

柚皮挥发油化学成分及对灰葡萄孢菌的抑菌活性

叶肖辰皓¹,姜珊珊²,焉炳飞^{1*},叶敏^{2*}

¹烟台大学化学化工学院,烟台 264005;²云南农业大学植物保护学院,昆明 650201

摘要:为探讨柚皮挥发油用于果蔬采后抑菌防腐的可能性,本研究以水蒸气蒸馏法提取柚皮挥发油,利用菌丝生长速率法测定了挥发油及其主要化学成分对灰葡萄孢菌的接触和熏蒸抑菌活性。研究结果表明,用水蒸气蒸馏法提取10 h柚皮挥发油的得率为0.32% (w/w),挥发油密度为0.66 g/cm³。通过气质联用分析发现柚皮挥发油中有8种主要化学成分,其中柠檬烯含量最高,其次是月桂烯和香柏酮。挥发油及柠檬烯和月桂烯的熏蒸抑菌活性显著高于相同剂量的接触抑菌活性,且柠檬烯的活性显著高于相同剂量的挥发油和月桂烯。由于柚皮挥发油对灰葡萄孢菌有显著的抑制作用,有必要进一步研究将其用于防治灰葡萄孢菌所致果蔬采后病害的可行性。

关键词:柚皮;挥发油;化学成分;抑菌活性;灰葡萄孢菌

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)1-0047-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.1.007

Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Citrus maxima* against *Botrytis cinerea*

YEXIAO Chen-hao¹, JIANG Shan-shan², YAN Bin-fei^{1*}, YE Min^{2*}

¹College of Chemistry and Chemical Engineering, Yantai University, Yantai 264005, China;

²School of Crop Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

Abstract: In order to explore the possibility of essential oil from *Citrus maxima* used to control diseases of postharvest, essential oil was extracted from *Citrus maxima* peel through hydro-distillation. The antifungal activity of the essential oil against *Botrytis cinerea* was determined by the poison food technique and the volatile activity assay. The results showed that yield of the essential oil was about 0.32% (w/w) for 10 h extraction and density of the essential oil was 0.66 g/cm³. Eight different compositions in the essential oil were identified by using GC-MS. The major components in the essential oil detected were limonene, myrcene and nootkatone, respectively. Comparing with the poison food technique the essential oil and its two main constituents, limonene and myrcene, showed better antifungal activity against *B. cinerea* in volatile activity. Antifungal activity of limonene was significant higher than the essential oil and myrcene did at same concentration. It is necessary to explore the possibility of *Citrus maxima* peel essential oil used in practice of postharvest disease control because of its significant antifungal activity.

Key words: *Citrus maxima* peel; essential oil; chemical composition; antifungal activity; *Botrytis cinerea*

水果和蔬菜富含维生素、无机盐和植物纤维,是人体所需维生素、矿物质和膳食纤维的重要来源,也是仅次于粮食的主要农产品^[1]。新鲜果蔬在贮运过程中常常会因植物病原菌侵染而发生病变腐烂,造成巨大的经济损失和资源浪费^[2]。灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)是一种导致草莓、番茄等果蔬采后

发生灰霉病的重要植物病原真菌^[3]。长期以来,国内外防治果蔬采后灰霉病的主要方法是使用人工合成的化学杀菌剂,其中常用的化学杀菌剂有噻菌灵(triabendazole)、甲基硫菌灵(thiophanate-methyl)、异菌脲(iprodione)等^[4]。然而,已有足够的证据显示,化学杀菌剂长期用于果蔬采后抑菌防腐不仅对人体健康造成较大危害,同时也增大了致病微生物产生抗性的潜在风险^[5]。大量研究结果表明,某些植物的挥发油(essential oils)能够有效控制果蔬的采后病害,从而降低因使用化学杀菌剂造成的食品

安全风险^[6]。

柚(*Citrus maxima*)是芸香科柑橘属乔木的果实,属于芳香类水果,主要分布于东南亚及我国的长江以南地区。我国是世界上名列第二的柚子种植大国,柚子的种植面积和产量仅次于美国^[7]。柚皮占柚子重量的三分之一,食用或加工后产生的大量柚皮不仅污染环境,而且是一种资源浪费^[8]。有报道称柚皮提取物对多种植物病原菌有显著的抑菌活性^[9],为了更好地开发和利用柚皮这一天然的抑菌物质资源,本研究以果蔬采后重要致病真菌灰葡萄孢菌作为供试靶标,对柚皮挥发油的抑菌活性进行研究,探讨将柚皮挥发油用于果蔬采后抑菌防腐的可能性。

1 仪器与材料

1.1 主要仪器

气相色谱仪(Agilent 7890B 具 FID 检测器,美国 Agilent 公司);气相色谱-质谱联用仪(Agilent 7890A/5975,美国 Agilent 公司);HP-5MS 石英毛细管柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm,美国 J&W Scientific 公司);电子分析天平(AL-104 型,瑞士 Mettler Toledo 仪器有限公司);旋转蒸发仪(Buchi R-114,瑞士 Buchi 公司);低温冷却循环泵(DLS-5L/25,巩义市予华仪器有限责任公司);超声波清洗器(SK8210LHC,上海科导超声仪器有限公司);智能光照培养箱(MGC-300A,上海一恒科技有限公司);电热套;水蒸汽蒸馏装置;微量进样器等。

1.2 试剂

正十三烷、正十六烷、正十八烷(色谱纯,美国 Sigma-Aldrich 公司);柠檬烯(美国 Sigma-Aldrich 公司,含量 95%)、月桂烯(美国 Sigma-Aldrich 公司,含量 94%);正己烷(分析纯,天津化学试剂有限公司);高纯氮气(纯度 99.999%,昆明梅赛尔气体有限公司);葡萄糖(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);琼脂粉(分析纯,北京索莱宝科技有限公司)。

1.4 实验材料

实验用柚子为福建平和产琯溪蜜柚,购自昆明市农贸市场,取新鲜柚子将皮剥下备用。本研究使用的灰葡萄孢菌菌种,为云南农业大学云南生物资源保护与利用国家重点实验室保藏菌种。

