

doi:10.12301/spxb202300094

文章编号:2095-6002(2024)03-0104-10

引用格式:王一非,刘欣悦,宋晓秋,等.食品级丁香酚微乳液相行为及其抑菌性[J].食品科学技术学报,2024,42(3):104-113.



WANG Yifei, LIU Xinyue, SONG Xiaoli, et al. Phase behavior and antibacterial activity of food-grade eugenol-based microemulsions[J]. Journal of Food Science and Technology, 2024,42(3):104-113.

食品级丁香酚微乳液相行为及其抑菌性

王一非¹, 刘欣悦¹, 宋晓秋¹, 杨晓波¹, 周桐妃¹,
金嘉泓¹, 叶琳^{1,*}, 何守魁^{2,*}

(1. 上海应用技术大学 香料香精化妆品学部, 上海 201418;

2. 上海交通大学 农业与生物学院, 上海 200240)

摘要:为提高丁香酚的亲水性和抑菌效果,以吐温为表面活性剂,乳酸为助表面活性剂,构建可无限稀释的丁香酚微乳液,并探究微乳化前后丁香酚抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的效果。拟三元相图的分析结果表明,与吐温-40和吐温-60相比,吐温-80更能有效增加微乳液单相区面积;乳酸的增溶效果随着乳酸添加量的增加而提高,当丁香酚与乳酸质量比为1:3时,丁香酚微乳液单相区面积扩大至78.8%。抑菌特性研究结果显示:在一定范围内,随着吐温-80比例的降低,乳酸比例的增加,丁香酚微乳液的抑菌效果增强;当微乳液组分中丁香酚、乳酸与吐温-80的质量比为1:3:6时,质量分数0.05%的丁香酚可完全抑制2种受试细菌的生长,同时,该复合微乳液的抑菌活性显著高于不含乳酸的单一丁香酚微乳。研究开发的微乳液旨在为实现丁香酚的增溶增效提供可行的剂型,并有望用于食品防腐保鲜领域。

关键词:丁香酚;乳酸;微乳液;相行为;抑菌效果

中图分类号: TS201.3; TS201.7

文献标志码: A

随着绿色健康消费理念的深入人心,以天然安全的植物精油及其主要成分替代传统化学防腐剂的应用需求大幅增长。丁香酚(4-丙烯基-2-甲氧基苯酚)是丁香、肉桂、罗勒和月桂等植物精油的主要成分,属于我国食品安全标准中允许使用的食品添加剂,且对多种食源性细菌具有良好的抗菌活性^[1]。但是,丁香酚的挥发性和疏水性使其难以直接用于食品抑菌和保鲜,且添加量过高会影响产品本身的

风味^[2]。因此,如何实现丁香酚的增溶以及抑菌效果的维持,是食品抑菌领域亟待解决的问题。

微乳液是由油相、水相、表面活性剂或助表面活性剂组成的热力学稳定、透明及各向同性的分散体系,可以实现对部分植物精油及其主要成分的增溶效果^[3-4]。例如,将大豆油加入油相中可以有效提高丁香酚微乳液的可稀释性^[5]。植物精油微乳液应用于食品时需选择食品级的表面活性剂^[6],不能

收稿日期:2023-02-16

基金项目:上海市农业科技创新项目(T2023304);上海市自然科学基金资助项目(22ZR1429900)。

Foundation: Shanghai Agriculture Applied Technology Development Program (T2023304); Natural Science Foundation of Shanghai (22ZR1429900)。

第一作者:王一非,女,副教授,博士,主要从事食品贮藏与保鲜方面的研究。

*通信作者:叶琳,女,高级实验师,主要从事食品化学与分析方面的研究;

何守魁,男,副研究员,博士,主要从事食品安全与微生物方面的研究。

因稀释而破坏微乳液结构和抑菌活性^[7],因此需要构建可无限稀释植物精油微乳液(即U型微乳液)。U型微乳液在特定种类和比例的表面活性剂与油相下,无论如何稀释均可保持体系稳定。已报道的大多数U型微乳液使用吐温系列为表面活性剂,它是一类食品级的非离子型亲水表面活性剂^[8]。此外,微乳液的使用不能改变食品本身特性,乙醇等助表面活性剂也不能用于果蔬汁保鲜。

目前,已有关于丁香酚微乳液对大肠杆菌、单增李斯特菌等食源性细菌消减效果的报道^[7,9]。然而,罕有研究系统阐明表面活性剂和助表面活性剂等组分对微乳液抑菌效果的影响规律,同时对丁香酚增溶增效的食品级微乳液制备也鲜有报道,但这是实现植物精油及其主要成分在食品中应用的必要理论基础。因此,本研究通过拟三元相图法,以吐温系列为表面活性剂,以饮料中允许添加的乳酸或丙三醇为助表面活性剂,构建食品级可无限稀释的丁香酚微乳液。同时,分析微乳化前后丁香酚抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的效果,解析组分对微乳液相行为和抑菌活性的影响,以期微乳化提高植物精油增溶增效能力的关键技术研发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

丁香酚,分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;吐温-40、吐温-60、吐温-80,化学纯,上海泰坦科技股份有限公司;丙三醇、乳酸,分析纯,上海高信化玻仪器有限公司;实验用水为去离子水。

营养肉汤(nutrient broth, NB)、MH肉汤(Mueller-Hinton broth, MHB),青岛海博有限公司。

1.2 仪器与设备

TECAN Infinite M200RPO型多功能酶标仪,奥地利帝肯有限公司;L115-2型生化培养箱,美国谢尔顿制造公司;NanoBrook Omni型多角度粒度仪,美国布鲁克海文仪器公司;JEM-2100F型透射电子显微镜,日本电子株式会社。

1.3 实验方法

1.3.1 丁香酚微乳液的构建和表征

分别将丁香酚、丁香酚+丙三醇(质量比1:1)、丁香酚+乳酸(质量比为1:1、1:2、1:3、2:1、3:1)作为油相,吐温系列作为表面活性剂,采用滴水法^[10]

