

固态发酵番石榴叶精油释放及其活性变化

魏唯倩¹, 罗游¹, 胡曦^{1,2}, 方郑¹, 吴振强¹

(1. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

(2. 江门市泛亚生物工程与健康研究院, 广东江门 529000)

摘要: 本研究采用红曲霉和巨大芽孢杆菌对番石榴叶基质进行混菌固态发酵, 探讨发酵过程中番石榴叶精油成分的释放。结果表明, 发酵后番石榴叶精油中的 20 种主要成分种类不变, 但精油提取率显著提高, 发酵 10 d 提取率达到未发酵组的 6.53 倍。组织结构分析结合酶学分析推断, 糖苷酶破坏了番石榴叶的细胞壁、腺毛和液泡等结构, 并进一步切断糖间链接和糖苷键, 促进番石榴叶中芳香化合物的释放。发酵后番石榴叶精油的 2,2-二苯基-1-苦基肼 DPPH 自由基清除能力下降 26.15%, 但是 2,2'-联氮双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸阳离子 ABTS⁺ 自由基清除能力, 5-脂氧合酶和酪氨酸酶的抑制能力分别提高 32.66%、18.73%和 7.87%, 发酵 10 d 后相应 IC₅₀ 分别达到 20.47±2.49 mg/mL、23.21±1.92 μg/mL 和 107.41±3.48 μg/mL, 综合来看发酵能改善该精油的抗氧化和生物活性。本成果可为果树叶精油高效提取提供新方法, 为开发新型活性天然保健产品提供途径。

关键词: 番石榴叶发酵; 精油释放; 抗氧化活性; 5-脂氧合酶抑制活性; 酪氨酸酶抑制活性

文章编号: 1673-9078(2020)11-70-79

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.11.0126

Release and Changes in Activity of Essential Oils from Guava Leaves by Solid-state Fermentation

WEI Wei-qian¹, LUO You¹, HU Xi^{1,2}, FANG Zheng¹, WU Zhen-qiang¹

(1. School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

(2. Pan Asia Jiangmen Institute of Biological Engineering and Health, Jiangmen 529000, China)

Abstract: In this work, the release of essential oil from guava leaves during the solid-state fermentation of guava leaf substrate with mixed strains, *Monascus anka* and *Bacillus megaterium*, were investigated. The results showed that the 20 main components in the guava leaf essential oil remained unchanged after fermentation, but the rate of essential oil extraction increased significantly and reached 6.53 times that of the unfermented group after 10 days of fermentation. Tissue structure analysis combined with enzymatic analysis inferred that glycosidases destroyed the cell walls, glandular trichomes, and vacuoles of guava leaves, and cleaved the intersugar linkages and glycosidic bonds, to promote the release of aromatic compounds from guava leaves. After fermentation, the DPPH radical scavenging ability of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl in guava leaf essential oil decreased by 26.15%, but the ABTS⁺ radical scavenging ability and 5-lipoxygenase inhibitory capacity and tyrosinase inhibitory capacity of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt increased by 32.66%, 18.73% and 7.87%, respectively (with the corresponding IC₅₀ values reaching 20.47±2.49 mg/mL, 23.21±1.92 μg/mL and 107.41±3.48 μg/mL, respectively). Overall, fermentation can improve the antioxidant and biological activities of the guava leaf essential oil. The results may provide a new insight into the efficient extraction of fruit leaf essential oils and a pathway for the development of novel natural health products.

Key words: fermentation of guava leaves; release of essential oils; antioxidant activity; 5-lipoxygenase; tyrosinase

引文格式:

魏唯倩, 罗游, 胡曦, 等. 固态发酵番石榴叶精油释放及其活性变化[J]. 现代食品科技, 2020, 36(11): 70-79

WEI Wei-qian, LUO You, HU Xi, et al. Release and changes in activity of essential oils from guava leaves by solid-state fermentation [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(11): 70-79

收稿日期: 2020-02-13

基金项目: 广东省科技创新战略专项资金项目 (2018JK35202003); 广东省省级科技计划项目 (2017B020207003); 广东省科技创新战略专项 (大专项+任务清单) 项目 (2019JK25203010)

作者简介: 魏唯倩 (1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 发酵工程

通讯作者: 吴振强 (1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 发酵工程、生物工程和大健康产业

番石榴果树原产美洲热带, 生长性强, 我国福建、台湾、海南、江西及两广等省份均有栽培。番石榴叶精油主要由倍半萜和含氧倍半萜组成, 比果实的精油具有更大的药用价值。番石榴叶精油不仅在缓解常见的感冒症状, 治疗镇痛, 减少热应激对男性生殖系统的伤害方面有所功效^[1-3], 还能够杀死传播登革热和基孔肯雅病毒的埃及伊蚊幼虫, 对水蛭、蚊蝇具有趋避作用, 具有成为新型绿色杀虫剂的商业潜力^[4,5]。

传统的精油提取方法一般都是基于水蒸气蒸馏和有机溶剂的萃取, 存在提取率低和环境污染等缺点。近年来, 超声波、微波和酶辅助的提取技术由于缩短时间或提高效率而被关注。但它们依然因为能耗高、成本高和反应条件苛刻等问题的存在而无法进行大规模生产应用。微生物固态发酵是一种被应用于提高植物活性物质的传统生物技术, 微生物通过分泌多种水解酶, 能有效地破坏植物细胞壁, 切断共轭分子中活性成分与其他取代基的结合, 从而提高其营养价值和感官品质。迄今为止, 固态发酵已广泛用于从谷物、茶叶等天然产物中提高多酚、黄酮和多糖类物质的产量。然而, 还未有研究报道过固态发酵对精油类功能香气成分提取效果的改善作用。

本研究使用红曲霉和巨大芽孢杆菌对番石榴叶进行混菌固态发酵, 探讨发酵过程中微生物对番石榴叶精油的释放及体外抗氧化、抗炎和酪氨酸酶抑制活性的影响, 旨在为寻求高产量, 低能耗, 低成本的精油提取方法和开发新型天然药物或营养保健品开辟新思路。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

番石榴叶, 江门市江海区南粤番石榴农民专业合作社; 红曲霉 (*Monascus anka*) GIM 3.592, 广东省微生物菌种保藏中心 (GDMCC/GIMCC); 巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*): 筛选自番石榴叶, 为高产纤维素酶的内生菌, 经鉴定为巨大芽孢杆菌, 保存于华南理工大学生物科学与工程学院。

红曲霉种子培养基: 葡萄糖 20 g, 酵母粉 3 g, 鱼蛋白胨 10 g, 氯化钾 0.5 g, 磷酸二氢钾 4 g, 七水合硫酸亚铁 0.01 g, 蒸馏水 1000 mL。

化学试剂: 2,2-二苯基-1-苦基肼 (DPPH)、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 (ABTS)、4-硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷 (p-NPG)、对硝基苯酚 (p-NP)、羧甲基纤维素钠 (CMC-Na)、邻硝基苯- β -D-半乳糖苷 (ONPG)、邻硝基苯酚 (ONP)、木聚糖、

