

溶膠-凝膠法製備含檸檬烯抑菌粒子的檸檬烯含量及其抑菌效果之探討

劉佳玲* 曾煒哲

實踐大學食品營養與保健生技學系

10462 台北市大直街 70 號

*c11@g2.usc.edu.tw

摘要

近年來，人們對食品安全的議題非常關注，常在食品中使用天然精油作為抑菌成分來抑制食品中微生物生長，以滿足消費者對食品品質及安全性的期望，來達到延長食品保存期限之目的。本研究目的是使用溶膠-凝膠法 (Sol-Gel) 製備出具有揮發性檸檬烯 (Limonene) 之抑菌粒子，在製備過程中探討此抑菌粒子的檸檬烯含量及對 *Escherichia coli* 的抑菌效果。試驗使用聚乙烯醇 (Polyvinyl alcohol, PVA) 和四乙氧基矽烷 (Tetraethoxysilane, TEOS) 進行溶膠-凝膠法，來製備具有揮發性物質檸檬烯之抑菌粒子，用氣相層析儀 (Gas chromatography, GC) 分析抑菌粒子中檸檬烯的含量，並使用變異數分析 (Analysis of variance, ANOVA) 及多元迴歸分析 (Multiple regression analysis) 來探討參數對檸檬烯含量之關係，再將檸檬烯抑菌粒子以揮發擴散方式得到抑菌圈大小及抑制率來評估 *Escherichia coli* 的抑菌效果。試驗結果將檸檬烯含量用多元迴歸分析 PVA/TEOS 比例、反應溫度及檸檬烯添加濃度三變量試驗而得到最好的製備條件，亦即是 PVA/TEOS 比例 1 : 6.24、反應溫度 60°C 及檸檬烯添加濃度 100% (v/v)，依迴歸方程式預測此條件抑菌粒子中最多有 0.94% 的檸檬烯含量，經試驗驗證後得到檸檬烯含量為 0.90% 與預估值的相對偏差為 2.17%。抑菌試驗方面：試驗證明利用溶膠-凝膠法製備出來的檸檬烯抑菌粒子對 *Escherichia coli* 可以有效達到抑菌效果，期望未來能應用在食品包裝上並延長食品的保存期限。

關鍵詞：溶膠-凝膠法，檸檬烯，抑菌粒子，多元迴歸

Preparation of Limonene-Containing Particles with Antibacterial Property Using the Sol-Gel Method

CHIA-LING LIU* and WEI-CHE TSENG

Department of Food Science, Nutrition, and Nutraceutical Biotechnology, Shih Chien University

No. 70 Ta-Chih Street, Taipei 10462, Taiwan, R. O. C.

*c11@g2.usc.edu.tw

ABSTRACT

In contemporary times, many people are concerned about food safety issues. Natural essential oils are widely used as antibacterial ingredients to inhibit microbial growth in foods and fulfil consumer expectations regarding food quality and safety and to extend the shelf life of food. In this study, the objective was to prepare antibacterial particles containing volatile limonene by using the sol-gel method and to investigate their antibacterial effect on *Escherichia coli*. Polyvinyl alcohol (PVA) and tetraethoxysilane (TEOS) were used in the sol-gel process to form a gel network structure to prepare limonene particles. Limonene and gas chromatography were used to analyze volatilization of the particles. Analysis of variance and multiple regression analysis were used to investigate the solubility and volatilization properties of limonene and to determine the optimal conditions for preparing antibacterial particles. The antibacterial effect of limonene against *Escherichia coli* was determined by measuring the inhibition zones of limonene particles. Multiple regression analysis of the three variables revealed an optimized condition when the particles were prepared using PVA and TEOS in the ratio 1:6.24, a reaction temperature of 60°C, and limonene concentration of 100% (v/v). According to the regression equation, nearly 0.94% of limonene was released from the particles, and after verification, the amount of limonene released was nearly 0.90%. In summary, the limonene-containing particles prepared using the sol-gel method exhibit effective antibacterial properties against *Escherichia coli*. The results of this study can be applied to food packaging and to extend the shelf life of food.

Key words: Sol-Gel method, limonene, antibacterial particles, multiple regression

一、前言

近年來，食品中使用精油作為天然抑菌物質已經引起人們對食品品質和安全性的期望 [10]，同時隨著食品包裝技術的日益成長，發展出各種新型的包裝技術如活性包裝及智慧型包裝技術，其功能有防止水分流失、控制呼吸速率、抑制微生物生長等，來達到延長食品的保存期限之目的。根據歐盟食品接觸材質規範（Regulation EC No. 1935/2004）內容來定義活性包裝與智慧型包裝。「活性包裝」是指為了增加食品保存期限或維持與增進食品品質，包裝材料會釋放某些物質在食品中來延長保存期限。「智慧型包裝」則是指能顯示食物狀況或監測包裝內環境變化的材料 [12]。抑菌包裝屬於「活性包裝」中的一種，可用於抑制或殺死包裝內微生物藉以延長食品的保存期限並增加食品安全性 [9]。檸檬烯（Limonene）是從柑橘類水果中提取的主要風味成分，被美國食品藥物管理局（FDA）列為是一般安全的食品（GRAS），同時被批准為食品添加劑，檸檬烯也被證實有抑菌活性 [18, 2]。Minelli等人[7]於2010年研究中使用有機的聚乙烯醇（Polyvinyl alcohol, PVA）和無機的四乙氧基矽烷（Tetraethoxysilane, TEOS）作為試劑並進行溶膠-凝膠法技術（Sol-gel technique）成功的製備出薄膜，接著Corradini等人 [3]與Lantano等人 [5]分別於2013及2014年研究中分別使用PVA與TEOS進行溶膠-凝膠法技