2 实验方法

2.1 柚皮挥发油提取及密度测定

采用水蒸气同时蒸馏萃取法提取柚皮挥发油。

现有研究结果表明^[10,11],采用水蒸气蒸馏提取植物挥发油,植物材料与水的料液比大多采用 1:3 或 1:4 本研究采用 1:3。准确称取新鲜柚皮 200 g 于提取瓶中,加入 600 mL 蒸馏水,摇匀。将 200 mL 正己烷装入溶剂瓶中,分别加热至沸腾,自水和溶剂回流正常开始计时,提取时间为 6、8、10 和 12 h,提取完成后正己烷经无水 NaSO₄ 脱水过滤,滤液在 40 ℃ 下减压除去溶剂得到柚皮挥发油,每个实验重复 3 次,依据 3 次重复的结果计算平均得率。

准确移取柚皮挥发油 1.0 mL 于干燥的称量瓶中称重(精确至 0.001 g),计算挥发油的密度(g/cm³)。

2.2 柚皮挥发油化学成分的 GC-FID 分析

色谱柱:HP-5MS 石英毛细管柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm,美国 J&W Scientific 公司);柱箱温度:初温 40 ℃,保持 2 min,以 5 ℃/min 升至 250 ℃,保持 6 min;进样口温度:230 ℃;检测器温度 260 ℃;载气为高纯氦气(纯度 99.999%),流量 1.0 mL/min;燃气为氢气(纯度 99.9%),流量:60 mL/min;助燃气为无水空气,流量:400 mL/min;进样分流比 10:1;进样量 1.0 μL,样品浓度 1.0 mg/mL(溶剂为正己烷)。

2.3 柚皮挥发油化学成分的 GC-MS 分析

2.3.1 气相色谱条件

色谱柱:HP-5MS 石英毛细管柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm);柱箱温度:初温 40 ℃,保持 2 min,以 5 ℃/min 升至 250 ℃,保持 6 min;进样口温度:230 ℃;载气为高纯氦气(纯度 99.999%),流量 1.0 mL/min;分流比 10:1,进样量 1.0 μL,样品浓度 1.0 mg/mL(溶剂为正己烷)。

2.3.2 质谱条件

EI 离子源,电离能量:70 eV,扫描范围:50 ~ 550 amu,四极杆温度:150 ℃,离子源温度:230 ℃,接口温度:280 ℃,EM 电压:1 450 V,溶剂延迟:6 min。

2.4 柚皮挥发油及其主要单体化合物抑菌活性测定

2.4.1 培养基的制备

本研究使用马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基(马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,水 1 000 mL),高压湿热灭菌(121 ℃,30 min)后备用。

2.4.2 挥发油及其主要单体化合物接触抑菌活性测定

本研究采用 Gogolous 等^[12]的菌丝生长速率法,

测定柚皮挥发油及其主要单体化合物的抑菌活性。将柚皮挥发油及其主要单体化合物用适量丙酮溶解,加入与丙酮等量的 Tween-80 摆匀后用灭菌蒸馏水配制系列预浓度的挥发油乳浊液,待 PDA 培养基冷却至 45 ℃时,将挥发油乳浊液加至培养基中(挥发油乳浊液体积与培养基体积比为 1:9),充分混匀后移入直径为 9 cm 的培养皿制成含挥发油及其主要单体化合物 62.5、125、250、500、1 000、2 000 μg/mL 的 PDA 含药平板,空白对照培养基加入与处理培养基等量的丙酮和 Tween-80。

在经 7 天预培养的病原菌菌落边沿用内径 5 mm 打孔器制取菌饼后将菌丝面分别接种到含药及对照(含等量溶剂和 Tween-80)的 PDA 培养基平板中心,于 25 ℃下黑暗培养 1、2、3、4、5 和 6 天后用十字交叉法分别测量各处理的菌落直径并计算其平均值,依据下列公式计算各处理对病原菌菌丝的生长抑制率,每处理重复 3 次。

2.4.3 挥发油及其主要单体化合物熏蒸抑菌活性测定

采用 Chutia 等^[13]的培养皿对扣熏蒸法,测定柚皮挥发油及其主要单体化合物的抑菌活性。在经 7 天预培养的病原菌菌落边沿用内径 5mm 打孔器制取菌饼后将菌丝面接种到 PDA 培养基平板中心。在直径 40 mm 的无菌滤纸片上用微量进样器分别准确滴加浓度为 62.5、125、250、500、1 000、2 000 μg/mL 的柚皮挥发油及其主要单体化合物(浓度按培养皿对扣的净空体积折算)并置于培养皿盖中,将接种后的 PDA 培养基平板倒扣在培养皿盖上用帕拉膜(Parafilm)密封后 25 ℃下黑暗培养,接种后 1、2、3、4、5 和 6 天后用十字交叉法分别测量各处理的菌落直径并计算其平均值,依据上列公式计算各处理的菌丝生长抑制率,每个处理重复 3 次。

2.5 数据分析

用 SPSS17.0 数据处理软件对实验数据,结合 Student-Newman-Keuls 检验进行单向 ANOVA 分析,评价处理间的差异显著性和重复间的离散度。

3 结果与分析

3.1 柚皮挥发油提取时间与得率

水蒸气蒸馏不同时间提取柚皮挥发油得率和物理性状结果,如表 1 所示。

试验结果表明,用水蒸气同时蒸馏萃取法提取柚皮挥发油的最佳提取时间为 10 h,得率为 0.32% (w/w),柚皮挥发油密度为 0.66 g/cm³。

表 1 不同时间提取柚皮挥发油得率

Table 1 Yield of the essential oil from peel of *C. maxima* with different extraction time

提取时间 Extraction time (h)	得率 Yield (% , w/w)
6	0.12 ± 0.02
8	0.17 ± 0.02
10	0.32 ± 0.02
12	0.33 ± 0.02

注:得率为均值 ± 标准差。

Note: Values are mean ± standard deviation (n=3).

