



Analysis of Volatile Components From the Extracts of Honeysuckle by Microbial Fermentation

Wei Min, Chen Shuo, Song Xu-yan*, Li Ran, Pan Xi, Guo Guo-ning

Technology Center of China Tobacco Hubei Industry Limited-liability Company, Wuhan, China

Email address:

weimin@hbtobacco.cn (Wei Min), 99486535@qq.com (Song Xu-yan)

*Corresponding author

To cite this article:

Wei Min, Chen Shuo, Song Xu-yan, Li Ran, Pan Xi, Guo Guo-ning. Analysis of Volatile Components From the Extracts of Honeysuckle by Microbial Fermentation. *Science Discovery*. Vol. 6, No. 1, 2018, pp. 43-46. doi: 10.11648/j.sd.20180601.17

Received: March 1, 2018; **Accepted:** April 17, 2018; **Published:** May 23, 2018

Abstract: In order to analysis the volatile components of honeysuckle extract, the honeysuckle extracts by *Raoultella planticola* fermented and its contrast extracts were analyzed by GC/MS after simultaneous distillation extraction. The results showed: In compared with the contrast, (1) 35volatile components were identified from the fermented honeysuckle extract, including 22 kinds of new: 3- hydroxy -2- methyl ethyl ketone, hexanal, isoamyl propionate, benzene ethanol, two hydrogen actinidiolide, etc.,which accounted for more than 40% of the total relative percentage content; (2) And 23 kinds of volatile components' content changed, including linalool, α -terpineol increased, at the same time, the stimulus components disappeared, such as dibutyl phthalate. After fermentation, the volatile components of honeysuckle extract has changed in a big way, with fragrance, fruit sweet, creamy and rich aroma, and stimulating ingredients reduce, leading to improve the quality of aroma.

Keywords: *Enterobacter Mori*, Biotransformation, Honeysuckle Extract, GC/MS, Volatile Components

微生物发酵金银花提取物的挥发性成分分析

魏敏, 陈硕, 宋旭艳*, 李冉, 潘曦, 郭国宁

湖北中烟工业有限责任公司技术中心, 武汉, 中国

邮箱

weimin@hbtobacco.cn (魏敏), 99486535@qq.com (宋旭艳)

摘要: 采用桑肠杆菌(*Enterobacter mori*)发酵金银花提取物, 经同时蒸馏萃取, 气相质谱对比分析发酵金银花提取物及其对照的挥发性成分。结果表明, 与对照相比较, (1)微生物发酵金银花提取物鉴定出36种挥发性成分, 新增有23种, 主要包括3-羟基-2-丁酮、己醛、丙酸异戊酯、苯乙醇、二氢猕猴桃内酯等香气成分, 占相对百分含量40%以上; (2)相对含量发生变化的有13种, 芳樟醇、 α -松油醇等大幅增加; 邻苯二甲酸二正丁酯等刺激性成分消失。微生物发酵后金银花提取物挥发性香气成分改变大, 带有清香、水果甜香、奶香等丰富香气, 刺激性成分减少, 香气质提高。

关键词: 桑肠杆菌, 微生物转化, 金银花提取物, GC/MS, 挥发性成分

1. 引言

金银花为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花 [1], 主要含有绿原酸、木犀草苷等成分, 其化学组成复杂, 数目繁多, 并且在抑菌、疏散风热等方面也起着显著作用, 是金银花的有效部位之一 [2, 3]。金银花在抗病毒活性方面不仅受到人们的关注而且也得到了广泛的应用 [4]; 在各种因素对挥发性化学成分影响方面也有不少研究报道, 如烘干 [5]、不同产地 [6]、不同部位 [3]、变种 [7]、乳酸菌发酵 [8] 等; 金银花致香成分检测及在烟草中的应用也做了相关研究 [9,10]。本工作拟利用产香菌桑肠杆菌 *Enterobacter mori* 发酵金银花提取物, 采用同时蒸馏萃取和气相色谱-质谱 (GC/MS) 检测分析其挥发性成分, 以研究微生物发酵对金银花提取物香气成分的改善, 为这一药食两用资源的开发利用提供试验科学依据。

2. 材料与方法

2.1. 材料和仪器

桑肠杆菌 *Enterobacter mori* VL4-3 CCTCC M2012020, 从香荚兰植物的茎中筛选得到, 于2012年1月16日保藏于武汉大学中国典型培养物保藏中心;