術來製備含有溶菌酶（Lysozyme）與納他黴素（Natamycin）的抑菌薄膜，結果顯示這兩種抑菌薄膜都具有抑制微生物的能力，研究中也提到製備條件會被PVA與TEOS相對量所影響，造成抑菌薄膜的抑菌能力降低。因此，本研究目的使用溶膠-凝膠法來製備具有揮發性物質檸檬烯之抑菌粒子，並以氣相層析儀（Gas chromatography, GC）分析抑菌粒子中檸檬烯的含量，藉此了解不同製備條件下檸檬烯抑菌粒子的檸檬烯含量或抑制率之差異，同時也利用ANOVA與多元回歸分析找出最好之製備條件，並探討檸檬烯抑菌粒子對大腸桿菌的抑菌效果。期此檸檬烯抑菌粒子未來可應用在食品包裝上，以延長食品之保存期限。

二、材料與方法

（一）試驗材料

Polyvinyl alcohol (PVA) 購自 Sigma-Aldrich 公司 (USA)，Tetraethoxy orthosilicate (TEOS) 購自 Sigma-Aldrich 公司 (USA)，(R)-(+)-limonene 97% 購自 Sigma-Aldrich 公司 (USA)，Ethanol (99.5%) 購自島久藥品株式會社 (Japan)，Hydrochloric acid 購自島久藥品株式會社 (Japan)，Plate Count Agar 購自 Becton 公司 (USA)，Nutrient Agar 購自 Becton 公司 (USA)，Nutrient Broth 購

自 Becton 公司 (USA)，Tween 20 購自關東化學株式會社 (Japan)，Glycerol 購自關東化學株式會社 (Japan)。

(二) 試驗方法

1. 溶膠-凝膠溶液之製備

本試驗使用四乙氧基矽烷 (Tetraethoxysilane, TEOS) 作為無機相前趨物，以鹽酸為催化劑，水和乙醇作為溶劑，將上述混合而成之溶液進行溶膠-凝膠反應 (Sol-gel reaction)，之後添加有機聚乙烯醇 (Polyvinyl alcohol, PVA)，使其形成PVA/TEOS混合溶液。首先，取定量之蒸餾水80 mL置於250 mL燒杯中，同時加入6 g (6.42 mL) 之TEOS與乙醇(添加量為TEOS量之20%)，並放入磁石，之後使用1M鹽酸將此溶液的pH值調整到2，升溫至40°C並以400 rpm之轉速持續攪拌30min使TEOS溶液混合均勻。將溶液升溫至85°C，15min之後添加1.5 g的聚乙烯醇於溶液中，以400 rpm之轉速持續攪拌1小時，使聚乙烯醇完全溶解，再將溶液冷卻至室溫，而得PVA/TEOS混合溶液，於室溫下儲存備用。

2. 抑菌粒子之製備

將製備完成的PVA/TEOS混合溶液，分別添加檸檬烯0.66 mL、1.36 mL、4.15 mL 及6.94 mL的量與1.5% (v/v) 濃度的乳化劑 (Tween 20)，並放入磁石，以500 rpm轉速在25°C下進行攪拌5min，使檸檬烯均勻分散於其中，並成為抑菌粒子溶液。取約10 mL抑菌粒子溶液至培養皿 (90 mm) 當中，利用真空乾燥機進行4小時的真空乾燥後，用不鏽鋼研磨機磨碎，最後形成抑菌粒子。

3. 探討製備條件對抑菌粒子中檸檬烯之影響

(1) PVA/TEOS比例對抑菌粒子中檸檬烯之影響

試驗先進行單因子試驗，製備條件分別為反應溫度60°C、檸檬烯添加量為4.15 mL及乳化劑添加量1.5% (v/v)，來探討不同PVA/TEOS比例對抑菌粒子中檸檬烯含量與抑制率的影響，並參考多元迴歸分析進行試驗設計，將PVA/TEOS比例的範圍設計成1:1.76、1:4、1:6.24，再換算成添加1.5 g的PVA與2.64 g、6 g、9.36 g的TEOS進行製備，並對抑菌粒子進行檸檬烯含量測定與抑菌試驗。

(2) 反應溫度對抑菌粒子中檸檬烯之影響

製備溶膠-凝膠法過程中反應溫度對抑菌粒子的大小具有影響，在2002年Kim與Kim [4]兩人的共同研究中說明了當反應溫度越高，可形成的抑菌粒子越小。試驗先進行單因子試驗，製備條件分別為PVA/TEOS比例1:4、檸檬烯

添加量為4.15 mL及乳化劑添加量1.5% (v/v)，來探討反應溫度對抑菌粒子中檸檬烯含量與抑制率的影響，並參考多元迴歸分析進行試驗設計，基於安全考量反應溫度不得太高，在許多文獻中使用的反應溫度約在15°C~85°C [3-5]，將反應溫度的範圍設計成27°C、60°C、93°C，並對抑菌粒子進行檸檬烯含量測定與抑菌試驗。