制备丁香酚微乳液。油相与表面活性剂以不同质量比(10:0、9:1、8:2、7:3、6:4、5:5、4:6、3:7、2:8、1:9和0:10)混合后,边振荡边滴加去离子水,直至样品失去澄清透明时记录消耗的水相质量。根据临界点油相、表面活性剂和水相质量比,采用Origin 2023软件绘制对应的拟三元相图,以单相微乳面积(total monophasic area, A_t)与相图总面积的比表征丁香酚微乳液形成程度。

从拟三元相图的无限稀释线中选取18个不同的微乳液,用于理化表征。微乳体系的名称及各组分具体质量比如下。EMLE1、EMLE2, m (油相): m (吐温-80)=2:8、1:9,油相中 m (丁香酚): m (乳酸)=3:1;EMLE3、EMLE4, m (油相): m (吐温-80)=2:8、1:9,油相中 m (丁香酚): m (乳酸)=2:1;EMLE5、EMLE6、EMLE7, m (油相): m (吐温-80)=3:7、2:8、1:9,油相中 m (丁香酚): m (乳酸)=1:1;EMLE8、EMLE9、EMLE10、EMLE11, m (油相): m (吐温-80)=4:6、3:7、2:8、1:9,油相中 m (丁香酚): m (乳酸)=1:2;EMLE12、EMLE13、EMLE14、EMLE15, m (油相): m (吐温-80)=4:6、3:7、2:8、1:9,油相中 m (丁香酚): m (乳酸)=1:3;EMLS5、EMLS6、EMLS7, m (油相): m (吐温-60)=3:7、2:8、1:9,油相中 m (丁香酚): m (乳酸)=1:1。

将这18个体系配制成为丁香酚质量分数为2%的储备液,测定其粒径;高低温稳定性实验后,采用苏丹红染色法筛选水包油(O/W)型微乳液并观察其外貌特征,用于后续抑菌性能的研究^[11]。粒径测定:使用多角度粒度仪在室温25℃条件下,光路角为90°时对丁香酚微乳液的粒径和分散指数(PDI)进行测量。高低温稳定性测定:将丁香酚微乳液分别在高温(65℃)和低温(4℃)环境下放置24h,观察不同温度对微乳液状态的影响^[10]。染色法测定:将1mg/mL的苏丹红溶液等量滴加到各个样品中,观察判断微乳液的类型。透射电镜测定:取少量制备好的O/W型微乳液滴在铜网上,自然晾干,随后用透射电镜进行观察拍照。实验均重复3次。

1.3.2 抑菌率的测定

将筛选出的O/W型微乳液用于抑菌实验。分别将大肠杆菌ATCC 25922和金黄色葡萄球菌ATCC 25923菌株在营养琼脂平板上进行活化,并挑选单个菌落接种至50mL NB培养基中,在37℃、

200 r/min 条件下培养 18 ~ 24 h。

参照 Xu 等^[12]的微量肉汤稀释法,稍加修改后用于测定丁香酚微乳液的抑菌率。分别从不同组成的微乳液储备液中取 5、10、50 μL 的样品,加入 100 μL 的 $2 \times \text{MHB}$ 培养基中。然后,加入 50 μL 菌液,并用无菌水补齐至每个处理总体积 200 μL ,使得丁香酚最终质量分数为 0.05%、0.10% 或 0.50%。混匀后,将酶标板于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18 ~ 24 h。其中无菌水代替微乳液作为生长对照,MHB 培养基作为空白对照,培养结束后,于 625 nm 处测定吸光度,并计算抑菌率。实验重复 3 次。抑菌率计算见式(1)。

$$\text{抑菌率} = \frac{(A - A_0) - (A_x - A_0)}{A - A_0} \times 100\% \quad (1)$$

式(1)中, A 为生长对照的吸光度, A_0 为空白对照的吸光度, A_x 为待测样品的吸光度。

1.4 数据处理

采用 Origin 2023 软件绘制相图并以 Adobe Photoshop 2021 计算 A_t ,利用 IBM SPSS Statistics 23 中单因素方差分析和邓肯检验对数据进行显著性分析, $P < 0.05$ 为显著相关。

2 结果与讨论

2.1 丁香酚微乳液的相行为分析

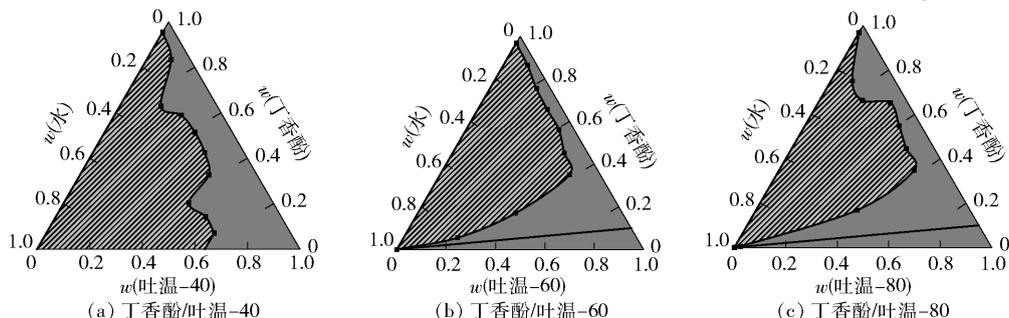
2.1.1 表面活性剂对微乳液相行为的影响

能够形成无限稀释通道的微乳液称为 U 型微乳液,适合在食品工业中应用^[6]。通常用无限稀释通道数量来筛选增溶效果好的表面活性剂和助表面活性剂^[13]。本研究以吐温-40、吐温-60 和吐温-80