斜面培养基 (马铃薯葡萄糖琼脂培养基, 北京三药科技开发公司, BR): 马铃薯浸液180 mL/L, 葡萄糖18 g/L, 琼脂14 g/L; 原始种子培养基 (麦芽糖蛋白胨培养基): 麦芽糖50 g/L, 蛋白胨9 g/L, 氯化钠4.5 g/L; 葡萄糖、琼脂、麦芽糖、蛋白胨、氯化钠、二氯甲烷、无水硫酸钠 (国药集团化学试剂有限公司, AR), 95%乙醇 (食用级); 发酵底物: 市售金银花 (产地湖北) 粉碎到40目后, 回流提取3小时, 抽滤后的滤液。

生化培养箱 (上海精宏实验设备有限公司, SHP-080)、灭菌锅 (上海三申医疗器械有限公司, YX.350Z)、超净工作台 (苏净集团安泰公司, SW-CJ-1FD)、恒温摇床 (武汉中科科仪技术发展有限责任公司, HQL 300B)、气相色谱质谱联用仪 (安捷伦科技公司, Agilent GC:6890N MS:5973)。

2.2. 方法

2.2.1. 微生物发酵金银花提取物的制备

将金银花和水按质量比1: 40混合, 回流提取3 h后, 抽滤, 取滤液, 115℃高压灭菌25分钟。

将桑肠杆菌L4-3接种到马铃薯葡萄糖琼脂斜面培养基上, 在恒温培养箱中31℃、pH自然, 静置培养48 h后置于4℃冰箱中; 用上述斜面培养物, 接种到种子培养基, 在31℃, 转速130 rpm条件下振荡培养24 h, 转接1次后制得种子培养液; 将种子培养液按体积比18%接种到金银花滤液中, 装罐量为20%, 在pH自然, 温度32℃, 转速120 rpm, 不避光条件下, 发酵36 h, 得到金银花发酵液, 抽滤浓缩得到相对密度约为1.3的浸膏, 与95%乙醇按质量比1: 3进行醇沉, 过夜后抽滤, 除去杂质保留滤液, 并减压浓缩

除去溶剂, 制得黄褐色浸膏, 密度为1.11, 为微生物发酵金银花提取物。

2.2.2. 挥发性成分同时蒸馏萃取

将5g微生物发酵金银花提取物装入圆底烧瓶中, 加入400 mL水, 用电热套加热至沸腾, 另一侧的圆底烧瓶中加入200 mL的二氯甲烷, 60℃水浴沸腾, 待中间分液管处液面出现分层后计时萃取2.5 h。萃取结束后, 向二氯甲烷萃取液中加入无水硫酸钠, 过夜, 过滤并浓缩至1 mL, 浓缩液用于进行GC/MS分析。同样的方法进行5 g未发酵金银花提取物, 同时蒸馏萃取后作为对照样, 进行GC/MS分析。

2.2.3. GC/MS对比检测分析

HP-5MS(50 m×0.25 mm×0.25 μm)毛细管柱; 进样温度: 250℃; 分流比25:1; 载气: He, 1 mL/min; 升温程序: 从50℃ (1 min) 以5℃/min升到250℃ (5 min); 传输线温度: 250℃; 离子源: EI源; 电子能量: 70 eV; 扫描范围: 50~400 amu; 使用WILEY和MINILAB谱库进行检索。

3. 结果与分析

微生物发酵金银花提取物及其对照的挥发性香气成分GC/MS分析结果 (表1)。结果表明: ①金银花提取物对照共分离鉴定出23种挥发性成分, 总相对百分含量为57.05%, 包括酯类9种 (32.00%), 酸类6种 (22.67%), 醇类3种 (0.93%), 酮类2种 (0.77%), 酚类1种 (0.40%), 其他杂环类2种; ②微生物发酵金银花提取物共分离鉴定出36种挥发性成分, 总相对百分含量为77.38%, 包括酯类10种 (23.61%), 酸类4种 (13.53%), 酮类3种 (21.58%), 醛类3种 (7.19%), 醇类3种 (3.50%), 烯类2种 (0.30%), 酚类2种 (0.15%), 烷烃1种 (0.70%), 其他杂环类化合物8种, 其中新出现了23种成分, 主要有3-羟基-2-丁酮、己醛、丙酸异戊酯、3-糠醛、二甲基呋喃、苯乙醇、二氢猕猴桃内酯等, 占总挥发性成分相对百分含量40%以上。其中, 3-羟基-2-丁酮 (21.42%), 具有强烈的奶油、脂肪、白脱样香气, 高度稀释后有令人愉快的奶香气; 己醛, 呈生的油脂和青草气及苹果香味; 丙酸异戊酯, 具有水果香味, 似杏、悬钩子、凤梨洋气息; 苯乙醇, 具有柔和、愉快而持久的玫瑰香气; 二氢猕猴桃内酯 (7.37%), 带有香豆素样香气, 并有麝香样气息; 还有3-糠醛、二甲基呋喃、五甲基环戊烯、2,3-二氢-3,3-二甲基-4-硝基苯并呋喃-2-酮、红没药醇氧化物 A, 9,12 -十八碳二烯酸甲酯、2-甲基-7-苯基吡啶、1-甲基-2-苯基吡啶、己二酸二异辛酯、正十八烷, 邻苯二甲酸二异辛酯等。③芳樟醇, 具有铃兰香气, α-松油醇, 具有优雅的紫丁香香气; 以及肉豆蔻酸、十六酸乙酯等6种香气成分相对百分含量有不同程度的提高。相对百分含量降低的有2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚, 为刺激性成分; 棕榈酸, 可能被转化分解为其他小分子香气物质。④经微生物发酵后, 金银花提取液中一些成分消失, 包括邻苯二甲酸二乙酯、邻苯二甲酸二正丁酯等刺激性成分, 占对照相对百分含量的12.95%, 以及其他一些香气成