亚油酸、L-多巴、去甲二氢愈创木酸、奎诺二甲基丙烯酸酯 (Trolox)、曲酸 (均>98.0%), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 大豆 5-脂氧合酶、蘑菇酪氨酸酶 (均为生物试剂), 美国 Sigma 公司; β -石竹烯 (色谱纯), 美国 Sigma 公司; C7-C40 正构烷烃 (色谱纯), 美国 O2si 公司; 马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA)、鱼粉蛋白胨、酵母粉 (均为生物试剂), 北京奥博星生物技术有限责任公司; 葡萄糖、氯化钠、磷酸二氢钾、七水合硫酸亚铁、柠檬酸、柠檬酸钠、过硫酸钾 (均为分析纯), 天津市大茂化学试剂厂。

1.2 主要仪器设备

SW-CK-1 洁净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; ZWYD-2402 恒温培养振荡器 (摇床), 智城分析仪器制造有限公司; LRH-150 B 型生化培养箱, 韶关市泰宏医疗器械有限公司; GCMS-QP2010 Ultra 气质联用仪, 日本岛津公司; 安捷伦 HP-5 MS (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μ m) 色谱柱; GC-2014 C 气相色谱, 日本岛津公司; 安捷伦 HP-5 (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μ m) 色谱柱; SpectraMax 自动酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司; 5804 R 台式超速大容量离心机, 德国 Eppendorf 公司; 台式冷冻干燥机, 美国 Labconco 公司; GeminiSEM 500 场发射扫描电子显微镜, 德国 ZEISS 公司; 超声波清洗机, 天津奥特赛恩斯仪器有限公司; 粉碎机, 小熊电器股份有限公司; 同时蒸馏萃取装置, 安徽科腾实验设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 混菌固态发酵

根据 Wang 等人的方法进行适当修改^[6], 具体如下。

种子液的配置: 用 6 mL 浓度为 0.1% (m/V) 的灭菌吐温 80 溶液于 PDA 培养基中收集红曲霉孢子悬浮液, 取 5 mL 孢子悬液加入 50 mL 红曲霉种子培养基中制备红曲霉种子液 (约 10^7 孢子/mL)。取巨大芽孢杆菌冻存菌液加入 100 mL 液体 LB 培养基, 配制成为芽孢菌种子液 (约 10^6 cfu/mL)。将两种子液于 180 r/min, 30 $^{\circ}$ C, 恒温摇床培养 26 h。

混菌固态发酵: 干燥番石榴叶切成约 10 mm 的方块。将 5 g 番石榴叶片, 3 g 米粉和 8 mL 去离子水加入 250 mL 锥形瓶搅拌均匀, 经 121 $^{\circ}$ C 高压蒸汽灭菌 20 min 作为固态发酵培养基。设置 32 瓶番石榴叶培养基以供进行平行发酵实验。待其冷却至 25 $^{\circ}$ C 左右, 在每瓶固态发酵培养基中分别接入 4 mL 红曲霉种子液和 1 mL 芽孢菌种子液, 搅拌均匀。于 30 $^{\circ}$ C 恒温,

70%恒湿的生化培养箱中培养 10 d, 每天翻动培养基一次。以同样处理但不接种的番石榴叶固体培养基为空白对照。分别于 0 d、4 d、7 d 和 10 d 取出样品, 置于 -80 °C 冷冻 24 h, 经冷冻干燥机冻干, 以备分析。

1.3.2 发酵基质中糖苷酶活力测定

粗酶液的制备: 分别取一定量发酵后和对照组的番石榴叶样品, 按 1:10 (m/V) 料液比加入 0.2 M, pH 7.0 的磷酸缓冲液, 置于 180 r/min, 30 °C 的恒温摇床提取 1 h, 随后在 4 °C, 10000 r/min 离心 20 min 取上清, 即为粗酶液。

纤维素酶活力测定: 参照文献的方法, 并做适当修改^[7,8]。分别以 25 mM 的 p-NPG、1% (m/V) 的 CMC-Na 和 1 cm×6 cm 的滤纸条为底物, 测定 β -葡萄糖苷酶、内切葡聚糖酶和外切葡聚糖酶的活性。反应结束后, 在 420 nm 处测定吸光度来确定 p-NP 的含量, 以此计算 β -葡萄糖苷酶活性; 通过测定 540 nm 处的吸光度来确定葡萄糖的含量, 以此计算内切葡聚糖酶和外切葡聚糖酶的活性。以煮沸 1 h 后的粗酶液作对照。

木聚糖酶活力测定: 在 Wang 等的方法基础上稍作调整^[8]。400 μ L 的粗酶液与 400 μ L 1% 木聚糖 (m/V , 溶于 50 mM, pH 5.0 的柠檬酸钠缓冲液) 于 5 mL 试管中混合。将混合溶液于 50 °C 下孵育 30 min, 立即加入 3 mL DNS 试剂以终止反应。所有试管置沸水浴煮沸 10 min。测量 540 nm 处的吸光度来计算释放木糖的量。以煮沸 1 h 后的粗酶液作对照。

β -半乳糖苷酶活力测定: 测定按照 Klein 等报道的方法略作修改^[9]。反应体系包含 300 μ L 粗酶液和 300 μ L 20 mM ONPG。在 35 °C 下孵育 20 min 后, 添加 3 mL 1 M Na_2CO_3 终止反应, 通过测量 420 nm 的吸光度确定 ONP 的量。以煮沸 1 h 后的粗酶液作对照。

1.3.3 番石榴叶显微结构的测定

使用扫描电子显微镜 (SEM, GeminiSEM 500, 德国蔡司公司) 对冻干后, 不同处理组的番石榴叶进行观测。

表皮形态的观测: 将叶片切成 3 mm×3 mm 的叶块, 使用导电胶布将其固定在样品台, 置于 SEM 样品仓, 调到合适的倍率进行测定。

内部形态的观测: 使用粉碎机将叶片打碎, 过 80 目筛, 均匀的涂抹在导电胶布上, 洗耳球吹去多余样品粉末, 选择合适的倍率进行测定。

1.3.4 番石榴叶精油提取

取不同发酵组的冻干番石榴叶样品, 用粉碎机磨粉过 80 目筛。将 20 g 样品粉末与 10 g NaCl、250 mL 去离子水于 500 mL 圆底烧瓶中混合, 过夜浸泡 10 h。

浸泡后的样品在 40 kHz, 500 W 的超声波进行 15 min 前处理后, 在同时蒸馏萃取装置内完成番石榴叶精油的提取。装有 20 g 样品粉末的烧瓶与另一装有 150 mL 二氯甲烷的圆底烧瓶分别置于同时蒸馏萃取装置的两端, 通过恒温油浴和水浴分别保持在 125 °C 和 55 °C, 每次提取时间为 3 h。然后通过旋转蒸发仪在 25 °C 下分离二氯甲烷和精油样品, 样品称重, 保存在 -20 °C 下。

1.3.5 番石榴叶精油成分分析

通过气相色谱-质谱联用仪 (GC-MS, GCMS-QP2010 Ultra, 日本岛津公司) 对番石榴叶精油成分进行定性分析, 通过气相色谱仪 (GC, GC-2014 C, 日本岛津公司) 对精油各成分进行定量分析^[10]。