(3) 檸檬烯添加濃度對抑菌粒子中檸檬烯含量及抑菌效果之影響

本研究目的是使用溶膠-凝膠法來製備具有揮發性物質檸檬烯之抑菌粒子，而檸檬烯濃度就是一個主要變因，在預試驗中將添加4.15 mL 檸檬烯之抑菌粒子進行抑菌試驗，發現對大腸桿菌產生 39.8 ± 0.8 mm的抑菌圈直徑。因此先進行單因子試驗，製備條件分別為PVA/TEOS比例1:4、反應溫度60°C及乳化劑添加量1.5% (v/v)，來探討檸檬烯添加濃度對抑菌粒子中檸檬烯含量與抑制率的影響，檸檬烯添加的濃度以TEOS的量為基準，並參考多元迴歸分析進行試驗設計，將檸檬烯濃度的範圍設計成10.3% (v/v) (0.66 mL)、21.2% (v/v) (1.36 mL)、64.7% (v/v) (4.15 mL)、108.2% (v/v) (6.94 mL) 及119.1% (v/v) (7.6 mL)，並對抑菌粒子進行檸檬烯含量測定與抑菌試驗。

(4) 乳化劑添加量對抑菌粒子中檸檬烯之影響

2016年Su與Zhong [14]研究中使用Tween 20與酪蛋白酸鈉製備檸檬油 (lemon oil) 奈米乳液，結果發現使用0.4%~1.2% (w/v) 的Tween 20與2% (w/v) 的酪蛋白酸鈉可以增加檸檬油奈米乳液在15天內的穩定性。因此本試驗使用Tween 20當作乳化劑，並對乳化劑添加量進行單因子試驗，製備條件分別為PVA/TEOS比例1:4、反應溫度60°C及檸檬烯添加量為4.15 mL，將製備完成的PVA/TEOS混合液依預實驗時找出之0.38%等比例的量，分別加入0.75% (v/v)、1.13% (v/v)、1.5% (v/v)、1.88% (v/v) 的乳化劑，在常溫下均勻分散製備成抑菌粒子溶液，將其放置於真空乾燥機中進行4小時真空乾燥後，用不鏽鋼研磨機磨碎，最後形成抑菌粒子，探討乳化劑添加量對於抑菌粒子中檸檬烯的含量及抑菌試驗的影響。

4. 三變量多元迴歸對PVA/TEOS比例、反應溫度及檸檬烯濃度來探討檸檬烯含量及抑制率之條件

本試驗參考2005年Montgomery [8]中心組合設計 (Central composite design) 法，利用多元迴歸對PVA/TEOS比例、反應溫度及檸檬烯濃度進行三變量五水準的探討，

反應因子水準範圍分別是PVA/TEOS比例為1:1.76、1:2.67、1:4、1:5.33、1:6.24；反應溫度為27°C、40°C、60°C、80°C、93°C；檸檬烯添加濃度為10.3% (v/v)、32.3% (v/v)、64.7% (v/v)、97.1% (v/v)、119.1% (v/v)，PVA/TEOS比例以 X_1 表示，反應溫度(°C)以 X_2 表示，檸檬烯添加濃度(%)以 X_3 表示，反應條件組合如表5所示。將試驗結果反應值 Y_1 (檸檬烯含量%)及 Y_2 (抑制率%)分別使用SAS (Statistics Analysis System) 統計軟體進行分析。由試驗條件變異因子 (X_1)、(X_2) 及 (X_3) 之試驗組合，與反應值 (Y_1) 和 (Y_2) 所得知結果，探討三變量之間是否有交互作用及各變量對反應值之影響，最後針對PVA/TEOS比例、反應溫度及檸檬烯濃度三因子進行多元迴歸分析來找出抑菌粒子的製備條件。

5. 抑菌粒子中檸檬烯含量的測定方法

(1) 定量檸檬烯之標準曲線

本試驗參考 2005 年 Njoroge 等人 [11]之研究，使用氣相層析儀 (Gas chromatography, GC) 對檸檬烯進行測試 (GC 條件:管柱:DB wax column(30 m, 0.25 mm, 0.25 μ m)，偵測器:FID，偵測器溫度:250°C，注射溫度:300°C，氣體:氮氣，壓力:80.9 kpa，管柱升溫步驟:初始溫度 60°C (維持 2 min)，梯度 5°C/min，最終溫度 240°C (維持 10 min)，注射量:1 mL)，在 4.67 min 時可得出檸檬烯標準品的 GC 圖譜。檸檬烯稀釋濃度之標準曲線製作方法是使用 0.1 mL 的檸檬烯加入 9.9 mL 的乙醇中配製成 1% (v/v) 的檸檬烯，然後連續稀釋成 0.2% (v/v)、0.04% (v/v)、