作为表面活性剂制备丁香酚微乳液,得到拟三元相图(图 1)。吐温-40 不能形成无限稀释通道,吐温-60 和吐温-80 均能形成 U 型微乳液,其 A_t 分别为 39.7% 和 46.7%。罗伟斌等^[14]也得出了相似结论,吐温系列表面活性剂都具有 20 个环氧乙烷甲基,但疏水链的长度、脂肪酸类型和酯化程度不同,因此使用吐温-40、吐温-60 和吐温-80 制备得到的单相微乳面积各不相同。此外,吐温-80 中的非极性尾是不饱和且扭曲的,非极性链上存在双键,这种情况下能够制备出液滴尺寸较小的微乳液^[15]。因此,后续实验选择吐温-60 和吐温-80 作为表面活性剂,以进一步研究助表面活性剂对丁香酚的增溶作用。

2.1.2 助表面活性剂对微乳液相行为的影响

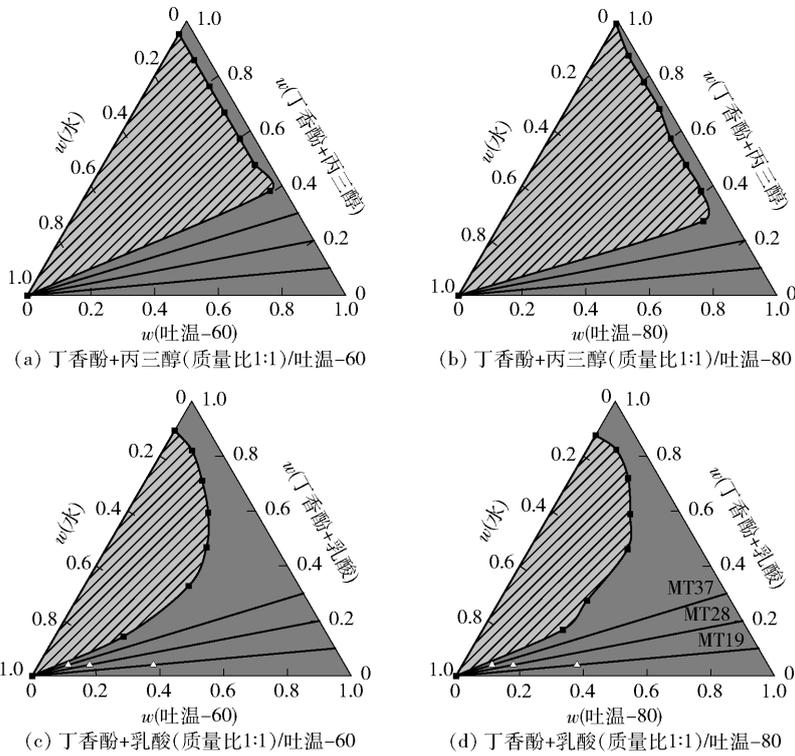
选择饮料中允许添加的乳酸和丙三醇为助表面活性剂,分别与丁香酚混合(质量比 1:1)作为油相,研究助表面活性剂对丁香酚微乳液相行为的影响(图 2)。结果发现,丙三醇和乳酸均能增加丁香酚微乳液的无限稀释通道。但是,添加丙三醇的拟三元相图中 A_t 与不含丙三醇的微乳液接近,说明丙三醇的增溶作用不明显。与之相反,乳酸表现出较好的增溶效果,丁香酚+乳酸/吐温-60 微乳液和丁香酚+乳酸/吐温-80 微乳液的 A_t 分别为 62.2% 和 63.1%。Spermath 等^[16]报道了短链有机酸作为助表面活性剂对 U 型微乳液形成的影响,发现丙酸的增溶效果最好,这可能是由于丙酸可降低体系黏度和液面张力,提高流动性,从而调节水相、油相在界面的分布^[17]。乳酸和丙酸类似,碳链长度相同,且具有一个亲水基团羟基,因此,乳酸对丁香酚也呈现了明显的增溶效果。丙三醇的亲水性



斜线区域为双相区;深灰色区域为微乳液单相区,单相区中直线表示无限稀释通道。图(a)~图(c)中单相微乳液面积(A_t)分别为 35.4%、39.7% 和 46.7%。

图 1 吐温对丁香酚微乳液相行为的影响

Fig. 1 Effects of Tween on phase behavior of eugenol microemulsions



斜线区域为双相区;深灰色区域为微乳液单相区,单相区中直线表示无限稀释通道。图(a)~图(d)中单相微乳液面积(A_1)分别为45.6%、35.8%、62.2%、63.1%。

