

番石榴叶挥发油的抗菌性及优化提取研究

张晓南^{1,2}, 王建豪², 王佳丽², 朱鸿维², 牛亚倩², 熊婷婷², 张英迪², 徐福²

1. 嘉应学院, 广东梅州 541000; 2. 东北农业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨 150030

摘要: 分别由酸疮痂链霉菌 (*Streptomyces acidiscabies*, SA)、茄科雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*, RS) 和胡萝卜软腐欧文氏菌 (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* Borgey, ECCB) 引起的植物疮痂病、青枯病、软腐病是农作物生产中常见多发的细菌病害。番石榴叶挥发油由多种活性物质组成, 具有广谱抗微生物活性。本研究旨在提取并配置番石榴叶挥发油抗菌液, 针对酸疮痂链霉菌、茄科雷尔氏菌、胡萝卜软腐欧文氏菌等 3 种病原菌进行挥发油的抗性研究, 为农作物病害生物防治储备资源。采用添加锂盐结合微波辅助水蒸馏法提取番石榴叶挥发油, 通过滤纸片扩散法和最小抑制浓度 (MIC) 评价了番石榴叶挥发油对 3 种供试菌株的抗菌效果, 单因素结合响应面法优化提取工艺, 采用气相色谱-质谱联用技术 (GC-MS) 测定番石榴叶挥发油的化学成分。结果表明: 番石榴叶挥发油对酸疮痂链霉菌、茄科雷尔氏菌、胡萝卜软腐欧文氏菌均表现出良好的抑制效果, 抑菌圈直径范围为 20.57~23.24 mm, 抑菌率均达到 60% 以上, MIC 值分别为 3.13、1.56、3.13 $\mu\text{g/mL}$ 。挥发油对茄科雷尔氏菌的抑制效果最好, 抑菌圈直径为 (23.24 \pm 0.47)mm, 属于高度敏感, 对酸疮痂链霉菌、胡萝卜软腐欧文氏菌也具有一定的抑制效果。提取的最佳工艺条件为: 液料比 10 mL/g (干重)、微波功率 660 W、微波时间 43 min, 在此条件获得的挥发油得率为 (10.23 \pm 0.17)mL/kg (干重), 3 次平行试验验证了该方法的有效性和重现性。检测出番石榴叶挥发油的主要成分为萜烯类、醇类等物质, 其中 β -石竹烯 (28.36%)、去氢白菖烯 (11.47%)、蓝桉醇 (11.31%)、 α -蒎烯 (10.01%) 的含量相对较高; 抗菌试验中, 发挥主要作用的物质为 β -石竹烯、 α -蒎烯、丁香酚、D-柠檬烯, 推测番石榴叶挥发油对供试菌株的抑菌机理是对其细胞结构造成了破坏, 导致细胞内物质泄漏。上述结果表明, 番石榴叶挥发油具有良好的抗菌活性以及可观的提取得率, 研究结果为番石榴叶的开发应用和农作物病害综合防治提供参考。

关键词: 番石榴叶; 挥发油; 抗菌性; 响应面优化; GC-MS 分析

中图分类号: R284.2 文献标识码: A

Antibacterial Activity and Optimal Extraction of Volatile Oil from Guava Leaves

ZHANG Xiaonan^{1,2}, WANG Jianhao², WANG Jiali², ZHU Hongwei², NIU Yaqian², XIONG Tingting², ZHANG Yingdi², XU Fu²

1. Jiaying University, Meizhou, Guangdong 541000, China; 2. College of Food Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China

Abstract: *Streptomyces acidiscabies* (SA), *Ralstonia solanacearum* (RS) and *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* borgey (ECCB) cause plant scab, brucellosis and soft rot of carrot, respectively. These are common and prevalent bacterial disease in crop production. The volatile oil of Guava leaves consists of a variety of active substances with broad-spectrum anti-microbial activity. The aim of this study was to extract and configure an antimicrobial solution of guava leaves volatile oil to conduct a volatile oil resistance study against three disease bacteria, SA, RS and ECCB, to reserve resources for biological control agents. The volatile oil of guava leaves was extracted by the addition of lithium salt combined with microwave-assisted hydrodistillation, the antibacterial effect of guava leaf volatile oil on three test strains was evaluated by the filter paper diffusion method and minimum inhibitory concentration (MIC), and the extrac-

收稿日期 2022-01-25; 修回日期 2022-04-21

基金项目 梅州市科技专项资金项目 (No. 2021B0204007)。

作者简介 张晓南 (1982—), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 功能食品, E-mail: xiaonanzhang@neau.edu.cn。

tion process was optimized by single factor combined with response surface experiments. The chemical components of guava leaf volatile oil were determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The results showed that the oil exhibited excellent inhibitory effects against SA, RS and ECCB, with the inhibition circle diameters ranging from 20.57 to 23.24 mm and the inhibition rates reaching more than 60%, and the MIC values of 3.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 3.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. The oil had the greatest inhibitory effect on RS, the diameter of the inhibition circle was (23.24 \pm 0.47)mm, which was highly sensitive, and also had certain inhibitory effect on SA and ECCB. The optimum process conditions for the extraction process were liquid to material ratio of 10 mL/g DW, microwave power of 660 W and microwave time of 43 min. The yield of the oil obtained under the conditions was (10.23 \pm 0.17)mL/kg DW, and the validity and reproducibility of the method were verified by three parallel experiments. The components of the oil were detected to be mainly terpenes and alcohols, with relatively high content of β -caryophyllene (28.36%), 1-calamenene (11.47%), (-)-globulol (11.31%) and α -pinene (10.01%). The substances that played a major role in the antibacterial experiment were β -caryophyllene, α -pinene, eugenol, and D-limonene. It was speculated that the mechanism of guava leaf volatile oil inhibition on the test strain was the damage to its cell structure, which resulting in the leakage of intracellular material. The above results demonstrated that the guava leaf volatile oil has an excellent antimicrobial activity and considerable extraction rate, the results of the study would provide a reference for the development and application of guava leaves and integrated control of crop diseases.

Keywords: guava leaf; volatile oil; antibacterial activity; response surface optimization; GC-MS analysis

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.01.018

番石榴 (*Psidium guajava* Linn.) 是桃金娘科 (Myrtaceae) 乔木, 原产于北美洲墨西哥, 主要分布在热带和亚热带地区^[1]。其对气候条件适应能力强, 尤喜爱干燥条件下生长, 浆果呈球形、卵圆形或梨形, 种子密集分布于果肉中^[2-3], 是公认的优质水果, 在我国南部地区有广泛栽培。研究证实番石榴叶中富含挥发油、黄酮类和多糖类等多种代谢产物, 这些物质具有很高的药用价值和多种生理功能^[4-5], 包括治疗皮肤病、抗肿瘤^[6]、抗糖尿病^[7]、抗氧化以及抗菌活性^[8]等。其中具有较大研究意义的是番石榴叶挥发油, 其主要成分为柠檬烯、异二氯苯酚、反式石竹烯和氧化倍半萜等物质^[9], 可有效抑制金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和沙门氏菌, 对革兰氏阳性菌和真菌也显示出较强的抗菌活性^[10-11]; 此外, 其中的反式石竹烯在杀虫方面有很高的活性, 还具有局部麻醉、抗炎等功能^[12]。

经济作物生产过程中易受病原菌的侵害, 其中酸疮痂链霉菌 (*Streptomyces acidiscabies*, SA)、茄科雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*, RS) 和胡萝卜软腐欧文氏菌 (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* Borgey, ECCB) 是 3 种危害性较大的农作物病原菌, 它们的寄主广泛 (甚至在土壤中也存活), 主要寄居在马铃薯、番茄、辣椒等农作物的根茎或果实上, 诱发植物疮痂病、青枯病和软腐病等, 抑制果实生长, 降低产品的市场价值^[13]。此外, 病害具有一定的传染性, 因此对其预防和

