

葡萄柚籽提取物抑菌作用及应用进展

周瑶^{1,2}, 陈岗^{1,2}, 詹永¹, 杨勇¹, 吴振^{1,2}, 谭红军^{1*}

¹重庆市中药研究院; ²重庆市中药健康学重点实验室, 重庆 400065

摘要:葡萄柚籽提取物是一种非常有潜力的高效广谱抗菌剂,在极低浓度时就可取得明显的抑菌活性,同时还具备微弱的抗氧化活性。本文综述了葡萄柚籽提取物的制备方法、抑菌作用及其在食品、医学等方面的应用研究进展,以期为葡萄柚籽的深度开发利用提供参考。

关键词:葡萄柚籽提取物;副产物;抑菌作用;应用进展

中图分类号:TS255.1

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)Suppl-0200-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.S.029

Advances of grapefruit seed extract in anti-bacteria and application

ZHOU Yao^{1,2}, CHEN Gang^{1,2}, ZHAN Yong¹, YANG Yong¹, WU Zhen^{1,2}, TAN Hong-jun^{1*}

¹Chongqing Academy of Chinese Materia Medica; ²Chongqing Health Science Key Laboratory, Chongqing 400065, China

Abstract: Grapefruit seed extract was an efficient and broad-spectrum antibacterial agent with potential, which shows significant bactericidal effects at very low concentrations. Meanwhile, it also has some antioxidant effect. For providing references in depth development and exploitation of grapefruit seed extract, the preparation methods, antibacterial effect and application research have been reviewed in this paper.

Key words: grapefruit seed extract, by-product, antibacterial effect, application advances

葡萄柚籽提取物 (grapefruit seed extract, GFSE) 是一种从葡萄柚 (芸香科) 的种籽和果肉中提取的物质。化学分析发现,葡萄柚籽提取物含有类黄酮 (柚皮苷、山奈酚和槲皮素等)、抗坏血酸、生育酚、柠檬酸、甾酮和矿物质等。而且 GFSE 还含有大量的多酚类化合物,如儿茶酚、表儿茶素、以及二聚体、三聚体和四聚体原花青素等,这些化学成分可能具有很好的抑菌活性,如 GFSE 对细菌 (如金黄色葡萄球菌、大肠杆菌等) 及真菌均有较高的抑菌活性^[1-5]。此外,有研究表明在有效抑菌浓度下 GFSE 对环境对人体无毒,是一种非常有潜力的高效广谱抑菌化合物^[6]。目前,对 GFSE 的研究都在国外,国内基本还没有对其展开研究和开发,特别是食品领域。本文概述了 GFSE 抑菌作用的研究进展,为葡萄柚及其他芸香科柑橘属植物的种子提取物的抑菌作用的深入研究及其抑菌产品的开发提供依据。

1 葡萄柚籽提取物的制备

GFSE 的制备方法主要分为水提法、乙醇提取法及其他有机溶剂提取法,目前,对 GFSE 的水提法和乙醇提取法使用较多。GFSE 的水提法^[7]是将干燥后的葡萄柚种子和果肉磨成细粉溶解在纯水中,使用天然催化剂 (包括盐酸) 和天然酶进行催化转化成为一种酸性液体,该液体含有多酚类化合物,包括槲皮素,柚皮苷,柚皮素等。多酚本身不稳定,但通过化学转化成为更稳定的季铵化合物。Cvetnic 等^[8]将无汁液的柚果肉和种子风干为粉末 (定量比为 4:1),然后在索氏抽提中用 70% 乙醇提取 6 h。冷却后,用旋转蒸发去除溶剂,通过微生物测试后,用 70% 的乙醇制备成 33% 的提取物。Al-ani 等^[9]比较了葡萄柚籽水和乙醇提取物的抗菌活性,结果表明 20% (W/V) 浓度的葡萄柚籽水提取物对金黄色葡萄球菌,变形杆菌,肺炎克雷伯氏菌,白色念珠菌均有较强的抑菌活性,但 20% (W/V) 浓度的葡萄柚籽乙醇提取物对上述细菌未表示出任何抗菌活性。Adeneye 等^[10]发现葡萄柚籽甲醇提取物比乙醇提取物显示更强的抗菌活性。其他许多研究表明葡萄柚

