

牛至精油微胶囊包埋工艺及抑菌效果的测定

田永强, 卢燕霞, 张维, 王元鹏
(兰州交通大学, 兰州 730070)

摘要: **目的** 制备牛至精油微胶囊, 以提高牛至精油的稳定性。**方法** 选取明胶和阿拉伯胶作为壁材, 采用复凝聚法制备牛至精油微胶囊, 并利用单因素实验和正交实验优化其工艺条件, 同时研究牛至精油微胶囊的抑菌效果。**结果** 牛至精油微胶囊化最佳的工艺条件, 芯壁质量比为 3:1, 反应 pH 值为 4.5, 乳化剂 WJE-880 的添加量为 0.1%, 以 6000 r/min 高速剪切 2 min, 在 55 ℃, 250 r/min 的条件下搅拌固化 60 min。此工艺条件下包埋率可达到 83.1%。**结论** 牛至精油经微胶囊化后显著地提高了其抑菌的持久性。

关键词: 牛至精油; 微胶囊; 工艺优化; 抑菌效果

中图分类号: TS225.1; R994. **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-3563(2016)17-0102-06

Microencapsulation of Oregano Oil and Its Antibacterial Effects

TIAN Yong-qiang, LU Yan-xia, ZHANG Wei, WANG Yuan-peng
(Lanzhou Jiaotong University, Lanzhou 730070, China)

ABSTRACT: This paper aims to prepare oregano oil microcapsules and improve the stability of the oil. The microcapsule was prepared by complex coacervation using gelatin and Arabic gum as wall material and the process conditions were optimized by the single factor experiment and the orthogonal experiment, and the antibacterial effect of the microcapsule was tested. Results showed that the optimal conditions were as follows: the ratio of core and wall was 3:1, dosage of the emulsifier was 0.1%, cutting 2 min at speed 6000 r/min, pH value 4.5; curing time 60 min at temperature 55 ℃ and shaking speed 250 r/min. Under these conditions, the encapsulation efficiency could reach 83.1%. In conclusion, oregano essential oil by microcapsule can significantly increase the persistence of antibacterial effect.

KEY WORDS: oregano oil; microcapsule; optimization; antimicrobial effect

牛至属于唇形科植物, 主要分布于我国华北、西北至长江以南各地^[1]。牛至是中国传统的中药, 属于药食同源植物, 能够治疗因暑湿所引起的发热、头痛、全身困倦、呕吐、腹泻、腹痛等症状, 也可用于治疗急性胃肠炎、沙门氏菌感染等疾病^[2-3]。牛至精油是从牛至全草中提取出来的淡黄色液体, 含有 30 多种挥发性成分, 其含有的香芹酚和百里香酚具有很强的抑菌和抗菌活性^[4-5]。由于牛至精油挥发性强, 稳定性差, 易损失、易氧化而难以储

存^[6], 同时牛至精油具有很强的刺激性难闻气味, 因此严重限制了其在药物、食品和饲料添加剂等领域的应用。

微胶囊技术起源于 20 世纪 30 年代, 目前工艺日益成熟, 应用范围逐渐扩大, 如医药、食品、日用化学品、肥料、化工等领域都有涉及^[7]。该技术能够对药物和食品添加剂进行包埋, 有效提高天然药物的水溶性, 降低挥发性和刺激性^[8]。复凝聚法^[9]生产工艺简单, 便于掌握, 是常用的微胶囊化方法

收稿日期: 2016-02-26

基金项目: 甘肃省农业科技支撑项目 (1304NKCA156)

作者简介: 田永强 (1972—), 男, 甘肃兰州人, 博士, 兰州交通大学教授, 主要研究方向为生物化学与微生物工程。

之一。有关植物精油的包覆已经有诸多报道，但牛至精油微胶囊的制备鲜有报道，仅有刘光发等用海藻酸钠包埋，且包埋率仅为 60%^[10]。文中采用复凝聚法以明胶和阿拉伯胶为壁材制备了牛至精油微胶囊，利用正交实验优化了其工艺条件，并测试了牛至精油微胶囊的抑菌效果，为牛至精油的进一步开发和应用提供理论依据。