3.2 柚皮挥发油化学成分分析

3.2.1 柚皮挥发油化学成分的 GC-MS 和 GC-FID 分析

GC-MS 分析结果表明,柚皮挥发油中共有 8 个主要化学成分,占挥发油总量的 99.8%,柚皮挥发油化学成分的总离子流图,详见图 1。

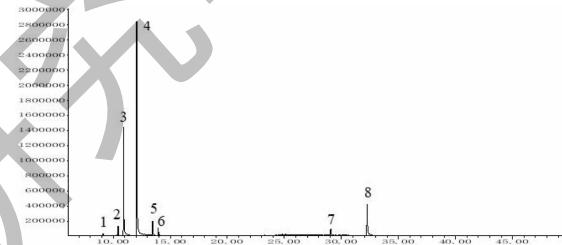


图 1 柚皮挥发油 GC-MS 分析的总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram of essential oil from *C. maxima* peel

通过 NIST08 质谱库检索并结合 GC-FID 保留指数测定鉴定了柚皮挥发油中 8 个主要成分的化学结构,柚皮挥发油中所含的 8 个主要成分的质谱图,如图 2 所示;主要碎片离子数据,如表 2 所示。在 GC-MS 分析同等的色谱分离条件下,以正十三烷(n-octane)、正十六烷(n-hexadecane)和正十八烷(n-octadecane)为基准物质进行柚皮挥发油的 GC-FID 分析,按 8 种主要化学成分的保留时间,计算其保留指数。经与相关文献^[14-16]中挥发性化学成分的 GC-FID 保留指数比对,柚皮挥发油中 8 中化学成分的保留指数分别与相同或相近气相色谱分析条件下 3-methyl-apopinene、α-蒎烯(α-pinene)、月桂烯(myrcene)、柠檬烯(limonene)、α-methyl-α-[4-methyl-3-pentenyl] oxiranemethanol、氧化芳樟醇(linalool oxide)、蓝桉醇(globulol)和香柏酮(nootkatone)的保留指数相吻合。挥发油中各个组分的相对含量依据 GC-FID 的分析结果,采用归一化法按峰面积大小进

行定量。柚皮挥发油 GC-MS 分析和 GC-FID 保留指

数测定的结果,如表 3 所示。

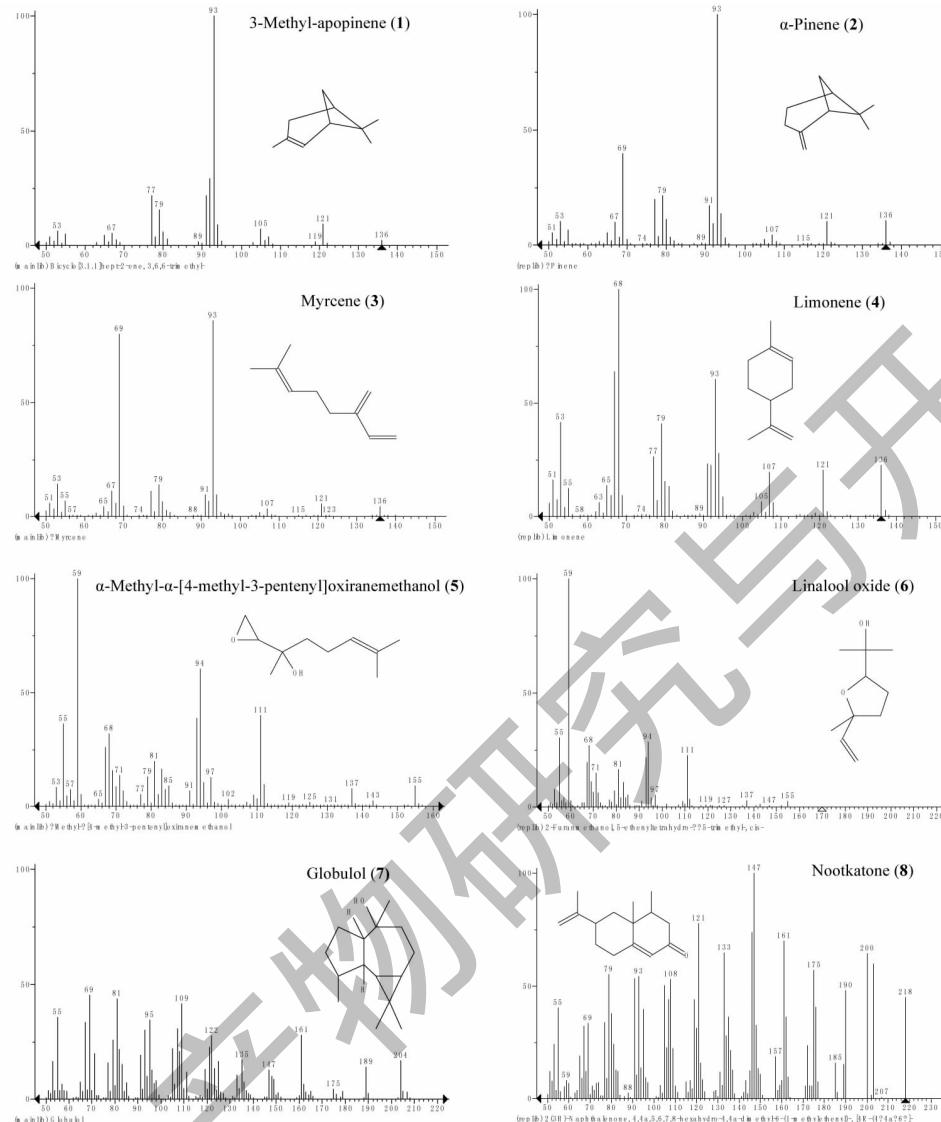


图 2 柚皮挥发油主要成分的质谱图

Fig. 2 Mass spectra of main chemical compositions in essential oil from *C. maxima* peel.