灭杀十分必要。目前主要的防治手段是化学合成杀菌剂, 但农药和抗生素等作用靶单一, 使病原菌的耐药性不断增强, 防治效果不理想, 并且对环境不友好。因此, 防治重点逐渐转向生物防治, 据报道, 采用噬菌体或噬菌体组合、无致病菌株等方法可防治青枯病菌, 但在多种多样的土壤环境下, 易受寄主范围的限制, 因此防治效果并不稳定^[14-15]。挥发油是一种植物次级代谢产物, 具备多种生物活性, 还具有天然无毒、易降解的特点, 可作为防治农作物病害的物质来源。本研究通过添加锂盐结合微波辅助加热提取番石榴叶挥发油, 研究番石榴挥发油对 3 种重要农作物病原菌的抗性; 尝试单因素设计结合响应面优化试验探究各因素之间的二次多项式模型, 获得最佳提取条件; 确定挥发油的组成成分, 初步探究其抑菌成分, 为番石榴叶挥发油植物源抗菌剂的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 番石榴叶: 采购于广东梅州, 保存在干燥、凉爽、避光的环境中。

1.1.2 主要试剂 无水氯化锂、氢氧化锂、醋酸锂、硝酸锂、硫酸锂 (纯度 \geq 99%): 合肥巴斯夫生物科技有限公司; 无水乙醇 (分析纯): 天津市富宇精细化工有限公司; 正己烷 (色谱纯): 天津市光复科技发展有限公司; 无水硫酸钠 (纯

度 $\geq 99\%$)：天津市福晨化学试剂厂；利福平(分析纯)：上海源叶生物科技有限公司；LB 营养琼脂、LB 肉汤：北京奥博星生物技术有限责任公司；酸疮痂链霉菌 (*Streptomyces acidiscabies*, SA)、茄科雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*, RS)、胡萝卜软腐欧文氏菌 (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* Borgey, ECCB)：购自东北农业大学生命科学学院。

1.1.3 仪器与设备 M1-L213B 微波炉：广东美的厨房电器有限公司；JA2003 电子天平：上海浦春计量仪器有限公司；7890A-5975C 型气相色谱-质谱联用仪 (GC-MS)：美国安捷伦公司；B-220 恒温水浴锅：上海亚荣生化仪器厂；高压灭菌锅：致微(厦门)仪器有限公司；洁净工作台：北京联哈尔仪器制造有限公司。

1.2 方法

1.2.1 抑菌研究 (1) 培养基的制备及菌株的活化。称取 LB 营养琼脂 32 g，加入 1000 mL 去离子水中，加热煮沸溶解，分装，121℃ 高压灭菌 15 min，备用。在无菌操作台中，取 10 μL 保存于甘油中的菌液，接种到 LB 肉汤培养基中，于 37℃ 摇床上培养 12 h，用培养基将菌液浓度稀释至 $10^7\sim 10^8$ CFU/mL，置于 4℃ 冰箱中保存备用。

(2) 滤纸片扩散法测定抗菌活性。用打孔器将干净滤纸制成直径为 8 mm 的圆形纸片，经高压蒸汽灭菌后，放入挥发油原液中浸渍 4 h，晾干备用。在无菌操作台中，用移液枪吸取 10 μL 活化后的菌液，均匀涂布到培养皿中。再用无菌镊子将滤纸片贴在培养皿中心，置于 37℃ 恒温培养箱中倒置培养 24 h，生理盐水为空白对照，抗生素利福平为阳性对照，平行试验 3 次。观察抑菌圈的大小，采用十字交叉法测量抑菌圈直径。抑菌率按以下公式计算：

$$\text{抑菌率} = \frac{\text{测量直径} - \text{滤纸片直径}}{\text{测量直径}} \times 100\%$$

(3) 最小抑菌浓度 (MIC) 的测定。番石榴叶挥发油用 0.1% 吐温-80 溶液稀释浓度为 0.71~50 $\mu\text{g/mL}$ 。分别吸取 5 μL 不同浓度的挥发油溶液滴加在 8 mm 的滤纸片上，将滤纸片置于培养皿中心，于 37℃ 恒温培养箱中培养 24 h，0.1% 吐温-80 为空白对照，观察细菌生长情况。最小抑菌浓度 (MIC) 为具有抑菌作用时的最低浓度。

1.2.2 挥发油的提取及优化 番石榴叶经粉碎机

制成直径约为 8~10 mm 的块状碎片，置于阴凉通风处，干燥后冷藏备用。称取番石榴叶 30 g (去除含水率 70% 后的质量) 置于 1000 mL 蒸馏烧瓶中，将锂盐溶液和适量溶剂加入到烧瓶中并在室温下放置 1 h 使料液充分混匀，一定功率和时间条件下，置于微波提取装置中进行加热，溶剂沸腾后产生的水蒸气携带挥发油经冷凝回流装置冷凝并收集，加无水硫酸钠进行脱水处理，记录挥发油提取量。挥发油得率按以下公式进行计算：

$$\text{挥发油得率 (mL/kg)} = (\text{挥发油提取量} / \text{番石榴叶质量}) \times 1000$$

选取液料比、微波功率和微波时间为自变量，试验范围为：液料比 4、6、8、10、12 mL/g (干重)，微波功率 120、230、385、540、700 W，微波时间 20、30、40、50、60 min，挥发油得率为响应值，进行单因素试验。根据单因素试验结果，以 1、0、-1 分别代表各因素的高中低水平，使用 Design-Expert 10.0 软件设计响应面试验，因子编码及水平见表 1。取优化工艺后收集的挥发油 0.5 mL，溶解在 500 倍体积的正己烷中，0.22 μm 滤膜过滤后用于 GC-MS 分析。

表 1 响应面设计因素和水平
Tab. 1 Factor and levels in response surface analysis

因素 Factor	水平 Level		
	-1	0	1
A 液料比/(mL·g ⁻¹)	6	8	10
B 微波功率/W	385	540	700
C 微波时间/min	35	40	45

1.2.3 GC-MS 检测条件 气相色谱条件：色谱柱为 HP-5MS (25 m \times 0.2 mm, 0.25 μm) 石英毛细管柱 OV-101；柱温 40~200℃；柱前压 0.8 kg/cm²；程序升温：初始温度 50℃，以 3℃/min 升温至 180℃，保持 10 min，再以 5℃/min 升温至 280℃。气化温度 250℃；载气为氦气；分流比为 50:1；进样量为 1 μL 。质谱条件：EI 电离源，电子能量 70 eV；离子源温度 250℃，分析采用扫描方式，质量扫描范围 40~400 m/z 。

1.3 数据处理

所有实验均重复 3 次。采用 SPSS 23.0 软件进行数据分析，利用 Excel 2010 软件绘图，采用 Design Expert 10.0 软件进行响应面优化设计、分析。










2 结果与分析

2.1 挥发油的抑菌研究

2.1.1 番石榴叶挥发油的抗菌活性分析 番石榴叶挥发油原液和对照样品对供试菌株的抑菌圈直径、菌落形态及挥发油抑菌率见表 2。在培养皿内挥发油直接同菌株接触，具有抗菌活性的物质能够抑制细菌的生长，并在滤纸片周围形成抑菌圈，抑菌圈直径越大，说明抗菌活性越好。从表 2 可以看出，虽然番石榴叶挥发油的抑菌效果低于抗生素，但对 3 种细菌菌株均有一定的抑菌效

果。对茄科雷尔氏菌 (RS) 的抑菌圈直径为 (23.24 ± 0.27) mm，属于高度敏感^[16]，抑菌率达 $65.58\% \pm 0.22\%$ ；对酸疮痂链霉菌 (SA) 和胡萝卜软腐欧文氏菌 (ECCB) 的抑菌圈直径分别为 (21.87 ± 0.53) 、 (20.57 ± 0.19) mm，属于中度敏感^[16]，抑菌率均在 60% 以上。抑菌圈活性测试结果表明，番石榴叶挥发油对茄科雷尔氏菌抑制作用最强，对酸疮痂链霉菌的抑制作用次之，对胡萝卜软腐欧文氏菌的抑制作用最弱，而且显著弱于茄科雷尔氏菌 ($P < 0.05$)。

表 2 番石榴叶挥发油的抗菌活性
Tab. 2 Antibacterial activity of guava leaf volatile oil

菌株 Strain	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter/mm			菌落形态 Colony morphology			抑菌率 Antibacterial rate/%
	空白对照 Blank control	挥发油 Volatile oil	阳性对照 Positive control	空白对照 Blank control	挥发油 Volatile oil	阳性对照 Positive control	
SA	8	21.87 ± 0.53^{ab}	26.83 ± 0.32^b				63.42 ± 0.35^{ab}
RS	8	23.24 ± 0.47^a	25.71 ± 0.27^b				65.58 ± 0.22^a
ECCB	8	20.57 ± 0.19^b	28.78 ± 0.56^a				61.11 ± 0.14^b

注：同列不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$).