图2 助表面活性剂类型对丁香酚微乳液相行为的影响

Fig. 2 Effect of cosurfactant type on phase behavior of eugenol microemulsions

更好,因此与表面活性剂疏水链之间的相容性变差,所以对丁香酚的增溶效果不如乳酸。因此,选取乳酸研究助表面活性剂含量对丁香酚微乳液相行为的影响。

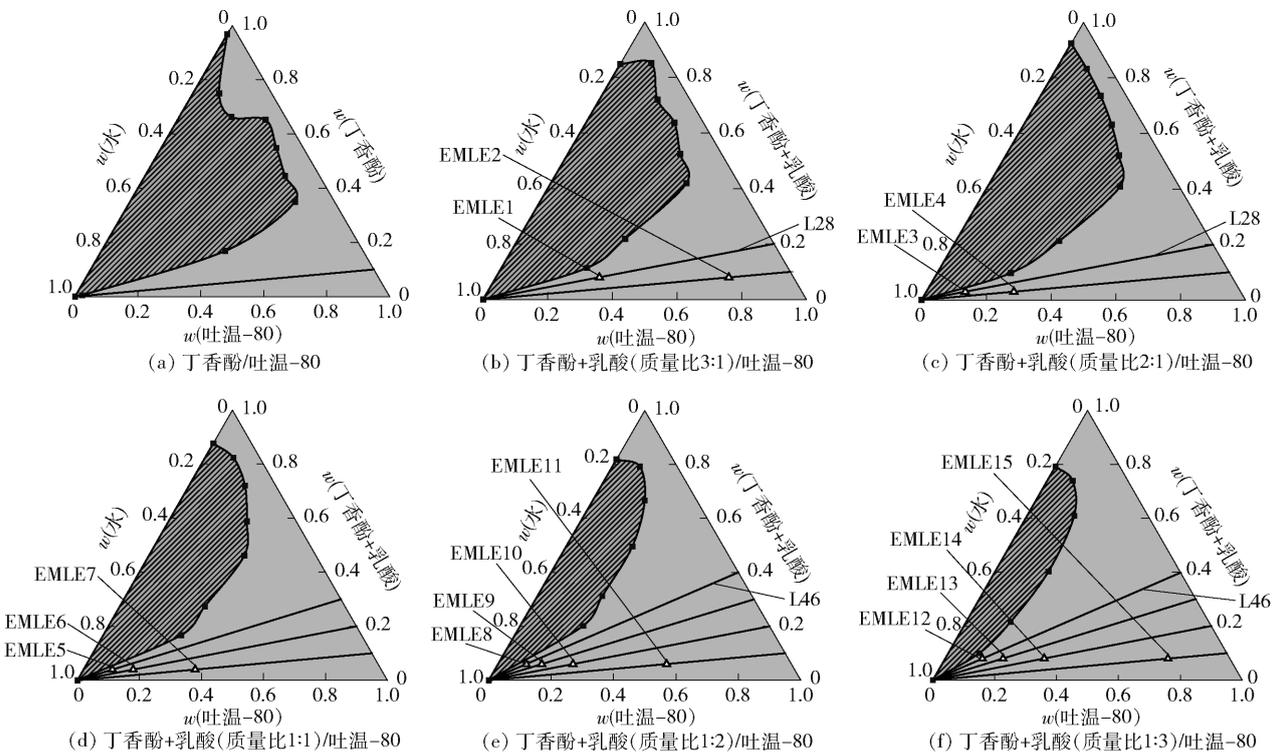
2.1.3 乳酸添加量对微乳液相行为的影响

在微乳液的形成过程中,调整助表面活性剂含量可以进一步实现增溶^[18]。将丁香酚与乳酸以不同质量比(1:1、1:2、1:3、2:1、3:1)混合后为油相,分析乳酸添加量对丁香酚微乳液相行为的影响,结果见图3。由图3可知,未添加乳酸的微乳液 A_t 最小为46.7% [图3(a)],而添加了乳酸的微乳液 A_t 为52.0%~78.8% [图3(b)~图3(f)],说明添加乳酸能起到明显的增溶效果。微乳液单相区面积随着乳酸添加量的增加而明显增大,丁香酚与乳酸质量比为3:1和2:1时,微乳液单相区面积增加到50%以上,且在油相与吐温-80质量比为2:8时产生稀释通道[图3(b)和图3(c)中的L28];丁香酚与乳酸质量比为1:2和1:3时, A_t 分别增大到72.3%和78.8%,且出现了油相与吐温-80质量比为4:6的稀释通道[图3(e)和图3(f)中的L46]。

丁香酚+乳酸/吐温-60微乳液的相行为见图4。与丁香酚+乳酸/吐温-80体系相似,添加乳酸可以有效增溶丁香酚,且增溶效果与乳酸比例有关。当丁香酚与乳酸质量比为1:1时,拟三元相图中产生了3条可无限稀释通道[图4(d)],即在這些通道上无论如何改变水相占比,体系均为微乳液。然而,随着乳酸比例进一步地提高,水角附近的非微乳区域面积增加,微乳液被破坏[图4(e)~图4(f)]。Spernath等^[16]认为在微乳液的构建中,短链有机酸发挥了助表面活性剂和助溶剂的双重作用。本课题组前期研究也报道了,乙酸乙酯作为助溶剂对美藤果油U型微乳液的扩溶作用,并且助溶剂的含量越高,增溶效果越好^[18]。

2.2 丁香酚微乳液的外观、类型和粒径分析

根据微乳液相行为结果,从图3和图4的拟三元相图无限稀释通道上选择18个不同组分的丁香酚微乳液(丁香酚质量分数为2%)进行表征,结果见图5。这些微乳液均呈现澄清、透明和均一的外观特征。粒径测定结果显示,18个体系的平均粒径没有明显差异,在9~37 nm。一般认为,基于吐温



斜线区域为双相区;深灰色区域为微乳液单相区,单相区中直线表示无限稀释通道。图(a)~图(f)中单相微乳液面积(A_t)分别为46.7%、52.2%、52.0%、63.1%、72.3%和78.8%。

图3 丁香酚+乳酸/吐温-80微乳液的拟三元相图

Fig. 3 Pseudo-ternary phase diagram of eugenol + lactic acid/Tween-80 microemulsions

体系的微乳液粒径小于100 nm时,体系具有良好的分散性^[19],说明本研究构建的微乳液适合作为丁香酚的运载体系。微乳液的多分散指数PDI较小(0.12~0.25),而且在高低温条件下保存后均未发现相分离现象,说明体系稳定性较好。图5(a)为染色结果,苏丹红不能马上扩散,证明测试的不同组分的丁香酚微乳液体系均为O/W型微乳液^[10]。图5(b)为代表性O/W型微乳液样品EMLE12的透射电镜分析,微乳颗粒呈现球状或类球状,表面光滑。O/W型微乳液能够在水相中溶解,并且能长效维持其包埋的活性物质的抗菌活性^[20]。因此,选用这18组分散性、稳定性较好的O/W型丁香酚微乳液用于后续抑菌性能研究。