表 2 柚皮挥发油主要成分的主要碎片离子数据

Table 2 Main fragment ions of main chemical compositions in essential oil from *C. maxima* peel

峰号 Peak No.	化合物 Compound	主要碎片离子 Main fragment ion [m/z (%)]
1	3-Methyl-apopinene	93 (99.9); 92 (28.8); 77 (21.6); 91 (21.5); 79 (15.2); 41 (13.2); 39 (10.8); 121 (9.0); 94 (8.7); 27 (7.3)
2	α-Pinene	93 (99.9); 41 (50.8); 69 (39.6); 79 (21.2); 39 (20.3); 77 (19.6); 27 (17.8); 91 (16.8); 94 (13.4); 80 (11.0)
3	Myrcene	41 (99.9); 93 (85.5); 69 (79.6); 39 (29.9); 27 (28.0); 53 (14.1); 79 (13.8); 77 (11.0); 67 (11.0); 91 (9.5)
4	Limonene	68 (99.9); 67 (63.7); 93 (60.3); 39 (57.8); 41 (46.3); 53 (41.4); 79 (40.7); 27 (39.7); 94 (27.8); 77 (26.1)

续表2(Continued Tab. 2)

峰号 Peak No.	化合物 Compound	主要碎片离子 Main fragment ion [m/z (%)]
5	α -Methyl- α -[4-methyl-3-pentenyl] oxiranemethanol	59 (99.9); 94 (60.3); 43 (52.7); 111 (39.8); 93 (38.5); 55 (36.2); 68 (31.8); 67 (25.8); 41 (25.6); 81 (19.6)
6	Linalool oxide	59 (99.9); 43 (66.4); 55 (30.2); 94 (28.3); 68 (26.9); 41 (26.2); 111 (22.6); 93 (21.5); 67 (19.2); 81 (16.3)
7	Globulol	43 (99.9); 41 (62.3); 69 (45.2); 81 (43.5); 109 (41.2); 55 (35.4); 95 (34.2); 67 (33.3); 107 (30.6); 93 (30.0)
8	Nootkatone	147 (99.9); 121 (77.4); 146 (73.5); 161 (69.9); 41 (68.4); 133 (64.5); 200 (64.2); 203 (59.7); 175 (56.7); 79 (54.8)

表3 柚皮挥发油的主要化学成分

Table 3 Main chemical compositions of essential oil from *C. maxima* peel

峰号 Peak No.	化合物 Compound	保留时间 <i>t_R</i> (min)	保留指数 RI	相对含量 Relative amount (%)
1	3-Methyl-apopinene	9.11	948	0.23
2	α -Pinene	10.44	987	1.16
3	Myrcene	10.91	995	14.64
4	Limonene	12.08	1048	73.68
5	α -Methyl- α -[4-methyl-3-pentenyl] oxiranemethanol	13.46	1078	2.12
6	Linalool oxide	13.95	1086	1.16
7	Globulol	29.06	1569	0.87
8	Nootkatone	32.24	1783	5.94

表4 接种后不同时间柚皮挥发油对灰葡萄孢菌的接触抑菌活性

Table 4 Antifungal activity of essential oil from *C. maxima* peel against *B. cinerea* with different contact times

浓度 Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	菌丝生长抑制率 Mycelial growth inhibition (%)					
	1 天	2 天	3 天	4 天	5 天	6 天
62.5	0.00 \pm 0.00 ^a	12.04 \pm 5.71 ^b	2.51 \pm 2.20 ^a	1.15 \pm 1.99 ^a	0.43 \pm 0.00 ^a	1.05 \pm 0.61 ^{ab}
125	1.52 \pm 2.62 ^a	23.74 \pm 5.88 ^b	11.80 \pm 3.94 ^b	4.46 \pm 3.12 ^{ab}	1.57 \pm 1.30 ^a	1.16 \pm 0.19 ^{ab}
250	0.00 \pm 0.00 ^a	21.45 \pm 4.89 ^b	14.93 \pm 3.14 ^b	5.63 \pm 2.82 ^{ab}	2.71 \pm 1.48 ^a	1.63 \pm 0.87 ^{ab}
500	4.62 \pm 4.55 ^a	40.23 \pm 4.49 ^c	21.17 \pm 1.02 ^c	10.35 \pm 1.56 ^b	8.86 \pm 1.29 ^b	5.59 \pm 0.92 ^b
1 000	4.62 \pm 4.55 ^a	58.57 \pm 13.44 ^d	35.48 \pm 7.42 ^d	22.98 \pm 8.54 ^c	20.02 \pm 5.30 ^c	13.40 \pm 0.57 ^c
2 000	3.10 \pm 2.69 ^a	80.74 \pm 2.24 ^e	55.34 \pm 1.57 ^e	37.74 \pm 1.92 ^d	30.89 \pm 0.96 ^d	29.02 \pm 0.74 ^d
CK	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a

注: 菌丝生长抑制率数值之后为 \pm 标准差(三次重复); 同列平均值后的字母不同表示经 S-N-K 检验在 $P = 0.05$ 水平上差异显著。

Note: Values are mean \pm standard deviation ($n = 3$); Means in the same column followed by the different letter were significant different according to S-N-K test at $P = 0.05$.

3.3 柚皮挥发油的抑菌活性

3.3.1 柚皮挥发油的接触抑菌活性

接种后不同时间柚皮挥发油对灰葡萄孢菌的接触抑菌活性实验结果, 如表 4 所示。

试验结果表明, 柚皮挥发油对灰葡萄孢菌的接触抑菌活性与处理剂量成正相关, 接种第 2 天后与

时间成负相关, 结果见表 4。总体来看柚皮挥发油对灰葡萄孢菌的接触抑菌活性较低, 活性最高值为接种后第 2 天的 2 000 $\mu\text{g/mL}$ 处理, 对菌丝生长的抑制率为 80.74%, 其余处理的活性均低于 60%。接种第 4 天后 250 $\mu\text{g/mL}$ 及以下处理的抑菌活性与空白对照相比在 $P < 0.05$ 水平上无显著差异。

3.3.2 柚皮挥发油的熏蒸抑菌活性

蒸抑菌活性实验结果,如表5所示。

接种后不同时间柚皮挥发油对灰葡萄孢菌的熏

表5 接种后不同时间柚皮挥发油对灰葡萄孢菌的熏蒸抑菌活性

Table 5 Antifungal activity of essential oil vapour from *C. maxima* peel against *B. cinerea* with different exposure times