番石榴叶精油进样前处理: 样品经干燥后, 用二氯甲烷稀释, 过 0.22 μ m 有机滤膜, 取 1.5 mL 置棕色气相进样瓶待测。

GC-MS 条件: 采用 HP-5 MS (30 m×0.25 mm×0.25 μ m) 色谱柱, 以 1.5 mL/min 的流速将氦气用作载气。以 1:50 的分流比将 1 μ L 样品注入 GC-MS 分析系统。溶剂延迟 2 min。进样口温度: 250 °C, 柱温最初在 50 °C 下保持 2 min, 以 10 °C/min 的速率升至 120 °C, 保持 3 min。然后, 以 5 °C/min 升温至 180 °C, 接着以 20 °C/min 升至 280 °C, 保持 10 min。EI 离子源; 电子能量 70 eV; 传输线温度为 250 °C; 在质量范围为 50 至 600 u 进行全扫描。

番石榴叶精油成分的鉴定是通过将质谱图与 GC-MS 中 NIST₁₄ 标准质谱库进行对比, 计算各成分与一系列正构烷烃 ($\text{C}_7\text{-C}_{40}$) 相关的科瓦茨保留指数 (RI) 来进行的。

GC 条件: 采用 HP-5 (30 m×0.25 mm×0.25 μ m) 色谱柱, 以 30 cm/s 的流速将氮气作为载气。以 1:20 的分流比将 1 μ L 样品注入 GC 分析系统。进样口温度: 250 °C, 初始柱温在 50 °C 保持 1 min, 以 3 °C/min 的速率升至 130 °C, 保持 3 min。然后以 1 °C/min 升至 210 °C, 最后以 5 °C/min 升至 240 °C, 保持 5 min。检测器温度 250 °C。

将在番石榴叶精油组分中占比最高的 β -石竹烯标准品用二氯甲烷稀释成不同浓度, 与精油样品相同色谱条件下进样, 以 β -石竹烯标准溶液的浓度和峰面积绘制标准曲线: $y=2^{1000000000}x+847226$ ($R^2=0.996$), 用其他成分的峰面积与 β -石竹烯的峰面积比值, 结合归一化法, 计算精油中每种成分的含量。

1.3.6 不同发酵度番石榴叶精油体外活性测定

1.3.6.1 ABTS⁺自由基清除能力的测定

参考文献方法测定 ABTS⁺自由基清除率^[11]。将

ABTS 甲醇溶液 (7 mM) 和 $K_2S_2O_8$ 水溶液 (2.45 mM) 混合, 黑暗中反应 16 h, 产生 $ABTS^+$ 。使用前将 $ABTS^+$ 储备液用甲醇稀释至在 734 nm 波长下吸光度为 0.7 ± 0.02 。将 50 μ L 精油样品 (浓度分别为: 5、10、20、50、100 mg/mL) 与 200 μ L $ABTS^+$ 甲醇溶液混合, 室温下避光反应 30 min, 随后于 734 nm 处测量吸光度。相同实验条件下, 将 Trolox 用作阳性对照, 甲醇用作阴性对照。

1.3.6.2 DPPH 自由基清除能力的测定

在文献方法的基础上略作修改^[11]。将 50 μ L 精油样品 (浓度分别为: 5、10、20、40 和 80 mg/mL) 与 200 μ L DPPH 甲醇溶液 (100 μ M) 混合, 室温下避光反应 30 min, 在 517 nm 处测量吸光度。将 Trolox 用作阳性对照, 甲醇用作阴性对照。

1.3.6.3 5-脂氧合酶抑制能力的测定

参考 Demirci 等的方法^[12], 使用大豆 5-脂氧合酶来代替人的 5-脂氧合酶进行番石榴叶精油酶抑制能力的测定。将 970 μ L 磷酸钾缓冲液 (100 mM; pH 9.0), 20 μ L 精油 (浓度分别为: 5 μ g/mL、10 μ g/mL、20 μ g/mL、40 μ g/mL 和 80 μ g/mL, 溶于 DMSO) 和 10 μ L 5-脂氧合酶 (9.5 U/mL) 在室温下孵育 15 min。添加 20 μ L 70 mM 亚油酸开始反应, 反应 10 min 后使用酶标仪在 234 nm 处测定。通过与阴性对照 (DMSO) 组比较, 计算出酶活性的抑制百分数, 并将去甲二氢愈创木酸用作阳性对照。

1.3.6.4 酪氨酸酶抑制能力的测定

采用蘑菇酪氨酸酶多巴速率氧化法进行实验^[13]。将 50 μ L 精油 (浓度分别为: 20 μ g/mL、40 μ g/mL、80 μ g/mL、160 μ g/mL 和 320 μ g/mL, 溶于 DMSO), 100 μ L 磷酸钾缓冲液 (50 mM, pH 6.8) 与 100 μ L 1.5 mM 蘑菇酪氨酸酶 (50 U/mL) 充分混合, 30 $^{\circ}$ C 下孵育 10 min。加入 30 μ L L-多巴 (溶解于 50 mM 磷酸钾缓冲液, pH 6.8) 引发反应。置于 30 $^{\circ}$ C 的恒温水浴中反应 20 min, 使用酶标仪在 475 nm 波长处进行测定。将 DMSO 用作阴性对照, 曲酸用作阳性对照, 计算抑制百分率。

1.3.7 数据分析

本研究中每个实验进行三次重复, 实验结果以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示。运用 SPSS 24.0 统计软件对实验数据进行处理, 单因素方差分析时, 采用 Duncan 法对实验数据进行分析, 并对差异性分析后的数据进行多重比较, 按照三次重复实验后数据平均数大小与差异显著性依次进行英文字母的标注。相关性分析时, 采用 Pearson 法对实验数据进行分析, 对相关性系数的显著性进行双尾检验。运用 R 语言中的

“corrplot”程序包对相关系数进行可视化。

2 结果与讨论

2.1 番石榴叶发酵对精油成分的影响

通过 GC-MS 鉴定番石榴叶精油中含量大于 1% 的 20 种主要成分, 包括: 12 种倍半萜类、5 种含氧倍半萜类、1 种含氧单萜类、1 种酮类和 1 种酸类物质, 未鉴定出非氧化的单萜类物质, 如表 1 所示。总倍半萜类的含量高达 93.88%, 含氧倍半萜占 21.34%; 而含氧单萜与酮、酸总和的含量较少, 分别占: 2.32% 和 3.41%。含量最高的三种成分为 β -石竹烯 (34.46%)、氧化石竹烯 (14.05%) 和 (+)-香橙烯 (7.54%), 它们具有舒肝、镇痛、降压、祛风除湿的功效^[14]。