2.3 丁香酚微乳液的抑菌性能分析

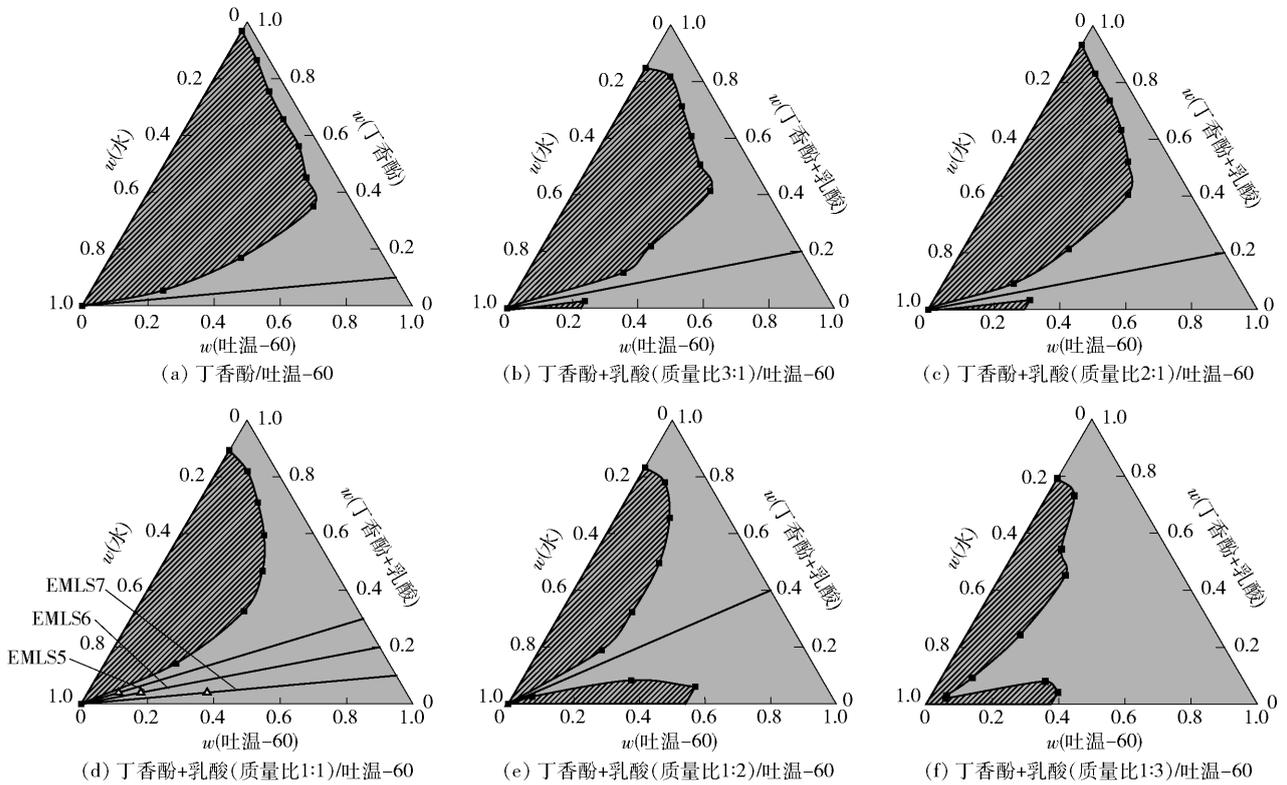
基于微乳液的相行为和理化特征数据,选取稳定的O/W型丁香酚微乳液,探索吐温、乳酸等因素对微乳液抑菌性能的影响,从而筛选出兼具可无限稀释和强抑菌特性的微乳液。

2.3.1 吐温对微乳液抑菌性能的影响

微乳液组分通常会影响精油的抑菌活性^[7],研

究选取丁香酚与乳酸(质量比1:1)为油相,吐温-60(EMLS5~7)或吐温-80(EMLE5~7)为表面活性剂,分析吐温种类和含量对丁香酚微乳液抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌效果的影响,结果如图6。当丁香酚质量分数为0.1%时,随着吐温含量的减少,2种丁香酚微乳液对受试细菌的抑菌率呈不同程度的增加。当油相与吐温质量比为3:7时,2种微乳液在丁香酚质量分数为0.10%时均完全抑制了大肠杆菌的生长。在其他报道里也发现了类似的现象,Nielsen等^[21]在实验室培养基中添加了质量分数0.1%的吐温-80后提高了金黄色葡萄球菌分批培养的生长速度,也增加了金黄色葡萄球菌的菌膜形成量。刘继^[22]在研究吐温-80对肉桂精油抑菌效果的影响中发现,吐温-80能够极大地提高*Mortierella* sp.对肉桂精油的耐药性,这可能是由于吐温-80可以作为碳源为细菌提供生长所需的元素^[23]。

另外,油相与吐温-80质量比为2:8时,吐温-80体系能完全抑制金黄色葡萄球菌。因此,选择吐温-80作为表面活性剂进一步研究乳酸对微乳液抑菌性能的影响。



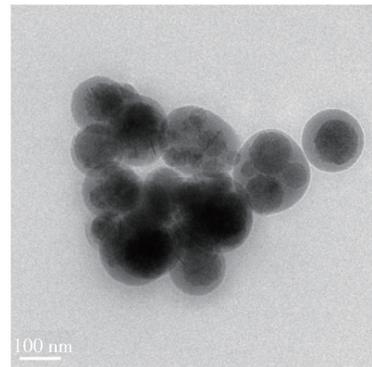
斜线区域为双相区；深灰色区域为微乳液单相区，单相区中直线表示无限稀释通道。图(a)~图(f)中单相微乳液面积(A_1)分别为39.7%、53.1%、55.3%、62.2%、67.5%和76.1%。

图4 丁香酚 + 乳酸/吐温-60 微乳液的拟三元相图

Fig. 4 Pseudo-ternary phase diagram of eugenol + lactic acid/Tween-60 microemulsions



(a) 苏丹红染色结果



(b) 透射电镜结果(EMLE12)