籽乙醇提取物针对多种微生物的活动具有良好的抑制作用。这表明,提取方法可能会影响 GFSE 的化学成分,而目前,关于 GFSE 的不同提取方法的抑菌活性的比较研究还不多,GFSE 的提取方法还较单一,大多集中在葡萄柚籽水提取物和乙醇提取物的研究上,今后应对 GFSE 的制备方法作更深入地研究,并对各种方法的抑菌活性进行比较优化。

2 葡萄柚籽提取物的抑菌活性成分、作用及机理

2.1 葡萄柚籽提取物的抑菌活性成分

葡萄柚籽提取物含有多种活性成分,早在 1949 年,Miller 等^[11]就发现葡萄柚籽中含有抗坏血酸、胡萝卜素、维生素 P 及芦丁。之后展开的研究认为其还含有柠檬苦素及其类似物、柚皮苷、柠檬酸、生育酚、儿茶素,表儿茶素等^[12]。Cvetnic^[8]使用分光光度法测定出葡萄柚籽的乙醇粗提取物中含有总多酚物质 3.92%,总黄酮类物质 0.11%,其乙醇提取物对细菌和酵母菌表现出一定的抗菌作用,对肠沙门氏菌则表现出较强的抗菌作用(MIC 2.06%, m/V)。目前对 GFSE 的具体抗菌成分几乎没有研究,其主要的抗菌活性成分还不完全清楚,但是一般认为主要是上述的多酚类化合物的作用,它们的含量与 GFSE 被认为在抑菌方面发挥了很重要的作用。

2.2 葡萄柚籽提取物的抑菌作用

葡萄柚籽提取物具有广谱的抑菌效果,研究表明 GFSE 能有效对抗多种细菌、病毒、真菌以及寄生虫,对革兰氏阳性菌的抑制作用比对革兰氏阴性菌的作用强。Reagor 等^[7]测试了 GFSE 对 67 种生物体(葡萄球菌、肠球菌、假单胞菌等)的抑制作用并同常用五种局部化学抗菌剂的抗菌效果进行了比较。结果表明,GFSE 对所测试的 67 种生物体都有抑制效果,抑菌圈均 ≥ 15 mm,且与五种局部化学抗菌剂效果相当。由于 GFSE 提取方法的不同,其抑菌活性也有明显差异。Choi 等^[5]研究了两种 GFSE 对 11 种酿酒酵母的抑制作用,结果显示两种 GFSE 对 11 种酿酒酵母的 MIC 值具有差异性。Ionescu 等^[13]证明 GFSE 对酵母和一些酵母样真菌的抑制活性通常比对细菌和真菌的抑制活性弱,但也有其他研究者得出相反的结论。可能是由于多酚类化合物含量的不同及 GFSE 的有效性在菌株之间不同所致。

GFSE 的抑菌效果跟细菌种类、自身浓度、有无蛋白质、环境温度等有关^[12]。假单胞菌属在 3% 浓度以下的 GFSE 矿物质培养基中可能会快速繁殖。

蛋白质对 GFSE 的影响也较大,GFSE 的最高推荐使用浓度(5%)对 1% 的脱脂牛奶和 1% 牛血清蛋白中的大肠杆菌无抑制作用。温度对 GFSE 的抑菌作用可能也有影响,用 1% 浓度的 GFSE 处理大肠杆菌,温度从 20 °C 减少到 10 °C 对大肠杆菌的影响不明显,而当温度从 20 °C 增加到 30 °C,1% 浓度的 GFSE 使葡萄球菌明显减少。