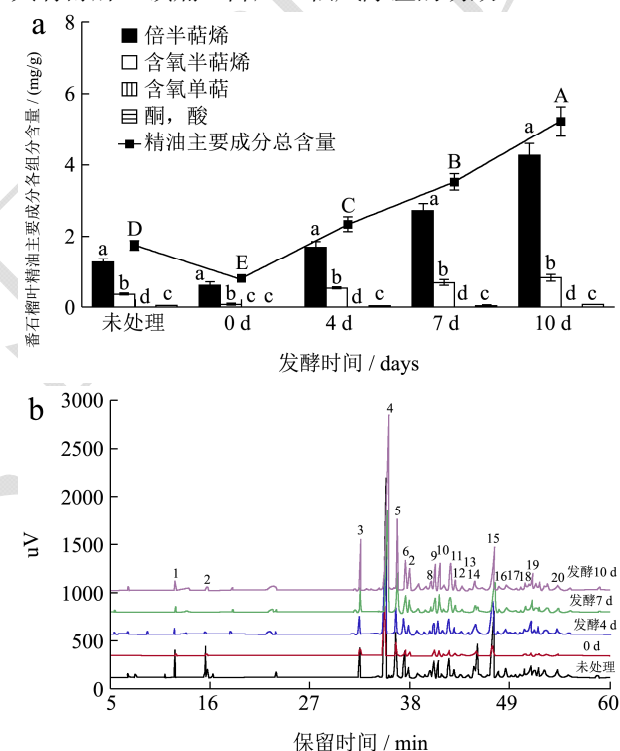


图 1 发酵番石榴叶精油组分提取量和成分构成

Fig.1 Fraction extraction amount and compositions of essential oils from fermented guava-leaf

注: a: 发酵番石榴叶精油组分含量, 同时期数据间字母不同表示差异显著, $p < 0.05$; b: 发酵番石榴叶精油的成分构成 GC 图 (1~20 号化合物为表 1 中鉴定出的番石榴叶精油的 20 种主要成分)。

番石榴叶培养基需在发酵前进行高压蒸汽灭菌, 高温高压蒸汽提供的能量会破坏热敏性物质和腺毛等精油储存结构^[15,16], 分析结果显示, 灭菌导致番石榴叶精油的提取率由 1.78 mg/g 下降到 0.80 mg/g, 使总单萜含量下降 90.22%, 推测是由于大多数单萜沸点较低且位于含油腺体的外源, 因此比位于内源部位的倍

半萜类更易受影响^[17]。混菌固态发酵显著性提高番石榴叶精油的提取率,但不改变20种主要成分的种类,如图1所示。精油的提取率随发酵时间持续升高,直到第10 d达到了5.22 mg/g,为非发酵样品的6.53倍。Chen等使用超声波结合微波共辅助提取紫苏精油,最优条件下提取率仅达对照组的1.14倍^[18]; Sowbhagya等使用不同商业酶辅助浸提大蒜精油,仅能使提取率达对照组的1.39~1.82倍^[19]; Sojic B等使用CO₂超临界萃取提高薄荷精油产率,虽能使提取率达对照组的4.87倍^[20],但却无法避免提取出的精油掺杂脂质等杂质问题的存在。

事实上,植物精油由两部分构成,一部分是储存在油腺、细胞腔、腺毛等器官中的游离挥发性化合物;另一部分储存在液泡中,与单糖、双糖结合成非挥发性糖苷化合物。某些情况下,结合态精油成分是由自由态成分的40到60倍^[21,22]。虽未发现固态发酵对植物精油提取的影响,但有报道谷物中挥发性有机化合物释放受微生物产生的酶活性的调节^[23],也有研究表明,利用 β -葡萄糖苷酶、纤维素酶和半纤维素酶等可以提高黑胡椒、豆蔻、菠萝皮等植物中的香气成分^[24]。因此,有必要探究混菌固态发酵过程中酶与精油释放的关联作用。

表1 番石榴叶精油20种主要成分GC-MS定性结果

Table 1 Qualitative results of 20 essential oil compositions from guava leaves by GC-MS

序号	化合物	保留时间/min	RI _{cal}	RI _{lab}	CAS号
1	乙酸	12.278	1029	1019	142-62-1
2	桉叶油素	15.665	1038	1030	470-82-6
3	(-)- α -蒎烯	32.666	1385	1376	3856-25-5
4	β -石竹烯	35.645	1420	1409	87-44-5
5	(+)-香橙烯	36.804	1446	1439	489-39-4
6	α -石竹烯	37.637	1458	1446	6753-98-6
7	香树烯	38.117	1460	1449	25246-27-9
8	红没药烯	40.404	1511	1504	17627-44-0
9	顺式-红没药烯	40.898	1513	1504	29837-07-8
10	(-)- β -红没药烯	41.393	1516	1506	495-61-4
11	δ -杜松烯	42.539	1527	1518	483-76-1
12	去氢白菖烯	43.147	1530	1521	483-77-2
13	9-甲基-2-异丙基二环[4.4.0]-6,9-癸烯	44.639	1537	1524	29837-12-5
14	α -二去氢菖蒲烯	45.243	1548	1534	21391-99-1
15	氧化石竹烯	47.451	1586	1573	1139-30-6
16	(-)-斯巴醇	47.885	1591	1578	77171-55-2
17	(-)-蓝桉醇	48.753	1591	1580	51371-47-2
18	(-)-库贝醇	50.800	1658	1642	21284-22-0
19	δ -杜松醇	51.559	1661	1645	19435-97-3
20	植酮	54.350	1849	1836	502-69-2

注: RI_{cal} (计算得出的科瓦茨保留指数); RI_{lab} (标准科瓦茨保留指数)。

2.2 发酵过程中糖苷酶对番石榴叶精油的释放作用

本研究重点测定了发酵过程中 β -葡萄糖苷酶、内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶这三种纤维素酶,以及木聚糖酶和 β -半乳糖苷酶的活力变化。结果表明,三种纤维素酶和木聚糖酶的活性较高,且随着发酵进程持续升高,如表2所示。特别是内切葡聚糖酶和外切葡聚糖酶,在发酵第10 d活性分别达到81.30 U/g和

42.07 U/g。 β -葡萄糖苷酶的活性虽低于前两者,但与精油成分的释放具有更显著的相关性(图2),与含量最多的 β -石竹烯释放的相关系数 r 值为0.995 ($p<0.01$),与其他倍半萜烯的相关系数几乎也都达到 $r>0.990$ ($p<0.01$)。木聚糖酶与倍半萜烯类释放的相关性都达到 $r>0.970$ ($p<0.01$),内切葡聚糖酶和外切葡聚糖酶与各成分释放的相关系数分别为 $r>0.950$ ($p<0.05$)和 $r>0.930$ ($p<0.05$)。纤维素酶在发酵初期先被菌体释放,与木聚糖酶结合,水解番石榴叶细胞壁聚合物的主链,释放出游离的挥发性化合物。同时

也将植物原本储存在细胞壁和细胞腔区域中的香气苷水解酶- β -葡萄糖苷酶和 β -樱草糖苷酶释放出^[25,26]。到发酵中后期,当液泡被微生物分泌的多种水解酶裂解后^[25],暴露出的非挥发性香气苷将会在来自于菌体和自身拥有的多种糖苷酶的协同作用下,切断糖间链接和糖苷键,释放原本作为苷元存在的香气化合物。

木聚糖酶除在发酵前期起到裂解细胞壁释放精油成分的作用,到发酵中后期阶段,也是切割二或三糖苷的糖间连接所必须的酶,部分与木糖相连的结合态香气化合物会直接被其释放,这与Ganga等利用糖苷酶浸渍葡萄增加葡萄酒香气的研究中发现木聚糖酶可增加酒中非挥发性香气前体的研究相吻合^[27],Fan