1 实验

1.1 材料与仪器

材料：牛至精油，购于华美天然植物油提炼厂；明胶，中国莱阳市双双化工有限公司；乳化剂 WJE-880，上海万金助剂有限公司；阿拉伯树胶粉、戊二醛（分析纯）均购于上海中秦化学试剂有限公司；大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌由兰州交通大学化学与生物工程学院毒理学实验室提供；无水乙醇、无水乙醚、石油醚等药品均为分析纯，甲醇为色谱纯。仪器：MXR 系列实验室高剪切乳化机，上海沐轩实业有限公司；NOVEL-300M 显微镜，宁波永新光学股份有限公司；数显电功搅拌器，常州国华电器有限公司。

1.2 方法

工艺流程为准备壁材溶液→芯壁混合→乳化→聚囊→交联固化→抽滤。

1.2.1 明胶/阿拉伯胶牛至精油微胶囊的制备

配制质量分数为 1%的明胶和阿拉伯胶溶液，混合均匀后加入一定量牛至精油和乳化剂，封口置于 45℃的水浴锅中一段时间，取出，待冷却至室温后高速剪切 2 min，再次冷却至室温，用浓度为 1 mol/L 的醋酸调 pH 至反应 pH 后置于一定温度的水浴锅中搅拌 30 min，取出，冰水浴降温至 5~6℃，用浓度为 1 mol/L 的氢氧化钠溶液调 pH 至 9.0，加入一定量固化剂戊二醛，置水浴中固化一段时间，抽滤，即得湿囊产物。

1.2.2 包埋率的测定

采用高效液相色谱法测定包埋率，称取 2 份质量相等的微胶囊样品，分别加入总体积相等的提取剂提取表面油和总油，用高效液相色谱测定，通过主峰牛至精油峰面积的大小判定两溶液中牛至精油的量，即知等质量微胶囊样品的总油和表面油含

量，按式(1)计算包埋率。

$$\text{包埋率} = (1 - \text{微胶囊表面油含量} / \text{微胶囊总油含量}) \times 100\%^{[11-12]}$$

(1)

1) 色谱条件。色谱柱 AT.Chrom C18 5u，流动相甲醇和水的体积比为 9:1，检测波长为 274 nm，流速为 0.5 mL/min，进样体积为 20 μL，柱温室温为 25℃^[13]。

2) 色谱系统。采用日本岛津公司 LC-10A 高效液相色谱仪，配有 LC-10AT 泵，DGU-12A 脱气设备，SPD-10A UV-VIS 检测器，CTO-10A 柱温箱和 SCL-10ASP 色谱数据处理器。

3) 湿囊产物总油的提取。称取 0.0753 g 微胶囊样品，按体积比为 2:2:1 分别加入无水乙醇、无水乙醚和石油醚^[14]，共 50 mL，超声 3 h，取上清液以 3000 r/min 的转速离心 15 min，待测。

4) 湿囊产物表面油的提取。称取 0.0753 g 微胶囊样品，加入 50 mL 石油醚^[11]，超声 4 min，取上清液以 3000 r/min 的转速离心 15 min，待测。

1.2.3 单因素和正交实验

1) 单因素实验。准确称取 2 g 壁材 ($m_{\text{明胶}} : m_{\text{阿拉伯胶}} = 1:1$)，制得微胶囊湿囊产物，研究不同芯壁质量比 (1:1, 1.5:1, 2:1, 2.5:1, 3:1)、反应 pH 值 (3.8, 4.0, 4.5, 5.0, 5.2)、乳化剂的体积分数 (0, 0.05%, 0.1%, 0.15%, 0.2%)、剪切速度 (2000, 5000, 8000, 10000, 12000 r/min)、搅拌速度 (120, 250, 380, 500, 650 r/min)、水浴温度 (35, 45, 50, 55, 65℃) 和固化时间 (10, 30, 60, 90, 120 min) 对包埋率的影响。

2) 正交实验。在单因素实验结果基础上，采用 7 因素 3 水平设计正交实验，确定最优的包埋工艺参数见表 1。

表 1 L₁₈ (3⁷) 正交实验因素水平
Tab.1 Factors and levels of orthogonal tests L₁₈ (3⁷)

水 平	芯壁 质量比	乳化剂 添加量/ %	剪切 速度/ (r·min ⁻¹)	反应 pH	反应 温度 /℃	搅拌 速度 (r·min ⁻¹)	固化 时间 /min
1	2 : 1	0.075	6000	4.0	45	250	30
2	2.5 : 1	0.1	8000	4.5	50	350	60
3	3 : 1	0.125	10 000	5.0	55	450	120