2.3 葡萄柚籽提取物的抑菌机理

国内外对 GFSE 的抑菌机理研究的报道较少,还有待进一步讨论。Reagor 等^[7]测量了 GFSE 的 pH 值为 5.5,这种酸性对于建立一个阻止细菌生活的环境是至关重要的。同时,借助扫描透射电子显微镜,揭示了 GFSE 的可能抑菌机制,GFSE 在接触细胞 15 分钟后破坏细胞膜并释放出细胞质内容物进而导致细胞死亡^[6]。Zhang 等^[14]研究了 GFSE 对酿酒酵母的抑制机理,结果表明 GFSE 能诱导酿酒酵母胞内活性氧大幅增加(600%)。DAPI 和 TUNEL 核酸荧光染色表明 GFSE 能使酿酒酵母细胞核浓缩,并导致核裂及 DNA 断链。

3 葡萄柚籽提取物的应用

3.1 葡萄柚籽提取物在食品中的应用

葡萄柚籽提取物在食品中主要应用于食品的防腐和保鲜。目前对于 GFSE 的防腐和保鲜的研究主要集中在:一是可食用天然抗菌保鲜膜的研发;二是作为天然防腐剂替代化学合成防腐剂的可能。

可食用膜可以调控水分、氧气或溶质的迁移,因而能够在一定程度上减少食品在贮藏过程中的汁液流失和干耗,减少与腐败微生物接触,并可以与被包装食品一起食用,对环境无污染^[15,4],是一种具有广阔应用前景的食品保鲜方式,但是,应该指出的是,大多数可食用薄膜的物理性能不如塑料薄膜,更重要的是成本高于塑料薄膜^[16,17]。将 GFSE 添加入可食用薄膜能增强薄膜的抗菌特性,在原有保鲜基础上能有效延长食品货架期,进而降低可食用薄膜的成本。此外,GFSE 的加入还会影响膜的机械性能,如薄膜的厚度,表面形态,拉伸强度(tensile strength, TS),伸长率(elongation, E),水蒸气渗透率(water vapor permeability, WVP)等。将 GFSE 掺入膜中还可能会降低薄膜的亮度以及屏蔽紫外线的辐射,这可能有助于防止包装食品的氧化变质。研究认为,影响薄膜机械性能的因素与 GFSE 的浓度及所其所含有的化学成分有关。如,薄膜厚度随 GFSE 浓度增加而增加,且随着 GFSE 浓度的增加,薄膜越

粗糙,这可能是由于 GFSE 中存在亲水性化合物,当 GFSE 含量增加会有更多水分被吸收入薄膜基质。2016 年,新加坡国立大学的研究团队^[18,19]研发出了一种新型环保的食物包装膜,可双倍延长易腐烂食物的保质期。这种保鲜膜材料源自葡萄柚籽提取物和壳聚糖,这种复合膜不仅能防止真菌和细菌生长,而且拥有类似食品包装常用的合成聚乙烯薄膜的机械强度和柔韧性。这种复合膜还能有效阻挡紫外