等也直接从橘子中分离出木糖和葡萄糖作为香气苷的组成部分^[28]。 β -半乳糖苷酶也是原本存在于植物中的生香酶,但在发酵过程中其与精油各成分释放的相关系数 $r<0.850$ 且没有显著相关性,可能是因为红曲霉和巨大芽孢杆菌所产生的 β -半乳糖苷酶太少,且番石榴叶精油中的化合物结合的半乳糖远远低于葡萄糖的缘故^[27,29]。由图2可知,糖苷酶的活性变化与精油中非含氧化合物释放的相关性大于与含氧化合物释放的相关性,可能是由于含氧香气成分在植物内的结合方式,还需要酯酶等其他酶协同释放。有趣的是,桉叶油素与所有糖苷酶都呈负相关性,可能是因为作为单萜类更易在释放后挥发或被氧化^[17]。

表 2 发酵过程糖苷酶活力的变化

Table 2 Activities of glycosidase in the fermentation period

酶种类	未处理/(U/g)	0 d/(U/g)	4 d/(U/g)	7 d/(U/g)	10 d/(U/g)
β -葡萄糖苷酶	1.85±0.09 ^d	0±0 ^e	4.21±0.27 ^c	17.83±1.52 ^b	24.38±1.99 ^a
内切葡聚糖酶	3.01±0.31 ^d	0±0 ^e	9.93±1.03 ^c	59.22±3.71 ^b	81.30±6.13 ^a
外切葡聚糖酶	2.06±0.26 ^c	0±0 ^d	2.64±0.51 ^c	30.51±1.93 ^b	42.07±3.26 ^a
木聚糖酶	1.08±0.31 ^d	0±0 ^e	4.37±0.34 ^c	7.84±0.69 ^b	13.05±1.52 ^a
β -半乳糖苷酶	0.69±0.21 ^c	0±0 ^d	0.63±0.07 ^c	3.58±0.21 ^a	2.59±0.33 ^b

注: 同行小写字母表示差异显著 ($p<0.05$)。

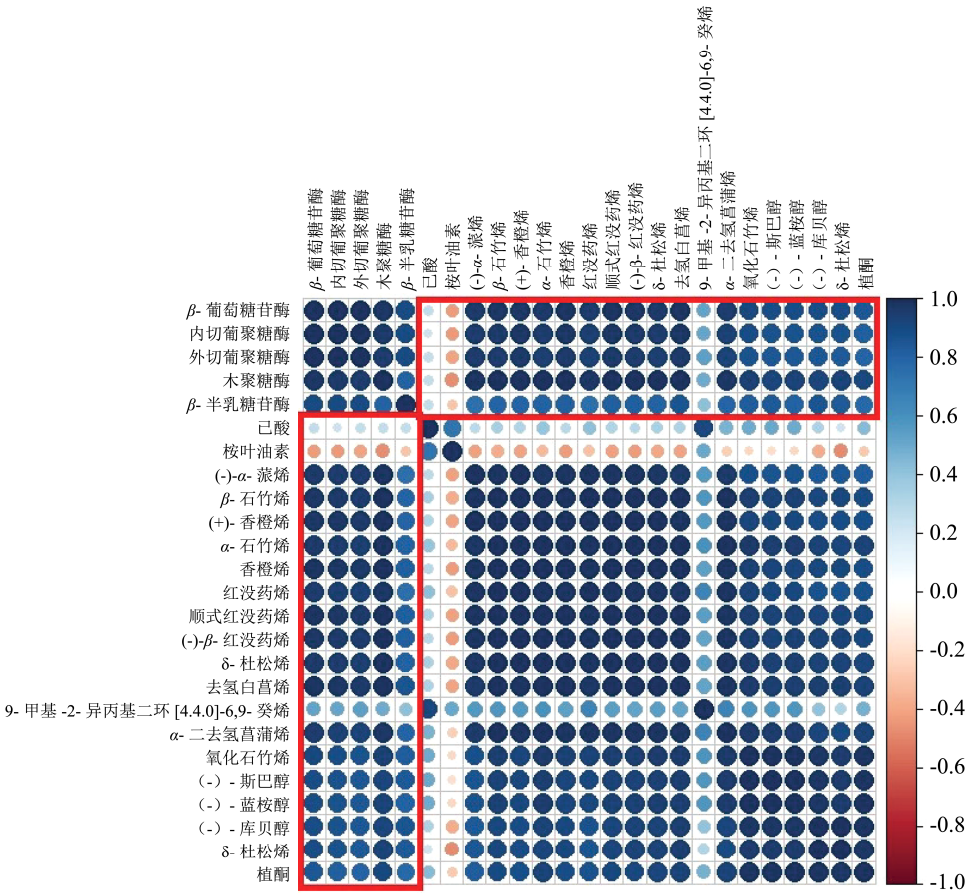


图 2 糖苷酶活性与发酵番石榴叶精油中 20 种主要化合物的相关性热图

Fig.2 The heatmaps of the correlation analysis between glycosidases and 20 main compounds of essential oils from fermented guava-leaf

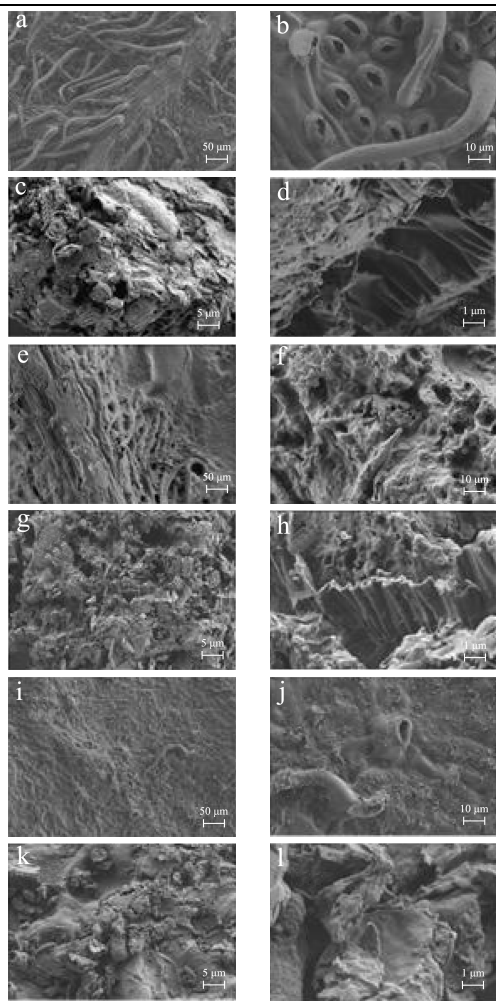


图3 不同处理的番石榴叶表皮和内部的扫描电镜微观形态图

Fig.3 Morphological characteristics of the epidermis and interior of the guava leaves treated with different methods under SEM

注: 未处理的番石榴叶表皮(a~b)和内部(c~d); 高压蒸汽灭菌后的番石榴叶表皮(e~f)和内部(g~h); 发酵第10 d的番石榴叶表皮(i~j)和内部(k~l)。