分，可能经转化、分解为其他小分子挥发性物质。所有这些香气糅合在一起赋予微生物发酵金银花提取物清香、水果甜香、奶香等丰富香气，刺激性成分减少，香气质提高。

表1 微生物发酵金银花提取物与其对照的挥发性成分GC/MS对比分析。

| 峰号 | 保留时间RT(min) | | 化合物 | 相对百分含量 (%) | |
|----|-------------|----------|-----------------------------|------------|----------|
| | 对照 | 发酵金银花提取物 | | 对照 | 发酵金银花提取物 |
| 1 | - | 5.62- | 3-(4-硝基苯氨基)-吡啶 | - | 0.58 |
| 2 | - | 6.26 | 3-羟基-2-丁酮 | - | 21.42 |
| 3 | - | 8.56 | 己醛 | - | 2.27 |
| 4 | - | 9.27 | 丙酸异戊酯 | - | 1.35 |
| 5 | 9.51 | - | 异戊酸 | 0.18 | - |
| 6 | - | 9.75 | 3-糠醛 | - | 4.83 |
| 7 | - | 9.81 | 二甲基呋喃 | - | 2.94 |
| 8 | - | 12.33 | 五甲基环戊烯 | - | 0.15 |
| 9 | 14.05 | 14.12 | 4-乙烯基吡啶 | 0.13 | 0.13 |
| 10 | 18.06 | 18.11 | 芳樟醇 | 0.62 | 1.78 |
| 11 | - | 19.10 | 苯乙醇 | - | 1.22 |
| 12 | 20.49 | - | 2,2,6-三甲基-6-乙烯基四氢-2H-呋喃-3-醇 | 0.10 | - |
| 13 | 21.08 | 21.14 | α-松油醇 | 0.21 | 0.50 |
| 14 | - | 21.99 | α-4-二甲基-3-环己烯-1乙醛 | - | 0.09 |
| 15 | 25.58 | 25.61 | 丙酸苯乙酯(内标) | 3.44 | 3.48 |
| 16 | 26.62 | - | 大马酮- | 0.16 | - |
| 17 | - | 29.66 | 2,4-二叔丁基酚 | - | 0.08 |
| 18 | 29.78 | 29.84 | 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚 | 0.40 | 0.07 |
| 19 | 30.15 | 30.19 | 六甲基-1,3-环己二烯 | 0.15 | 0.15 |
| 20 | - | 30.72 | 二氢猕猴桃内酯 | - | 7.38 |
| 21 | 31.77 | - | 邻苯二甲酸二乙酯 | 1.02 | - |
| 22 | - | 33.46 | 红没药醇氧化物 A | - | 0.51 |
| 23 | 34.08 | - | 甲基庚烯酮 | 0.61 | - |
| 24 | 35.18 | 35.23 | 肉豆蔻酸 | 0.83 | 1.40 |
| 25 | 37.71 | 37.79 | 邻苯二甲酸丁酯2-乙基己基酯 | 4.87 | 5.29 |
| 26 | 38.68 | 38.74 | 邻苯二甲酸, 6-乙基-3-辛基丁基酯 | 0.62 | 1.15 |
| 27 | - | 39.05 | 2,3-二氢-3,3-二甲基-4-硝基苯并呋喃-2-酮 | - | 0.16 |
| 28 | 39.28 | 39.39 | 棕榈酸 | 15.75 | 9.23 |
| 29 | 39.68 | - | 邻苯二甲酸二正丁酯 | 11.93 | - |
| 30 | 39.95 | 40.02 | 十六酸乙酯 | 0.94 | 1.69 |
| 31 | - | 42.04 | 9,12-十八碳二烯酸甲酯r | - | 0.46 |
| 32 | - | 42.12 | 2-甲基-7-苯基吡啶 | - | 0.20 |
| 33 | - | 42.55 | 1-甲基-2-苯基吡啶 | - | 0.74 |
| 34 | 42.70 | 42.75 | 亚油酸 | 1.93 | 0.84 |
| 35 | 42.76 | 42.82 | 十八碳-9-烯酸 | 2.52 | 2.06 |
| 36 | 43.27 | 43.33 | 亚油酸乙酯 | 1.74 | 1.47 |
| 37 | - | 43.89 | 十五烷酸-2,6,10,14-四甲基-甲酯 | - | 0.42 |
| 38 | - | 43.96 | 柠檬酸丁酯 | - | 0.52 |
| 39 | 48.53 | - | 脱氢枞酸甲酯 | 0.33 | - |
| 40 | - | 49.36 | 己二酸二异辛酯 | - | 1.99 |
| 41 | - | 50.59 | 2,2'-亚甲基双-(4-甲基-6-叔丁基苯酚) | - | 1.09 |
| 42 | - | 50.98 | 2-苯基-1-苯并吡喃 | - | 0.77 |
| 43 | 51.77 | - | 脱氢枞酸 | 1.46 | - |
| 44 | - | 52.83 | 正十八烷 | - | 0.70 |
| 45 | 55.39 | - | 邻苯二甲酸单乙基己基酯 | 9.94 | - |
| 46 | - | 55.41 | 邻苯二甲酸二异辛酯 | - | 2.35 |
| 47 | 57.89 | - | 7-氧脱氢枞酸甲基酯 | 0.61 | - |
| 48 | - | 63.32 | 二甲基-苯并[h]喹啉 | - | 0.17 |