浓度 Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	菌丝生长抑制率 Mycelial growth inhibition (%)					
	1天	2天	3天	4天	5天	6天
62.5	24.89 \pm 7.98 ^b	11.15 \pm 3.53 ^b	3.64 \pm 1.19 ^{ab}	3.29 \pm 1.37 ^a	7.83 \pm 1.97 ^b	1.29 \pm 0.86 ^a
125	32.42 \pm 11.58 ^b	16.44 \pm 4.97 ^b	8.89 \pm 3.66 ^b	4.49 \pm 1.57 ^a	5.68 \pm 2.10 ^b	6.28 \pm 1.28 ^b
250	75.96 \pm 3.05 ^c	46.41 \pm 5.33 ^c	29.54 \pm 3.56 ^c	19.17 \pm 2.68 ^b	16.36 \pm 1.48 ^c	9.68 \pm 2.79 ^b
500	91.81 \pm 1.16 ^d	67.57 \pm 5.69 ^d	45.72 \pm 6.58 ^d	34.74 \pm 4.25 ^c	29.36 \pm 3.88 ^d	22.52 \pm 2.70 ^c
1 000	100 \pm 0.00 ^d	97.64 \pm 2.73 ^e	85.83 \pm 3.06 ^e	72.47 \pm 3.49 ^d	62.34 \pm 3.38 ^e	49.46 \pm 3.15 ^d
2 000	100 \pm 0.00 ^d	100 \pm 0.00 ^e	100.00 \pm 0.00 ^f	100.00 \pm 0.00 ^e	100.00 \pm 0.00 ^f	100.00 \pm 0.00 ^e
CK	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a

注:菌丝生长抑制率数值之后为 \pm 标准差(三次重复);同列平均值后的字母不同表示经 S-N-K 检验在 $P = 0.05$ 水平上差异显著。下同。

Note: Values are mean \pm standard deviation ($n = 3$); Means in the same column followed by the different letter were significant different according to S-N-K test at $P = 0.05$. The same as below.

试验结果表明,柚皮挥发油对灰葡萄孢菌的熏蒸抑菌活性与处理剂量成正相关,接种第2天后与时间成负相关,结果见表5。总体来看当柚皮挥发油浓度在低于500 $\mu\text{g/mL}$ 时抑菌活性不突出,对菌丝生长的抑制率大部分均低于50%,但1 000 $\mu\text{g/mL}$ 及以上浓度处理则表现出较好的抑菌活性,2 000 $\mu\text{g/mL}$ 处理在接种后不同时间对菌丝生长的抑制率均为100.00%,与其它各处理在 $P < 0.05$ 水平上均差异显著。

3.4 柚皮挥发油中主要单体化合物抑菌活性

柚皮挥发油中两种相对含量较高的化学成分是柠檬烯(73.68%)和月桂烯(14.64%),为明确这两种主要成分的抑菌活性,进行了柠檬烯和月桂烯对灰葡萄孢菌的接触抑菌活性和熏蒸活性的测定。

3.4.1 柠檬烯的接触抑菌活性

接种后不同时间柠檬烯对灰葡萄孢菌的接触抑菌活性实验结果,如表6所示。

表6 接种后不同时间柠檬烯对灰葡萄孢菌的接触抑菌活性

Table 6 Antifungal activity of limonene against *B. cinerea* with different contact times

浓度 Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	菌丝生长抑制率 Mycelial growth inhibition (%)					
	1天	2天	3天	4天	5天	6天
62.5	0.00 \pm 0.00 ^a	3.37 \pm 3.33 ^a	4.21 \pm 3.30 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a	0.71 \pm 1.23 ^{ab}	0.23 \pm 0.40 ^a
125	1.52 \pm 2.62 ^a	8.52 \pm 5.94 ^a	11.80 \pm 3.94 ^b	0.97 \pm 1.22 ^a	1.28 \pm 1.48 ^{ab}	2.79 \pm 2.10 ^{ab}
250	0.00 \pm 0.00 ^a	25.14 \pm 10.15 ^b	14.93 \pm 3.14 ^b	3.89 \pm 2.13 ^a	2.14 \pm 1.54 ^{ab}	2.90 \pm 2.02 ^{ab}
500	4.62 \pm 4.55 ^a	28.59 \pm 4.60 ^b	17.51 \pm 1.99 ^{bc}	7.63 \pm 1.55 ^b	6.15 \pm 4.35 ^{bc}	4.77 \pm 0.98 ^b
1 000	4.62 \pm 4.55 ^a	37.07 \pm 5.51 ^b	22.07 \pm 2.73 ^c	10.78 \pm 1.45 ^b	8.43 \pm 2.53 ^c	5.13 \pm 0.41 ^b
2 000	3.10 \pm 2.69 ^a	54.11 \pm 6.48 ^c	41.18 \pm 3.63 ^d	31.25 \pm 4.20 ^c	25.76 \pm 2.71 ^d	23.54 \pm 1.02 ^c
CK	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a

试验结果表明,柠檬烯对灰葡萄孢菌的接触抑菌活性与处理剂量成正相关,接种第2天后与时间成负相关,结果见表6。总体来看柠檬烯对灰葡萄孢菌的接触抑菌活性较低,活性最高的为接种后第2天的2 000 $\mu\text{g/mL}$ 处理,其对菌丝生长的抑制率也仅为54.11%,其余各处理的抑菌活性均低于50%。125 $\mu\text{g/mL}$ 及以下处理的抑菌活性与空白对

照相比,在 $P < 0.05$ 水平上无显著差异。

3.4.2 柠檬烯的熏蒸抑菌活性

接种后不同时间柠檬烯对灰葡萄孢菌的熏蒸抑菌活性实验结果,如表7所示。

试验结果表明,柠檬烯对灰葡萄孢菌的熏蒸抑菌活性与处理剂量成正相关,接种第2天后与时间成负相关,结果见表7。总体来看当柠檬烯浓度在

表 7 接种后不同时间柠檬烯对灰葡萄孢菌的熏蒸抑菌活性

Table 7 Antifungal activity of limonenevapour against *B. cinerea* with different exposure times