0.008% (v/v) 及 0.0016% (v/v) 的濃度，並使用氣相層析儀進行分析，利用檸檬烯的稀釋濃度及波峰面積 (peak area) 求得標準曲線 (圖 1)，其公式如下所示：

$$Y=4E+0.6x-18786$$

(2) 抑菌粒子中檸檬烯含量的測定方法

將檸檬烯抑菌粒子使用不鏽鋼研磨機磨碎 30 秒鐘，取 1g 的抑菌粒子粉末置於 50 mL 離心管中，同時添加 10 mL 乙醇，並使用桌上型均質機攪拌 1min，讓抑菌粒子中的檸檬烯溶於乙醇中。再以轉速 2465 xg 離心 10min，用 5 mL 針筒取 1 mL 上清液經由 Filter (0.45 μ m) 過濾至 1.5 mL 離心管中，利用氣相層析儀進行測定，得到波峰面積後再用檸檬烯標準曲線公式換算出抑菌粒子中檸檬烯的含量，因此乙醇萃取出之檸檬烯含量相當於抑菌粒子中檸檬烯含量。

6. 抑菌粒子之抑菌試驗

改良 López 等人 [6]在 2005 年發表的方法，將 0.1 mL 的 10^5 CFU/mL *Escherichia coli* (BCRC 10675) 塗抹在具有培養基的培養皿 (90 mm diameter) 上，將 1g 以 4.15 mL 之檸檬烯製備之抑菌粒子使用直徑 2 cm 不織布固定在培養皿的蓋子上，將此培養皿反過來讓含有 1g 檸檬烯的抑菌粒子在下方，之後放置 37°C 培養箱中培養 24 小時，利用抑菌粒子中檸檬烯的揮發特性在培養基的表面產生抑菌圈。最後利用 Tyagi 等人在 2011 年發表的方法測量抑菌圈

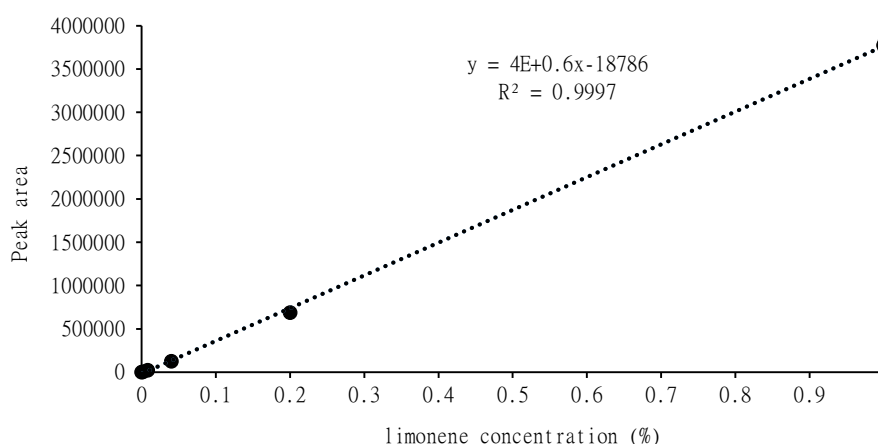


圖 1. 檸檬烯稀釋濃度之標準曲線

Each value is expressed as mean \pm standard deviation (n=3).

直徑 [16]，測量出抑菌圈的直徑再換算成抑制率 (%) [1]，藉此得知檸檬烯對於 *Escherichia coli* 的抑菌效果。其公式如下：

$$\text{抑制率}(\%) = \left\{ \frac{\text{抑菌圈直徑}(\text{mm})}{\text{培養皿的直徑}(90\text{mm})} \right\} * 100\%$$

7. 統計分析

試驗進行三重複，數據以平均值±標準偏差 (Mean±SD) 表示，統計使用 SAS (Statistics analysis system) 9.4 版本統計軟體，數據進行變異數分析 (Analysis of variance, ANOVA) 及鄧氏變域法 (Duncan's multiple range test) 比較各組間的差異，當 $p < 0.05$ 時具有顯著性差異，使用三變量多元迴歸來探討 PVA/TEOS 比例、反應溫度及檸檬烯添加濃度之條件進行統計分析。

三、結果與討論

(一) 探討製備條件對抑菌粒子中檸檬烯之影響

1. PVA/TEOS 比例對抑菌粒子中檸檬烯之含量及抑制率影響

Tomoaki 等人在 1997 年 [15] 的研究發現 TEOS 是主要形成二氧化矽的前驅物，當 TEOS 濃度增加時，就有更多的 Si (OR)₄ 參與溶膠-凝膠法反應，而使抑菌粒子停留在成核區比較久，增加相互碰撞機會，所形成的抑菌粒子就會比較大，因此 PVA/TEOS 比例是影響溶膠-凝膠法的主要因素之一。2014 年 Lantano 等人 [5] 用 PVA 與 TEOS 進行溶膠-凝膠法，並添加納他黴素 (Natamycin, NAT) 來製備可抑菌之活性包裝材料，其 PVA/TEOS 比例為 1:4~1:19，發現比例為 1:4 製備出抑菌包裝材料的 NAT 含量最高。因此本試驗 PVA/TEOS 比例選 1:4 為中心，其範圍為 1:1.76~1:6.24，試驗結果由表 1 得知，比例為 1:6.24 的檸檬烯含量是 0.5% 顯著高於比例為 1:4 (0.33%) 及 1:1.76 (0.04%) 這兩組 ($p < 0.05$)，這說明當 TEOS 的比例

