

橄榄果渣乙醇提取物成分分析及抗氧化和抑菌性能研究

李春爱,田立鹏,蔡梦,蒲陆梅*

甘肃农业大学理学院,兰州 730070

摘要:橄榄果渣中生物活性成分丰富。本文主要研究橄榄果渣提取物成分及其对灰葡萄孢的抑菌性能。首先以橄榄果渣为原料,采用加热回流法,分别以 H₂O、50% 乙醇、70% 乙醇和 90% 乙醇为提取剂,得到四种提取物并采用 HPLC 和 GC-MS 对提取物进行成分分析。其次测定了提取物的总酚含量、抗氧化性和对灰葡萄孢的抑菌性能。研究表明,90% 乙醇提取物的酚类含量较高,抗氧化水平优良,并且对灰葡萄孢有明显的抑制作用。该研究为橄榄果渣活性成分在抑菌性能方面的研究提供了一定的理论依据。

关键词:橄榄果渣;提取物;抗氧化;灰葡萄孢;抑菌性

中图分类号:S476

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)1-0007-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.1.002

Study on the component, antioxidant and antibacterial properties of ethanol extracts from olive pomace

LI Chun-ai, TIAN Li-peng, CAI Meng, PU Lu-mei*

College of Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

Abstract: Bioactive component are rich in olive pomace. This paper mainly researched the component and antibacterial activity against *Botrytis cinerea* of olive pomace extracts. Firstly, olive pomace were extracted by heating reflux method with H₂O, 50% ethanol, 70% ethanol and 90% ethanol as extractants respectively and four extracts were obtained. And the component of extracts were analyzed by GC-MS and HPLC. Secondly, the extracts of the total phenol and antioxidant activity, antibacterial activity against *B. cinerea* were investigated. The results showed that among the four extracts, 90% ethanol extract had high phenolic content, excellent antioxidant properties and obvious inhibitory effects on *B. cinerea*. This study provides a theoretical basis for the study of antibacterial properties of active components from olive pomace.

Key words: olive pomace; extracts; antioxidation; *Botrytis cinerea*; fungistasis

油橄榄主要产于地中海地区,为亚热带木本油料兼果用树种,橄榄果肉富含优质食用植物油——橄榄油,享有植物油皇后的美誉^[1]。橄榄树作为木本油料树种,因其“优质、高效益、高产”的特点而闻名,又以喜光、耐寒、生命力强而被称为长命树种^[2]。随着世界各国橄榄果加工业的迅速发展,每年都会产生大量橄榄油工业的废弃物——橄榄果渣^[3,4]。橄榄油加工过程中,橄榄果实中的酚类化合物(约2%)进入油相,大部分酚类化合物(98%)仍保留在固体残渣中^[5]。

橄榄果渣由橄榄皮、橄榄浆、橄榄核和废水组

成。据报道橄榄果渣的酚含量很高,是特级初榨橄榄油(EVOO)的100倍^[6,7],其酚类化合物是一种复杂的成分混合物,包括羟基酪醇(hydroxytyrosol, HT)和酪醇衍生物、环烯醚萜类前体、裂环烯醚萜类化合物和衍生物(橄榄苦苷、橄榄苦苷糖苷配基、女贞苷及其衍生物)、类黄酮(紫杉醇及其衍生物、木犀草素、芹菜素和芦丁)、苯丙烷类化合物(马鞭草苷及其衍生物)、木脂素(松脂醇及其衍生物)和酚酸(阿魏酸、香草酸、莽草酸、没食子酸、咖啡酸、肉桂酸和对香豆酸)^[8]。这些酚类化合物的结构中都含有羟基,其对自由基有一定的清除能力,因此它们具有一定的抗氧化活性。有研究发现,橄榄果渣中羟基酪醇的含量已达到1 624~2 873 mg/kg^[9,10]。HT与马斯林酸(MA,高浓度橄榄蜡)和齐墩果酸

(OA, 一种三萜酸)一起作用具有许多功能,例如抗氧化、抗菌、抗炎、抗糖尿病、抗癌和抗 HIV 等活性^[11,12]。

近年来对橄榄果渣提取物的研究发现,其在预防心脑血管疾病、抗氧化以及抑制细菌等方面有一定的作用^[13-15],而其对真菌生长抑制作用鲜有报道。有大量学者研究从橄榄果渣中提取分离有效成分,所采用的方法有超声辅助酶解法^[16],水解法^[17,18],有机溶剂提取法等,虽然这些方法得到的有效成分产率高,但综合评价后发现其所需成本较高,且提取过程中所使用的部分有机溶剂毒性比较大。因此,本文采用绿色环保的提取剂 H₂O、50%乙醇、70%乙醇和 90%乙醇,采用加热回流法得到提取物,利用 HPLC 和 GC-MS 对提取物进行了的成分分析,并对提取物进行了抗氧化性评价和对灰葡萄孢的抑菌性能研究。研究结果为橄榄果渣在抑菌领域的有效利用提供了一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