线,从而减缓因氧化和光化学变质反应而致的食品分解。但用这种材料来制作保鲜膜的成本要比普通聚乙烯保鲜膜高 30%。因此,未来还需展开进一步的研究,以改善这项技术。

表 1 列举了近年来应用于食品保鲜的几种可食用保鲜膜在添加了 GFSE 后机械性能的变化,并对其功能和效果进行了简要介绍。

表 1 添加有 GFSE 的可食用膜的应用研究

Table 1 Applications of edible films with grapefruit seed extract

成膜剂 Membrane agent	GFSE 最优添加浓度 Optimal concentration	随添加入膜的 GFSE 浓度的增加膜的机械性能的变化 Change in mechanical properties with increase of GFSE			应用产品 Product	研究目的 Research purpose	参考文献 Reference
		拉伸强度 Tensile strength	水蒸气渗透率 Water vapor permeability	伸长率 Longation			
石花菜、明胶	0.08%	增加	降低	降低	猪腰	抑制大肠埃希氏菌和李斯特菌,防止脂质氧化。	20
石花菜	1.2%	降低	降低	先增加后降低	-	抑制大肠埃希氏菌和李斯特菌	21
菜籽蛋白、明胶	1.0%	降低	增加	增加	草莓	抑制大肠杆菌、李斯特菌以及总好氧菌数量	16
红藻	1.0%	降低	增加	增加	奶酪、培根	抑制大肠杆菌、李斯特菌,防止脂质氧化。	22
大麦麸皮蛋白、明胶	1.0%	先增加后降低	降低	增加	三文鱼	抑制大肠杆菌、李斯特菌,防止脂质氧化。	23
柿子皮、红藻	1.0%	降低	增加	增加	-	抑制大肠杆菌、李斯特菌	24
壳聚糖	1.0%	降低	-	增加	面包	抑制真菌生长,保质期延长两倍	25
卡拉胶	6.6 g/mL	降低	增加	先增加后降低	-	抑制李斯特菌和金黄色葡萄球菌	26
琼脂	13.3 μg/mL	降低	增加	增加	-	抑制李斯特菌,蜡状芽孢杆菌和大肠杆菌	27

GFSE 具有广谱抑菌的特性,能够对大肠杆菌、沙门氏菌等致病微生物起到很好的抑制作用,因此在食品防腐保鲜方面备受研究人员的重视。Choi 等^[5]研究了 GFSE 对韩国米酒的保鲜效果。该实验将 GFSE 添加到米酒中,发现能在米酒原有感官特性下有效延长两周的货架期,且 0.1% ~ 0.2% (甘油 30%,柚皮苷 2.19%) 的 GFSE 是最佳添加浓度。试验还评估了 GFSE 对米酒中的酿造微生物和食源性病原体的抗菌活性,结果表明 GFSE 可减缓米酒发酵菌的生长,是一种有效的天然防腐剂。Jin 等^[28]研究了 GFSE 对延边黄牛肉保鲜效果的影响,Xu 等^[29]研究了 GFSE 对红地球葡萄的保鲜效果,发现 GFSE 对受试样品均能起到一定的防腐保鲜作

用,与对照相比延长了货架期,且 0.1% 的 GFSE 保鲜效果最好。但是,某些研究发现,GFSE 相较其他天然抗菌剂对某一些微生物抑菌效果不佳。Jiang 等^[30]研究了葡萄柚种子提取物、葡萄籽提取物、柠檬提取物、百里酚和茶多酚 5 种生物保鲜剂对假单胞菌和腐败希瓦氏菌的抑菌效果。结果表明,百里酚、茶多酚和葡萄籽提取物表现出较好的抑菌效果,相对而言,虽然假单胞菌、腐败希瓦氏菌对高添加量的 GFSE 表现出敏感,但对假单胞菌没有抑菌效果。因此,目前的研究新方向是将 GFSE 与其他天然抗菌剂配伍或与其他保鲜技术联合保鲜。Xu 等^[31]研究了 GFSE、乳酸链球菌素和柠檬酸对新鲜黄瓜和莴笋及其鲜切产品的抗菌效果,以三株沙门氏菌和三