通过 SEM 观察灭菌和发酵前后番石榴叶的显微结构变化。未处理的番石榴叶(图 3a~3d 所示)表面光滑, 气孔、非腺毛和少量腺毛稠密排布在叶表面, 结构清晰完整, 打碎后内部可见大块纤维素碎块致密排布。经高压蒸汽灭菌后, 番石榴叶外壁变粗糙, 气孔、腺毛等结构被破坏, 表面分布不规则孔洞, 观察其内部结构, 可见碎块失去原本的棱角感, 致密的纤维排列变得疏松, 有断层出现(图 3e~3h 所示)。表明高压蒸汽对番石榴叶的破坏不仅作用到叶子表面覆盖的角质层, 还会涉及细胞壁和腺毛等结构。发酵第 10 d 的番石榴叶(图 3i~3l 所示)表皮所特有的腺体和叶脉结构几乎被酶水解完全, 消失不见, 微生物的菌丝体均匀附着在叶表面, 打碎叶子后可见原本紧致、完整的纤维结构被分解成片状。该结果进一步支持红曲霉和巨

大芽孢杆菌通过释放糖苷酶破坏番石榴叶的细胞壁、腺体, 深入切割叶的内部结构导致精油释放的事实。

2.3 发酵对番石榴叶精油体外活性的影响

2.3.1 抗氧化活性

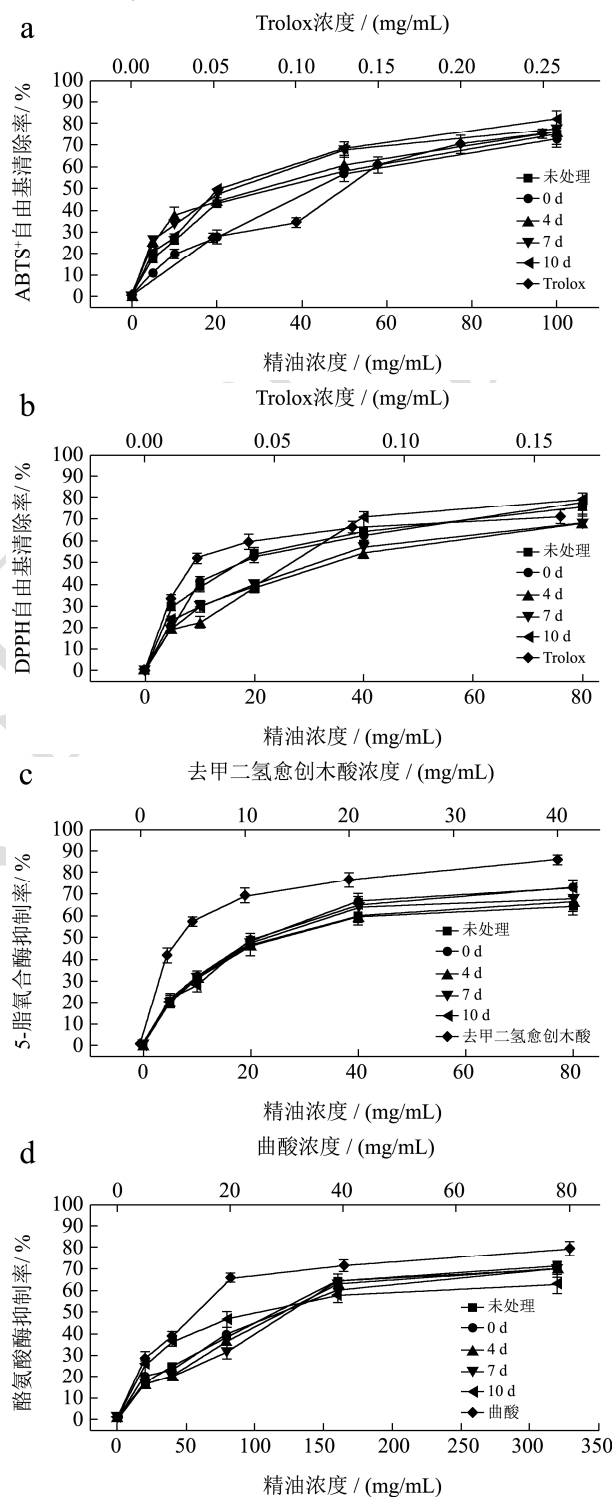


图4 发酵对番石榴叶精油体外抗氧化活性和酶抑制活性的影响

Fig.4 Effects of fermentation on antioxidant activities and enzyme-inhibitory activities of guava-leaf essential oils *in vitro*

注: a 为不同发酵时间的番石榴叶精油和阳性对照物 Trolox 对 ABTS⁺ 自由基的清除作用; b 为不同发酵时间的番石榴叶精油和阳性对照物 Trolox 对 DPPH 自由基的清除作用; c 不同发酵时间的番石榴叶精油和阳性对照物去甲二氢愈创木酸对 5-脂氧合酶的抑制能力; d 为不同发酵时间的番石榴叶精油和阳性对照物曲酸对酪氨酸酶的抑制能力。

抗氧化剂被认为是非常有必要的膳食补充剂, 它们可以保护人体健康并预防许多疾病的发生。基于电子转移和氢质子转移两种机制^[30], 通过测定发酵前后番石榴叶精油对 ABTS⁺ 和 DPPH 两种自由基的清除能力, 更全面地评价发酵对番石榴叶精油体外抗氧化活性的影响。各精油样品在 0.00~100.00 mg/mL 的浓度范围内对 ABTS⁺ 和 DPPH 自由基的清除率呈良好的剂量-效应关系, 清除能力的增加幅度由急到缓, 但所有精油的抗氧化能力均显著低于 Trolox ($p<0.05$) 和番石榴叶多酚提取物(对 ABTS⁺ 和 DPPH 的 IC₅₀ 分别为: 27.60±0.06 μg/mL 和 67.38±0.12 μg/mL)。这是由于番石榴叶精油的主要成分为倍半萜类而非具有共轭双键的酚类^[6]。在 ABTS⁺ 自由基清除试验中, 低浓度时 (0.00~20.00 mg/mL), 发酵 4 d 和 7 d 的番石榴叶精油表现出更强的清除能力; 而在中、高浓度时

(20.00~100.00 mg/mL), 发酵 7 d 和 10 d 的番石榴叶精油表现出更强的清除能力 (图 4a)。在 DPPH 自由基清除试验中, 低于 35.00 mg/mL 浓度时, 未处理和发酵 0 d 的番石榴叶精油表现出更强的清除能力; 浓度大于 35.00 mg/mL 时, 发酵 10 d 的番石榴叶精油表现出优异的自由基清除能力 (图 4b)。

半抑制浓度 (IC₅₀) 是衡量物质生物活性优劣的最常用参数, 即 ABTS⁺ 和 DPPH 自由基的初始浓度降低 50% 所需的抗氧化剂浓度。由表 3 可知, 发酵第 10 d 番石榴叶精油的 ABTS⁺ 自由基清除活性的 IC₅₀ 为 20.47±2.49 mg/mL, 明显高于其他发酵组 ($p<0.05$), 较对照组提高 32.66%, 但发酵第 10 d 番石榴叶提取出的精油对 DPPH 自由基的清除能力却下降 26.15%。这可能是由于蓝绿色的 ABTS⁺ 自由基适用于亲水和亲脂性的抗氧化剂系统, 而紫红色的 DPPH 自由基在测定时被溶解于有机介质, 仅适用于疏水系统。同时番石榴叶精油中的不同组分在不同反应体系里的电子传递、氧化电势及与活性位点的空间位阻都不同, 所以精油的抗氧化性能由拮抗和协同作用共同组成^[30], 在不同反应体系中发酵前后的番石榴叶精油呈现不同的抗氧化性结果, 需综合分析。