实验材料:橄榄果渣,由甘肃省陇南市油橄榄翔宇公司提供(-80 ℃ 储存),烘干备用。灰葡萄孢由甘肃农业大学食品科学与技术学院采后生物学实验室提供。

实验试剂:无水乙醇(AR)、羟基酪醇(98%纯度)、2,2-联苯-1-苦味酸(DPPH)、福林试剂(BR, 1 mol/L)(上海远业生物科技有限公司,中国);甲醇(AR)(天津市津东天正精细化学试剂厂,中国);铁氰化钾(AR)、三氯乙酸(AR)(成都市科龙化工试剂厂,中国)。

实验仪器:LC-20A 液相色谱(北京京科瑞达科技有限公司);GC-MS-QP2010PLUS 型气相色谱-质谱联用仪(岛津企业管理(中国)有限公司);LDZX-50KBS 立式高压蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械厂);BCM-1600A 生物洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司)等。

1.2 方法

1.2.1 提取物制备

橄榄果渣经冷冻干燥,粉碎,过筛(80 目)除去果核,得到果粉。按料液比为 1:10 将果粉固体分别与提取剂(H₂O、50%乙醇、70%乙醇和 90%乙醇)混合,倒入圆底烧瓶,80 ℃ 回流 1 h,离心,上清液减压蒸馏除去乙醇,剩余液体经冷冻干燥得到固体提取物。本文以 H₂O、50%乙醇、70%乙醇和 90%乙

醇为提取剂提取的提取物分别记为 E1、E2、E3 和 E4。

1.2.2 果渣粉主要成分分析

粗脂肪含量:用索氏抽提法;水分含量:根据国标 GB/T 5497 测定;灰分:用国标 GB/T 5505-2008 测定;总蛋白质含量:采用国标法 GB 5009.5-2016 测定;碳水含量:总碳水化合物含量由蛋白质、水分、总脂肪和总灰分含量之和与 100 之差计算得到。

1.2.3 提取物的总酚含量测定

总酚含量采用 Yin 等^[19]的比色法稍做修改测定,没食子酸标准溶液 0.1 mg/mL;准确称取 0.025 g 没食子酸用甲醇定容至 250 mL,低温避光贮存;0.2 mol/L 的福林酚试剂:准确量取 2 mL 福林酚标准试剂,水稀释至 10 mL;0.15 g/mL Na₂CO₃:称取 Na₂CO₃ 粉末 37.5 g,蒸馏水溶解并定容至 250 mL。

比色法条件:取 6 个 10 mL 比色管,分别加入 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 的没食子酸溶液,分别先加入 1.0 mL 福林酚试剂,混匀再加入 2.0 mL Na₂CO₃ 溶液,摇匀再加蒸馏水定容到 10 mL,反应静置 1 h,在 760 nm 处测定吸光度值。提取物总酚测定:1 mg/mL 的样品,按上述方法测定,每组样品测定三次,根据标准曲线以没食子酸作为对照品,计算样品的总酚含量。

1.2.4 提取物中羟基酪醇含量

根据 Obied 等^[20]描述的方法,并略作修改。分别称取 0.004 g 提取物溶于 2 mL 色谱纯甲醇,得到 2 mg/mL 的样品,过 0.45 μm 滤膜,进行液相色谱测定。色谱条件:色谱柱是 C₁₈ 柱(250 mm × 5.0 mm, 4.6 μm),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 280 nm,柱温为 30 ℃,进样量为 10 μL,运行时间 60 min。流动相:流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液,流动相 B 为甲醇。洗脱梯度:0 ~ 10 min,流动相 A 为 83%,流动相 B 为 17%;10 ~ 20 min,流动相 A 为 85%,流动相 B 为 15%;20 ~ 25 min,流动相 A 为 70%,流动相 B 为 30%;25 ~ 45 min,流动相 A 为 60%,流动相 B 为 40%;45 ~ 60 min,流动相 A 为 60%,流动相 B 为 40%。

1.2.5 果渣粉与提取物中挥发性成分分析

固体样品直接进行固相微萃取,固体加热温度为 70 ℃,加热期间将萃取头插在顶空瓶中,注意不要接触到固体,10 min 后取出萃取头,手动进样。

GC-MS 分析方法采用 Liu 等^[21]的方法稍作修改,GC-MS 条件色谱柱:OV-1701(30 mm × 0.25

mm × 0.25 μm);升温程序:柱温 40 °C 保持 2 min,以 4 °C/min 升至 180 °C,保持 1 min,再以 8 °C/min 升至 220 °C;载气:氦气,柱流速为 1.77 mL/min,溶剂延迟 2.5 min,进样温度:250 °C,进样方式:不分流进样。MS 条件离子源为 EI 源,接口温度 250 °C,离子源温度 200 °C,扫描质量范围 35 ~ 350 m/z。

1.2.6 提取物抗氧化性

1.2.6.1 DPPH·清除率

根据 Duan 等^[22]所述的方法,对橄榄果渣提取物的清除活性进行了测定,并略作修改。0.1 mmol/L DPPH 溶液的制备:精密称取 0.004 g DPPH,加入无水乙醇溶解,定容至 100 mL,在 4 °C 避光保存。测定了不同浓度(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL)提取物对 DPPH·的清除活性。实验方法(见表 1)。每组做三个平行组,使用公式(1)计算 DPPH·清除率。

$$\text{DPPH}\cdot\text{清除率} = [1 - (A_S - A_R) / A_C] \times 100\% \quad (1)$$

式中: A_S 为样品的吸光度; A_R 为参比的吸光度; A_C 为空白的吸光度。

表 1 DPPH·清除实验方法

Table 1 Experimental method of DPPH·scavenging activity

样品 Sample	指标 Index	实验步骤 Experimental step
提取物 Extract	A_S	100 μL 样品(不同浓度) + 3.9 mL DPPH
	A_R	100 μL 样品(不同浓度) + 3.9 mL 无水乙醇
	A_C	100 μL(样品溶剂) + 3.9 mL DPPH