株单增李斯特菌的混合菌为实验对象,GFSE 抗菌效果比单独的抗菌剂乳链菌肽或柠檬酸更好,而 GFSE 与乳酸链球菌素和柠檬酸混合抗菌剂比单独的 GFSE 抗菌效果更显著。Kim 等^[32]将 1% 的苹果酸和 0.5% 的 GFSE 作用于接种了大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌以及单增李斯特菌的莴笋上,发现苹果酸和 GFSE 联合作用比两者单独作用更有效。Lucera 等^[33]研究了百里香酚、香芹酚和 GFSE 对禽肉制品的脂质氧化和颜色稳定性的影响,结果表明,对禽肉制品的抗氧化作用是单独使用百里香酚和香芹酚时效果最好,其次是相互作用,如百里香酚和香芹酚,百里香酚和 GFSE,效果最差的是香芹酚和 GFSE 的联合使用。GFSE 还可以通过与其他防腐技术相结合来提高保鲜效果,如 Won 等^[34]开发了一款应用于温州蜜柑保鲜的 GFSE-巴西棕榈蜡(CW)涂层,实验将 GFSE(1%)-CW 涂层和 GFSE(0.5%)-牛至精油(OO,0.5%)-CW 涂层与对照相比,蜜柑表面青霉菌的发病率分别降低了(23.6±3.6)%和(25.0±5.0)%,但是 GFSE(1%)-CW 与 GFSE(0.5%)-OO(0.5%)-CW 涂层相比表现出更高的胶体稳定性,GFSE(1%)-CW 涂层在减少青霉菌发病率优于单独的 CW 涂层,且 GFSE(1%)-CW 涂层在保持果皮颜色和抗坏血酸浓度等有较好效果。Jung 等^[35]研究了 GFSE 与冰蓄冷技术结合(GFSE-ice)对棕色鳟目鱼储存效果的影响,棕色鳟目鱼在对照组中能有效储存 9~10 天,而在 GFSE-ice 组中能储存 12~13 天。

另外,GFSE 还具有抗氧化特性。Armando 等^[36]将不同量的 GFSE 粉末溶解在大豆油和菜籽油的混合物中,通过活性氧化法评估了不同温度和空气流速下 GFSE 对大豆油和菜籽油混合物的抗氧化能力。结果表明,GFSE 在低温下(66.5℃)才表现出抗氧化能力,高温条件下(75、97.8℃)则具有促氧化的效果。高温对 GFSE 的抗氧化活性有阻断作用,这是由于生育酚、抗坏血酸、柠檬酸和游离脂肪酸都含有羟基,生育酚分子可能与抗坏血酸或游离脂肪酸之间发现相互作用,形成配合物,高温则促进了氧化速率,所以推荐 GFSE 使用于室温下长时间储存的食物油脂。

目前 GFSE 在食品保鲜方面虽然作了不少的研究,但是还存在很多的问题。大多研究实验是在单一微生物存在和恒定的环境条件下进行的,还缺乏在多种微生物共同存在和多变的环境条件下的深入

研究。其次,GFSE 对果蔬的某些生理因素的影响,如呼吸,乙烯和氧化还原酶系统的变化以及是否产生负面影响没有更多的研究。

3.2 葡萄柚籽提取物在医学上的应用

葡萄柚籽提取物显示出多种生物学活性和药理作用。Liu 等^[37]采用 GFSE 长效抗菌洗剂联合长效抗菌贴治疗 II 期、III 期压疮病人,结果表明 GFSE 长效抗菌洗剂联合长效抗菌贴治疗 II 期、III 期压疮的效果优于传统 0.5% 碘伏换药方法。Oyelami^[38]用干嚼葡萄柚种子治疗尿路感染。四名尿路感染患者每八小时口服干嚼 5~6 粒干葡萄柚种子或者新鲜葡萄柚种子,两周后除了含有铜绿假单胞菌菌株的人之外,其他三名患者的尿液微生物都显示正常。Wang^[39]通过模具法造成大鼠抑郁状态,然后喂食 GFSE,与对照相比,GFSE 可使大鼠糖水消耗量增加,使抑郁大鼠的行为学指标得以改善。高、中、低剂量的 GFSE 相比,对不同指标的改善作用各有强弱,总的来看,无明显的量效关系。其抗抑郁机理可能与其升高 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)及其代谢产物的含量有关。Brorson 等^[40]研究了引起莱姆病的伯氏疏螺旋体,伯氏疏螺旋体有一个外排基因可能导致抗生素耐药性的产生。GFSE 是一种外排抑制剂,可用于增强抗菌剂的活性。当进行流动螺旋体敏感性试验时,螺旋体转化为囊肿的概率强烈依赖于 GFSE 的浓度。在 34℃ 孵育 1 小时后,GFSE 浓度为 0.165%~0.0052% 时没有发现有螺旋体转化为囊肿,GFSE 浓度在 0.00064% 时有 95% 及以上的螺旋体转化为囊肿。通过透射电镜可以观察到,在最高 GFSE 浓度下细菌和囊肿完全消失,只留下少量不典型的碎片,在 GFSE 浓度水平较低时,膜表现出疝气和破裂,并且有内容物泄漏出来。GFSE 的存在减少了螺旋体到囊肿的转化,这项研究是在体外进行的,需要进一步的研究来证明在体内的效果如何,但是,从研究结果看,检验 GFSE 和抗生素联合治疗莱姆病的假说是可能的。还有将 GFSE 添加到牙膏中,发现其对口腔炎症具有抗菌作用。此外, Lee 等^[41]还研制了一款包含有 GFSE 的可吸收抗菌手术缝合线。目前,商业化的可吸收手术缝合线是用三氯生涂布的聚乳酸凝胶制备,但最近报道其可能有致癌的潜在危害性,由于 GFSE 之前被证实是一种广谱抗菌剂,且高效无毒,因此在这项研究中用 GFSE 代替三氯生,评估了加