浓度 Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	菌丝生长抑制率 Mycelial growth inhibition (%)					
	1 天	2 天	3 天	4 天	5 天	6 天
62.5	61.20 \pm 2.29 ^b	17.41 \pm 8.12 ^b	9.97 \pm 4.90 ^b	4.70 \pm 3.10 ^a	2.16 \pm 1.90 ^a	0.41 \pm 0.71 ^a
125	70.71 \pm 4.86 ^c	28.87 \pm 5.92 ^c	20.77 \pm 5.74 ^c	13.81 \pm 4.83 ^b	8.90 \pm 4.18 ^b	3.30 \pm 4.67 ^a
250	87.69 \pm 1.96 ^d	45.80 \pm 4.44 ^d	29.63 \pm 2.92 ^d	23.05 \pm 4.90 ^c	14.21 \pm 3.92 ^b	8.51 \pm 2.53 ^b
500	96.55 \pm 0.12 ^e	85.57 \pm 5.28 ^e	59.04 \pm 6.81 ^e	45.85 \pm 6.31 ^d	34.22 \pm 4.18 ^c	25.53 \pm 3.02 ^c
1 000	100.00 \pm 0.00 ^e	100.00 \pm 0.00 ^f	97.41 \pm 1.90 ^f	85.63 \pm 4.31 ^e	71.54 \pm 5.18 ^d	60.57 \pm 4.84 ^d
2 000	100.00 \pm 0.00 ^e	100.00 \pm 0.00 ^f	100.00 \pm 0.00 ^f	100.00 \pm 0.00 ^f	100.00 \pm 0.00 ^e	100.00 \pm 0.00 ^e
CK	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a

低于 500 $\mu\text{g/mL}$ 时抑菌活性较低, 对菌丝生长的抑制率大多低于 50%。1 000 $\mu\text{g/mL}$ 及以上浓度处理则表现出较好的抑菌活性, 2 000 $\mu\text{g/mL}$ 处理在接种后不同时间的菌丝生长抑制率均为 100.00%。各处理的抑菌活性与空白对照相比, 在 $P < 0.05$ 水平上均差异显著。

柠檬烯接触和熏蒸两种不同处理方法对病原菌菌丝生长的抑制活性熏蒸处理的要高于接触处理的抑制活性。

3.4.3 月桂烯的接触抑菌活性

月桂烯对灰葡萄孢菌接种后不同时间的接触抑菌活性实验结果, 如表 8 所示。

表 8 接种后不同时间月桂烯对灰葡萄孢菌的接触抑菌活性

Table 8 Antifungal activity of myrcene against *B. cinerea* with different contact times

浓度 Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	菌丝生长抑制率 Mycelial growth inhibition (%)					
	1 天	2 天	3 天	4 天	5 天	6 天
62.5	1.93 \pm 2.51 ^a	13.15 \pm 7.40 ^{ab}	3.23 \pm 3.26 ^{ab}	4.50 \pm 3.97 ^a	1.80 \pm 1.53 ^a	1.78 \pm 2.46 ^{ab}
125	0.00 \pm 0.00 ^a	11.67 \pm 12.22 ^{ab}	3.87 \pm 5.79 ^{ab}	2.60 \pm 4.50 ^a	2.22 \pm 3.42 ^a	1.63 \pm 2.82 ^{ab}
250	0.00 \pm 0.00 ^a	26.02 \pm 5.43 ^b	11.41 \pm 2.42 ^{b,c}	7.31 \pm 1.45 ^{ab}	0.66 \pm 0.76 ^a	1.02 \pm 1.76 ^{ab}
500	3.51 \pm 2.16 ^a	28.98 \pm 8.35 ^b	14.95 \pm 2.82 ^c	8.52 \pm 4.70 ^{ab}	1.59 \pm 2.33 ^a	2.27 \pm 0.75 ^{ab}
1 000	2.54 \pm 2.40 ^a	48.80 \pm 12.25 ^c	25.19 \pm 8.49 ^d	14.18 \pm 6.40 ^{b,c}	4.44 \pm 6.85 ^a	4.28 \pm 2.83 ^b
2 000	2.56 \pm 1.96 ^a	51.02 \pm 11.92 ^c	30.62 \pm 4.40 ^d	18.91 \pm 3.12 ^c	8.46 \pm 1.77 ^a	6.06 \pm 0.05 ^b
CK	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a

试验结果表明, 月桂烯对灰葡萄孢菌的接触抑菌活性与处理剂量成正相关, 接种第 2 天后与时间成负相关。总体来看, 月桂烯对灰葡萄孢菌的接触抑菌活性比较低, 2 000 $\mu\text{g/mL}$ 处理 2 天时的菌丝生长抑制率也仅为 51.02%, 其余处理的抑菌率均

低于此值。大部分处理的抑菌效果与空白对照相比, 在 $P < 0.05$ 水平上均无显著差异。

3.4.4 月桂烯的熏蒸抑菌活性

月桂烯对灰葡萄孢菌接种后不同时间的熏蒸抑菌活性实验结果, 如表 9 所示。

表 9 接种后不同时间月桂烯对灰葡萄孢菌的熏蒸抑菌活性

Table 9 Antifungal activity of myrcenevapour against *B. cinerea* with different exposure times

浓度 Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	菌丝生长抑制率 Mycelial growth inhibition (%)					
	1 天	2 天	3 天	4 天	5 天	6 天
62.5	36.90 \pm 10.24 ^b	11.71 \pm 5.34 ^b	8.38 \pm 3.10 ^b	4.97 \pm 3.49 ^b	2.88 \pm 2.59 ^{ab}	2.28 \pm 1.28 ^{ab}
125	42.07 \pm 12.54 ^b	18.66 \pm 2.57 ^c	13.16 \pm 4.01 ^b	9.12 \pm 1.34 ^c	5.30 \pm 2.30 ^b	2.90 \pm 0.35 ^b
250	53.97 \pm 2.62 ^c	33.13 \pm 3.70 ^d	21.97 \pm 3.98 ^c	15.60 \pm 1.19 ^d	9.63 \pm 1.43 ^c	4.98 \pm 0.63 ^b

续表 9(Continued Tab. 9)