2.1.2 番石榴叶挥发油对供试菌株的最小抑菌浓度分析 番石榴叶挥发油对供试菌株的最小抑菌浓度 (MIC) 如表 3 所示。可以看出，挥发油浓度越大，对菌株的抑制效果越好。当番石榴叶挥发油浓度为 $1.56 \mu\text{g/mL}$ 时，番石榴叶挥发油对酸疮痂链霉菌 (SA) 和胡萝卜软腐欧文氏菌 (ECCB) 未显示出抑制作用，但对茄科雷尔氏菌 (RS) 产生了抑制作用，抑菌率为 $12.57\% \pm 0.49\%$ ；番石榴叶挥发油浓度增大至 $3.13 \mu\text{g/mL}$ 时，对酸疮痂链霉菌和胡萝卜软腐欧文氏菌均产生抑制作用；随着挥发油浓度的增大，抑菌作用也逐渐增大，挥发油浓度为 $50 \mu\text{g/mL}$ 时，抑菌率在 $46.52\% \sim 55.36\%$ 之间，其中对茄科雷尔氏菌的抑菌效果最好，抑菌率为 $55.36\% \pm 0.13\%$ ；对酸疮痂链霉菌的抑菌率为 $47.92\% \pm 0.37\%$ ；对胡萝卜软腐欧文氏菌的抑菌率为 $46.56\% \pm 0.15\%$ 。以上结果表明，番石榴叶挥发油在一定浓度下对供试菌株才有抑制作用，呈剂量依赖型抑制关系。通过倍数稀释法测定番石榴叶挥发油对茄科雷尔氏菌的 MIC 值为 $1.56 \mu\text{g/mL}$ ，而对酸疮痂链霉菌和胡萝卜软腐欧文氏

菌的 MIC 值为 $3.13 \mu\text{g/mL}$ ，表明 3 种供试菌株中茄科雷尔氏菌对番石榴叶挥发油最敏感，在浓度仅 $1.56 \mu\text{g/mL}$ 时即产生抑制作用；对胡萝卜软腐欧文氏菌的抑制效果最弱，浓度达到 $3.13 \mu\text{g/mL}$ 才能起到抑菌效果，抑菌率为 $11.89\% \pm 0.37\%$ 。

表 3 番石榴叶挥发油的最小抑菌浓度 (MIC)
Tab. 3 Minimum inhibitory concentration of guava leaf volatile oil (MIC)

浓度 Concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	抑菌率 Antibacterial rate/%			
	SA	RS	ECCB	CK
50.00	47.92 ± 0.37^a	55.36 ± 0.13^a	46.56 ± 0.15^a	0
25.00	41.05 ± 0.11^b	50.77 ± 0.24^b	40.34 ± 0.06^b	0
12.50	37.11 ± 0.47^{bc}	46.98 ± 0.29^c	36.61 ± 0.23^c	0
6.25	33.72 ± 0.30^c	42.36 ± 0.38^d	22.78 ± 0.27^d	0
3.13	16.23 ± 0.45^d	28.89 ± 0.57^e	11.89 ± 0.37^e	0
1.56	0	12.57 ± 0.49^f	0	0
0.71	0	0	0	0
MIC($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	3.13	1.56	3.13	

注：同列不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$).

2.2 金属锂盐筛选

2.2.1 锂盐类型的筛选 锂离子 (Li^+) 分别与氯离子 (Cl^-)、氢氧根 (OH^-)、醋酸根 (CH_3COO^-)、硝酸根 (NO_3^-) 和硫酸根 (SO_4^{2-}) 结合成锂盐, 锂盐对挥发油得率的影响如图 1A 所示。添加氯化锂时番石榴叶挥发油得率最高 (5.02 mL/kg), 使用其他锂盐时挥发油得率则呈逐渐下降趋势。盐析作用是促进挥发油分离的最有效的一种手段, 通过改变各相在体系中的溶解度来达到分离的目的。陈迅等^[17]在考察 6 种盐对罗汉松挥发油提取率的影响中发现, 阴离子盐析效应强弱依次是氯离子>硝酸根离子>硫酸根离子, 这与本研究结果一致。因此后续试验中所添加的锂盐确定为氯化锂。

2.2.2 锂盐用量的筛选 如图 1B 所示, 与未添加锂盐时相比, 随着锂盐 (氯化锂) 用量增加, 挥发油得率显著升高。锂盐用量为 45 μmol 时, 挥发油得率达到 5.08 mL/kg; 继续增大锂盐用量至 60 μmol , 挥发油得率为 5.14 mL/kg, 与锂盐用量 45 μmol 时的挥发油得率差异不显著。为减少成本, 确定锂盐用量为 45 μmol 。

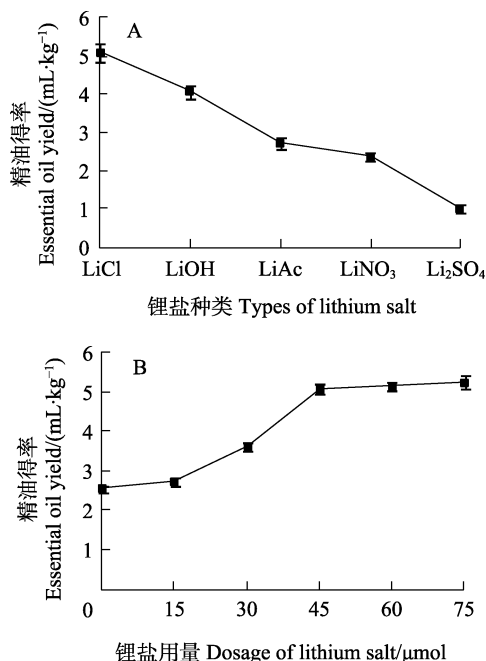


图 1 锂盐种类 (A) 和用量 (B) 对精油得率的影响
Fig. 1 Effect of the type (A) and dosage (B) of lithium salt on the yield of essential oil

2.3 单因素提取条件的优化

2.3.1 液料比的影响 液料比在挥发油提取过程中具有重要的影响, 溶剂过多或过少都会影响挥

发油得率^[18]。由图 2A 可知, 随着液料比的增加, 番石榴叶挥发油得率先升高后降低, 在液料比达到 8 mL/g 时挥发油得率最高 (7.31 mL/kg)。其原因可能是当水分过多时, 混合物沸腾所需时间延长, 得率降低, 同时液料比增大也会导致一部分挥发油成分溶解到水中而无法提出, 这与李麟洲等^[19]提取胡椒梗挥发油的研究结果相似。结合原料成本选择液料比为 8 mL/g。

2.3.2 微波功率的影响 如图 2B 所示, 番石榴叶挥发油得率与微波功率呈正相关, 微波功率的增大显著提高了挥发油得率。随着微波功率的增大, 挥发油得率呈阶梯式升高, 微波功率在 700 W 时得率最高, 为 7.85 mL/kg。其原因可能是在微波提取过程中, 液料需要一定的温度达到沸腾状态, 通过调整不同档位的微波功率来达到控制温度的目的; 当某一档位的功率持续工作时, 第一滴挥发油被馏出前 2 min 内体系会逐渐趋于稳定, 温度在恒定范围内保持不变, 因而达到恒温提取挥发油的目的^[20-21]。尽管提取过程中温度不再变化, 但较大的微波功率下使液料沸腾进程加快, 并且产生更大的微波能量加速植物细胞的破裂, 使得率升高。考虑到过高功率可能导致挥发油中生物活性成分的降解^[22], 同时结合设备实际情况以功率 540 W 为中心优化水平。