注：①符号“—”表示未检出；②内标为丙酸苯乙酯。

4. 结论

经桑肠杆菌（*Enterobacter mori*）发酵后，金银花提取物挥发性香气成分发生了较大的改变，相对百分含量总量从57.05%提高到77.38%，成分、种类增多，香气更丰富自然，带有清香、水果甜香、奶香等丰富香气，同时刺激

性成分减少，香气质提高。微生物在增殖过程中可产生庞大的高活性酶系，如多糖水解酶类、蛋白酶类、酯化酶类、氧化还原酶类及裂合酶类等，在酶促作用、化学作用及微生物体内复杂代谢的协同作用下，以金银花提取液为原料发生分解、降解、氧化、还原、聚合、偶联、转化等作用，形成复杂的低分子化合物，其中包括各种香味化合物，如醇类、醛类、酮类、酸类、酯类、酚类、吡喃类等。本论

文期望能对金银花这一药食两用资源的研究开发提供试验科学依据,并对微生物发酵技术开拓金银花提取物的资源利用方面提供参考。在此研究基础上,希望对微生物发酵金银花香料的生产工艺进一步优化,并对其应用进行研究。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典, 四部[S].北京:中国医药科技出版社, 2015:203。
- [2] 管仁伟,王亮,曲永胜,等.“九丰一号”金银花挥发性成分的GC-MS分析[J].中成药, 2014, 36(11):2367-2371。
- [3] 杨俊杰, 陈琼.河南野生忍冬叶、花、果挥发性成分比较[J].福建林业科技,2015,42(2):5-8。
- [4] 王亚琼, 陈卫, 钟水生, 等.金银花清热解毒作用的血清代谢组学研究[J].中药材, 2016,39(5):1129-1133。
- [5] 杨金平, 高玲, 管仁伟, 等.烘干对金银花挥发性成分的影响[J].时珍国医国药, 2016,27(4):869-871。
- [6] 杜成智, 冯旭, 王卉, 等.不同产地金银花挥发性成分的GC-MS 分析[J].江苏农业科学,2014,42(7):313-315。
- [7] 崔婷婷, 单长松, 吴澎, 等.金银花和红银花挥发性成分的顶空固相微萃取气质联用检测与比较[J].园艺学报, 2015, 42(11):2283-2290。
- [8] 陈学红, 秦卫东, 马利, 等.乳酸菌发酵对金银花抗氧化活性的影响[J].农业机械, 2013, 26(9):84-87。
- [9] 景延秋, 全琳, 罗辉, 等.金银花中挥发性及半挥发性成分的测定及其在烟草中的应用展望[J].江西农业学报,2010,22(12):120-123。
- [10] 解民, 张琳.金银花萃取物致香成分研究及其在烟草中的应用[J].食品工业, 2015, 36(3):115-117。