1.2.6.2 Fe^{3+} 还原力

按照 Zhao 等^[23]描述的方法,对橄榄果渣提取物的还原能力进行了测定,分别取不同浓度(2、1.5、1、0.5、0.2 mg/mL)的 E1、E2、E3 和 E4 0.5 mL,与 pH 6.6 的 0.2 mol/L 磷酸缓冲液 2.5 mL 和 1 g/100 mL $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 2.5 mL 混合,在 50 °C 下反

应 20 min,加入 10 g/100 mL 三氯乙酸 2.5 mL,4 000 rpm 离心 10 min,取上清液 2.5 mL,加蒸馏水 2.5 mL,加入 0.1 g/100 mL 三氯化铁 0.5 mL,在 700 nm 处测定吸光度,蒸馏水为空白。吸光度越大,表示样品的还原力越大。

1.2.7 提取物对灰葡萄孢的抑制

孢子悬浮液制备:灰葡萄孢菌饼,用约 10 mL 无菌水冲洗至锥形瓶中,经过滤后充分振荡均匀形成孢子悬浮液,采用血球计数法,使孢子浓度控制在 1×10^6 CFU/mL。

菌落生长:因 90% 乙醇提取物多酚含量最高,故选其做抑菌实验。配制成浓度为 100、50、25、12.5 mg/mL 的提取物溶液,分别加入 PDA 培养基(50 °C),制备成带药培养基(10、5、2.5、1.25 mg/mL),待 PDA 培养基凝固,接菌,观察并记录 1 ~ 8 天的菌落直径。

1.2.8 数据分析

实验数据采用 Excel 整理,SPSS 进行方差分析($P < 0.05$,表示差异显著)。

2 结果

2.1 橄榄果渣的主要成分分析

橄榄果渣的组成成分如表 2 所示。湿重样品的水分含量比为 65.52 ± 0.52 g/100 g,蛋白质和灰分含量比分别为 0.18 和 0.61 g/100 g,脂肪含量比为 2.25 g/100 g;在干重比中,总碳水化合物占比最高,达到 89.97 ± 0.48 g/100 g,总蛋白、总脂肪和灰分含量比分别达到 0.45 ± 0.1 、 5.16 ± 0.5 和 0.61 ± 0.01 g/100 g。通过对比干重含量比和湿重含量比,发现在干重比中总碳水化合物含量比最高,其次是水分、总脂肪。湿重比中水分含量比最高,其次是总碳水化合物、总脂肪。结果表明,橄榄果渣主要成分中总碳水化合物、水分、总脂肪占比较高。

表 2 橄榄果渣中的主要成分

Table 2 Main components in olive pomace

近似分析 Approximate analysis	干重 Dry weight (g/100 g)	湿重 Wet weight (g/100 g)
水分 Water	3.82 ± 0.04	65.52 ± 0.52
总蛋白 Total protein	0.45 ± 0.1	0.18 ± 0.01
总脂肪 Total fat	5.16 ± 0.5	2.25 ± 0.21
灰分 Ash	0.61 ± 0.01	0.61 ± 0.02
总碳水 Carbohydrate	89.97 ± 0.48	31.43 ± 0.32

2.2 提取物的总酚含量

采用没食子酸比色法测定提取物中总酚的含量,标准曲线如下:

$$y = 116.6x + 0.14, R^2 = 0.9959 \quad (2)$$

式中: y 为计算浓度, x 为吸光度,总酚含量用公

式(2)计算,结果如表3所示,E4的总酚含量最大为73.00 mg/g,E1的总酚含量最少为26.00 mg/g,该实验结果发现,随着提取剂中乙醇含量的增加,提取物中的总酚含量逐渐增加。

表3 提取物中的总酚含量

Table 3 Total phenol content in extract

提取物 Extract	吸光度 Absorbance	浓度 Concentration (mg/mL)	总酚 Total phenol (mg GAE/g)
E1	0.454 1	0.002 6	26.00 ± 0.5 ^a
E2	0.497 1	0.003 0	30.00 ± 0.26 ^b
E3	0.595 0	0.003 9	39.00 ± 0.4 ^c
E4	0.991 0	0.007 3	73.00 ± 0.35 ^d

注:不同字母(a~d)表示差异显著, $P < 0.05$ 。

Note: Different letters (a-d) indicate the significant difference at $P < 0.05$.