2.3.3 微波时间的影响 由图 2C 可观察到, 随着微波时间的延长, 番石榴叶挥发油得率呈先升高后稳定的趋势。微波时间从 20 min 增加到 40 min 的过程中, 挥发油得率呈阶梯型增长; 继续增加微波时间, 挥发油得率升高不显著。在这期间, 挥发油得率的增长速率从 20~40 min 内的 71.91% 下降到 40~60 min 内的 7.18%。PENG 等^[23]进行了类似的研究, 在提取初始阶段, 白松树皮挥发油的产量增加很快, 于 30 min 后产量变为恒定。因此选取最佳提取时间为 40 min。

2.3.4 挥发油提取过程动力学分析 固定液料比为 8 mL/g, 每间隔 5 min 记录不同微波功率下番石榴叶挥发油得率, 对提取过程进行动态研究, 结果见图 3。不同微波功率条件下, 番石榴叶挥发油得率随微波时间的增加而升高。在 120 W 和 230 W 功率时, 挥发油得率增长缓慢, 提取不充分; 在 385、540、700 W 功率时挥发油得率升高较快, 提取 20 min 时挥发油得率分别为 3.81、5.12、5.92 mL/kg; 提取 40 min 时挥发油得率可以达到 6.35、7.74、8.46 mL/kg, 此时挥发油得率

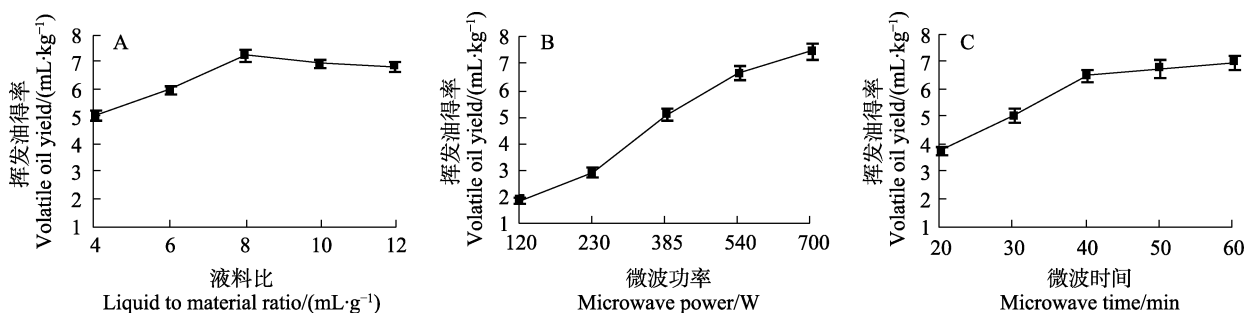


图 2 不同因素对挥发油得率的影响

Fig. 2 Effects of different factors on extraction rate of volatile oil

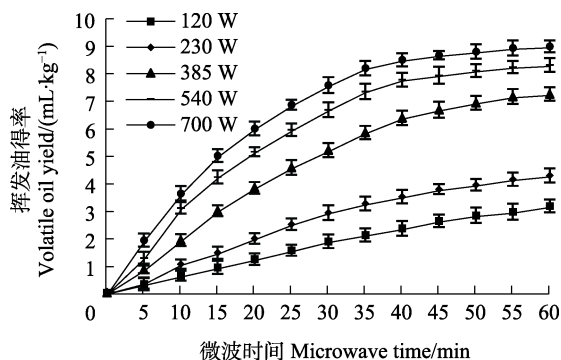


图 3 提取动力学研究

Fig. 3 Extraction kinetics study

显著升高；继续增加提取时间至 60 min，挥发油得率分别为 7.22、8.27、8.95 mL/kg，这一过程挥发油得率增加不显著。整个提取过程说明微波时间对挥发油得率产生了显著影响。与 MEGAWATI 等^[24]提取肉豆蔻挥发油的规律相似：提取初始阶段挥发油产量增加较快，一定时间后增加量逐渐变缓直到恒定。且微波功率越大，挥发油得率越快趋于稳定，即系统更快达到平衡，说明微波功率也对提取过程产生了较大影响^[25]。综合以上因素确定以液料比、微波功率和微波时间为优化因素，中心优化水平分别为 8 mL/g、540 W 和 40 min。

2.4 响应面法优化

2.4.1 响应面试验设计 结合单因素试验结果，使用 Design-Expert 10.0 软件进行响应面试验设计、分析数据并建立数学模型，以液料比 (A)、微波功率 (B) 和微波时间 (C) 为自变量，以番石榴叶挥发油得率 (Y) 为响应值，共设计 17 个处理组，结果见表 4。

2.4.2 响应面试验设计回归模型的建立和分析 利用 Design-Expert 10.0 软件对表 4 试验数据进行多元回归拟合，得到各因子对响应值的二次多项回归模型：

表 4 响应面试验设计方案和响应值

Tab. 4 Experiment design scheme and response values of response surface

序号 No.	A 液料比 Liquid to material ratio/(mL·g ⁻¹)	B 微波功率 Microwave power/W	C 微波时间 Microwave time/min	Y 挥发油得率 Volatile oil yield/(mL·kg ⁻¹)
1	8	700	45	9.61
2	10	700	40	9.89
3	6	700	40	6.33
4	8	385	45	7.45
5	8	540	40	7.95
6	6	385	40	5.95
7	8	540	40	8.11
8	8	540	40	7.98
9	10	385	40	7.58
10	6	540	45	6.28
11	8	700	35	8.33
12	10	540	45	10.33
13	8	385	35	6.87
14	6	540	35	7.02
15	10	540	35	8.33
16	8	540	40	8.21
17	8	540	40	8.19

$$Y=8.09+1.32A+0.79B+0.39C+0.48AB+0.69AC+0.17BC-0.36A^2-0.29B^2+0.26C^2$$

挥发油得率 (Y) 的回归方程方差分析结果如表 5 所示，模型 $P<0.0001$ ，差异极显著 ($P<0.01$)，说明回归模型显著；失拟项不显著 ($P=0.1193>0.05$)，说明未知因素对试验结果干扰较小，试验误差可以忽略；模型的 $R^2=0.99$ ， $R^2_{adj}=0.98$ ， $CV=2.21\%<3\%$ ，说明模型拟合度高。以上结果表明，模型能够很好地拟合试验数据，准确地反应各个因素对挥发油得率的影响。一次项、二次项和交互项的 AB 和 AC 对挥发油得率的影响极显著 ($P<0.01$)，交互项 BC 对挥发油得率的影响不显著。按照 F 值大小对影响挥发油得

率的各个因素进行排序为：A（液料比）>B（微波功率）>C（微波时间）。

表 5 挥发油得率的回归方程方差及显著性分析
Tab. 5 Regression equation variance and significance analysis of volatile oil yield

变异来源 Source of variation	平方和 Square sum	自由度 Freedom	均方 Mean square	F 值 F-value	P 值 P-value	显著性 Significance
模型	24.21	9	2.69	88.32	<0.0001	**
A	13.91	1	13.91	456.79	<0.0001	**
B	4.98	1	4.98	163.41	<0.0001	**
C	1.22	1	1.22	39.95	0.0004	**
A ²	0.55	1	0.55	18.19	0.0037	**
B ²	0.35	1	0.35	11.45	0.0117	*
C ²	0.30	1	0.30	9.69	0.0170	*
AB	0.93	1	0.93	30.57	0.0009	**
AC	1.88	1	1.88	61.62	0.0001	**
BC	0.12	1	0.12	4.02	0.0849	
残差	0.21	7	0.03			
失拟项	0.16	3	0.05	3.70	0.1193	
纯误差	0.05	4	0.01			
总变异	24.42	16				
R ²	0.99					
R ² _{adj}	0.98					
CV/%	2.21					

注：*表示差异显著 ($P < 0.05$)；**表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

Note: * indicates significant difference ($P < 0.05$); ** indicates extremely significant difference ($P < 0.01$).