表 3 发酵番石榴叶精油的自由基清除活性和两种酶抑制活性的 IC₅₀

Table 3 IC₅₀ of two radical scavenging and two enzyme - inhibitory activities of essential oils from fermented guava-leaf

样品	ABTS ⁺ 自由基清除 (mg/mL)	DPPH 自由基清除 (mg/mL)	5-脂氧合酶抑制 (μg/mL)	酪氨酸酶抑制 (μg/mL)
未处理	30.40±2.71 ^B	17.02±1.57 ^D	28.56±1.49 ^A	116.59±5.17 ^D
0 d	41.37±2.99 ^A	18.72±0.69 ^D	21.89±0.80 ^D	119.28±3.51 ^C
4 d	23.92±1.04 ^C	33.73±2.29 ^A	27.08±2.85 ^A	123.09±5.97 ^B
7 d	21.71±0.76 ^D	30.20±3.20 ^B	25.34±0.74 ^B	127.65±4.18 ^A
10 d	20.47±2.49 ^D	21.47±1.95 ^C	23.21±1.92 ^C	107.41±3.48 ^E
Trolox	0.12±0.02 ^E	0.03±0.01 ^E	-	-
去甲二氢愈创木酸	-	-	3.72±0.11 ^E	-
曲酸	-	-	-	13.82±0.75 ^F

注: “-”表示未进行实验, 同列大写字母表示差异显著 ($p<0.05$)。

2.3.2 5-脂氧合酶抑制活性

5-脂氧合酶在体内的积累会导致白三烯的过量产生, 引起炎症与过敏反应, 导致心血管疾病、哮喘和牛皮癣等病理反应。并且该酶参与前列腺癌、膀胱癌等多种肿瘤的生长^[31]。探究发酵前后番石榴叶精油的 5-脂氧合酶抑制活性, 可以为开发治疗炎症反应及肿瘤等相关疾病的天然化合物提供理论依据。

未处理组番石榴叶精油对 5-脂氧合酶抑制能力的 IC₅₀ 为 28.56±1.49 μg/mL, 强于 IC₅₀ 分别为 36.15、39.22 和 48.58 μg/mL 的茼蒿 (*S. officinalis*)、洋葱 (*S. albicaulis*) 和蓝鼠尾草 (*S. chamelaeagnea*) 精油^[31]。

发酵后的番石榴叶精油显示出更强的抑制 5-脂氧合酶的能力, 与浓度呈现良好的正相关性, 但低于阳性对照去甲二氢愈创木酸 (图 4c)。发酵第 4 d、7 d、10 d 的番石榴叶精油的 IC₅₀ 分别为: 27.08±2.85、25.34±0.74 和 23.21±1.92 μg/mL, 对酶活性的抑制能力随着发酵程度的增加而增加 (表 3)。推测这与发酵过程中 β-石竹烯在番石榴叶精油组分中的占比从 37.29% 持续增加到 40.54% 有关。相关体内实验表明, 除了抑制 5-脂氧合酶途径, β-石竹烯也会选择性地与 2 型大麻素受体 (CB2) 结合, 在小鼠体内发挥显著的大麻素性抗炎作用。此外, 精油的抗炎活性也与涉及调节细

胞因子和转录因子的信号级联以及影响促炎基因的表达有关^[31]。

2.3.3 酪氨酸酶抑制活性

在哺乳动物皮肤中, 黑色素的过度分泌和积蓄会导致脂溢性角化病、糖尿病性皮肤病、恶性黑色素瘤、黄褐斑等病症^[32]。紫外线、慢性炎症和激素都可刺激黑色素生成, 而酪氨酸酶是控制黑色素生成的起始和限速酶。

采用不同组番石榴叶精油进行 5-脂氧合酶抑制能力的测定, 结果表明所有精油样品均表现出剂量依赖性的酪氨酸酶抑制作用, 但它们的抑制作用小于曲酸(图 4d)。对比 IC_{50} 分别为: 116.59 $\mu\text{g/mL}$ 、123.09 $\mu\text{g/mL}$ 和 127.65 $\mu\text{g/mL}$ 的未处理组、发酵第 4 d 和第 7 d 的精油样品来说, IC_{50} 为 107.41 $\mu\text{g/mL}$ 的发酵第 10 d 的番石榴叶精油对酪氨酸酶抑制作用最强。这与发酵对在抑制酪氨酸酶活性中起着至关作用的成分 β -石竹烯的浓度调节有关, 已证实 β -石竹烯在 B16F10 黑色素瘤细胞中, 通过下调 *MITF*, *TRP-1*, *TRP-2* 酪氨酸酶相关基因的表达来减少黑色素生成, 从而降低黑色素含量^[33]。此外, 有报道表明(+)-香橙烯、香树烯、 δ -杜松烯和氧化石竹烯也具有酪氨酸酶抑制活性, 因此番石榴叶精油各成分以协同方式发挥其对酪氨酸酶的抑制作用, 而发酵到第 10 d 刚好使精油中各成分达到酶抑制效果最好的浓度组合。实际上, 曲酸、熊果素和对苯二酚是抑制酪氨酸酶活性最常见的成分, 但关于它们安全性和有效性的文献仍存在一些争议。因此, 功效适中且副作用较小的精油作为新型天然酪氨酸酶抑制剂的开发有着巨大潜力。

3 结论

采用红曲霉和巨大芽孢杆菌对番石榴叶进行混菌固态发酵, 显著提高番石榴叶精油的提取率, 达到未发酵组的 6.53 倍, 效果优于超声、微波、酶辅助和超临界提取技术。相关性分析和 SEM 电镜观察表明, 番石榴叶精油中主要成分的释放与发酵中微生物分泌的糖苷酶密切相关, 三种纤维素酶和木聚糖酶在破坏细胞结构、促进挥发性芳香化合物的释放中起着关键作用, 其中 β -葡萄糖苷酶和木聚糖酶也是促使结合态芳香糖苷转化为挥发性化合物的关键酶。而番石榴叶精油主要成分的释放与 β -半乳糖苷酶的相关性较低。同时, 发酵后的番石榴叶精油清除 $ABTS^+$ 自由基和抑制 5-脂氧合酶、酪氨酸酶的能力均有所提高, 说明红曲霉和巨大芽孢杆菌的混菌固态发酵体系能够改善番石榴叶精油的生物活性。本研究为固态发酵技术提高植物精油的释放提供了理论依据, 也为开发新型的天