越高，製備出來抑菌粒子中的檸檬烯含量越多。而抑菌試驗結果是比例 1:4 的抑制率 43.8% 顯著高於比例為 1:1.76 (36.6%) 及 1:6.24 (36%) 兩組 ($p < 0.05$)，表示雖然在檸檬烯含量的測定中 TEOS 比例越高則檸檬烯含量越多，而在抑菌試驗中發現 TEOS 比例若是太低或太高都會影響抑菌粒子中檸檬烯的釋放，綜合上述結果，認為比例為 1:4 的抑制效果最佳，與 Lantano 等人 [5] 於 2014 年得到之結果相符合。

2. 反應溫度對抑菌粒子中檸檬烯之含量及抑制率影響

在 2014 年 Singh 等人 [13] 認為抑菌粒子的粒徑大小、孔徑大小、壁厚及表面會受到試劑濃度、反應溫度、pH 值及乾燥方法等反應條件所影響，而在 2004 年 Yasuhiko 等人 [17] 研究中指出抑菌粒子的直徑及形狀會被反應溫度影響，高溫下會使顆粒具有高縱橫比及較小直徑。因此反應溫度可能會影響抑菌粒子中檸檬烯的含量。試驗結果由表 2 得知，反應溫度為 60°C 及 93°C 的檸檬烯含量分別是 0.32% 及 0.34%，兩者之間沒有顯著差異，卻顯著高於反應溫度為 27°C 的 0.18% ($p < 0.05$)，表示反應溫度上升到 60°C 之後再升溫也不影響抑菌粒子中檸檬烯含量。抑菌試驗結果是反應溫度為 60°C 的抑制率是 45.9% 顯著高於反應溫度為 27°C (42.2%) 及 93°C (36.8%) 這兩組 ($p < 0.05$)，發現反應溫度若是太低或太高也都會影響抑菌粒子對 *E.coli* 的抑制能力，因此認為反應溫度設定在 60°C 的抑制效果最佳。

3. 檸檬烯添加濃度對抑菌粒子中檸檬烯之含量及抑制率影響

檸檬烯是抑菌粒子含量試驗中主要的測定物質，同時也是抑制 *E.coli* 生長的天然抑制劑，因此添加檸檬烯的多寡會直接影響到含量及抑制率的結果，試驗分別添加 10.3% (v/v)、21.2% (v/v)、64.7% (v/v)、108.2% (v/v) 及 119.1% (v/v) 濃度的檸檬烯，結果由表 3 得知，抑菌粒子中檸檬烯含量分別為 0.05%、0.09%、0.29%、0.49% 及

表 1. PVA/TEOS 比例對抑菌粒子中檸檬烯之含量及抑制率影響

	PVA/TEOS ratio		
	1:1.76	1:4	1:6.24
Limonene content (%)	0.04±0.00 ^c	0.33±0.01 ^b	0.50±0.03 ^a
Inhibition rate (%)	36.6±1.3 ^b	43.8±1.7 ^a	36.0±0.7 ^b

1. Each value is expressed as mean ± standard deviation (n=3) .

2. a-c, means in a column with different lowercase letter are significantly different ($p < 0.05$) .

表 2. 反應溫度對抑菌粒子中檸檬烯之含量及抑制率影響

	Reaction temperature (°C)		
	27	60	93
Limonene content (%)	0.18±0.00 ^b	0.32±0.03 ^a	0.34±0.02 ^a
Inhibition rate (%)	42.2±1.6 ^b	45.9±0.3 ^a	36.8±2.7 ^c

1. Each value is expressed as mean ± standard deviation (n=3).

2. a-c, means in a column with different lowercase letter are significantly different ($p < 0.05$).

表 3. 檸檬烯添加濃度對抑菌粒子中檸檬烯之含量及抑制率影響

	Limonene concentration (%)				
	10.3	21.2	64.7	108.2	119.1
Limonene content (%)	0.05±0.00 ^c	0.09±0.01 ^c	0.29±0.01 ^b	0.49±0.06 ^a	0.51±0.05 ^a
Inhibition rate (%)	0 ^d	24.7±0.4 ^c	41.7±2.9 ^b	45.1±2.1 ^{ab}	46.2±1.1 ^a

1. Each value is expressed as mean ± standard deviation (n=3).

2. a-d, means in a column with different lowercase letter are significantly different ($p < 0.05$).

表 4. 乳化劑添加量對抑菌粒子檸檬烯之含量及抑制率影響

	Emulsifier concentration (%)			
	0.75	1.13	1.50	1.88
Limonene content (%)	0.28±0.05 ^c	0.35±0.01 ^b	0.45±0.04 ^a	0.48±0.02 ^a
Inhibition rate (%)	40.34±2.84 ^a	35.91±3.73 ^a	36.55±1.15 ^a	27.65±0.87 ^b

1. Each value is expressed as mean ± standard deviation (n=3).

2. a-c, means in a column with different lowercase letter are significantly different ($p < 0.05$).

