攜帶氣體為氦氣，流速為 1.0 mL/min。使用分流注射法 (split)，分流比為 1:10，注射孔溫度為 220℃，離子化電壓為 70eV，質譜範圍 m/z 為 33-400，注射量 1 μL。分析條件為起始溫度 40℃，維持 4 分鐘，再以 10℃/min 之升溫速度至終溫 300℃，維持 5 分鐘，總分析時間為 35 分鐘。成分之鑑定是比較 National Institute of Standards and Technology (NIST; U.S.A.) 及 Wiley (U.S.A.) 兩種資料庫之質譜。

六、精油乳化液製備(Preparation of essential oil emulsion)

依據 Kim 等 (1995)方法加以修飾。精油取 25 g 以無菌 1% Tween 20 溶液稀釋成 10、20、30 及 40% (w/w)，以超音波於冰浴下震盪 5 分鐘，得精油乳化液，進行抗菌活性之測定(Kim et al., 1995)。

七、抑菌圈試驗(Microbial inhibition test)

將測試菌株接種至 TSA 培養基，於 37 °C 下培養 1 天，菌株活化後，以 1.5×10^8 CFU/ml 菌量進行平盤塗抹。將 oxford cup (8 x 6 x 10 mm)放入於已接種菌體之固體培養基內，再加入不同濃度的精油乳化液 100 μ L，培養 18 小時後，測定抑菌圈之大小，評估其抗菌能力。

八、統計分析(Statistical analysis)

實驗數據是以平均值和標準偏差(mean $\pm$ SD)表示。處理間的統計分析是利用 SAS 軟體(Version 2.1.40, SAS Institute Inc. Cary NC, USA)進行，採單因子變異分析 ANOVA 分析。顯著水準設定為 $p < 0.05$ 。

參、結果與討論

一、成熟度對精油萃取率之影響

本研究所使用之未熟果與成熟果之特性(如表一)，未熟果生長期大約為五個月，而成熟果大約為九個月，未熟果果重為 275 ± 75 克，成熟果為 2000 ± 500 克，外果皮(flavedo)平均厚度兩者皆為 1~2mm，重量所佔分別約佔整顆果實的 20%(未成熟)及 10%(成熟)。但精油萃取收率成熟果較未熟果為高，依次為 1.87%及 1.10%。柑橘類果皮精油含量受品種、季節及成熟度影響，。而精油折射率(n_D^{20})，未熟果與成熟果兩者差異不大，分別 1.474 及 1.473。

二、白柚精油組成

未熟與成熟白柚精油，直接經 GC/MS 進行成份分析與鑑定，共鑑定出 31 種化合物，如表二所示，包括了 7 種單萜碳氫化合物(α -pinene、camphene、sabinene、 β -pinene、 β -myrcene、 α -phellandrene、limonene)、13 種單萜含氧化合物(cis-linalool oxide、trans-linalool oxide、linalool、nonanal、trans-p-mentha-2,8-dienol、cis-limonene oxide、trans-limonene oxide、citronellal、 α -terpineol、decanal、neral、geraniol、geranial)、9 種倍半萜碳氫化合物(δ -elemene、 β -elemene、caryophyllene、 α -caryophyllene、germacrene D、 γ -elemene、 α -farnesene、germacrene B、copaene)、2 種倍半含氧化合物(tau-murolol、 α -cadinol)。兩種精油脂成分並沒有差異，但在部分成分的含量上有些差異。未熟與成熟白柚精油主要成分 limonene 所佔比率最高，且未熟果顯著性高於成

熟果($p<0.05$)，含量依次為 $78.97\pm0.06\%$ 及 $76.81\pm0.04\%$ ， β -myrcene 含量約 $4.27\pm0.01\%$ 及 $5.63\pm0.02\%$ 。

比較單萜碳氫化合物成分中，未熟果含量顯著較高者有 sabinene (依次含量為 1.56 ± 0.01 、 $0.54\pm 0.01\%$)、 β -pinene (依次含量為 2.16 ± 0.02 、 $1.02\pm0.01\%$) 及 limonene(依次含量為 $78.97\pm0.06\%$ 、 $76.81\pm0.04\%$)($p<0.05$)。未熟果含量顯著較低者有 β -myrcene (依次含量為 4.27 ± 0.01 、 $5.63\pm0.02\%$)、 α -phellandrene (依次含量為 0.25 ± 0.02 、 $0.33\pm0.01\%$)($p<0.05$)。

