

粉单竹竹叶提取物的抑菌活性研究*

祁红兵¹, 宋军霞², 张志敏¹

(1. 岭南师范学院 生命科学与技术学院, 广东 湛江 524048;

2. 岭南师范学院 物理科学与技术学院, 广东 湛江 524048)

摘要:【目的】研究粉单竹竹叶提取物的抗菌活性及其稳定性, 为其应用提供参考。【方法】采用抑菌圈法研究系统分离得到的粉单竹竹叶提取物对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、酿酒酵母和黄曲霉等常见微生物的抑菌活性; 确定最低抑菌质量浓度; 考察温度、pH、紫外线和化学药剂等因素对提取液抗菌活性的影响。【结果】竹叶提取物系统分离各部分对4种菌有不同的抑制作用, 其中正丁醇萃取物对金黄色葡萄球菌的抑菌效果最好, 最小抑菌质量浓度是 1.67×10^{-1} mg/mL; 石油醚萃取物和萃余水相物对大肠杆菌的抑制作用最好, 最小抑菌质量浓度分别为 1.38×10^{-3} mg/mL 和 3.17×10^{-3} mg/mL; 正丁醇萃取物和萃余水相物对酿酒酵母的抑菌效果最好, 最小抑菌质量浓度分别为 1.67×10^{-2} mg/mL 和 3.17×10^{-2} mg/mL; 只有氯仿萃取物对黄曲霉有抑菌作用。除加入 Tween 20 会明显增加抑菌活性外, 各外界条件对竹叶提取物的抑菌性能影响较小。【结论】粉单竹竹叶提取物有较好的抑菌活性, 且竹叶提取物的生物活性比较稳定, 有较好的应用前景。

关键词: 粉单竹; 竹叶提取物; 抑菌活性

中图分类号: S 482.292

文献标识码: A

文章编号: 1004-390X (2019) 05-0906-05

Antibacterial Research on the Bamboo Leaf Extracts from *Bambusa cerosissima* McClure

QI Hongbing¹, SONG Junxia², ZHANG Zhimin¹

(1. Life Sciences and Technology School, Lingnan Normal University, Zhanjiang 524048, China;

2. Physical Sciences and Technology School, Lingnan Normal University, Zhanjiang 524048, China)

Abstract: [Purpose] The antibacterial activity and stability of bamboo leaf extracts from *Bambusa cerosissima* McClure were studied to provide references for their application. [Method] Using *B. cerosissima* as the material and distilled water, ethanol and petroleum ether, chloroform, ethyl acetate and N-butanol as the solvents, the antibacterial effects of bamboo leaf extracts on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus flavus* were studied by the method of bacteriostasis circle. The minimum bacteriostasis mass concentration was determined. The effects of temperature, pH, ultraviolet radiation and chemicals on the antibacterial activity of the extracts were also studied. [Results] Five bamboo leaf extract systems had different inhibitory effects on four kinds of bacteria, among which the N-butanol extract had the best inhibitory effect on *S. aureus* with the minimum inhibitory mass concentration of 1.67×10^{-1} mg/mL. The petroleum ether extract and water soluble extract had the best inhibitory effect on *E. coli* with the minim-

收稿日期: 2018-09-30

修回日期: 2019-07-18

网络首发时间: 2019-09-30 11:57:32

*基金项目: 国家星火计划项目(2015GA780051); 产业链协同创新类公共服务平台项目(湛江创2017C8B2); 广东省岭南师范学院校内专项项目(2L1311)。

作者简介: 祁红兵(1971—), 男, 河南潢川人, 博士, 副教授, 主要从事微生物活性成分的提取分析研究。E-mail: qhbsjxqxy@126.com

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.s.20190930.0855.005.html>



um inhibitory mass concentrations of 1.38×10^{-3} mg/mL and 3.17×10^{-3} mg/mL, respectively. The butanol extract and water soluble extract had the best bacteriostatic effect on *S. cerevisiae* with the minimum bacteriostatic mass concentrations of 1.67×10^{-2} mg/mL and 3.17×10^{-2} mg/mL, respectively, and only the trichloromethane extract had bacteriostatic effect on *A. flavus*. In addition to Tween 20, the biological activity of bamboo leaf extract is stable for a variety of external conditions. [**Conclusion**] The extract of bamboo leaves has better bacteriostatic activity, and the biological activity of bamboo leaf extract is relatively stable, so it has a good application prospect.