2.3 提取物的羟基酪醇含量

采用高效液相色谱法测定提取物中羟基酪醇含量,结果如表4所示。根据标准曲线,羟基酪醇含量按式(3)计算:

$$y = 8.83408x - 39.89008 \quad (3)$$

式中, y 为峰面积, x 为 HT 含量(mg/L),E3 和 E4 中羟基酪醇含量分别为 15.942 5 mg/L 和 27.473 3 mg/L(见表4),E1 和 E2 中未检测到 HT。由此可得,提取剂中乙醇含量较多,提取物中羟基酪醇含量越多。

表4 四种提取物中羟基酪醇含量

Table 4 Content of HT in four extracts

提取物 Extract	HT (mg/L)
E1	0 ^a
E2	0 ^a
E3	15.942 5 ± 0.45 ^b
E4	27.473 3 ± 0.74 ^c

注:不同字母(a~c)表示差异显著, $P < 0.05$ 。

Note: Different letters (a-c) indicate the significant difference at $P < 0.05$.

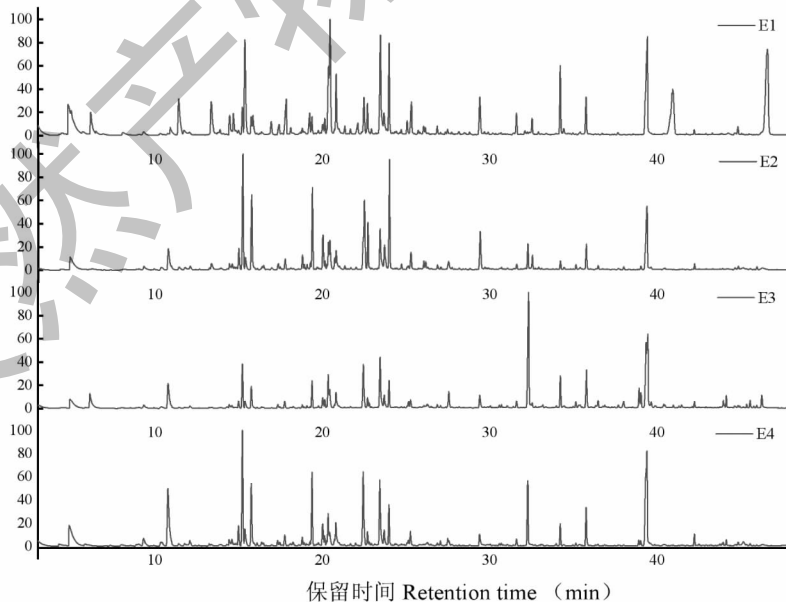


图1 橄榄果渣四种提取物的 GC-MS 谱图

Fig. 1 GC-MS spectrum of four extracts of olive pomace

2.4 四种提取物的挥发性成分分析

四种橄榄果渣提取物的 GC-MS 谱图(见图 1),由图可知,相同的 GC-MS 条件,四种提取物的色谱图有一定差异,与其他化合物相比,一些化合物的色谱峰展现了相对较高的丰度。色谱图中特征峰可根

据已知质谱数据库进行分析。通过对比谱图峰的位置发现,E1 和 E2 的谱图相似,E3 和 E4 的谱图相似,说明 E1 和 E2 组成成分类似,E3 和 E4 组成成分类似。表 5 为 GC-MS 对四种提取物中化合物组成的部分分析结果,且与数据库有较高的匹配度。

表 5 四种提取物 GC-MS 谱图部分数据
Table 5 Partial data of GC-MS spectra of four extracts

提取物 Extract	峰号 Peak number	保留时间 Retention time	峰面积 Peak area (%)	峰高 Peak height	相似度 Similarity	CAS#	化合物 Compound
E1	3	4.976	3.53	1 685 312	97	64-19-7	乙酸 Acetic acid
E1	17	15.205	1.14	1 938 857	96	3779-61-1	(E)-罗勒烯 (E)-Ocimene
E1	34	20.452	5.8	8 205 550	95	529-21-5	3-乙基-4-甲基吡啶 Pyridine,3-ethyl-4-methyl-
E1	42	22.473	1.82	2 643 685	94	626-82-4	己酸乙酯 Butyl hexanoate
E1	48	23.976	3.76	6 540 465	94	10032-15-2	异戊酸己酯 Hexyl-2-methylbutyrate
E2	1	4.911	3.16	890 194	98	64-19-7	乙酸 Acetic acid
E2	16	15.237	9.44	8 379 850	96	3779-61-1	(E)-罗勒烯 (E)-Ocimene
E2	35	20.436	2.52	2 084 432	94	529-21-5	3-乙基-4-甲基吡啶 Pyridine,3-ethyl-4-methyl-
E2	43	22.497	5.7	4 999 639	91	626-82-4	己酸丁酯 Butyl hexanoate
E2	48	23.994	7.69	7 905 753	95	10032-15-2	异戊酸己酯 Hexyl-2-methylbutyrate
E3	4	10.767	4.22	2 442 497	98	100-42-5	苯乙烯 Styrene
E3	27	22.442	4.86	4 321 960	94	932-85-4	5-乙氧基-4,5-二氢-2(3H)-呋喃酮 5-Ethoxy-4,5-dihydro-2(3H)-furanone
E3	47	32.314	13.08	11 000 000	83	0-0-0	4,6-庚二烯酸-3,3,6-三甲基乙酯 4,6-Heptadienoic acid,3,3,6-trimethyl-, ethyl ester
E3	63	39.439	8.51	7 325 037	81	1193-18-6	3-甲基-2-环己烯-1-酮 3-Methyl-2-cyclohexen-1-one
E4	4	10.758	8.05	2 937 038	98	100-42-5	苯乙烯 Styrene
E4	41	22.433	6.68	3 786 390	94	932-85-4	5-乙氧基-4,5-二氢-2(3H)-呋喃酮 5-Ethoxy-4,5-dihydro-2(3H)-furanone
E4	62	32.261	4.41	3 288 384	84	0-0-0	4,6-庚二烯酸-3,3,6-三甲基-乙酯 4,6-Heptadienoic acid,3,3,6-trimethyl-, ethyl ester
E4	72	39.383	6.92	4 858 810	82	1193-18-6	3-甲基-2-环己烯-1-酮 3-Methyl-2-cyclohexen-1-one