浓度 Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	菌丝生长抑制率 Mycelial growth inhibition (%)					
	1 天	2 天	3 天	4 天	5 天	6 天
500	82.43 \pm 5.09 ^d	53.02 \pm 2.93 ^e	36.01 \pm 1.66 ^d	27.32 \pm 3.46 ^e	19.50 \pm 3.19 ^d	13.58 \pm 3.10 ^c
1 000	100.00 \pm 0.00 ^e	64.45 \pm 2.30 ^f	50.38 \pm 2.51 ^e	38.23 \pm 0.99 ^f	26.98 \pm 2.00 ^e	20.75 \pm 0.45 ^d
2 000	100.00 \pm 0.00 ^e	100.00 \pm 0.00 ^g	88.84 \pm 1.47 ^f	80.00 \pm 1.23 ^g	70.11 \pm 1.35 ^f	60.79 \pm 0.69 ^e
CK	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a

试验结果表明,月桂烯对灰葡萄孢菌的熏蒸抑菌活性与处理剂量成正相关,接种第 2 天后与时间成负相关。总体来看月桂烯浓度在 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 及以下时抑菌活性较低,对菌丝生长的抑制率大多低于 50%,62.5 与 125 $\mu\text{g/mL}$ 两个处理间在 $P < 0.05$ 水平上无显著差异,但浓度为 2 000 $\mu\text{g/mL}$ 的处理则表现出较好的抑菌活性。

4 结论

现有研究结果表明,植物挥发油是一个由多种挥发性化学成分组成的复合体系,其中萜类、酚类、醇类、醛类和芳香化合物是植物挥发油的重要成分。很多单萜(monoterpene)和倍半萜(sesquiterpene)类化合物在植物与病原菌的互作中,具有较强的生物

活性和重要的生态功能,其中有的化合物在抑制果蔬采后致病微生物方面具有重要的研究价值。

植物病原菌的侵染和危害,是加速采收后果蔬腐烂最重要的致腐因子,利用植物挥发油进行果蔬采后抑菌防腐,国内外学者做过很多研究^[17-19]。Nengguo 等^[20]认为芸香科有些植物的挥发油能抑制某些果蔬的采后病害。Nengguo 等的研究结果表明,柑橘挥发油对水果的重要致病真菌意大利青霉菌(*Penicillium italicum*)和指状青霉菌(*P. digitatum*)具有显著的抑菌活性。本研究结果表明,柚皮挥发油对果蔬采后重要致病真菌灰葡萄孢菌的菌丝生长具有明显的抑菌活性。柚子与柑橘同为芸香科植物,本研究结果印证了 Nengguo Tao 等的观点。

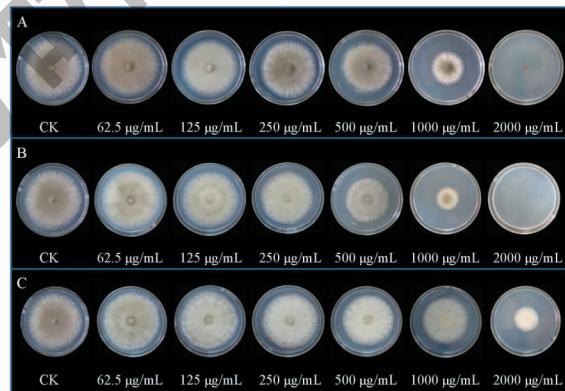
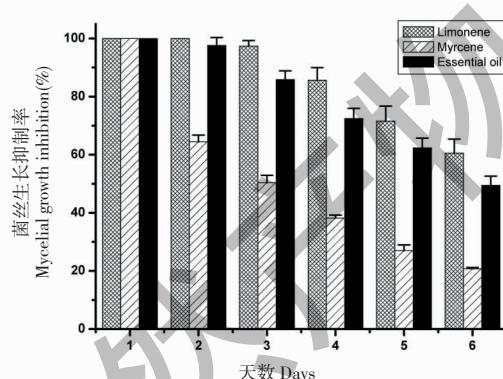


图 3 柚皮挥发油及其主要化学成分对灰葡萄孢菌处理后 6 天的熏蒸抑菌效果示意图

Fig. 3 Antifungal activity of essential oil and its chemical compositions vapour against *B. cinerea* after 6 days exposure
注:A-柚皮挥发油;B-柠檬烯;C-月桂烯。Note: A-Essential oil from *C. maxima* peel; B-Limonene; C-Myrcene.

本研究结果表明,柚皮挥发油中共有 8 个主要化学成分,其中含量最高的是柠檬烯,天开始,柚皮挥发油和柠檬烯的抑菌效果显著强于月桂烯。柚皮挥发油和柠檬烯 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 处理表现出较好的抑菌活性,2 000 $\mu\text{g/mL}$ 处理在接种后不同时间的菌丝生长抑制率均为 100.00%,抑菌活性极显著优于同等剂量的月桂烯。因此,可以推测柠檬烯是柚皮挥发油中的主要抑菌活性成分。柚皮挥发油、柠檬烯

和月桂烯 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 接种后 6 天对灰葡萄孢菌的抑菌活性结果,如图 3 所示。

用同一种有抑菌活性的挥发性化学成分熏蒸和接触处理靶标病原菌,不同处理方式间的抑菌活性可能会有较大差异^[10],本研究的结果也证明了这种现象。柚皮挥发油在同等剂量下接触和熏蒸处理灰葡萄孢菌,其抑菌活性表现出很大差异,熏蒸处理的抑菌活性显著高于接触处理,且各处理的抑菌活性

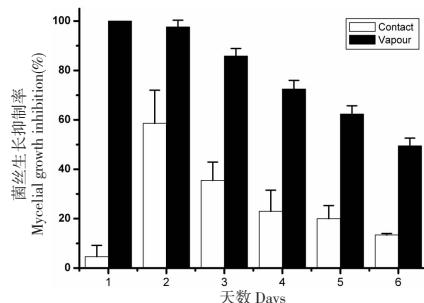


图 4 柚皮挥发油不同处理方法对灰葡萄孢菌的熏蒸抑菌效果($1\,000\,\mu\text{g}/\text{mL}$)

Fig. 4 Antifungal activity of essential oil with different treatment methods against *B. cinerea* after 6 days exposure ($1\,000\,\mu\text{g}/\text{mL}$)