Keywords: *Bambusa cerosissima* McClure; bamboo leaf extracts; antibacterial activity

竹子是禾本科(Poaceae)竹亚科(Bambusoideae)多年生常绿植物,全世界有竹类植物1200余种,中国是世界上竹类资源最丰富的国家,素有“竹子王国”之称^[1-3]。竹叶在中国具有悠久的食用和药用历史^[4],《本草求真》《本草逢原》等古代医学著作均有大量记载。有研究表明:竹叶中含有大量的黄酮类化合物和生物活性多糖等有效成分,应用价值极大^[5];尤其是竹叶黄酮具有显著的抗氧化、调节血脂、抗肿瘤、抗癌、抗衰老、抗心血管疾病、抗菌抗炎、增强免疫、抗辐射及保肝等多种功效^[6-7]。竹叶具有广谱抗菌性,在中性条件下竹叶防腐剂有很强的抑菌作用,其防腐性能明显优于山梨酸钾和苯甲酸钠^[8],如超声波微波提取法提取的竹叶提取液对食源性细菌的生长有较高的抑制作用,可用于天然食品防腐剂的开发^[9]。国外主要是日本对竹叶防腐剂的应用进行研究,如日本中山食品技术研究所从竹叶中提取出高效天然食品防腐剂,其防腐效果比现有天然防腐剂高1倍^[10]。但目前鲜有以粉单竹为原料的竹叶提取物的抑菌防腐报道。

本研究以粉单竹(*Bambusa cerosissima* McClure)为材料,采用系统分离法萃取分离粉单竹竹叶水提液,以打孔法研究竹叶提取物对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、酿酒酵母和黄曲霉等常见微生物的抑菌活性和最低抑菌质量浓度,同时考察了温度、pH、紫外线和化学药剂等外界因素对其抗菌活性的影响,为进一步开发利用粉单竹竹叶提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

粉单竹(*B. cerosissima*)竹叶采于广东省湛江市寸金公园,洗净、晾干,打粉装入封口袋中备用。

细菌包括金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus*

aureus)和大肠杆菌(*Escherichia coli*),真菌包括酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和黄曲霉(*Aspergillus flavus*),均为岭南师范学院微生物实验室保存菌种。

细菌用培养基为营养琼脂培养基(nutrient agar medium):蛋白胨5g,牛肉膏5g,氯化钠10g,琼脂20g,水1L,加热溶解,调pH7.0~7.2,然后121℃灭菌30min。真菌用培养基为马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA):马铃薯200g,去皮、去芽眼,切片,加水煮沸30min,加水至1L,加入葡萄糖20g溶解后,121℃灭菌30min。

1.2 试验方法

1.2.1 竹叶提取物的制备与分离

把300g竹叶粉放在锅里煮沸,浓缩提取至100mL,减压干燥得竹叶粗提物;粗提液转入500mL分液漏斗中,加入200mL石油醚,充分振摇萃取,静置,待溶液完全分层后,得上层的石油醚萃取液,剩余水相用同样的方法再萃取4次,每次分别加入200、150、100和50mL石油醚,将5次石油醚萃取液合并,在35~40℃下减压回收石油醚,得到墨绿色脂状物124.2mg,为石油醚萃取物;石油醚萃取下层水相再分别加入氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃取,按上述操作分别得到4个样品:氯仿萃取物137.3mg、乙酸乙酯萃取物519.8mg、正丁醇萃取物1500mg和萃余水相物285.0mg。5种萃取物即竹叶总提取物共2566.3mg。

1.2.2 粉单竹竹叶提取物抑菌活性的测定

细菌经37℃24h、真菌经28℃48h恒温培养活化后制备10倍系列稀释的菌悬液。取合适浓度菌液或孢子涂布平板,打孔法检测抑菌活性,即每皿打3个孔(抑菌试验孔直径1cm,稳定性试验孔直径0.6cm),每孔加入20μL提取液。细菌经37℃24h、真菌经28℃48h培养

后,以抑菌圈直径作为竹叶抑菌活性指标,重复 3 次,直径越大抗菌活性越强。

1.2.3 最低抑菌浓度 (MIC) 的测定

取各菌稀释的菌悬待测液依次进行梯度稀释,以上述打孔法测定生长抑制率,重复 3 次,最小抑制率对应浓度为最低抑菌浓度。

1.2.4 外界条件对抑菌稳定性的影响

10 倍稀释的竹叶粗提物稀释液,以大肠杆菌和酿酒酵母为指示菌,抑菌圈法检测其抑菌活性稳定性,重复 3 次。

(1) 温度影响

竹叶粗提物分别置于 4、60、80 和 100 °C 水浴和 121 °C 湿热条件(水蒸气高压灭菌),对照样置于 30 °C 条件,各处理 20 min,进行测定其抑菌活性。