采用 GC-MS 分析方法,根据保留时间、相似度和 CAS 号确定了四种提取物的挥发性成分。通过分析发现,H₂O 提取物和 50% 乙醇提取物,分别在保留时间 4.976 min 和 4.911 min,乙酸的峰面积占 3.53% 和 3.16%;在保留时间 15.205 min 和 15.237 min,(E)-罗勒烯的峰面积占 1.14% 和 9.44%;在

20.452 min 和 20.436 min,3-乙基-4-甲基吡啶的峰面积占 5.80% 和 2.52%;在 22.473 min 和 22.497 min,己酸乙酯的峰面积占 1.82% 和 5.7%;在 23.976 min 和 23.994 min,异戊酸己酯的峰面积占 3.76% 和 7.69%。

70% 乙醇提取物和 90% 乙醇提取物,分别在保

留时间 10.767 min 和 10.758 min, 苯乙烯的峰面积占 4.22% 和 8.05%; 在保留时间 22.442 min 和 22.433 min, 5-乙氧基-4,5-二氢-2(3H)-呋喃酮的峰面积占 4.86% 和 6.68%; 在 32.314 min 和 32.261 min, 4,6-庚二烯酸-3,3,6-三甲基乙酯的峰面积占 13.08% 和 4.41%; 在 39.439 min 和 39.383 min, 3-甲基-2-环己烯-1-酮的峰面积占 8.51% 和 6.92%。结果表明, 乙酸、(E)-罗勒烯、3-乙基-4-甲基吡啶、异戊酸己酯和己酸丁酯含量在 E1 和 E2 中含量较多, 说明 E1 和 E2 的挥发性成分相似。苯乙烯、5-乙氧基-4,5-二氢-2(3H)-呋喃酮、4,6-庚二烯酸-3,3,6-三甲基乙酯和 3-甲基-2-环己烯-1-酮在 E3 和 E4 中含量较多, 说明 E3 和 E4 挥发性成分相似。结果表明 E1 和 E2 组成成分相似, E3 和 E4 组成成分相似。从表 5 又可知 H₂O 提取物中己酸乙酯和异戊酸己酯含量比醇提取物中多, 酮类(5-乙氧基-4,5-二氢-2(3H)-呋喃酮和 3-甲基-2-环己烯-1-酮)含量在三种醇提取物中最高。

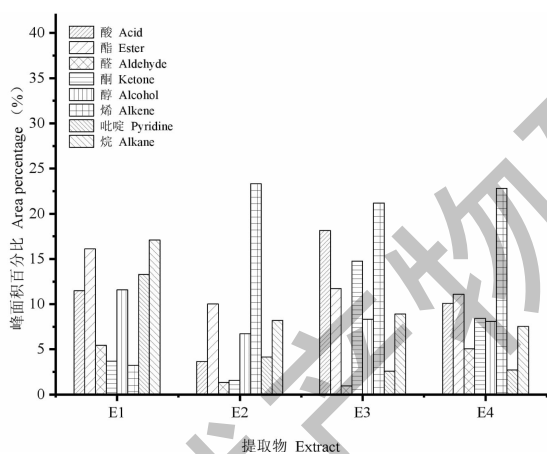


图2 橄榄果渣四种提取物的挥发性成分分析

Fig. 2 Analysis of volatile components of four extracts from olive pomace

图2是对GC-MS谱图数据的归类, 综合分析了各类挥发性成分在提取物中的相对含量。从图2可知, 橄榄果渣提取物中存在的主要成分有酸类、酯类、醛类、酮类、醇类、烯类、吡啶、烷烃等。酸类在四种提取物中含量较高, 其中E3的酸类含量最高, E3和E4中酮类含量较高, 酯类含量在E1中最高, 烯类在三种醇提取物中含量较高。由于溶剂极性差异, 四种提取物的GC-MS分析结果存在一定的差异, 结果表明, H₂O提取物中酯类含量较多, 醇提取物中酮类和烯类含量较多, 四种提取物中都含有较多酸类和醇类。