1.2.4 牛至精油微胶囊抑菌活性研究

选用大肠杆菌和金黄色葡萄球菌为供试菌种测试。微胶囊试验组，按 0.02 g/100 mL 的添加量将湿囊产物（牛至精油的体积分数为 0.006%）溶解到已

灭菌的培养基中, 配制平板; 精油对照组, 取 0.6 mL 牛至精油和 1.0 mL 乳化剂, 用蒸馏水定容至 100 mL, 以 6000 r/min 的转速剪切 1 min, 立即取 1 mL 添加于 100 mL 培养基中, 配制平板; 乳化剂对照组, 取 1.0 mL 乳化剂, 用 100 mL 容量瓶定容, 搅拌均匀后立即取 1 mL 添加于 100 mL 培养基中, 配制平板; 空白对照组, 取 100 mL 已灭菌的培养基制平板备用。用十倍梯度稀释法将大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的菌悬液稀释至一定浓度, 取 200 μ L 涂布培养皿, 每组设 3 个平行组, 37 $^{\circ}$ C 恒温培养, 采用直接计数法确定单菌落个数, 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果与分析

以包埋率为主要评价指标, 所得单因素实验结

果见图 1。试验范围内, 芯壁质量比为 2.5 : 1 时包埋率最佳, 见图 1a。剪切速度增加, 包埋率先增加后减小, 见图 1b, 8000 r/min 时效果最好。pH 值的结果见图 1c, 其中 4.0, 4.5, 5.0 这 3 个 pH 值下包埋率差异较大, 说明 pH 值是影响微胶囊包埋率的关键因素。pH 为 4.5 时包埋率达到最大, 此 pH 下明胶所带正电荷的数量达到最高值, 形成微胶囊的数量最多, 故包埋率呈现一个峰值。乳化剂的添加量对包埋率具有一定的影响, 添加量增加, 包埋率先增加后降低, 见图 1d, 最佳体积分数为 0.15%。反应温度升高, 包埋率先升高后降低, 见图 1e, 最适反应温度为 50 $^{\circ}$ C。固化时间在 10 ~ 90 min 范围内, 包埋率大幅增加, 在试验范围内 120 min 时达到最大, 与 90 min 相比显示出略微的优势, 见图 1f; 搅拌速度增加, 包埋率先增加后减小, 见图 1g, 最适搅拌速度为 250 r/min。