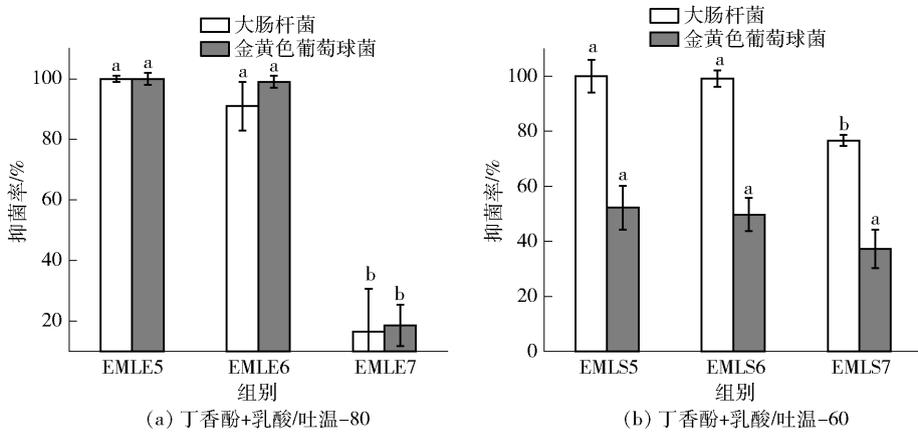
图5 O/W型丁香酚微乳液的形态特征

Fig. 5 Morphological characteristics of eugenol-based O/W type microemulsions

2.3.2 乳酸对微乳液抑菌性能的影响

表1为乳酸添加量对丁香酚 + 乳酸/吐温-80体系抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌效果的影响。所有的处理在丁香酚质量分数为0.10%时均能不同程度地抑制2种受试细菌。但是,在丁香酚与乳酸质量比为3:1和2:1时,质量分数0.05%丁香酚的微乳液均无法完全抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球

菌,其中,乳酸比例高且吐温含量低的2个体系对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌率可达90%和50%左右。当丁香酚与乳酸质量比为1:3时,油相与吐温-80质量比为4:6和3:7的2个体系,在丁香酚质量分数0.05%时均可完全抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌。乳酸可通过增强细菌细胞膜通透性,破坏菌体的膜结构和胞内结构,从而发挥抗菌作



不同小写字母表示不同处理组对同种细菌的抑菌率差异显著 ($P < 0.05$)。

图6 吐温对丁香酚微乳液抑菌效果的影响

Fig. 6 Effect of Tween on antibacterial effects of eugenol-based microemulsions

表1 乳酸添加量对丁香酚微乳液抑菌效果的影响

Tab. 1 Effect of lactic acid content on antibacterial effects of eugenol-based microemulsions

组别	微乳组成质量比		w (丁香酚)/ %	抑菌率/%	
	m (丁香酚): m (乳酸)	m (油相): m (吐温-80)		大肠杆菌	金黄色葡萄球菌
EMLE1	3:1	2:8	0.05	38.4 ± 3.2 ^a	8.6 ± 1.3 ^a
			0.10	83.5 ± 3.2 ^b	76.6 ± 2.7 ^b
EMLE2	3:1	1:9	0.05	18.4 ± 8.0 ^a	—
			0.10	36.7 ± 4.2 ^b	47.8 ± 2.6
EMLE3	2:1	2:8	0.05	38.1 ± 6.8 ^a	37.8 ± 3.5 ^a
			0.10	99.0 ± 2.8 ^b	96.4 ± 4.3 ^b
EMLE4	2:1	1:9	0.05	13.3 ± 4.3 ^a	17.6 ± 6.1 ^a
			0.10	46.0 ± 1.2 ^b	72.3 ± 1.6 ^b
EMLE5	1:1	3:7	0.05	51.0 ± 9.6 ^a	55.0 ± 9.6 ^a
			0.10	100.0 ± 1.0 ^b	100.0 ± 1.8 ^b
EMLE6	1:1	2:8	0.05	49.0 ± 5.1 ^a	30.3 ± 4.1 ^a
			0.10	91.0 ± 8.0 ^b	99.0 ± 2.0 ^b
EMLE7	1:2	1:9	0.05	10.7 ± 7.2 ^a	—
			0.10	6.7 ± 2.8 ^a	18.6 ± 6.8
EMLE8	1:2	4:6	0.05	84.6 ± 3.0 ^a	47.7 ± 5.3 ^a
			0.10	99.0 ± 0.1 ^b	100.0 ± 0.6 ^b
EMLE9	1:2	3:7	0.05	90.0 ± 1.2 ^a	47.1 ± 5.1 ^a
			0.10	99.0 ± 0.1 ^b	99.0 ± 1.0 ^b
EMLE10	1:3	2:8	0.05	81.8 ± 2.0 ^a	47.8 ± 5.0 ^a
			0.10	100.0 ± 0.1 ^b	99.0 ± 1.0 ^b
EMLE11	1:3	1:9	0.05	39.7 ± 8.1 ^a	60.8 ± 2.9 ^a
			0.10	100.0 ± 0.2 ^b	100.0 ± 0.7 ^b
EMLE12	1:3	4:6	0.05	99.0 ± 0.2 ^a	100.0 ± 2.8 ^a
			0.10	100.0 ± 0.1 ^a	100.0 ± 0.7 ^a
EMLE13	1:3	3:7	0.05	100.0 ± 0.4 ^a	100.0 ± 4.8 ^a
			0.10	100.0 ± 0.1 ^a	99.0 ± 0.8 ^a
EMLE14	1:3	2:8	0.05	90.5 ± 7.9 ^a	100.0 ± 3.3 ^a
			0.10	100.0 ± 0.1 ^a	99.0 ± 0.8 ^a
EMLE15	1:3	1:9	0.05	60.0 ± 5.1 ^a	96.7 ± 4.0 ^a
			0.10	100.0 ± 0.1 ^b	100.0 ± 0.7 ^a