在單萜含氧化合物成分中，未熟果含量顯著較高者有 α -terpineol (含量分別為 0.58 ± 0.01 及 $0.48\pm0.02\%$) 及 geraniol (含量分別為 0.21 ± 0.01 及 $0.14\pm0.01\%$)。未熟果含量顯著較低者有 cis-linaloloxide (含量分別為 0.51 ± 0.02 及 $0.64\pm0.03\%$)、linalool(含量分別為 0.50 ± 0.01 及 $0.66\pm0.02\%$)、nonanal(含量分別為 0.11 ± 0.01 及 $0.19\pm0.01\%$)、neral (含量分別為 1.63 ± 0.03 及 $1.85\pm0.02\%$)及 geranial (含量分別為 1.97 ± 0.02 及 $2.45\pm 0.04\%$)($p<0.05$)。

在倍半萜碳氫化合物成分中，未熟果含量顯著較低者有 γ -elemene (含量分別為 0.11 ± 0.01 及 $0.16\pm0.01\%$)、germacrene D(含量分別為 2.75 ± 0.03 及 $3.39\pm0.03\%$)、 γ -elemene (含量分別為 0.38 ± 0.02 及 $0.56\pm0.01\%$)($p<0.05$)。

由上述結果得知，比較生長五個月和九個月不同成熟度的白柚果皮，其精油組成份沒有顯著影響，但部份各組成份的百分比有顯著的差異。

三、精油之抑菌活性

為了解精油之抑菌活性，以革蘭氏陽性菌 (*Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*)、革蘭氏陰性菌 (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica* subsp., *Vibrio parahaemolyticus*)與黴菌 (*Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*)為抑菌對象。以添加 20~100%的精油乳化液，以抑制圈來測試其抑菌活性，結果如表三所示，成熟度對微生物的抗菌活性差異並不顯著，對於黴菌的效果高於細菌，且在 100%的濃度時，抑制圈可達到高度抑菌活性效果(30 mm)。且對革蘭氏陽性菌在高濃度下較具有抑菌效果。比較五株革蘭氏陽性菌，其敏感度也有差異，以 *Streptococcus sanguis* 為最敏感。而對於革蘭氏陰性菌的 *Escherichia coli*、*Salmonella enterica* subsp. 及 *Vibrio parahaemolyticus* 並沒有抑菌效果。在其他不同精油的抗菌試驗研究中也曾發現，革蘭氏陽性菌較革蘭氏陰性菌更易受精油抑制，其主要原因是革蘭氏陰性菌其外細胞膜具有親水性多醣，能阻礙疏水性精油的滲透性(Mimica-dukic et al., 2004)。比較對黴菌的抑制效果，發現不管在未成熟或成熟果皮精油，在 30%添加時對試驗所使用的三種黴菌皆有抑菌效果，在 100%實皆可達到最大的抑制效果。

肆、結論

利用白柚之廢果抽取精油時，除有較高的精油收率外，雖然部分的組成份有顯著性的差異，但在抑制革蘭氏陽性及黴菌上並沒有顯著的差異，因廢果在栽種管理上是比較容易收集的，不似熟果果皮的困難度。因此，認為利用未熟白柚果皮抽取精油的利用上，是較為可行的方法。此外，在實際的利用上，也將更進一步進行實驗。

伍、參考文獻

- Baratta, M. T., Dorman, H. J. D., Deans, S. G., Biondi, D. M., & Ruterto, G. (1998). Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, 10, 618-627.
- Barrios, M. J., Medina, L. M., Cordoba, M. G., & Jordano, R. (1997). Aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* isolated from cheese. *Journal of Food Protection*, 60(2), 192-194.
- Gorinstein, S., Martin-Belloso, O., Park, Y. S., Haruenkit, R., Lojek, A., Ciz, M., . . . Trakhtenberg, S. (2001). Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. *Food Chemistry*, 74.
- Kim, J., Marshall, M. R., & Wei, C.-i. (1995). Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *J. Agric. Food Chem.*, 43(11), 2839-2845.
- Loesche, W. J. (1986). Role of *Streptococcus mutans* in Human Dental Decay. *Microbiological Reviews*, 50(4), 353-380.
- Mimica-dukic, N., Bozin, B., Socovic, M., & Simin, N. (2004). Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) Essential Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2485-2489.
- Mokbel, M. S., & Hashinaga, F. (2006). Evaluation of the antioxidant activity of extracts from buntan (*Citrus grandis* Osbeck) fruit tissues. *Food Chemistry*, 94(4), 529-534. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.11.042>
- Sharma, N., & Tripathi, A. (2008). Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiological Research*, 163(3), 337-344. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2006.06.009>
- Singh, P., Shukla, R., Prakash, B., Kumar, A., Singh, S., Mishra, P. K., & Dubey, N. K. (2010). Chemical profile, antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene. *Food Chem Toxicol*, 48(6), 1734-1740.
- Stoeken, J. E., Paraskevas, S., & van der Weijden, G. A. (2007). The Long-Term Effect of a Mouthrinse Containing Essential Oils on Dental Plaque and Gingivitis: A Systematic Review. *Journal of Periodontology*, 78(7), 1218-1228.