0.51%，而添加 108.2% (v/v) 及 119.1% (v/v) 濃度的檸檬烯含量顯著高於其他組別 ($p < 0.05$)，但這兩者間沒有顯著差異，表示抑菌粒子中檸檬烯之添加量超過 100% (v/v) 時，粒子中檸檬烯含量仍維持在 0.49% 左右。抑菌結果顯示，添加濃度為 108.2% (v/v) 及 119.2% 的抑制率是 45.1% 及 46.2% 明顯高於其他組別並具有統計上的差異 ($p < 0.05$)，另外也發現，添加濃度為 10.3% (v/v) 時抑制率為 0%，可能是抑菌粒子中檸檬烯的濃度不夠，因而無法抑制 *E.coli* 的生長，而 108.2% 和 119.1% 濃度的抑制率兩者間沒有顯著差異，由此可知檸檬烯添加濃度越高抑菌粒子中檸檬烯含量也越高，對微生物的抑制率也愈好，但濃度超過 100% (v/v) 之後則沒有顯著差異，因此最佳檸檬烯添加濃度為 100% (v/v)。

4. 乳化劑添加量對抑菌粒子檸檬烯之含量及抑制率影響

在 2016 年 Su 與 Zhong [14] 研究中使用 Tween 20 與酪蛋白酸鈉製備檸檬油 (Lemon oil) 奈米乳液，其結果發現，使用 0.4%~1.2% (w/v) 的 Tween20 與 2% (w/v) 的酪蛋

白酸鈉可以增加檸檬油奈米乳液在 15 天內的穩定性。因此本試驗使用 Tween 20 當作乳化劑分別添加 0.75% (v/v)、1.13% (v/v)、1.5% (v/v) 及 1.88% (v/v) 的濃度來製備抑菌粒子，並進行檸檬烯含量測定與抑菌試驗，其結果如表 4。從試驗可知抑菌粒子中測得之檸檬烯含量分別為 0.28%、0.35%、0.45% 及 0.48%，當乳化劑添加濃度為 1.5% (v/v) 及 1.88% (v/v) 時檸檬烯的含量是顯著高於 0.75% (v/v) 及 1.13% (v/v) 組別 ($p < 0.05$)，表示乳化劑添加濃度太低或太高都會影響抑菌粒子中檸檬烯之含量，試驗證明添加乳化劑是能幫助檸檬烯分散在溶膠-凝膠溶液當中。抑菌試驗結果得知，抑制率分別為 40.34%、35.91%、36.55% 及 27.65%，經過統計後發現乳化劑添加濃度為 0.75% (v/v)、1.13% (v/v) 及 1.5% (v/v) 之間的抑制率沒有顯著差異，但顯著高於 1.88% (v/v) ($p < 0.05$)，說明添加濃度超過 1.5% (v/v) 之後其抑菌能力會降低，可能是添加不同的乳化劑濃度會影響到抑菌粒子之結構，並使抑菌粒子中檸檬烯的釋放受到影響。綜合以上結論，乳化

劑添加濃度為 1.5% (v/v) 時有最高的檸檬烯含量，同時也有最佳的抑菌能力，因此選擇添加 1.5% (v/v) 濃度的乳化劑作為製備抑菌粒子之最佳乳化劑添加濃度。

(二) 三變量多元迴歸對 PVA/TEOS 比例、反應溫度及檸檬烯添加濃度來探討檸檬烯含量及抑制率之條件

先前探討製備條件對抑菌粒子中檸檬烯含量的結果為 PVA/TEOS 比例 1:4、反應溫度 60°C、檸檬烯添加濃度 100% (v/v) 及乳化劑添加量 1.5% (v/v) 為最佳條件。本試驗利用多元迴歸方式來探討製備抑菌粒子的 PVA/TEOS 比例 (X_1)、反應溫度°C (X_2) 及檸檬烯添加濃度% (X_3) 三個條件，並進行檸檬烯含量% (Y_1) 與抑菌試驗的抑制率% (Y_2) 的測定，總共設計 20 組試驗，其結果如表 5。第 15 組到第 20 組共六組為重複試驗，條件分別是 PVA/TEOS 比例 1:4、反應溫度為 60°C、檸檬烯添加濃度為 64.7% (v/v)，可得知平均檸檬烯含量為 $0.315 \pm 0.013\%$ 以及平均抑制率為 $44.4 \pm 1.2\%$ 。分別對各項因子進行討論，PVA/TEOS 比例為 1:1.76、1:4、1:6.24，其檸檬烯含量為 0.043%、0.315%、0.488%，而抑制率為 35%、44.4%、47.2%，得知當 PVA/TEOS 比例愈高愈能讓抑菌粒子中檸檬烯含量提高，同時也能更有效的抑制 *Escherichia coli* 的

生長。反應溫度之條件為 27°C、60°C、93°C，其檸檬烯含量為 0.181%、0.315%、0.327%，而抑制率為 42.2%、44.4%、45.2%，得知反應溫度愈高則檸檬烯含量與抑制率皆會增加，檸檬烯添加濃度之條件為 10.03% (v/v)、64.7% (v/v)、119.1% (v/v)，其檸檬烯含量為 0.054%、0.315%、0.505%，而抑制率為 0%、44.4%、46.2%，得知當檸檬烯添加濃度愈高時會讓抑菌粒子中檸檬烯的含量更高，同時也能更有效的抑制 *Escherichia coli* 的生長，也發現當檸檬烯添加濃度只有 10.03% (v/v) 時雖然有 0.054% 的檸檬烯含量，但卻無法抑制 *Escherichia coli* 的生長，表示在製備檸檬烯抑菌粒子時若是添加的濃度太低則會沒有抑菌能力。從各項因子對抑菌粒子檸檬烯之影響中發現，第十四組製備條件 PVA/TEOS 比例為 1:4、反應溫度為 60°C、檸檬烯添加濃度為 10.3% (v/v) 時，其檸檬烯含量為 0.054% 及抑制率為 0%，反觀第十組條件為 PVA/TEOS 比例 1:1.76、反應溫度為 60°C、檸檬烯添加濃度為 64.7% (v/v) 時其檸檬烯含量只有 0.043%，但抑制率卻為 35%，雖然兩組的檸檬烯含量一樣少，但第十組卻有較強的抑制率，造成此結果的原因可能是 PVA/TEOS 比例少時會影響溶膠-凝膠反應中所形成的網狀結構大小，再加上檸檬烯的濃度較高，進而影