(2) pH 影响

竹叶粗提物分别调节 pH 为 3.0、4.0、5.0、6.0 和 7.0,比较样品的抑菌效果。

(3) 紫外线影响

将竹叶粗提物倒入无菌平皿中,铺成约 1 mm 薄层,在无菌条件下用 40 W 紫外灯距 50 cm 处照射 1、2、3、4、5 和 6 h。以未照射过的原液作为对照。

(4) 化学试剂影响

向竹叶粗提物分别加入 Triton X-100、EDTA、Tween 80、Tween 20 和 NaCl,使各物质的终质量浓度达到 1 mg/mL,30 °C 温浴 2 h,检测样品

的化学稳定性。

1.3 数据分析

试验数据均为 3 个重复的平均值,采用 Excel 2007 处理数据、绘图并进行统计分析。

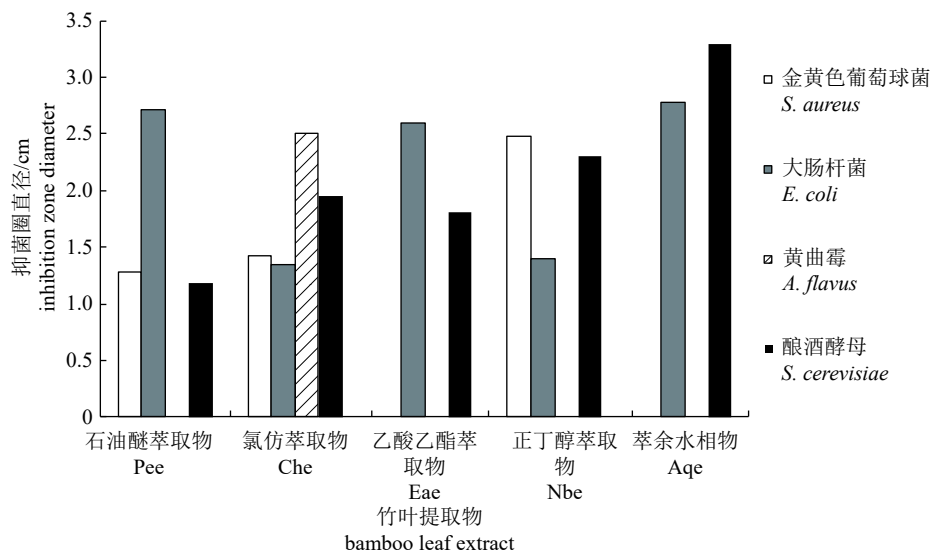
2 结果与分析

2.1 竹叶提取物的抑菌作用

由图 1 可知:竹叶提取物系统分离各部分对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、黄曲霉和酿酒酵母抑制作用各不相同。石油醚萃取物对大肠杆菌的抑制效果最好,对黄曲霉没有抑菌作用;氯仿萃取物对黄曲霉的抑制效果最好;乙酸乙酯萃取物对大肠杆菌的抑制作用最好,但对金黄色葡萄球菌和黄曲霉没有抑制作用;正丁醇萃取物对金黄色葡萄球菌和酿酒酵母的抑制作用最好,对黄曲霉没有抑菌作用;萃余水相物对大肠杆菌和酿酒酵母有较好的抑制作用,但对金黄色葡萄球菌和黄曲霉没有抑制作用。由上可知:5 个部分对大肠杆菌都有抑菌作用,但只有氯仿萃取物对黄曲霉有抑菌作用。

2.2 竹叶提取物各部分的最小抑菌质量浓度

由表 1 可知:石油醚萃取物对大肠杆菌的抑菌活性最好,最小抑菌质量浓度为 1.38×10^{-3} mg/mL,而乙酸乙酯萃取物和萃余水相物对金黄色葡萄球菌则无抑菌效果。乙酸乙酯萃取物对大肠杆菌和酿酒酵母的抑菌活性最好。氯仿萃取物对黄曲霉



注/Note: Pee, petroleum ether extract; Che, chloroform extract; Eae, ethyl acetate extract; Nbe, N-butanol extract; Aqe, aqueous extract.