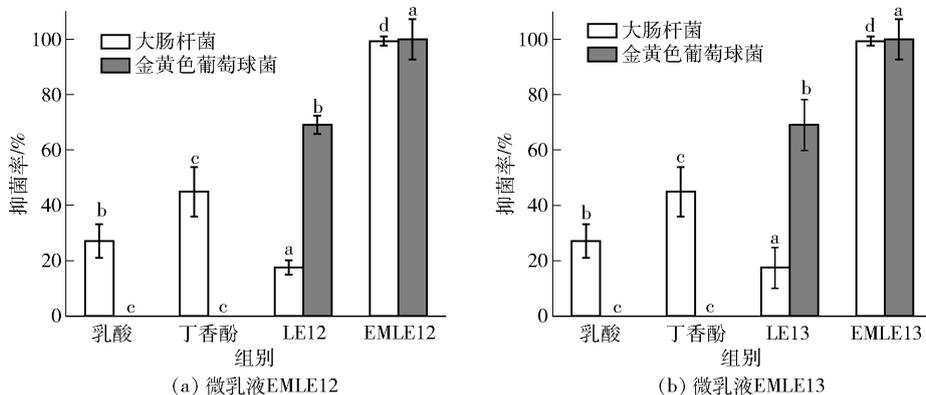
“—”代表没有抑菌作用;不同小写字母表示相同微乳液组成质量比、不同丁香酚质量分数时抑菌率差异显著 ($P < 0.05$)。

用^[24];当乳酸以适当比例添加到微乳液中时,推测它可能与丁香酚产生协同抗菌作用。

2.3.3 微乳液对丁香酚抑菌的促进作用

根据2.3.2节的结果,选择质量分数0.05%丁香酚的2个体系(EMLE12和EMLE13),以体系的单组分为对比,研究微乳液对丁香酚抑菌的促进作用,结果见图7。从图7可以看出,EMLE12和EM-

LE13可以完全抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的生长,各单组分抑菌率均低于69.1%。这一结果说明,在吐温含量低且乳酸比例高的丁香酚微乳液中,微乳液呈现了不同程度的促进抑菌作用。同样,Zhang等^[6]在研究单甘油月桂酸酯/乙醇/乳酸钠/吐温-20微乳液时,发现其抑菌效果显著高于单一组分的抑菌效果。



微乳液EMLE12、EMLE13的 $m(\text{油相}):m(\text{吐温}-80)$ 分别为4:6、3:7,油相中 $m(\text{丁香酚}):m(\text{乳酸})=1:3$;LE12、LE13为以水替代丁香酚后的溶液。不同小写字母表示不同处理组对同种细菌的抑菌率差异显著($P < 0.05$)。

图7 丁香酚+乳酸/吐温-80微乳液及其单组分的抑菌效果

Fig. 7 Antibacterial effects of eugenol + lactic acid/Tween-80 microemulsions and its single component

3 结论

解析了食品级表面活性剂和助表面活性剂对丁香酚微乳液特性的影响,发现以吐温-60或吐温-80作为表面活性剂时可以形成U型微乳液,而且乳酸这一助表面活性剂含量的增加可以明显增溶丁香酚。抑菌实验结果显示,微乳液体系中吐温含量的减少或乳酸比例的增加均有助于提高丁香酚的抑菌性能;当油相 $m(\text{丁香酚}):m(\text{乳酸})=1:3$ 与吐温-80质量比为4:6和3:7时,丁香酚的抑菌效果明显受到促进。这一丁香酚微乳液组分与抑菌率关系的发现,可为制备兼具可无限稀释和强抑菌特性的微乳液提供一定的理论基础,扩大丁香酚这一重要食品添加剂的应用范围。在未来研究中,可从细胞壁膜特征、抗菌靶点发掘等角度分析丁香酚微乳液的抑菌机理,从而为丁香酚在食品抑菌保鲜领域的应用提供更多数据支持。

参考文献:

[1] 刘锦渊,刘晓丽,夏文水. 负载丁香酚的改性纳米粒

对玉米醇溶蛋白膜性能的影响[J]. 食品科学技术学报, 2023, 41(5): 123-135.

LIU J Y, LIU X L, XIA W S. Effects of modified nanoparticles loaded with eugenol on properties of zein films [J]. Journal of Food Science and Technology, 2023, 41(5): 123-135.

[2] PAVONI L, PERINELLI D R, BONACUCINA G, et al. An overview of micro- and nanoemulsions as vehicles for essential oils: formulation, preparation and stability [J]. Nanomaterials, 2020, 10(1): 135.

[3] BHARGAVA K, CONTI D S, DA ROCHA S R P, et al. Application of an oregano oil nanoemulsion to the control of foodborne bacteria on fresh lettuce [J]. Food Microbiology, 2015, 47: 69-73.

[4] WANG Y F, ZHANG Q, BIAN W Y, et al. Preservation of traditional Chinese pork balls supplemented with essential oil microemulsion in a phase-change material package [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020, 100(5): 2288-2295.

[5] MA Q M, ZHONG Q X. Incorporation of soybean oil improves the dilutability of essential oil microemulsions [J]. Food Research International, 2015, 71: 118-125.