2.4.3 响应面设计各因素交互作用分析 对上述模型进行分析，得到各因素之间交互作用对挥发油得率 (Y) 影响的响应曲面图 (图 4)。响应曲面的陡峭和平缓程度与各因素交互作用的强弱呈正相关^[26]。由图 4A 和图 4B 可以看出，液料比对挥发油得率的影响最大，表现为固定微波功率或微波时间时，液料比的方向的曲线变化较陡；同时也显示出液料比与微波功率、液料比与微波时间的交互作用对挥发油得率的影响是显著的。而图 4C 的响应曲面变化平缓，说明微波功率和微波时间之间的交互作用对挥发油得率的影响较弱，相对于液料比，微波功率和微波时间对挥发油得率的影响较小。结合各交互项的 F 值大小可知，影响挥发油得率的各交互作用因素顺序为 $AC > AB > BC$ 。

2.4.4 响应面优化工艺条件与验证试验 在各因素试验范围内，以最高挥发油得率为优化目标，响应面软件分析获得最优的工艺参数为：液料比

9.73 mL/g、微波功率 658 W 和微波时间 43 min，预测模型的挥发油得率为 10.45 mL/kg。在验证试验中，根据实际试验条件和仪器参数调整提取工艺条件为：液料比 10 mL/g，微波功率 660 W，微波时间 43 min，最终得到番石榴叶挥发油得率为 (10.23 ± 0.17) mL/kg，与理论预测值 (10.45 mL/kg) 无显著性差异，表明该模型可用于优化番石榴叶挥发油的提取工艺。

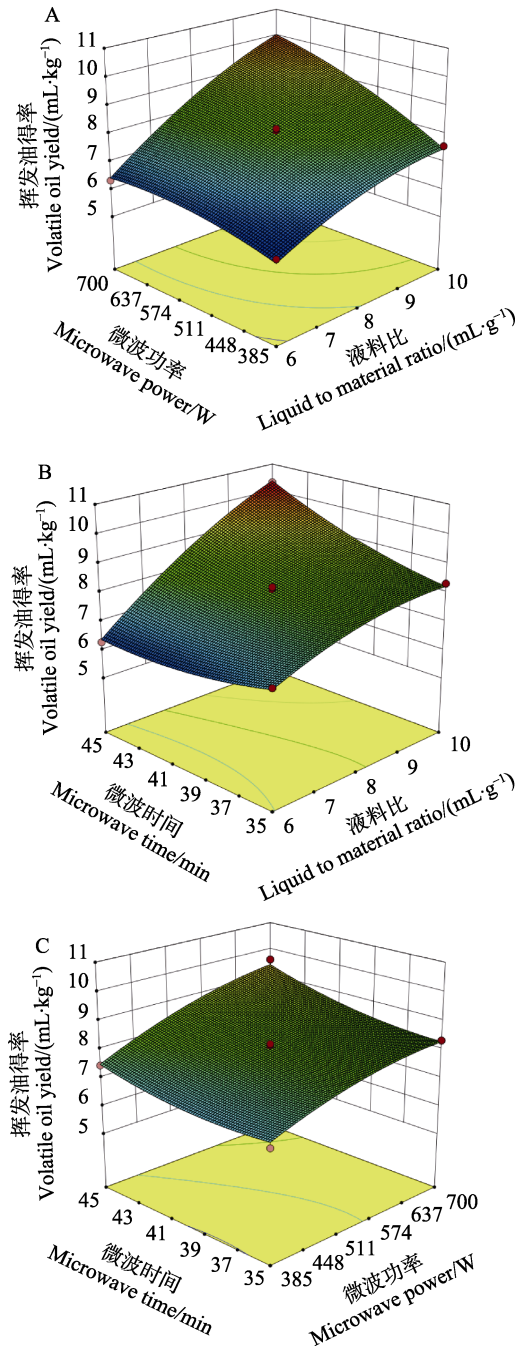


图 4 各因素对挥发油得率的响应曲面图
Fig. 4 Response surface diagram of each factor on yield of volatile oil

2.5 番石榴叶挥发油成分分析

运用气相色谱-质谱联用技术对番石榴叶挥发油成分进行检测,并结合 NIST11.L 质谱库进行检索和分析,保留其中与 NIST11.L 谱库匹配度 $\geq 80\%$ 的成分(表 6)。样品中共检测出 33 种成分,占总成分的 98.51%,检出最多的物质是萜烯类,

有 16 种,其次为醇类和其他类,分别有 7 种和 6 种,醛类、烷烃类、酚类、酯类均只检测出 1 种。含量较高的成分有 β -石竹烯(28.36%)、去氢白菖烯(11.47%)、蓝桉醇(11.31%)、 α -蒎烯(10.01%),其次是香橙烯(5.18%)、1,2,3,4,4a,7-六氢-1,6-二甲基-4-(1-甲基乙基)-萘(5.14%)、 α -

表 6 番石榴叶挥发油化学成分的气相色谱-质谱分析结果

Tab. 6 Gas chromatography-mass spectrometry results for chemical compositions of guava leaf volatile oil

种类 Species	化合物 Component	分子式 Molecular formula	保留 指数 RI	CAS 号 CAS number	峰面积 Peak area/%
醛类	苯甲醛 benzaldehyde	C ₁₁ H ₁₄ O	1022	000100-52-7	0.09
萜烯类	D-柠檬烯 D-limonene	C ₁₀ H ₁₆	1079	005989-27-5	0.32
	α -葑烯 α -cubebene	C ₁₅ H ₂₄	1362	017699-14-8	0.42
	α -蒎烯 α -pinene	C ₁₅ H ₂₄	1381	003856-25-5	10.01
	α -古芸烯 α -gurjunene	C ₁₅ H ₂₂	1402	000489-40-7	0.43
	β -石竹烯 β -caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	1410	000087-44-5	28.36
	大根香叶烯 D germacrene D	C ₁₅ H ₂₄	1416	023986-74-5	0.22
	白菖烯(+)-calarene	C ₁₅ H ₂₄	1419	017334-55-3	0.10
	香橙烯 aromandrene	C ₁₅ H ₂₄	1424	000489-39-4	5.18
	α -石竹烯 humulene	C ₁₅ H ₂₄	1434	006753-98-6	3.91
	香树烯 alloaromadendrene	C ₁₅ H ₂₄	1439	025246-27-9	1.97
	(+)-epi-双环倍半水芹烯(+)-epi-bicyclosesquiphellandrene	C ₆ H ₁₀ O ₆	1447	054274-73-6	0.99
	γ -衣兰油烯 γ -muurolene	C ₁₅ H ₂₄	1449	030021-74-0	1.17
	顺式- α -甜没药烯 cis- α -bisabolene	C ₁₅ H ₂₄ O	1466	029837-07-8	1.83
	β -甜没药烯 β -bisabolene	C ₁₅ H ₂₄	1471	000495-61-4	0.96
	γ -杜松烯(-)- γ -cadinene	C ₁₅ H ₂₄	1476	039029-41-9	0.97
	去氢白菖烯 1-calamenene	C ₁₈ H ₂₀	1483	000483-77-2	11.47
烷烃类	十二甲基环六硅氧烷 2,2,4,4,6,6,8,8,10,10,12,12-dodecamethyl-cyclohexasiloxane	C ₁₂ H ₃₆ O ₆ Si	1343	000540-97-6	0.16
酚类	丁香酚 eugenol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	1367	000097-53-0	1.19
醇类	α -松油醇 α -terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	1241	000098-55-5	0.11
	表蓝桉醇 epiglobulol	C ₁₅ H ₂₆ O	1514	088728-58-9	1.29
	[1aR-(1a α ,4 β ,4 β ,7 α ,7 β ,7 β)]-十氢-1,1,4,7-四甲基-1H-环丙并[e]萘-4-醇 decahydro-1,1,4,7-tetramethyl-1H-cycloprop[e]azulen-4-ol	C ₁₅ H ₂₆ O	1518	000552-02-3	0.65
	蓝桉醇(-)-globulol	C ₁₅ H ₂₆ O	1532	000489-41-8	11.31
	喇叭茶醇 ledol	C ₁₅ H ₂₆ O	1544	000577-27-5	4.10
	反式-杜松醇 trans-cadinol	C ₁₅ H ₂₆ O	1571	005937-11-1	2.59
	α -葑烯醇 α -cadinol	C ₁₅ H ₂₆ O	1581	000481-34-5	0.02
酯类	反式-金合欢醇乙酸酯 3,7,11-trimethyl-,1-acetate,(2E,6E)-2,6,10-dodecatrien-1-ol	C ₁₇ H ₂₈ O ₂	1630	004128-17-0	0.09
其他类	(+)-环苜蓿烯(+)-cyclosativene	C ₁₅ H ₂₄	1374	022469-52-9	0.28
	1,2,3,4,4a,5,6,8a-八氢-4a,8-二甲基-2-(1-甲基乙基)-萘	C ₁₅ H ₂₄	1458	000473-13-2	0.78
	1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-4a,8-dimethyl-2-(1-methylethenyl)-naphthalene				
	1,2,3,3a,4,5,6,7-八氢-1,4-二甲基-7-(1-甲基乙基)-甘菊烯	C ₁₅ H ₂₄	1463	022567-17-5	2.11
	1,2,3,3a,4,5,6,7-octahydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-azulene				
	1,2,3,4,4a,7-六氢-1,6-二甲基-4-(1-甲基乙基)-萘	C ₁₅ H ₂₄	1489	016728-99-7	5.14
	1,2,3,4,4a,7-hexahydro-1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl)-naphthalene				
	A-二去氢菖蒲烯 α -calacorene	C ₁₅ H ₂₀	1497	021391-99-1	0.27
	1,2,3,5,6,7,8,8a-八氢-1-甲基-6-亚甲基-4-(1-甲基乙基)-萘	C ₁₅ H ₂₄	1580	150320-52-8	0.02
	1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-1-methyl-6-methylene-4-(1-methylethyl)-naphthalene				
	合计				98.51