图 1 竹叶提取物的抑菌作用

Fig. 1 Bacteriostasis of extracts from bamboo leaves

表 1 竹叶系统分离提取物的最小抑菌质量浓度

系统相 system phase	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	酿酒酵母 <i>S. cerevisiae</i>	黄曲霉 <i>A. flavus</i>
石油醚萃取物 Pee	1.38×10^{-3}	1.38×10^{-2}	1.38×10^{-1}	—
氯仿萃取物 Che	1.53	1.53×10^{-1}	1.53×10^{-2}	5.38×10^{-1}
乙酸乙酯萃取物 Eae	5.38×10^{-5}	—	5.38×10^{-5}	—
正丁醇萃取物 NBe	1.67	1.67×10^{-1}	1.67×10^{-2}	—
萃余水相物 Aqe	3.17×10^{-3}	—	3.17×10^{-2}	—

注/Note: Pee. petroleum ether extract; Che. chloroform extract; Eae. ethyl acetate extract; Nbe. N-butanol extract; Aqe. aqueous extract.

的最小抑菌质量浓度是 5.38×10^{-1} mg/mL, 其余部分对黄曲霉则没有抑菌作用。

2.3 外界条件对粉单竹叶提取物稳定性的影响

由图 2 可知: 温度、pH、紫外照射时间变化

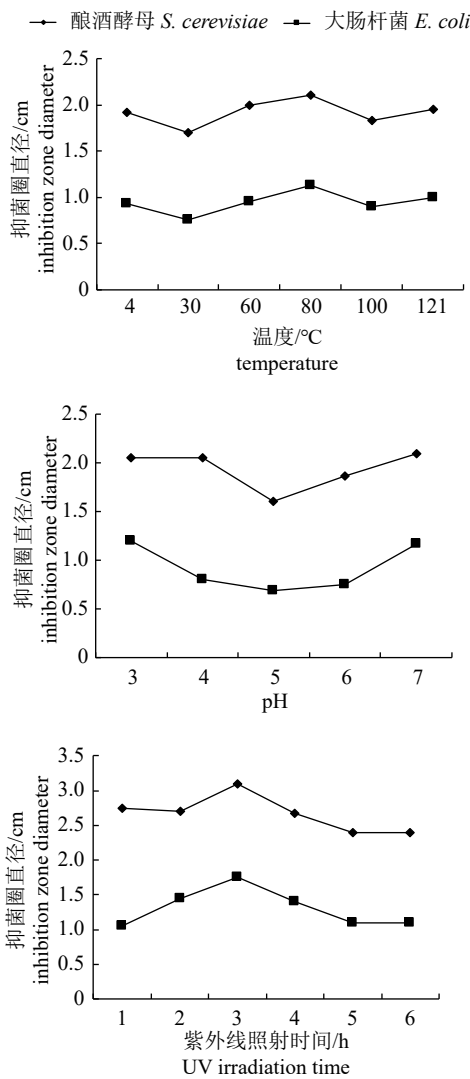


图 2 温度、pH 和紫外线对粉单竹叶提取物稳定性的影响

Fig. 2 The effect of temperature, pH and UV irradiation on the stability of the extract of bamboo leaf

对竹叶提取物抑菌活性没有太大影响, 酿酒酵母和大肠杆菌的抑菌效果虽有一定波动, 但总体变化不大。

由图 3 可知: 粉单竹竹叶提取物抑菌物质经 EDTA、Triton X-100 和 NaCl 处理后未受明显影响, 抑菌活性仍然保持稳定。而加入吐温后, 特别是 Tween 20 抑菌活性明显的增加。

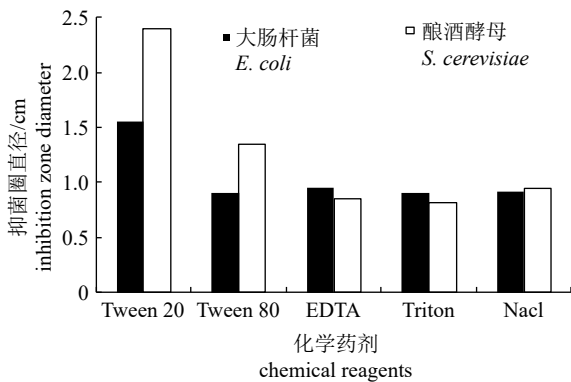


图 3 化学试剂对粉单竹叶提取物稳定性的影响

Fig. 3 Effects of chemical reagents on stability of leaves of bamboo leaves

3 讨论

随着人们生活水平的提高, 安全健康消费意识不断增强, 对食品安全问题日益关注, 寻找一种新的安全高效食品防腐添加剂显得尤为迫切。竹叶提取物作为天然食品防腐剂具有安全无毒高效的特点^[11-13], 其开发研究蕴藏着良好的市场前景。