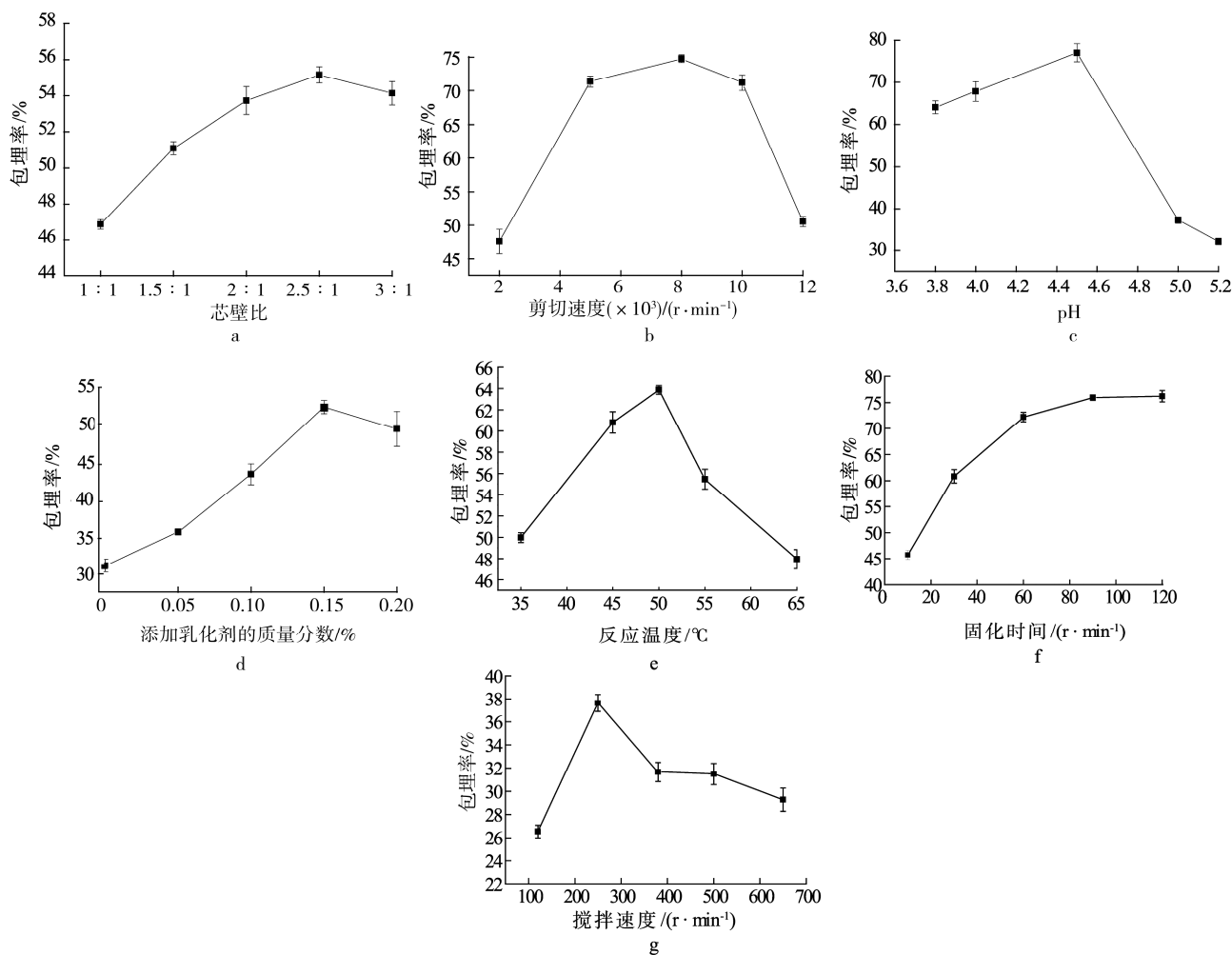


图 1 单因素实验结果

Fig.1 Single factor test results

经单因素条件优化实验表明, 包埋率最高的条件分别为: 芯壁质量比为 2.5 : 1, 剪切速度为 8000 r/min, pH 为 4.5, 乳化剂的体积分数为 0.15%, 水浴温度为 50 ℃, 固化时间 120 min, 搅拌速度为 250 r/min。

2.2 pH 值对微胶囊成囊效果的影响

牛至精油微胶囊在电子显微镜下放大 10×100 倍时, 所选 3 个 pH 值对牛至精油微胶囊的成囊效果具有较大的影响, 见图 2。pH 为 4.0 时, 微胶囊颗粒均匀, 形状规则; pH 为 4.5 时, 颗粒大小不均一; 当 pH 为 5.0 时, 形成的颗粒较小, 比较均匀。分析其原因, 主要是随着 pH 的减小, 溶液中明胶所带的正电荷逐渐增加, 形成的微胶囊数目随之增加, 颗粒结块的几率增加, 所以颗粒较大。

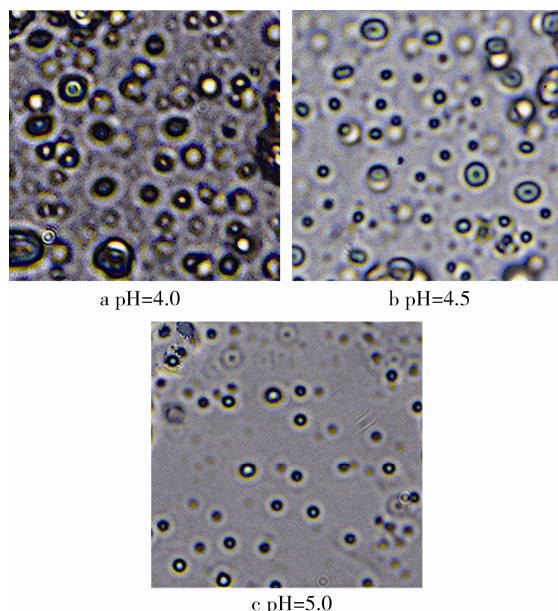


图 2 pH 值对成囊效果的影响
Fig.2 Effect of pH value on microencapsulation

2.3 综合分析

芯壁比例对微胶囊化效果具有很大影响, 该值过大时, 壁材不足以包埋芯材导致包埋率下降, 从经济性的角度考虑, 增加了成本, 造成了资源的浪费; 该值过小时, 形成的空囊较多, 包埋率下降。较大的剪切速度如 12 000 r/min 时, 局部高温会加快精油的氧化和挥发, 导致包埋率下降, 而剪切速度过小又会使芯材不能充分乳化, 影响包埋效果。pH 直接影响微胶囊的形成、形态、产率和包埋率, 故选择合适的 pH 显得尤为重要。乳化剂的体积分数为 0.15% 时, 包埋率相对较高, 但是颗粒不均匀, 有的甚至聚团存在,