注: RI 为使用 C₁₁~C₂₁ 正构烷烃计算的保留指数。

Note: RI is the retention index calculated using C₁₁-C₂₁ n-alkanes.

石竹烯 (3.91%)、反式-杜松醇 (2.59%)、1,2,3,3a,4,5,6,7-八氢-1,4-二甲基-7-(1-甲基乙烯基)-甘菊烯 (2.11%)。检出成分中 β -石竹烯、 α -蒎烯、 α -石竹烯、大根香叶烯 D、 α -葑烯油烯等具有呈香效果,它们是挥发油香味的主要来源物质;而 β -石竹烯、 α -蒎烯、D-柠檬烯、大根香叶烯 D、香橙烯、丁香酚、 α -松油醇等成分具有抑菌效果^[27-28]。其中 β -石竹烯、 α -蒎烯、D-柠檬烯、丁香酚、 α -松油醇具有广谱抗微生物活性,除了能够抑制细菌的生长外,还具有抗真菌、抗病毒等活性^[29],因此推测它们在抗菌试验中发挥的作用较大。

3 讨论

目前,有关番石榴叶挥发油抗菌活性的研究较多,将其用于防治由细菌引起的农作物病害甚至动物病害逐渐成为研究热点。CHATURVEDI 等^[30]验证了番石榴叶挥发油对新月弯孢菌和厚垣镰孢菌有明显的抑制作用,抑菌率分别可以达到 86.02%和 82.80%。ZHANG 等^[31]将番石榴叶挥发油负载壳聚糖中,发现在最低浓度 (100 mg/mL) 时对肺炎克雷伯菌有抑制作用。这些研究说明番石榴叶挥发油具有代替合成杀菌剂的潜力。本研究中,番石榴叶挥发油对酸疮痂链霉菌、茄科雷尔氏菌、胡萝卜软腐欧文氏菌均有良好的抗菌活性, MIC 值分别为 3.13、1.56、3.13 $\mu\text{g/mL}$ 。其中,番石榴叶挥发油对茄科雷尔氏菌的抑制效果最好,在最低浓度 1.56 $\mu\text{g/mL}$ 的条件下,抑菌率为 12.57%,最高浓度 50 $\mu\text{g/mL}$ 时的抑菌率为 55.36%。这与先前对香茅精油抗菌性的研究结果相似,茄科雷尔氏菌也是供试菌株中最敏感的细菌,在精油浓度为 40 $\mu\text{g/mL}$ 时的抑制率达到 66.43%^[32]。2 种挥发油的抑菌率存在差别可能是化学成分的差异导致的。本研究结果表明番石榴叶挥发油是酸疮痂链霉菌、茄科雷尔氏菌、胡萝卜软腐欧文氏菌的有效抗菌剂,为农作物病害的防治提供了新选择,具有重要意义。

在番石榴叶挥发油的提取过程中,考虑了一种通过自主改造微波设备的新思路,并添加适量的金属锂盐提取番石榴叶挥发油,显著提高了挥发油产量。通过单因素筛选结合响应面优化得到最佳提取工艺条件为:液料比 10 mL/g、微波功率 660 W 和微波时间 43 min,此工艺提取的番石榴叶挥发油得率为(10.23 \pm 0.17)mL/kg,模型拟合

度良好。郭莹等^[33]使用常规加热套加热结合水蒸气蒸馏法提取番石榴叶挥发油,经正交优化后的工艺为粉碎程度为粉末(20目),料液比为 1:12,提取时间为 5 h,挥发油得率最高达到 0.85 mL/100g。与传统加热套法相比,微波具有液料受热均匀、提取效率高、节省时间等优点。本研究中使用微波辅助水蒸馏法收集的番石榴叶挥发油得率可观,优化后的提取工艺具有很好的实际应用价值,对促进番石榴叶的开发具有现实意义。

先前的研究表明,番石榴叶挥发油的主要成分为 α -蒎烯、柠檬烯、薄荷醇、异丙醇、 β -石竹烯等,多为萜类化合物及其衍生物,其纯物质广泛应用于治疗各种疾病^[34]。不同种植地点、提取方式等会造成挥发油成分含量的差异。例如, SILVA 等^[35]发现番石榴叶挥发油以倍半萜类为主,反式石竹烯、 α -石竹烯、 α -selinene 和 selin-11-en-4 α -ol 为主要化合物。而郭莹等^[33]报道番石榴叶挥发油以烯、醇类物质为主,其中广藿香烯含量占 54.97%。挥发油成分含量存在明显差异。值得注意的是,还提出 β -石竹烯、 α -蒎烯具有较强的抗菌活性。本研究中,优化后获得的番石榴叶挥发油共检测出 33 种化合物,包括醛类、萜烯类、烷烃类、酚类、醇类、酯类和其他类成分。检出成分中已报道具有抗菌活性的物质包括 β -石竹烯、 α -蒎烯、D-柠檬烯、大根香叶烯 D、香橙烯、丁香酚、 α -松油醇等,主要为萜烯类、酚类和醇类物质,这些成分约占挥发油总成分的一半,可能在抗菌试验中发挥重要作用。