表 5. 三變量區間估計之試驗結果

Treatment	Factor			Response	
	X_1	X_2	X_3	Limonene content (%)	Inhibition rate (%)
1	1:2.67	40	32.3	0.149±0.012	40.6±2.0
2	1:5.33	40	32.3	0.138±0.010	36.3±1.1
3	1:2.67	80	32.3	0.161±0.008	41.0±1.1
4	1:5.33	80	32.3	0.182±0.013	42.6±3.7
5	1:2.67	40	97.1	0.126±0.006	43.6±1.7
6	1:5.33	40	97.1	0.459±0.013	47.7±3.5
7	1:2.67	80	97.1	0.207±0.002	42.5±1.6
8	1:5.33	80	97.1	0.498±0.023	49.1±0.5
9	1:6.24	60	64.7	0.488±0.010	47.2±1.9
10	1:1.76	60	64.7	0.043±0.003	35.0±1.1
11	1:4	93	64.7	0.327±0.018	45.2±1.5
12	1:4	27	64.7	0.181±0.005	42.2±1.6
13	1:4	60	119.1	0.505±0.051	46.2±1.1
14	1:4	60	10.3	0.054±0.002	0
15	1:4	60	64.7	0.327±0.011	45.5±1.3
16	1:4	60	64.7	0.326±0.036	43.8±1.7
17	1:4	60	64.7	0.319±0.030	45.9±0.3
18	1:4	60	64.7	0.324±0.026	44.5±0.6
19	1:4	60	64.7	0.317±0.022	43.6±1.1
20	1:4	60	64.7	0.311±0.025	42.9±1.2

X_1 = PVA/TEOS ratio X_2 = Reaction temperature (°C) X_3 = limonene concentration (%)

Each value is expressed as mean ± standard deviation (n=3).

響抑菌粒子對檸檬烯的揮發，因此認為第十組的抑菌粒子會在短時間內快速揮發，而導致第十組抑制率比第十四組高。就如同 Lantano 等人[5]在 2014 年研究結果相似，作者分別使用 1:19~1:4 比例的 PVA/TEOS 進行溶膠-凝膠法，並添加等量那他黴素，將其塗佈在聚乳酸薄膜表面形成抑菌塗層。結果 PVA/TEOS 比例愈大者其那他黴素含量愈少，證實了不同的 PVA/TEOS 比例將會影響塗層中那他黴素含量。

最後分別對檸檬烯含量與抑制率進行迴歸分析，檸檬烯含量其線性項達到顯著水準 ($p < 0.05$)，迴歸模式的 R^2 值經調整為 0.86，將不同製備條件抑菌粒子的檸檬烯含量結果寫成方程式，方程式表示如下： $Y_1 = -0.00721X_3 + 0.0015X_1X_3$ (Y_1 : 抑菌粒子含量%; X_1 : PVA/TEOS 比例; X_3 : 檸檬烯添加濃度%)。 X_3 之 p 值為 0.0356，而 X_1X_3 之 p 值為 0.0037，表示製備抑菌粒子的檸檬烯添加濃度顯著影響粒子中檸檬烯含量，而 PVA/TEOS 比例及檸檬烯添加濃度的交互作用也顯著影響粒子中檸檬烯含量。抑制率線性項達到顯著水準 ($p < 0.05$)，迴歸模式的 R^2 值經調整後為 0.3297，而從各項式中的 p 值都小於 0.05 為沒有顯著性差異，表示製備抑菌粒子的 PVA/TEOS 比例、反應溫度及檸檬烯添加濃度三個條件對於抑制率是不顯著。將檸檬烯含量方程式中包含的 X_1 項與 X_1X_3 項，再加上限制範圍後，預測出 PVA/TEOS 比例 1:6.24、反應溫度 60°C 及檸檬烯添加濃度 100% (v/v) 作為製備抑菌粒子的最佳條件，代入方程式後其預估之檸檬烯含量為 0.94%，經驗證試驗後得到檸檬烯含量結果為 0.90±0.01% 與預估值的相對偏差為 2.17%，表示此檸檬烯含量方程式能夠有效的預測。

四、結論

本研究以溶膠-凝膠法來製備天然揮發性物質檸檬烯之抑菌粒子，探討其製備參數對檸檬烯之含量和抑菌試驗的影響，並使用變異數分析或多元迴歸分析來探討參數對檸檬烯之重要性及其關係。單變量變異數分析結果分別是 PVA/TEOS 比例 1:4、反應溫度 60°C、檸檬烯添加濃度 100% (v/v) 及乳化劑添加量 1.5% (v/v) 為最好條件。三變量多元迴歸對 PVA/TEOS 比例、反應溫度及檸檬烯添加濃度進行分析，得知抑菌粒子最好之製備條件分別是 PVA/TEOS 比例 1:6.24、反應溫度 60°C 及檸檬烯添加濃