载有 GFSE 的 PLGA (poly (lactic-co-glycolic acid) 手术缝合线的抗菌和生物降解性能,发现其在伤口治疗上特别是内部伤口和切口上表现出极好的性能。

3.3 葡萄柚籽提取物在其他方面的应用

GFSE 还被用于农业、工业和化妆品中。

Choi^[42]研究了 GFSE 对莴笋种子的消毒和萌发影响,以及其活性成分柚皮苷、槲皮素、柠檬酸、pH 值分别对种子萌发的影响,发现柚皮苷对种子萌发没有抑制作用,但槲皮素有轻微抑制作用,柠檬酸在 0.1% 浓度下则有较强的抑制作用。0.05% 的 GFSE 对种子具有抑菌作用且对种子萌发无影响,这些结果表明 GFSE 可用作种子灭菌剂而不影响种子萌发或幼苗生长。

Woo 等^[43]研究了 GFSE 对空气过滤器上的生物气溶胶的抑菌效果,并与蜂胶进行了比较。空气过滤器在加热、通风的过程中容易积聚生物气溶胶,生物气溶胶可能包含有病毒、细菌、真菌等有害物质,并且过滤器上存在足够的水分和营养物质提供有害物质生存,为了灭活这种微生物的积累并尽可能减少可再生的生物气溶胶的再次夹带,空气过滤器的抑菌处理是很有必要的。试验的生物气溶胶研究了金黄色葡萄球菌,并将其沉积在空气过滤器上,通过喷洒各种面密度的 GFSE 和蜂胶,以评估带有这种生物气溶胶的空气过滤器上的细菌失活性能,可以得出结论,GFSE 处理过的空气过滤器比蜂胶处理的过滤器更有效,而且 GFSE 更经济。

GFSE 还可用于纺织品中,Alonso 等^[44]制备了一种抗菌留香的纺织品,实验过程中先将纤维素进行紫外线照射,然后壳聚糖与 GFSE 的混合液官能化,基于壳聚糖的包封有 GFSE 的微胶囊就简单可行地接枝到了纤维素纺织品上,其中使用的包封剂无毒并且可生物降解。该款新型材料容易获得持久的香味(GFSE 的特殊香味能够保留六个月时间)和较强的抗菌性能。

最近有公司开发出含有葡萄柚籽提取物的个人护理产品,该产品由 60% 的葡萄柚籽提取物和 40% 的蔬菜甘油组成。呈粘稠液体,柠檬黄,有淡淡柑橘香气,当稀释度到 2% 时其无毒无刺激性。除此之外,GFSE 还可用于保湿霜,精华素,面部化妆水,液体肥皂和护发产品等^[45]。

4 展望

随着我国葡萄柚产量稳步增加,除鲜食外,大量的果皮、种子、残次果成为提取生理活性物质和研制

加工产品的丰富来源,但国内对葡萄柚的关注较少,鲜少有相关研究报道。总的来说,国外对葡萄柚提取物的抑菌作用及应用已经作了较为深入广泛的研究,但还是存在一些待解决的问题:

4.1 对 GFSE 抑菌成分及其抑菌机理的研究不深入,大多是体外研究,体内研究几乎没有。

4.2 不同研究者使用不同提取方式获得的 GFSE,甚至会得到截然相反的结论。

4.3 GFSE 与其他抗菌剂的复配研究,大多没有从药理学角度进一步证实相互之间的关系。

4.4 GFSE 在医学方面的应用研究还停留在细胞生物学水平,对相关作用机制未有更深入的研究。

参考文献

- 1 Yao YC, et al. Effect of grapefruit it seed extract on preserving quality and microbial flora of rice wine [J]. Farm Prod Process (农产品加工), 2016, 7: 30-38.
- 2 Lu GY, et al. Determination of the main component changes in tea polyphenol after decoction with grapefruit seed extract by HPLC [J]. China Continuing Med Educ (中国继续医学教育), 2016, 7: 152-153.
- 3 Xu WT, et al. Physiological and biochemical responses of grapefruit seed extract dip on 'Redglobe' grape [J], Food Sci Technol, 2009, 42: 471-476.
- 4 Aloui H, et al. Alginate coatings containing grapefruit essential oil or grapefruit seed extract for grapes preservation [J]. Int J Food Sci Technol, 2014, 49: 952-959.
- 5 Choi JS, et al. Antibacterial effect of grapefruit seed extract (GSE) on makgeolli-brewing microorganisms and its application in the preservation of fresh makgeolli [J]. J Food Sci, 2014, 79: 1159-1167.
- 6 Heggors JP, et al. The effectiveness of processed grapefruit-seed extract as an antibacterial agent: II. mechanism of action and *in vitro* toxicity [J]. J Altern Complem Med, 2002, 8: 333-340.
- 7 Reagor L, et al. The effectiveness of processed grapefruit-seed extract as an antibacterial agent: I. an *in vitro* agar assay [J]. J Altern Complem Med, 2002, 8: 325-332.
- 8 Cvetnic Z, et al. Antimicrobial activity of grapefruit seed and pulp ethanolic extract [J]. Acta Pharm, 2004, 54: 243-250.
- 9 Al-ani WN, et al. Antimicrobial activity of grapefruit seeds extracts (*in vitro* study) [J] Al-Rafidain Dent J, 2011 11: 341-345.
- 10 Adeneye AA. Haematopoietic effect of methanol seed extract of *Citrus paradisi* macfad (grapefruit) in wistar rats [J]. Biomed Res, 2008, 19(1): 23-26.