目前植物源化合物对青枯病的防治机理大多为对病原菌细胞结构的破坏^[36]。由于番石榴叶挥发油中含有丰富的小分子化合物,这些化合物可以使细胞内外渗透压失衡,导致细胞膜破裂、内容物外流,细菌失活。PARET 等^[37]研究发现,玫瑰草和柠檬草挥发油处理茄科雷尔氏菌后细菌细胞壁和细胞碎片破裂,氨基酸、碱基、碳水化合物等水平显著降低。经调查发现,番石榴叶挥发油与以上挥发油共有成分中包括 β -石竹烯、丁香酚、 α -蒎烯等物质^[38-39]。而丁香酚不仅可以通过分解细胞壁,改变菌体形态来抑制细菌生长,还可以使细胞膜的通透性变大,大分子物质流出,导致菌体内功能分子如 ATP、蛋白质等含量减少,达到抑制或杀灭细菌的目的^[40]。这也进一步表明番石榴叶挥发油抗菌机制的多样性。

综合以上分析, 番石榴叶挥发油的主要成分 β -石竹烯和 α -蒎烯对供试菌株具有较强的抑制作用, 在抗菌试验中发挥重要的作用。另外, 挥发油对 3 种供试菌株发挥作用的关键贡献者可能是丁香酚。尽管该物质的含量较小 (1.19%), 但仍可能是番石榴叶挥发油对茄科雷尔氏菌具有较高抑制率的原因之一。此外, 不排除挥发油中其他萜类化合物如 D-柠檬烯的协同抑制作用。番石榴叶挥发油在对抗酸疮痂链霉菌、茄科雷尔氏菌和胡萝卜软腐欧文氏菌的抑菌试验中表现出良好的抑制效果, 表明其在农作物病害防治领域有一定的应用潜力, 为减少化学杀菌剂使用的负面影响, 作为植物源抗菌剂进行深度开发具有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] OLIVEIRA I D, UCHOA M A, FERNANDES M G, VIEIRA C R Y I, FACCENDA O, OLIVEIRA I S T. Antixenosis of the triozid, *Triozoida limbata* (Hemiptera: Trioziidae) to some cultivars of *Psidium guajava* (Myrtaceae) in the field[J]. Florida Entomologist, 2020, 102(4): 695-700.
- [2] HUSAINI O, ZULKIFLI Z, LANDE M L, NURCAHYANI E. Karakterisasi bahan anti browning dari ekstrak air buah jambu batu (*Psidium guajava* Linn) pada buah apel malang (*Malus sylvestris* (L.) Mill)[J]. Jurnal Penelitian Pertanian Terapan, 2017, 17(2): 85-92.
- [3] MORAIS-BRAGA M F B, CARNEIRO J N P, MACHADO A J T, SALES D L, SANTOS A T L, BOLIGON A A, ATHAYDE M L, MENEZES I R A, SOUZA D S L, COSTA J G M, COUTINHO H D M. Phenolic composition and medicinal usage of *Psidium guajava* Linn.: antifungal activity or inhibition of virulence?[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2017, 24(2): 302-313.
- [4] ALEXANDER P, SUDI I Y, TIZHE M. Phytochemical and antimicrobial studies of the crude extracts of the leaves of *Carica papaya* Linn (pawpaw) and *Psidium guajava* Linn (guava)[J]. Microbiology Research Journal International, 2019, 28(1): 1-7.
- [5] RAKMAI J, CHEIRSILP B, MEJUTO J C, SIMAL-GANDARA J, TORRADO-AGRASAR A. Antioxidant and antimicrobial properties of encapsulated guava leaf oil in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin[J]. Industrial Crops and Products, 2018, 111: 219-225.
- [6] RIAZ A, ARIF S, GHAFAR R, ASLAM R. Evaluation of comparative anti-diabetic effect of guava and mango leaves powder in streptozotocin induced diabetic rats[J]. Food Bioscience, 2020, 9(1): 1059-1068.
- [7] DHEIR I, ABU-NASER S S. Knowledge based system for diagnosing guava problems[J]. Social Science Electronic Publishing, 2019, 3(3): 9-15.
- [8] GOBI N, RAMYA C, VASEEHARAN B, MALAIKOZHUNDAN B, VIJAYAKUMAR S, MURUGAN K, BENELLI G. Oreochromis mossambicus diet supplementation with *Psidium guajava* leaf extracts enhance growth, immune, antioxidant response and resistance to aeromonas hydrophila[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2016, 58: 572-583.
- [9] GEETHA V. Green synthesis of silver nanoparticles from *Psidium guajava* leaves and its antibacterial activity[J]. International Journal of Bioassays, 2017, 6(7): 5441-5443.
- [10] HUSSIN N N, ADZAHAR N S, LEE T C, VENUGOPAL J R. Chemical constituents profiles and antibacterial activity of *Psidium guajava* leaves essential oil[J]. Materials Science Forum, 2021, 1025: 242-246.
- [11] AMMER M R, ZAMAN S, KHALID M, BILAL M, ERUM S, HUANG D, CHE S. Optimization of antibacterial activity of *Eucalyptus tereticornis* leaf extracts against *Escherichia coli* through response surface methodology[J]. Journal of Radiation Research and Applied Sciences, 2016, 9(4): 376-385.
- [12] MENDES L A, SOUZA T D S D, MENINI L, GUILHEN J H S, FERREIRA M F D S. Spring alterations in the chromatographic profile of leaf essential oils of improved guava genotypes in Brazil[J]. Scientia Horticulturae, 2018, 238: 295-302.
- [13] 徐沛东, 魏方林, 张蕊蕊, 郭近, 王益锋, 许丹倩. 5 种杀菌剂防治番茄青枯病的应用技术[J]. 世界农药, 2021, 43(12): 42-45.
XU P D, WEI F L, ZHANG R R, GUO J, WANG Y F, XU D Q. Application technology of 5 fungicides to control tomato bacterial wilt[J]. World Pesticide, 2021, 43(12): 42-45. (in Chinese)
- [14] 任敏华, 张静燕, 陈荣华, 刘琼光. 赣南地区番茄青枯菌系多样性分析[J]. 华南农业大学学报, 2022, 43(1): 67-76.
REN M H, ZHANG J Y, CHEN R H, LIU Q G. Diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from tomato in the south of Jiangxi Province[J]. Journal of South China Agricultural University, 2022, 43(1): 67-76. (in Chinese)
- [15] 郑雪芳, 朱育菁, 车建美, 陈燕萍, 蓝江林, 王阶平, 刘波. 青枯雷尔氏菌 Tn5 转座子无致病力突变株在番茄根部的定殖特性[J]. 植物保护学报, 2021, 48(2): 314-321.
ZHENG X F, ZHU Y J, CHE J M, CHEN Y P, LAN J L, WANG J P, LIU B. Colonization characteristics of *Ralstonia*