而体积分数为 0.1% 时, 虽包埋率较低, 但颗粒的均匀性较好。搅拌速度直接影响颗粒的大小, 故可根据对微胶囊大小的需求调整搅拌速度。

2.4 正交实验结果与分析

由表 2 极差 R 的结果可知, 试验范围内所考察的 7 个因素对牛至精油微胶囊包埋率的影响顺序依次为: 反应 pH 值 > 芯壁比例 > 搅拌速度 > 乳化剂添加量 > 乳化速度 > 固化时间 > 水浴温度。就单个因素而言, 对包埋率的影响顺序为, 因素 A: $A_3A_1A_2$; 因素 B: $B_2B_1B_3$; 因素 C: $C_1C_3C_2$; 因素 D: $D_2D_1D_3$; 因素 E: $E_3E_2E_1$; 因素 F: $F_1F_2F_3$; 因素 G: $G_2G_3G_1$ 。由以上分析可得, 包埋率最佳的组合应该为 $A_3B_2C_1D_2E_3F_1G_2$, 将该组条件进行进一步的验证实验, 所得微胶囊包埋率为 83.1%, 与表 2 中包埋率最高的组合即序号为 17 的正交试验组 (包埋率为 82.7%) 相比, 包埋率呈现出略微的优势。故可得出结论, $A_3B_2C_1D_2E_3F_1G_2$ 为最佳组合, 所以制备牛至精油微胶囊的最佳工艺条件为: 芯壁质量比为 3 : 1, 乳化剂 WJE-880 的添加量为 0.1%, 乳化速度为 6000 r/min, 反应 pH 值为 4.5, 水浴温度为 55 ℃, 搅拌速度为 250 r/min, 固化时间为 60 min, 在此条件下包埋率为 83.1%。由表 3 可知, 试验范围内所考察的 7 个因素中, 反应 pH 对包埋率的影响最显著。

2.5 牛至精油和牛至精油微胶囊对细菌的抑制作用

对牛至精油微胶囊 (含油率为 0.3 mL/g) 进行抑菌实验, 结果见图 3—4。培养 24 h 后, 牛至精油及其微胶囊对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均有显著的抑制作用。但当培养时间延长至 120 h 时, 牛至精油的抑菌效果明显降低, 而微胶囊效果较好。这是由于牛至精油具有挥发性, 而微胶囊可以保护芯材, 降低挥发性, 使得有效成分缓慢释放, 所以药效相对持久而稳定。另外, 对比图 3—4 可知, 牛至精油及其微胶囊对金黄色葡萄球菌的作用强于大肠杆菌。精油中的一些成分能够破坏菌体的细胞膜结构使细胞内容物外渗, 最终阻碍细胞正常的代谢活动。大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的细胞壁结构以及化学组成差异很大, 金黄色葡萄球菌的细胞壁较厚但化学组成单一, 只有肽聚糖和磷壁酸; 大肠杆菌的细胞壁较薄但结构复杂, 由脂多糖、类脂质和蛋白质组成的外膜层将含有肽聚糖的内壁层

从两侧包裹,这种双层脂质结构能够对细胞起到一定的保护作用^[15]。

表 2 正交试验设计与结果

Tab.2 Design and results of orthogonal tests

编号	芯壁比(A)	乳化剂添加量(B)	剪切速度(C)	反应 pH(D)	反应温度(E)	搅拌速度(F)	固化时间(G)	包埋率/%
1	1	1	1	1	1	1	1	59.2
2	1	2	2	2	2	2	2	75.7
3	1	3	3	3	3	3	3	20.6
4	2	1	2	1	3	2	3	46.7
5	2	2	3	2	1	3	1	54.9
6	2	3	1	3	2	1	2	33.1
7	3	1	1	2	2	3	3	79.4
8	3	2	2	3	3	1	1	60.7
9	3	3	3	1	1	2	2	69.2
10	1	1	3	1	2	2	1	38.7
11	1	2	1	3	3	3	2	64.8
12	1	3	2	2	1	1	3	72.2
13	2	1	3	2	3	1	2	69.9
14	2	2	1	3	1	2	3	32.5
15	2	3	2	1	2	3	1	20.6
16	3	1	2	3	1	3	2	24.3
17	3	2	3	1	2	1	3	82.7
18	3	3	1	2	3	2	1	75.7
K_1	55.200	53.033	57.450	57.200	52.050	62.967	51.633	
K_2	42.950	61.883	50.033	71.300	55.033	56.417	56.167	
K_3	65.333	48.567	56.000	34.983	56.400	44.100	55.683	
R	23.383	13.316	7.417	36.317	4.350	18.867	4.534	