然药物或营养保健品提供新途径。

参考文献

- [1] El-ahmady S H, Ashour M L, Wink M. Chemical composition and anti-inflammatory activity of the essential oils of *Psidium guajava* fruits and leaves [J]. J Essent Oil Res, 2013, 25(6): 475-481
- [2] Santos F A, Rao V S N, Silveira E R. Investigations on the antinociceptive effect of *Psidium guajava* leaf essential oil and its major constituents [J]. Phytother Res, 1998, 12(1): 24-27
- [3] Ngoula F, Tekam M G, Kenfack A, et al. Effects of heat stress on some reproductive parameters of male cavia (*Cavia porcellus*) and mitigation strategies using guava (*Psidium guajava*) leaves essential oil [J]. J Therm Biol, 2017, 64: 67-72
- [4] Mendes L A, Martins G F, ValBON W R, et al. Larvicidal effect of essential oils from Brazilian cultivars of guava on *Aedes aegypti* L. [J]. Ind Crop Prod, 2017, 108: 684-689
- [5] Tawatsin A, Thavara U, Chansang U, et al. Field evaluation of deet, Repel Care (R), and three plant-based essential oil repellents against mosquitoes, black flies (Diptera: Simuliidae), and land leeches (*Arhynchobdellida: Haemadipsidae*) in Thailand [J]. J Am Mosquito Contr, 2006, 22(2): 306-313
- [6] WANG Lu, BEI Qi, WU Ya-nan, et al. Characterization of soluble and insoluble-bound polyphenols from *Psidium guajava* L. leaves co-fermented with *Monascus anka* and *Bacillus* sp and their bio-activities [J]. J Funct Foods, 2017, 32: 149-159
- [7] Paz A, Outeirino D, Guerra N P, et al. Enzymatic hydrolysis of brewer's spent grain to obtain fermentable sugars [J]. Bioresource Technol, 2019, 275: 402-409
- [8] WANG Lu, ZHANG Jia-chao, ZHANG Wei-min, et al. Role of carbohydrate-cleaving enzymes in phenolic mobilization of guava leaves tea during solid state bio-processing with *Monascus anka* and *Bacillus* sp [J]. Process Biochem, 2019, 82: 51-58
- [9] Kishore D, Kayastha A M. Optimisation of immobilisation conditions for chick pea beta-galactosidase (CpGAL) to alkylamine glass using response surface methodology and its applications in lactose hydrolysis [J]. Food Chem, 2012, 134(3): 1650-1657
- [10] Mendes L A, De souza T D, Menini L, et al. Spring alterations in the chromatographic profile of leaf essential oils

- of improved guava genotypes in Brazil [J]. Sci Horti-Amsterdam, 2018, 238: 295-302
- [11] Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, et al. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts [J]. J Food Compos Anal, 2006, 19(6-7): 669-675
- [12] Demirci F, Karaca N, Tekin M, et al. Anti-inflammatory and antibacterial evaluation of *Thymus sipyleus* Boiss. subsp *sipyleus* var. *sipyleus* essential oil against rhinosinusitis pathogens [J]. Microb Pathogenesis, 2018, 122: 117-121
- [13] Mason h. Structures and functions of the phenolase complex [J]. Nature, 1956, 177(4498): 79-81
- [14] 周江菊,任永权,雷启义. 桉叶花叶精油化学成分分析及其抗氧化活性测定[J]. 食品科学, 2014, 35(6): 137-141
ZHOU Jiang-ju, REN Yong-quan, LEI Qi-yi. Chemical composition and antioxidant activities of the essential oil from leaves of *Zanthoxylum ailanthoides* sieb. et zucc [J]. Food Science and Technology, 2014, 35(6): 137-141
- [15] Tischer B, Vendruscolo R G, Wagner R, et al. Effect of grinding method on the analysis of essential oil from *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. [J]. Chem Pap, 2017, 71(4): 753-761
- [16] TENG Xiu-xiu, ZHANG Min, Devahastin S. New developments on ultrasound-assisted processing and flavor detection of spices: A review [J]. Ultrason Sonochem, 2019, 55: 297-307
- [17] Rashidi S, Eikani M H, Ardjmand M. Extraction of *Hyssopus officinalis* L. essential oil using instant controlled pressure drop process [J]. J Chromatogr A, 2018, 1579: 9-19
- [18] CHEN Feng-li, LIU Sha-sha, ZHAO Zi-yue, et al. Ultrasound pre-treatment combined with microwave-assisted hydrodistillation of essential oils from *Perilla frutescens* (L.) Britt. leaves and its chemical composition and biological activity [J]. Ind Crop Prod, 2020, 143
- [19] Sowbhagya H B, Purnima K T, Florence S P, et al. Evaluation of enzyme-assisted extraction on quality of garlic volatile oil [J]. Food Chem, 2009, 113(4): 1234-1238
- [20] Sojic B, Pavlic B, Tomovic V, et al. Essential oil versus supercritical fluid extracts of winter savory (*Satureja montana* L.) - Assessment of the oxidative, microbiological and sensory quality of fresh pork sausages [J]. Food Chem, 2019, 287: 280-286
- [21] Aharoni A, Giri A P, Deuerlein S, et al. Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic *Arabidopsis* plants [J]. Plant Cell, 2003, 15(12): 2866-2884
- [22] Pichersky E, Noel J P, Dudareva N. Biosynthesis of plant volatiles: Nature's diversity and ingenuity [J]. Science, 2006, 311(5762): 808-811
- [23] Busko M, Goral T, Boczkowski M, et al. Relationships between volatile organic compounds with an emphasis on terpene compounds and genetic matrix in inoculated and non-inoculated winter wheat cultivars [J]. Chem Ecol, 2019, 35(10): 971-986
- [24] Mohamad N, Ramli N, Abdaziz S, et al. Comparison of hydro-distillation, hydro-distillation with enzyme-assisted and supercritical fluid for the extraction of essential oil from pineapple peels [J]. 3 Biotech, 2019, 9(6): 1-9
- [25] YANG Zi-yin, Baldermann S, Watanabe N. Recent studies of the volatile compounds in tea [J]. Food Res Int, 2013, 53(2): 585-599
- [26] GUI Jia-dong, FU Xiu-min, ZHOU Ying, et al. Does enzymatic hydrolysis of glycosidically bound volatile compounds really contribute to the formation of volatile compounds during the Oolong tea manufacturing process? [J]. J Agr Food Chem, 2015, 63(31): 6905-6914
- [27] Ganga A, Pinaga F, Querol A, et al. Cell-wall degrading enzymes in the release of grape aroma precursors [J]. Food Sci Technol Int, 2001, 7(1): 83-87
- [28] FAN Gang, QIAO Yu, YAO Xiao-lin, et al. Free and bound volatile compounds in juice and peel of Jincheng oranges [J]. Eur Food Res Technol, 2009, 229(4): 571-578
- [29] Halder J, Bhaduri A. Glycosidases from tea-leaf (*Camellia sinensis*) and characterization of beta-galactosidase [J]. J Nutr Biochem, 1997, 8(7): 378-384
- [30] Schaich K M, TIAN X, XIE J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays [J]. J Funct Foods, 2015, 14: 111-125
- [31] El euch S K, Hassine D B, Cazaux S, et al. *Salvia officinalis* essential oil: Chemical analysis and evaluation of anti-enzymatic and antioxidant bioactivities [J]. S Afr J Bot, 2019, 120: 253-260
- [32] Aumeeruddy-elalfi Z, Gurib-fakim A, Mahomoodally M F. Kinetic studies of tyrosinase inhibitory activity of 19 essential oils extracted from endemic and exotic medicinal plants [J]. S Afr J Bot, 2016, 103: 89-94
- [33] YANG C H, HUANG Y C, TSAI M L, et al. Inhibition of melanogenesis by beta-caryophyllene from lime mint essential oil in mouse B16 melanoma cells [J]. Int J Cosmetic Sci, 2015, 37(5): 550-554