- solanacearum* avirulent mutants yielded by Tn5 transposon in the tomato root[J]. Journal of Plant Protection, 2021, 48(2): 314-321. (in Chinese)
- [16] 陈华铮, 朱凯. 两种柑橘类挥发油及其主要成分的抑菌和抗氧化活性[J]. 林产化学与工业, 2021, 41(4): 17-22.
CHEN H Z, ZHU K. Antibacterial and antioxidant activities of two citrus essential oils and their main components[J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2021, 41(4): 17-22. (in Chinese)
- [17] 陈迅, 陆筱艾, 刘向程, 张嗣东, 练继鹏, 王艳花. 盐析效应在水蒸气提取植物挥发油中作用分析[J]. 广州化工, 2015, 43(6): 112-113, 175.
CHEN X, LU X A, LIU X C, ZHANG S D, LIAN J P, WANG Y H. Analysis of salting-out effect on plant essential oil in steam distillation[J]. Guangzhou Chemical Industry, 2015, 43(6): 112-113, 175. (in Chinese)
- [18] 张凤兰, 贾利霞, 杨忠仁, 郝丽珍, 黄修梅, 张晓艳. 沙芥果实挥发油提取工艺优化及 GC-MS 分析[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(15): 40-46.
ZHANG F L, JIA L X, YANG Z R, HAO L Z, HUANG X M, ZHANG X Y. Optimization of extraction technology and GC-MS analysis of essential oil from *Pugionium cornutum* (L.) Gaertn. fruit[J]. Food Research and Development, 2021, 42(15): 40-46. (in Chinese)
- [19] 李麟洲, 张栢炎, 刘建卓, 冯建成, 张容鹄, 谷凤林. 胡椒梗挥发油的提取条件优化及其成分分析[J]. 现代食品科技, 2021, 37(10): 126-135, 86.
LI L Z, ZHANG Z Y, LIU J Z, FENG J C, ZHANG R G, GU F L. Optimization of extraction conditions of pepper stems essential oil and its composition analysis[J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(10): 126-135, 86. (in Chinese)
- [20] SONG Z L, WEI X X, XIE M M, ZHAO X Q, SUN J, MAO Y P, WANG X J, WANG W L. Study on the microwave extraction process and product distribution of essential oils from citrus peel[J]. Chemical Engineering and Processing - Process Intensification, 2022, 171: 108726.
- [21] COSTA S S, GARIEPY Y, ROCHA S C S, RAGHAVAN V. Microwave extraction of mint essential oil - temperature calibration for the oven[J]. Journal of Food Engineering, 2014, 126: 1-4.
- [22] SAHRAOUI N, VIAN M A, MAATAOUI M E, BOUTEKEDJIRET C, CHEMAT F. Valorization of citrus by-products using microwave steam distillation (MSD)[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2011, 12(2): 163-170.
- [23] PENG X J, FENG C T, WANG X, GU H Y, LI J L, ZHANG X N, ZHANG X C, YANG L. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from barks of *Pinus pumila* using microwave-assisted hydrodistillation after screw extrusion treatment[J]. Industrial Crops and Products, 2021, 166: 113489.
- [24] MEGAWATI, FARDHYANTI D S, SEDIWAN W B, HISYAM A. Kinetics of mace (*Myristica arillus*) essential oil extraction using microwave assisted hydrodistillation: effect of microwave power[J]. Industrial Crops and Products, 2019, 131: 315-322.
- [25] 王占一, 孙晓梅, 徐妍玉, 王维青, 王森, 向兰. 超声波辅助提取荷叶多酚工艺及其动力学分析[J]. 北方园艺, 2020, 26(5): 95-103.
WANG Z Y, SUN X M, XU Y Y, WANG W Q, WANG S, XIANG L. Optimization of the technology and kinetic analysis for ultrasonic-assisted extraction of polyphenols from lotus leaf[J]. Northern Horticulture, 2020, 26(5): 95-103. (in Chinese)
- [26] 何宇宁, 黄和, 颜韶波, 钟赛意, 刘海, 秦小明. 菠萝蜜果醋发酵工艺的优化及香气成分分析[J]. 热带作物学报, 2021, 42(5): 1462-1471.
HE Y N, HUANG H, YAN S B, ZHONG S Y, LIU H, QIN X M. Optimization of fermentation process of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) vinegar and analysis of aroma components[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2021, 42(5): 1462-1471. (in Chinese)
- [27] WINTOLA O A, OLAJUYIGBE A A, AFOLAYAN A J, COOPOOSAMY R M, OLAJUYIGBE O O. Chemical composition, antioxidant activities and antibacterial activities of essential oil from *Erythrina caffra* Thunb. growing in South Africa[J]. Heliyon, 2021, 7(6): e07244.
- [28] XU H, ZHANG D, LI J. Antibacterial nanoparticles with universal adhesion function based on dopamine and eugenol[J]. Journal of Bioresources and Bioproducts, 2019, 4(3): 177-182.
- [29] UGBOGU E A, EMMANUEL O, UCHE M E, DIKE E D, OKORO B C, IBE C, UDE V C, EKWEOGU C N, UGBOGU O C. The ethnobotanical, phytochemistry and pharmacological activities of *Psidium guajava* L.[J]. Arabian Journal of Chemistry, 2022, 15(5): 103759.
- [30] CHATURVEDI T, SINGH S, NISHAD I, KUMAR A, TIWARI N, TANDON S, SAIKIA D, VERMA R S. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of senescent leaves of guava (*Psidium guajava* L.)[J]. Natural Product Research, 2019, 35(8): 1-5.
- [31] ZHANG F, RAMACHANDRAN G, MOTHANA R A, NOMAN O M, MANOHARAN N. Anti-bacterial activity of chitosan loaded plant essential oil against multi drug resistant *K. pneumonia*[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2020,

- 27(12): 3449-3455.
- [32] ZHANG X N, ZHU H W, WANG J L, LI F L, WANG J H, MA X Y, LI J Y, HUANG Y, LIU Z W, ZHANG L B, LI S Q. Anti-microbial activity of citronella (*Cymbopogon citratus*) essential oil separation by ultrasound assisted ohmic heating hydrodistillation[J]. *Industrial Crops & Products*, 2022, 176: 114299.
- [33] 郭莹, 熊阳, 宋忠诚, 陈少云, 刘文洪, 余旭蕾. 番石榴叶挥发油的提取、成分分析及抑菌活性研究[J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(10): 3754-3757.
- GUO Y, XIONG Y, SONG Z C, CHEN S Y, LIU W H, YU X L. Study on extraction technology, components analysis and antibacterial activity of *Psidium guajava* L.[J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2015, 30(10): 3754-3757. (in Chinese)
- [34] AFAF W, AMNA A K, JAMAL A S, SAID S, AMZAD H, SOMMYA A R. Chemical composition and biological activities of the essential oils of *Psidium guajava* leaf[J]. *Journal of King Saud University - Science*, 2019, 31(4): 993-998.
- [35] SILVA E A J, SILVA V P D, ALVES C C F, ALVES J M, SOUCHIE E L, BARBOSA L C A. Chemical composition of the essential oil of *Psidium guajava* leaves and its toxicity against *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. *Semina-Ciencias Agrarias*, 2018, 39(2): 865-874.
- [36] 王琳琳, 张恒恺, 陈欣鑫, 陈立, 李建科. 天然化合物防治茄科青枯劳尔氏菌研究进展[J]. *中国果菜*, 2020, 40(1): 42-45, 52.
- WANG L L, ZHANG H K, CHEN X X, CHEN L, LI J K. Research progress of natural compounds against *Ralstonia solanacearum*[J]. *China Fruit and Vegetable*, 2020, 40(1): 42-45, 52. (in Chinese)
- [37] PARET M L, SHARMA S K, ALVAREZ A M. Characterization of biofumigated *Ralstonia solanacearum* cells using micro-Raman spectroscopy and electron microscopy[J]. *Phytopathology*, 2012, 102(1): 105-113.
- [38] 张凤梅, 刘哲, 司晓喜, 刘志华, 申钦鹏, 刘春波, 朱瑞芝, 张涛, 何沛, 唐石云. 玫瑰挥发油香味成分分析及在卷烟加香中的应用[J]. *烟草科技*, 2020, 53(5): 47-56.
- ZHANG F M, LIU Z, SI X X, LIU Z H, SHEN Q P, LIU C B, ZHU R Z, ZHANG T, HE P, TANG S Y. Aroma component analysis on mainstream cigarette smoke flavored with rose essential oil[J]. *Tobacco Science and Technology*, 2020, 53(5): 47-56. (in Chinese)
- [39] 张洪军, 曹亚斌, 刘伟, 丁华, 刘光发, 王建清. 响应面法优化香茅精油提取工艺及其成分分析[J]. *中国调味品*, 2017, 42(8): 15-20.
- ZHANG H J, CAO Y B, LIU W, DING H, LIU G F, WANG J Q. Optimization of citronella oil extraction technology by response surface method and its components analysis[J]. *China Condiment*, 2017, 42(8): 15-20. (in Chinese)
- [40] 刘欣怡, 王雅丽, 王昊, 王露露, 梅文莉, 戴好富, 王军. 4种沉香树叶挥发油化学成分 GC-MS 分析[J]. *热带作物学报*, 2022, 43(1): 196-206.
- LIU X Y, WANG Y L, WANG H, WANG L L, MEI W L, DAI H F, WANG J. GC-MS analysis of chemical constituents of volatile oil from four kinds of agarwood tree leaves[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2022, 43(1): 196-206. (in Chinese)