- 11 Miller EV, et al. Physiological studies of the seeds of grapefruit (*Citrus paradisi*, macfad) [J]. Food Rest, 1949, 14:492-498.
- 12 Sundheim G, et al. Natural and acquired resistance of bacteria associated with food processing environments to disinfectant containing an extract from grapefruit seeds [J]. Int Biodeterior Biodegrad, 1995:441-448.
- 13 Ionescu G, et al. 1991. Oral citrus seed extract. [J]. Orthomol Med 1991, 5:228-230.
- 14 Zhang N, et al. Preliminary study on mechanism of GSE-induced apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Food Sci (食品科学), 2010;31:137-140.
- 15 Bof MJ, et al. Grapefruit seed extract and lemon essential oils as active agents in corn starch-chitosan blend films [J/OL]. Food Bioprocess Technol, 2013.
- 16 Jang SA, et al. Effect of rapeseed protein-gelatin film containing grapefruit seed extract on 'Maehyang' strawberry quality [J]. Int J Food Sci Technol, 2011, 46:620-625.
- 17 Ma QQ, et al. Recent advances in functional edible coating film and its applications in preservation of fresh meat and meat products [J]. Food Sci (食品科学), 2012, 33:331-335.
- 18 Tong T. Singapore: Preparation of grapefruit seed extract to improve the preservation [J]. China Fruit News (中国果业信息), 2016, 33(3):43.
- 19 Anon. Singapore: development of environmental packaging materials to improve the preservation [J]. J Chin Inst Food Sci Technol (中国食品学报), 2016, 2:180.
- 20 Hong YH, et al. Physical properties of *Gelidium corneum*-gelatin blend films containing grapefruit seed extract or green tea extract and its application in the packaging of pork loins [J]. J Food Sci, 2009, 74(1):6-10.
- 21 Lim GO, et al. Physical and antimicrobial properties of *Gelidium corneum*/nano-clay composite film containing grapefruit seed extract or thymol [J]. J Food Eng, 2010, 98:415-420.
- 22 Shin YJ, et al. Preparation of red algae film containing grapefruit seed extract and application for the packaging of cheese and bacon [J]. Food Sci Biotechnol, 2012, 21:225-231.
- 23 Song HY, et al. Preparation of a barley bran protein-gelatin composite film containing grapefruit seed extract and its application in salmon packaging [J]. J Food Eng, 2012, 113:541-547.
- 24 Jo WS, et al. Physical properties and antimicrobial activities of a persimmon peel/red algae composite film containing grapefruit seed extract [J]. Food Sci Biotechnol, 2014, 23:1169-1172.
- 25 Tan YM, et al. Functional chitosan-based grapefruit seed extract composite films for applications in food packaging technology [J]. Mater Res Bull, 2014, 7853:1-5.
- 26 Kanmani P, et al. Development and characterization of carrageenan/grapefruit seed extract composite films for active packaging [J]. Int J Biol Macromol, 2014, 4335:1-9.
- 27 Kanmani P, et al. Antimicrobial and physical-mechanical properties of agar-based films incorporated with grapefruit seed extract [J]. Carbohydr Polym, 2014, 102:708-716.
- 28 Jin HL, et al. Effect of grapefruit seed extract in preserving meat quality of yanbian yellow cattle [J]. Meat Research (肉类研究), 2013, 27(6):29-32.
- 29 Xu WT, et al. Study on application of grapefruit seed extract in red globe grape preservation [J]. Storage Process (保鲜与加工), 2007, 7(2):14-16.
- 30 Jiang HL, et al. Comparative antibacterial effects and mechanisms of biological preservatives against fish spoilage organisms [J]. Food Sci (食品科学), 2012, 33(23):31-35.
- 31 Xu WT, et al. Antibacterial effect of grapefruit seed extract on food-borne pathogens and its application in the preservation of minimally processed vegetables [J]. Postharvest Biol Tec, 2007, 45:126-133.
- 32 Kim JH, et al. Effects of malic acid or/and grapefruit seed extract for the inactivation of common food pathogens on fresh-cut lettuce [J]. Food Sci Biotechnol, 2016, 25:1801-1804.
- 33 Lucera A, et al. Combined effects of thymol, carvacrol and grapefruit seed extract on lipid oxidation and colour stability of poultry meat preparations [J]. Int J Food sci technol, 2009, 44:2256-2267.
- 34 Won MY, et al. Coating *Satsuma mandarin* using grapefruit seed extract-incorporated carnauba wax for its preservation [J/OL]. Food Sci Biotechnol, 2018, 27:1649-1658.
- 35 Jung S, et al. Effects of slightly acidic electrolyzed water ice and grapefruit seed extract ice on shelf life of brown sole (*Pleuronectes herzensteini*) [J]. Food Sci Biotechnol, 2018, 27:261-267.
- 36 Armando C, et al. Antioxidant activity of grapefruit seed extract on vegetable oils [J]. J Sci Food Agric, 1998, 77:463-467.
- 37 Liu ML, et al. GSE long-acting antibacterial lotions and film cure II、III patients phase of pressure ulcers [J]. Chin Gen Nursing (全科护理), 2011, 9:614-615.
- 38 Oyelami OA, et al. The effectiveness of grapefruit (*Citrus paradisi*) seeds in treating urinary tract infections [J]. J Altern Complem Med, 2005, 11:369-371.