- [6] ZHANG H, SHEN Y, BAO Y, et al. Characterization and synergistic antimicrobial activities of food-grade dilution-stable microemulsions against *Bacillus subtilis* [J]. Food Research International, 2008, 41(5): 495–499.
- [7] MA Q M, DAVIDSON P M, ZHONG Q X. Antimicrobial properties of microemulsions formulated with essential oils, soybean oil, and Tween 80 [J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 226: 20–25.
- [8] NETO M C S, DE ABREU COSTA M L V, SILVA FIALHO P H, et al. Development of chlorhexidine digluconate and *Lippia sidoides* essential oil loaded in microemulsion for disinfection of dental root canals: substantivity profile and antimicrobial activity [J]. AAPS PharmSciTech, 2020, 21(8): 302.
- [9] GAYSINSKY S, TAYLOR T M, DAVIDSON P M, et al. Antimicrobial efficacy of eugenol microemulsions in milk against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 [J]. Journal of Food Protection, 2007, 70(11): 2631–2637.
- [10] 宋晓秋, 王丽萍, 孙月, 等. 薰衣草精油微乳体系的相行为、微观结构转变和清除自由基活性[J]. 食品科学, 2019, 40(15): 78–83.
- SONG X Q, WANG L P, SUN Y, et al. Phase behavior, microstructure transformation and free radical scavenging activity of lavender essential oil microemulsion systems [J]. Food Science, 2019, 40(15): 78–83.
- [11] HE S K, REN X Y, LU Y F, et al. Microemulsification of clove essential oil improves its *in vitro* and *in vivo* control of *Penicillium digitatum* [J]. Food Control, 2016, 65: 106–111.
- [12] XU S X, NI Z D, MA L Y, et al. Control of *Alternaria* rot of cherry tomatoes by food-grade *Laurus nobilis* essential oil microemulsion [J]. Journal of Food Safety, 2017, 37(1): e12286.
- [13] 刘君, 王雅娟, 李兴贞, 等. 吐温/短链醇/丁酸乙酯/水微乳体系相行为及微观结构[J]. 中国食品学报, 2022, 22(11): 77–87.
- LIU J, WANG Y J, LI X Z, et al. The phase behavior and microstructures of Tween 80/short-chained alcohol/ethyl butyrate/water microemulsion system [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(11): 77–87.
- [14] 罗伟斌, 曹扬建, 吴尔文, 等. 凉粉草精油微乳液抗氧化和抗 A375 细胞增殖活性[J]. 食品科学, 2022, 43(9): 1–9.
- LUO W B, CAO Y J, WU E W, et al. Antioxidant activity of *Mesona chinensis* Benth. essential oil microemulsion and its anti-proliferative activity against A375 cells [J]. Food Science, 2022, 43(9): 1–9.
- [15] GHOSH V, MUKHERJEE A, CHANDRASEKARAN N. Eugenol-loaded antimicrobial nanoemulsion preserves fruit juice against, microbial spoilage [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2014, 114: 392–397.
- [16] SPERNATH A, ASERIN A, GARTI N. Fully dilutable microemulsions embedded with phospholipids and stabilized by short-chain organic acids and polyols [J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2006, 299(2): 900–909.
- [17] 吴红艳, 孙长豹, 刘宁. 月见草油微乳的制备及工艺优化 [J]. 粮食与油脂, 2015, 28(9): 31–35.
- WU H Y, SUN C B, LIU N. Preparation and optimization of evening primrose oil microemulsion system [J]. Cereals and Oils, 2015, 28(9): 31–35.
- [18] SONG X Q, WANG J Y, LI S T, et al. Formation of sacha inchi oil microemulsion systems: effects of non-ionic surfactants, short-chain alcohols, straight-chain esters and essential oils [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2022, 102(9): 3572–3580.
- [19] ZAHIM R, LIANG H, YUAN Q P, et al. Improving the antimicrobial activity of D-limonene using a novel organogel-based nanoemulsion [J]. Food Control, 2015, 50: 554–559.
- [20] SHI W W, YAN R X, HUANG L Q. Preparation and insecticidal performance of sustained-release cinnamon essential oil microemulsion [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2022, 102(4): 1397–1404.
- [21] NIELSEN C K, KJEMS J, MYGIND T, et al. Effects of Tween 80 on growth and biofilm formation in laboratory media [J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1878.
- [22] 刘继. 仔姜采后保鲜技术及病害防治措施研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2014: 79–81.
- LIU J. Study on preservation technologies and control of pathogens during baby ginger storage period [D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2014: 79–81.

[23] XU R W, ZHANG Z, WANG L P, et al. Surfactant-enhanced biodegradation of crude oil by mixed bacterial consortium in contaminated soil [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2018, 25(15): 14437 - 14446.

[24] WANG C J, CHANG T, YANG H, et al. Antibacterial mechanism of lactic acid on physiological and morphological properties of *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* [J]. *Food Control*, 2015, 47: 231 - 236.

Phase Behavior and Antibacterial Activity of Food-Grade Eugenol-Based Microemulsions

WANG Yifei¹, LIU Xinyue¹, SONG Xiaoqiu¹, YANG Xiaobo¹, ZHOU Tongfei¹,
JIN Jiahong¹, YE Lin^{1,*}, HE Shoukui^{2,*}

(1. School of Perfume and Aroma Technology, Shanghai Institute of Technology, Shanghai 201418, China;
2. School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: To improve the hydrophilicity and antibacterial activity of eugenol, infinitely dilutive microemulsions of eugenol were constructed with Tween as the surfactant and lactic acid as the co-surfactant. The antibacterial activities of eugenol before and after micro-emulsification against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were also investigated. The results of the pseudo-ternary phase diagrams showed that compared with Tween-40 and Tween-60, Tween-80 was more effective to increase the area of microemulsion single phase. The solubilization effect of lactic acid was improved with the increase lactic acid concentrations. When the mass ratio of eugenol and lactic acid was 1:3, the area of eugenol microemulsion single phase was expanded to 78.8%. In the antibacterial activity test, the lower the Tween-80 content, the higher the lactic acid content in a certain scope, and the higher the antibacterial activity of eugenol microemulsions. When eugenol, lactic acid and Tween-80 was at a mass ratio of 1:3:6 in the microemulsion, the growth of two tested bacteria was completely inhibited at eugenol with a mass fraction of 0.05%. Moreover, the antibacterial activity of the complex system was significantly higher than that of single eugenol microemulsion without lactic acid. Therefore, microemulsions developed in this study could provide a feasible formulation for enhancing solubility and antibacterial effect of eugenol, and were expected to be used in the field of food antiseptis and preservation.

Keywords: eugenol; lactic acid; microemulsion; phase behavior; antibacterial activity

(责任编辑:张逸群)