注: K_i 为任意列上水平号为 i 时所对应的试验结果的平均值

表 3 正交试验结果方差分析
Tab.3 Variance analysis of orthogonal tests

因素	偏差平方和	自由度	F	F 阈值	显著性
芯壁质量比	1507.521	2	1.407	3.740	
乳化剂添加量	551.214	2	0.514	3.740	
剪切速度	185.421	2	0.173	3.740	
反应 pH 值	4022.581	2	3.754	3.740	*
反应温度	59.381	2	0.055	3.740	
搅拌速度	1101.108	2	1.027	3.740	
固化时间	74.374	2	0.069	3.740	
误差	7501.60	14			

注: F 值 ($\alpha=0.1$)

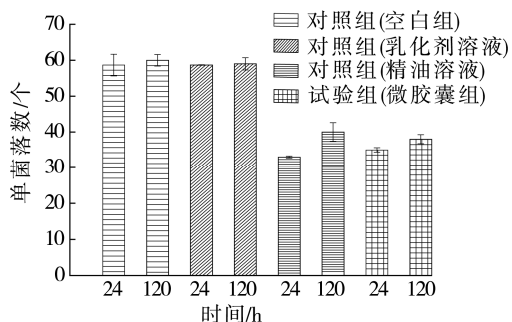


图 3 牛至精油及其包埋物对大肠杆菌的作用

Fig.3 Effect of oregano oil and its microcapsules on *E. coli*

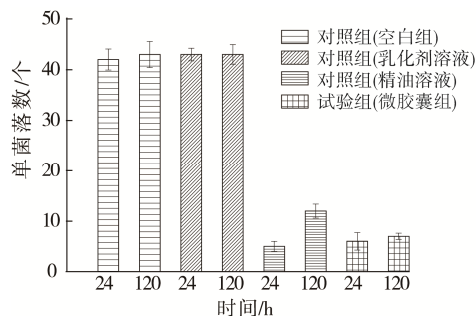


图 4 牛至精油及其包埋物对金黄色葡萄球菌的作用

Fig.4 Effect of oregano oil and its microcapsules on *Staphylococcus aureus*

3 结语

研究通过单因素和正交试验得出牛至精油微胶囊化适宜的工艺条件: 芯壁质量比为 3 : 1, 乳化剂 WJE-880 的体积分数为 0.1%, 乳化速度为 6000 r/min, 反应 pH 为 4.5, 水浴温度为 55 ℃, 搅拌速度为 250 r/min, 固化时间为 60 min, 在此条件下包埋率为 83.1%, 达到了工艺要求。牛至精油包埋物相比于液态的牛至精油表现出了更多、更好的优越性。除便于运输外, 重要的是表现出更持久的抑菌效果。牛至精油经微胶囊化后同样能够抑制大肠杆菌和金

黄色葡萄球菌,而且其抑菌的持久性更好。牛至精油微胶囊化为其在药物、食品^[3]和饲料添加剂^[16]等领域的广泛应用奠定了一定的理论基础。

参考文献:

- [1] 中国医学科学院药物研究所. 中药志[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1959.
Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences. Chinese Medicinal Herbal [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1959.
- [2] Jiangsu New Medical College. Dictionary of Traditional Chinese Medicine[M]. Shanghai: Shanghai People's Publishing House, 1977.
- [3] 李俊杰, 李蓉涛. 牛至的研究现状[J]. 光谱实验室, 2013, 30(1): 171—176.
LI Jun-jie, LI Rong-tao. Research Status of Origanum Vulgare L[J]. Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory, 2013, 30(1): 171—176.
- [4] 朱斌, 陈向炜, 刘迎新. 牛至油化学成分、药理活性剂提取方法研究进展[J]. 中药材, 2007, 30(8): 1038—1041.
ZHU Bin, Chen Xiang-wei, LIU Ying-xin. Study on the Chemical Constituents and Pharmacological Agents Extraction of Oregano Essential Oil[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2007, 30(8): 1038—1041.
- [5] 顾仁勇, 刘莹莹. 牛至精油抑菌及抗氧化性能研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(10): 50—53.
GU Ren-yong, LIU Ying-ying. Study on the Antioxidation and Bacteriostasis of Origanum Vulgare L Essential Oil[J]. Food and Fermentation Industries, 2006, 32(10): 50—53.
- [6] 张玉玉, 孙宝国, 祝钧. 牛至精油挥发性成分的 GC-MS 与 GC-O 分析[J]. 食品科学, 2009, 30(16): 275—277.
ZHANG Yu-yu, SUN Bao-guo, ZHU Jun. Analysis of Volatile Compounds of Essential Oil from Origanum Vulgare L. by GC-MS and GC-O[J]. Food Science, 2009, 30(16): 275—277.
- [7] 邓靖, 谭兴和, 刘婷婷, 等. 肉桂精油-β-环糊精微胶囊的制备[J]. 中国粮油学报, 2011, 26(2): 89—91.
DENG Jing, TAN Xing-he, LIU Ting-ting, et al. Preparation of Cinnamon Essence Oil/β-Cyclodextrin Microcapsule[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2011, 26(2): 89-91.
- [8] 陈燕, 陈计峦, 田金虎, 等. 薄荷精油微胶囊包埋工艺研究[J]. 食品工业, 2014, 35(4): 32—34.
CHEN Yan, CHEN Ji-luan, TIAN Jin-hu, et al. Research on Microencapsulation of Peppermint Oil[J]. Food Industry, 2014, 35(4): 32—34.
- [9] LYU Yi, YANG Fan, LI Xue-ying, et al. Formation of Heat-resistant Nanocapsules of Jasmine Essential Oil Via Gelatingum Arabic Based Complex Coacervation[J]. Food hydrocolloids, 2014, 35(1): 305—314.
- [10] 刘光发, 王建清, 赵亚珠. 牛至精油微胶囊的制备及其抑菌效果研究[J]. 包装工程, 2012, 33(3): 19—22.
LIU Guang-fa, WANG Jian-qing, ZHAO Ya-zhu, et al. Preparation and Antimicrobial Activity Study of Oregano Oil Microcapsule[J]. Packaging Engineering, 2012, 33(3): 19—22.
- [11] 谢功昀. 琯溪蜜柚果皮中精油的提取及微胶囊化技术研究[D]. 厦门: 集美大学, 2008. XIE Gong-jun. Studies on the Extraction and the Microcapsule of Essential Oil of Pomelo Peel[D]. Xiamen: Jimei University, 2008.
- [12] 陈琳, 李荣, 张禄捷, 等. 复凝聚法紫苏油微胶囊的制备及其性能研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(3): 232—238.
CHEN Lin, LI Rong, ZHANG Lu-jie. Preparation and Performance Studies on the Microencapsule of Perilla Oil Entrapped with Complex Coacervation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(3): 232—238.
- [13] 窦茂鑫, 赵迪, 侯永清, 等. 饲料添加剂牛至油中香芹酚和百里香酚含量的测定[J]. 饲料工业, 2013, 34(20): 12—15.
DOU Mao-xin, ZHAO Di, HOU Yong-qing, et al. The Content Determination of Carvacrol and Thymol in Feed Additive Oregano Oil[J]. Siliao Gongye, 2013, 34(20): 12—15.
- [14] 倪悦. 苦瓜籽油的复凝聚微胶囊化技术研究[D]. 无锡: 江南大学, 2010.
NI Yue. Study on Microcapsulation Technology of Bitter Gourd Seeds Oil by Complex Coacervation[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2010.
- [15] 赵丹, 孙旻, 陈光. 肉桂精油的抑菌作用[J]. 吉林农业大学学报, 2013, 35(4): 402—405. ZHAO Dan, SUN Yang, CHEN Guang. Inhibition Activity of Cinnamon Oil[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2013, 35(4): 402—405.
- [16] 蔡杰, 张文举. 新型饲料添加剂—牛至油的研究进展[J]. 资源开发, 2013(2): 38—42.
CAI Jie, ZHANG Wen-ju. Research Progress on Feed Additive Oregano Oil[J]. Resource Development, 2013(2): 38—42.