2.5 橄榄果渣提取物的抗氧化性

2.5.1 DPPH·清除活性

四种提取物和HT对DPPH·的清除率如图3所示。结果表明, HT对DPPH·的清除率明显高于其他四种提取物, 当HT浓度为1.0 mg/mL时, 四种提取物的清除率几乎为100%。随着样品浓度从0.2 mg/mL增加到1.0 mg/mL, 四种提取物的清除率均显著增加, 当样品浓度为1 mg/mL时, E1、E2、E3和E4的清除率分别为48.97%、44.30%、47.28%和56.94%, 明显高于其他浓度的清除率, 这可能是由于浓度较高时, 提取物溶液中含有的酚类物质较多, 从而导致清除率较高。四种提取物的清除率均随提取剂中乙醇含量的增加而增加, 说明提取物中酚类含量随着乙醇的增多而增多, 导致E4对DPPH·的清除率整体高于其他三种提取物。综上所述, E4的抗氧化性强于其他三种提取物, 该结果与总酚含量结果一致。

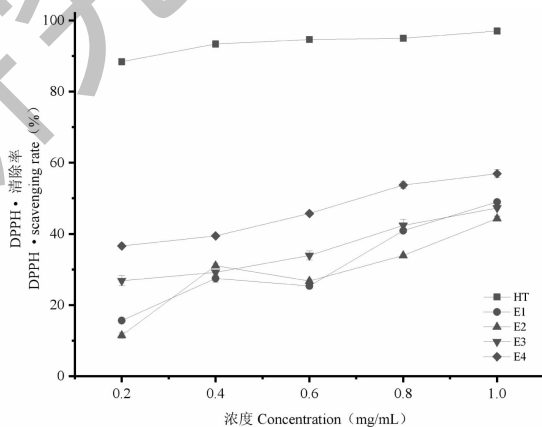


图3 四种提取物对DPPH自由基的清除率

Fig. 3 DPPH radical scavenging rate of four extracts

2.5.2 Fe³⁺还原力

图4显示了以HT为对照的四种提取物的Fe³⁺还原力。与DPPH·清除活性结果一致, 随着样品浓度的增加, 提取物对Fe³⁺的还原能力显著增强, 浓度为2.0 mg/mL时, E1和E2的还原力分别达到43.5%和43.87%, E4的还原力达到77.36%, 经分析造成该变化的原因可能是样品浓度较高时, 溶液中含有的酚类物质较多, 从而对Fe³⁺的还原力增强。四种提取物的还原力均随溶剂中乙醇含量的增加而增加, 这可能是由于乙醇含量较多的提取物中总酚含量较多, 导致E4对Fe³⁺的还原力强于E1、E2和E3。以上变化进一步说明E4的抗氧化性较

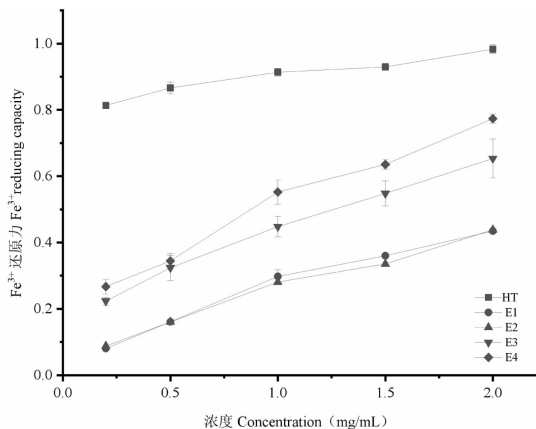
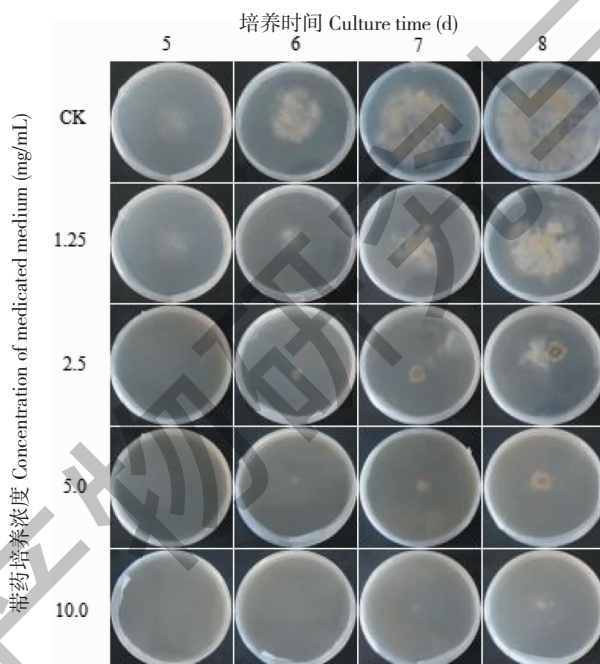
图4 四种提取物对Fe³⁺的还原力Fig. 4 Reducing power of four extracts to Fe³⁺

图5 橄榄果渣提取物对灰葡萄孢菌落生长的影响

Fig. 5 Effects of olive pomace extracts on colony growth of *Botrytis cinerea*

3 讨论与结论

橄榄果渣中含有橄榄油、水和大量的水溶性和脂溶性生物活性物质。特别是本研究采用的从两相体系中分离所得的橄榄果渣,在水相中的占比含量高达65%左右^[24]。对橄榄果渣的组成成分的分析发现,总脂肪含量在干重比和湿重比中占比较高,说明橄榄果渣含有较多的橄榄油,可以用于提炼果渣油,这种果渣油可以应用于食品或化妆品行业。例如,肥皂制造、化妆品配方中的赋形剂,甚至是以活性成分添加在产品中^[24-26]。有研究表明,除了农业实践、品种或成熟期等其他因素外,土壤、光、气候因素还可以影响橄榄果渣的组成成分以及生物活性化