与处理时间成反比(图4)。关于同等用药剂量下为什么熏蒸处理的抑菌活性远高于接触处理,笔者认为熏蒸处理挥发性抑菌活性成分通过空气与菌体全方位接触,使药效得到充分发挥,而接触处理菌体仅有接触培养基的部分才能受药,药效不能得到充分发挥。由于两种给药处理方法病原菌受药的面积相差较大,从而导致抑菌活性出现较大差异。

综上所述,柚皮挥发油对灰葡萄孢菌具有显著的抑菌活性,其主要化学成分是柠檬烯和月桂烯等8种挥发性有机化合物,其中含量最高的是柠檬烯(73.68%)和月桂烯(14.64%)。根据本研究的结果推测,柠檬烯是柚皮挥发油的主要抑菌活性成分。柚皮挥发油和柠檬烯单体化合物对灰葡萄孢菌熏蒸处理的抑菌活性显著高于接触处理,且各处理的抑菌活性与处理时间成反比。

致病真菌侵染是导致果蔬采后腐烂的重要因素,探寻可替代化学合成杀菌剂用于果蔬采后防腐的天然产物,对保障食品安全和公众健康,具有极其重要的意义。我国柚子种植分布广泛种植面积较大,因此柚皮资源丰富。本研究证明在离体条件下,柚皮挥发油对灰葡萄孢菌具有显著的抑菌活性,下一步可在此基础上通过深入研究,探讨柚皮挥发油用于番茄灰霉病等由灰葡萄孢菌所致果蔬采后重要病害防控的可能性。

参考文献

- Sivakumar D, Bautista BS. A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage[J]. Crop Prot, 2014, 64:27-37.
- Prusky D. Reduction of the incidence of postharvest quality losses, and future prospects [J]. Food Secur, 2011, 3:463-474.
- Cheng P, Ma X, Yun X, et al. Research progress of application of biological and natural preservatives in controlling post-harvest grape gray mold[J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技), 2019, 40:311-315.
- Chen XY, Mu WS, Peter S, et al. The effects of constant concentrations of sulfur dioxide on the quality evolution of post-harvest table grapes[J]. J Food Nutr Res, 2016, 55:114-120.
- Tripathi P, Dubey NK, Shukla AK. Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mould of grapes caused by *Botrytis cinerea*[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2008, 24:39-46.
- Bajpai VK, Shukla S, Kang SC. Chemical composition and antifungal activity of essential oil and various extract of *Silene armeria* L.[J]. Bioresource Technol, 2008, 99:8903-8908.
- Liu X, Ao Y, Quan Q, et al. Optimization of extraction process of polysaccharides from peels of Citrus Grandis by response surface methodology[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2015, 27:732-736.
- Liu A, Huang W. Extraction of cellulose from pomelo peel using alkaline hydrogen peroxide[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2017, 29:1779-1784.
- Xi W, Fang B, Zhao Q, et al. Flavonoid composition and antioxidant activities of Chinese local pummel (*Citrus grandis* Osbeck) varieties[J]. Food Chem, 2014, 161:230-238.
- M Chutia, Bhuyan PD, Pathak MG, et al. Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulate* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India[J]. LWT-Food Sci Technol, 2009, 42:777-780.
- Natalia SB, Lydiana PN, Jessica FPO, et al. Antifungal activity and inhibition of fumonisin production by *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Ni renberg[J]. Food Chem, 2015, 166:330-336.
- Gogolous SG, Dekker J. Detection and measurement of fungicide resistance general principles[J]. FAO Plant Protection Bull, 1982, 30(2):39-50.
- Chutia M, Deka PB, Pathak MG, et al. Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulate* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India[J]. LWT-Food Sci Technol, 2009, 42:777-780.
- Andrea M, Bruno M, Alessandra P, et al. Chemical characterization and biological activity of essential oils from *Daucus carota* L. subsp. *carota* growing wild on the Mediterranean coast and on the Atlantic coast[J]. Fitoterapia, 2009, 80:57-61.
- Ram SV, Neeta J, Rajendra CP, et al. Chemical composition

- and allelopathic, antibacterial, antifungal and in vitro acetyl-cholinesterase inhibitory activities of yarrow (*Achillea millefolium* L.) native to India [J]. *Ind Crops Prod*, 2017, 104: 144-155.
- 16 Priscila RNV, Selene M, Francisco HQB, et al. Chemical composition and antifungal activity of essential oils from Ocimum species [J]. *Ind Crops Prod*, 2014, 55: 267-271.
- 17 Pramila T, Dubey NK, Shukla AK. Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mould of grapes caused by *Botrytis cinerea* [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2008, 24: 39-46.
- 18 Achour A, Robert D, Anne LP, et al. *In vitro* and *in vitro* activity of eugenol oil (*Eugenia caryophyllata*) against four important postharvest apple pathogens [J]. *Int J Food Microbiol*, 2008, 126: 13-19.
- 19 Nikos GT, Costas DE. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens [J]. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 2007, 8: 253-258.
- 20 Nengguo T, Lei J, Haien Z. Anti-fungal activity of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum* [J]. *Food Chem*, 2014, 153: 265-271.

(上接第 22 页)

- 14 Neitemeier S, Jelinek A, Laino V, et al. BID links ferroptosis to mitochondrial cell death pathways [J]. *Redox Biol*, 2017, 12: 558-570.
- 15 Menozzi-Smarrito C, Riera CE, Munari C, et al. Synthesis and evaluation of new alkylamides derived from α -hydroxysanshool, the pungent molecule in szechuan pepper [J]. *J Agr Food Chem*, 2009, 57: 1982-1989.
- 16 Riera CE, Menozzi-Smarrito C, Affolter M, et al. Compounds from Sichuan and melegueta peppers activate, covalently and non-covalently, TRPA1 and TRPV1 channels [J]. *Br J Pharmacol*, 2009, 157: 1398-1409.
- 17 Fu C, Li FF, Wang FS. Study on chemical constituents of *Campylotropis trigonoclada* [J]. *J Dali Univ (大理大学学报)*, 2016, 1(4): 8-13.