度 100% (v/v)，使用方程式預估抑菌粒子可溶出 0.94% 的檸檬烯，經試驗驗證後檸檬烯含量為 0.90% 兩者相對偏差 2.17%。抑菌試驗方面：使用揮發擴散方式對 *Escherichia coli* 進行抑菌圈試驗，試驗結果證明利用溶膠-凝膠法來製備出含有檸檬烯之抑菌粒子可以有效的抑制 *Escherichia coli*。未來將持續探討利用溶膠-凝膠法製備天然含抑菌成份之抑菌粒子或薄膜的揮發功能特性，以應用在食品包裝上，達到保鮮及延長食品之保存期限。

誌謝

本研究承蒙實踐大學校內專題研究計畫 (USC-107-05-02008) 的經費補助，使本研究得以順利完成，特此致謝。

參考文獻

1. 朱妝音 (民 100)，含大蒜水萃物抑菌粒子的製備及抑菌效果之探討，實踐大學食品營養與保健生技研究所碩士論文。
2. Aldana, S. D., S. Andrade-Ochoa, C. N. Aguilar, J. C. Contreras-Esquivel, and G. V. Nevárez-Moorillón (2015) Antibacterial activity of pectic-based edible films incorporated with Mexican lime essential oil. *Food Control*, 50(4), 907-912.
3. Corradini, C., I. Alfieri, A. Cavazza, C. Lantano, A. Lorenzi, N. Zucchetto, and A. Montenero (2013) Antimicrobial films containing lysozyme for active packaging obtained by sol-gel technique. *Journal of Food Engineering*, 119(3), 580-587.
4. Kim, K. D. and H. T. Kim (2002) Formation of silica nanoparticles by hydrolysis of TEOS using a mixed semi-batch/batch method. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 25, 183-189.
5. Lantano, C., I. Alfieri, A. Cavazza, C. Corradini, A. Lorenzi, N. Zucchetto and A. Montenero (2014) Natamycin based sol-gel antimicrobial coatings on polylactic acid films for food packaging. *Food Chemistry*, 165, 342-347.
6. Lopez, P., C. Sanchez, R. Battle and C. Nerin (2005) Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne

- bacterial and fungal strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 6939-6946.
7. Minelli, M., M. G. De Angelis, F. Doghieri, M. Rocchetti and A. Montenero (2010) Barrier properties of organic-inorganic hybrid coatings based on polyvinyl alcohol with improved water resistance. *Polymer Engineering and Science*, 50(1), 144-153.
 8. Montgomery, D. C. (2012) *Design and Analysis of Experiments : response surface method and designs*. 8th Ed., 478-544. John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, NJ.
 9. Nadarajah, D., J. H. Han and R. A. Holley (2005) Inactivation of escherichia coli O157:H7 in packaged ground beef by allyl isothiocyanate. *International Journal of Food Microbiology*, 99(3), 269-279.
 10. Nash, J. J. and K. A. Erk (2017) Stability and interfacial viscoelasticity of oil-water nanoemulsions stabilized by soy lecithin and Tween 20 for the encapsulation of bioactive carvacrol. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 517, 1-11.
 11. Njoroge, S. M., H. Koaze, P. N. Karanja and M. Sawamura (2005) Volatile constituents of redblush grapefruit(*citrus paradisi*) and pummelo(*citrus grandis*) peel essential oils from kenya. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9790-9794.
 12. Restuccia, D., U. G. Spizzirri, O. I. Parisi, G. Cirillo, M. Curcio, F. Iemma, F. Puoci, G. Vinci and N. Picci (2010) New EU regulation aspects and global market of active and intelligent packaging for food industry applications. *Food Control*, 21(11), 1425-1435.
 13. Singh, L. P., S. K. Bhattacharyya, R. Kumar, G. Mishra, U. Sharma, G. Singh and S. Ahalawat (2014) Sol-Gel processing of silica nanoparticles and their applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 214, 17-37.
 14. Su, D. and Q. Zhong (2016) Lemon oil nanoemulsions fabricated with sodium caseinate and Tween 20 using phase inversion temperature method. *Journal of Food Engineering*, 171(2), 214-221.
 15. Tomoaki, S., A. Masami, K. Mikio and S. Shozaburo (1997) Particles size distributions produced by hydrolysis and condensation of tetraethylorthosilicate. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 30, 759-762.
 16. Tyagi, A. K. and A. Malik (2011) Antimicrobial potential and chemical composition of Mentha piperita oil in liquid and vapour phase against food spoiling microorganisms. *Food Control*, 22(11), 1707-1714.
 17. Yasuhiko, A., S. Hiroyo and Y. Kazuaki (2004) Synthesis of nano silica particles for polishing prepared by sol-gel method. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 32, 79-83.
 18. Zahi, M. R., M. El Hattab, H. Liang and Q. Yuan (2017) Enhancing the antimicrobial activity of d-limonene nanoemulsion with the inclusion of epsilon-polylysine. *Food Chemistry*, 221, 18-23.

收件：108.07.10 修正：108.10.08 接受：108.11.13