强,该结果同样与酚类含量一致。

2.6 橄榄果渣提取物对灰葡萄孢的抑制

橄榄果渣提取物抑制灰葡萄孢菌落生长如图5所示,菌落直径变化如图6所示。图5显示,随着培养时间的延长,菌落逐渐增大,与CK相比,菌落大小随着带药培养基浓度的增加而减小,其中带药培养基浓度为10 mg/mL时,抑制效果最明显,到第七天才观察到有微小的菌落。图6呈现了菌落生长趋势,随着培养时间的延长,菌落直径逐渐增大,菌落直径随着带药培养基浓度的增加而逐渐减小,其中10 mg/mL的菌落生长速度最慢,通过计算得出抑制率高达86.89%。

合物的分布^[27]。对橄榄果渣的总酚含量和羟基酪醇含量进行了测定,结果表明,90%乙醇提取物中羟基酪醇含量较高,同样90%乙醇提取物中检测到总酚含量最多,说明提取剂中乙醇含量越高,提取物中酚类物质越多。挥发性成分分析结果发现,H₂O提取物和50%提取物组成成分类似,70%乙醇提取物和90%乙醇提取物组成成分类似,其中H₂O提取物和50%乙醇提取物中主要挥发性成分有乙酸、(E)-罗勒烯、3-乙基-4-甲基吡啶、异戊酸己酯和己酸丁酯。70%乙醇和90%乙醇提取物中苯乙烯、5-乙氧基-4,5-二氢-2(3H)-呋喃酮、4,6-庚二烯酸-3,3,6-三甲基-乙酯和3-甲基-2-环己烯-1-酮是主要的挥发

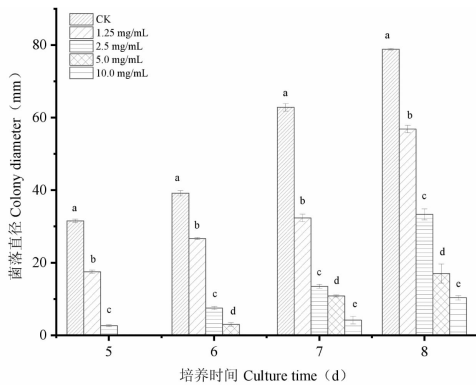


图6 橄榄果渣提取物抑制灰葡萄孢菌落生长的菌落直径

Fig. 6 Colony diameter of olive residue extract inhibiting colony growth of *Botrytis cinerea*

注:不同字母(a~e)表示差异显著, $P < 0.05$ 。Note: Different letters (a-e) indicate the significant difference at $P < 0.05$.

性成分。对 GC-MS 谱图数据进行归类发现酸类、酯类和烯类含量在四种物质中的含量较高。表明橄榄果渣中最主要的挥发性成分是酸类、酯类和烯类。

对提取物抗氧化性的评价表明,90%乙醇提取物对 DPPH·清除力和 Fe^{3+} 的还原力高于 H_2O 提取物、50%乙醇提取物和 70%乙醇提取物,经分析可能是由于 90%乙醇提取物中酚类含量高于其他三种提取物,导致 90%乙醇提取物对 DPPH·清除力和 Fe^{3+} 的还原力高于其他三种提取物。即 90%乙醇提取物的抗氧化水平整体高于其他三种提取物,该结果与酚类含量结果一致,说明酚类物质的存在是提取物具有抗氧化性的主要原因。

90%乙醇提取物对灰葡萄孢的抑制作用的研究结果为,90%乙醇提取物对灰葡萄孢的生长有明显的抑制作用,提取物所对应的带药培养基浓度为 10 mg/mL 时,对灰葡萄孢的抑制效果最显著,该研究结果与 Qi 等^[28]和 Zhang 等^[29]对灰葡萄孢抑制作用的研究结果基本一致。

参考文献

- Velasco J, Dobarganes C. Oxidative stability of virgin olive oil [J]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2015, 104:661-676.
- Li SH, Ruan HJ. Study on processing technology, development and utilization of olive oil [J]. *Cereals Oils Process: Electron* (粮油加工:电子版), 2006(5):45-47.
- Goldsmith CD, Vuong QV, Stathopoulos CE, et al. Ultrasound increases the aqueous extraction of phenolic compounds with high antioxidant activity from olive pomace [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2018, 89:284-290.

- Valta K, Aggeli E, Papadaskalopoulou C, et al. Adding value to olive oil production through waste and wastewater treatment and valorisation; the case of Greece [J]. *Waste Biomass Valori*, 2015, 6:913-925.
- Chanioti S, Tzia C. Optimization of ultrasound-assisted extraction of oil from olive pomace using response surface technology: oil recovery, unsaponifiable matter, total phenol content and antioxidant activity [J]. *LWT- Food Sci Technol*, 2017, 79:178-189.
- Yuan J. Enzymolysis mechanism from oleuropein extract and structure activity relationships of polyphenols products [D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry (中国林业科学研究院), 2016.
- Wang Z. Study on extraction and separation process of maslinic acid and oleonic acid from *Olea europaea* L. pomace [D]. Lanzhou: Lanzhou University of Technology (兰州理工大学), 2012.
- Paze IC, Lozano-Sánchez J, Borrás-Linares I, et al. Obtaining an extract rich in phenolic compounds from olive pomace by pressurized liquid extraction [J]. *Molecules*, 2019, 24(17):3108.
- Abdelilah EA, Hajar K, Abdellatif H. Phenolic profile and antioxidant activities of olive mill wastewater [J]. *Food Chem*, 2012, 132:406-412.
- Rubio-Senent F, Rodríguez-Gutiérrez G, Lama-Muñoz A, et al. New phenolic compounds hydrothermally extracted from the olive oil byproduct alperujo and their antioxidative activities [J]. *J Agr Food Chem*, 2012, 60:1175-1186.
- Peng MF, Zhao X, Biswas D. Polyphenols and tri-terpenoids from *Olea europaea* L. in alleviation of enteric pathogen infections through limiting bacterial virulence and attenuating inflammation [J]. *J Funct Foods*, 2017, 36:132-143.
- Medina E, Romero C, Brenes M. Residual olive paste as a source of phenolic compounds and triterpenic acids [J]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2018, 120:1700368.
- Khadim AA, Khadur ZK, Abdul-Jabar FA, et al. The antimicrobial activity of olive pomace (OLP) and pomegranate peels (POP) extracts and mix them against different bacteria isolated from clinical specimens [J]. *Eurasian J Biosci*, 2020, 14:3889-3896.
- Fazeli-Nasab B, Valizadeh M, Hassanzadeh MA, et al. Evaluation of the antimicrobial activity of olive and rosemary leaf extracts prepared with different solvents against antibiotic-resistant *Escherichia coli* [J]. *Int J Infect*, 2021, 8(3):e114498.
- Alsulaymani FA, Elmhdwi MF, Gaber S, et al. *In vitro* antioxidant and antibacterial activity of olive leaf extract [J]. *J*

- Pharm Appl Chem,2021,7(2):75-80.
- 16 Jing Y, Dang J, Dai J, et al. Purification of hydroxytyrosol from hydrochloric acid hydrolysate of oleopicroside[J]. Jiangsu Agr Sci(江苏农业科学),2012,40:208-210.
- 17 Zhao Y, Pu W, Liu C, et al. Study on extraction processing optimization of hydroxytyrosol from olive leaves and their antioxidant activities[J]. Food Ind(食品工业),2017,4:8-13.
- 18 Wang Q, Huang M, Xie Y, et al. Extraction process optimization of hydroxytyrosol from olive pomace by response surface methodology[J]. Food Ind Technol(食品工业科技),2018,17:145-151.
- 19 Yin P, Yang L, Li K. Bioactive components and antioxidant activities of oak cup crude extract and its four partially purified fractions by HPD-100 macroporous resin chromatography[J]. Arab J Chem,2019,12:249-261.
- 20 Obied HK, Jr DRB, Prenzler PD. Chemical screening of olive biophenol extracts by hyphenated liquid chromatography[J]. Anal Chim Acta,2007,603(2):176-189.
- 21 Liu J, Chen M, Zhong X, et al. Analysis of volatile composition of various parts in *Hemerocallis citrina* Baroni by HS-SPME-GC-MS[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2020,32:464-472.
- 22 Duan X, Li M, Ma H, et al. Physicochemical properties and antioxidant potential of phosvitin-resveratrol complexes in emulsion system[J]. Food Chem,2016,206:102-109.
- 23 Zhao S, Liu JY, Chen SY, et al. Antioxidant potential of polyphenols and tannins from burs of *Castanea mollissima* Blume[J]. Molecules,2011,16:8590-8600.
- 24 Roselló-Soto E, Koubaa M, Moubarik A, et al. Emerging opportunities for the effective valorization of wastes and by-products generated during olive oil production process: non-conventional methods for the recovery of high-added value compounds[J]. Trends Food Sci Technol,2015,45:296-310.
- 25 Rodrigues F, Nunes M, Oliveira MBPP. Applications of recovered bioactive compounds in cosmetics and health care products[J]. Olive Mill Waste,2017:255-274.
- 26 Rodrigues F, Pimentel FB, Oliveira MBPP. Olive by-products: challenge application in cosmetic industry[J]. Ind Crops Prod,2015,70:116-124.
- 27 Portarena S, Baldacchini C, Brugnoli E. Geographical discrimination of extra-virgin olive oils from the Italian coasts by combining stable isotope data and carotenoid content within a multivariate analysis[J]. Food Chem,2017,215:1-6.
- 28 Qi Z, Li X, Ji M. Antibacterial activity of crude extracts of four *Pepper* plants against *Botrytis cinerea*[J]. Chin Veg(中国蔬菜),2018(7):64-67.
- 29 Zhang T, Sun H, Wang G. Antibacterial activity of elderberry extract against *Botrytis cinerea in vitro*[J]. J Liaocheng Univ:Nat Sci(聊城大学学报:自科版),2011,24(3):43-46.