近年来已有不少竹叶提取物的抗菌研究。赵艳芹等^[14]制备的淡竹叶抗菌再生纤维素纤维对金黄色葡萄球菌的抑菌率达 94.8%; 王媛媛^[15]发现竹叶精油及其复配物有较好的抑菌活性, 并基于竹叶精油组分构成及其抑菌稳定性, 从细胞层面研究了其抑菌作用机制; 操海群等^[16]对毛竹抑菌有效成分进行了初步分离, 表明毛竹粗提物经萃

取分离得到组分中乙酸乙酯组分具有较强的抑菌作用,其抑菌有效成分为苯酚类化合物;江惠等^[17]从毛竹竹叶中分离纯化出一种新的抗菌肽,此竹叶多肽对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌以及枯草芽孢杆菌表现出良好的抑菌活性;姚志蕊^[18]研究了毛竹叶提取物的抑菌活性,结果显示毛竹叶提取物中乙酸乙酯相抑菌活性最强,其主要活性成分为黄酮类化合物。

虽然有较多竹叶抗菌活性的研究报道,但竹叶抗菌活性的对象多是以细菌为主,真菌较少,对于食品中危害极大的黄曲霉的抑菌活性则未见报道。本试验针对竹叶各系统分离提取成分的抗菌活性进行了研究,发现竹叶提取物系统分离各部分对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、酿酒酵母和黄曲霉 4 种菌均有不同的抑制作用,其中,乙酸乙酯提取物对大肠杆菌和酿酒酵母有很高的抗菌活性,这一结果与部分文献^[16,18]相似。各系统分离成分中氯仿萃取物对黄曲霉有较好抑菌作用,这一点未见报道。黄曲霉是食品加工贮存中常见的污染菌,其产生的黄曲霉毒素有极强毒性,粉单竹竹叶提取物作为食品防腐添加剂在这方面有很好的应用价值。本研究进一步考察了环境条件对竹叶提取物抑菌活性的影响,发现其在多种条件下稳定性较高,说明粉单竹竹叶提取物具备开发为抑菌防腐剂的良好条件。另外,课题组还将进行后续研究,包括竹叶抗菌成分的分析鉴定、不同时间采摘对竹叶的成分及抗菌活性的影响及抗菌复合作用等,其结果将进一步揭示竹叶提取物的抗菌活性。

[参考文献]

- [1] 江泽慧. 世界竹藤[M]. 北京: 中国林业出版社, 2008.
- [2] 滕波明. 竹业产业化发展的研究[J]. 中国科技财富, 2011(14): 226. DOI: 10.3969/j.issn.1671-461X.2011.14.201.
- [3] 刘翠, 王文久. 竹叶资源研究进展及开发利用——兼谈云南丛生竹竹叶资源开发对策[J]. 林业建设, 1999(6): 10.
- [4] 赖炳, 陈其兵. 竹叶提取物的化学成分及其生理功能研究进展[J]. 福建林业科技, 2013, 40(1): 214. DOI: 10.3969/j.issn.1002-7351.2013.01.48.
- [5] 王慧, 郑炯. 竹叶多糖的提取分离与生物活性研究进展[J]. 粮食与油脂, 2015, 28(10): 1. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9578.2015.10.001.
- [6] 毛嫚璇, 陶文亮, 陈馨. 多功能活性物质——竹叶黄酮的国内外研究及应用[J]. 广州化工, 2015(5): 12. DOI: 10.3969/j.issn.1001-9677.2015.05.005.
- [7] 王文渊. 竹叶黄酮的功能研究进展[J]. 中国食物与营养, 2012, 18(6): 71. DOI: 10.3969/j.issn.1006-9577.2012.06.018.
- [8] 林丽园, 张甄妮, 严姝, 等. 竹叶提取物的抑菌性分析[J]. 南方农业, 2015, 9(36): 134. DOI: 10.19415/j.cnki.1673-890x.2015.36.080.
- [9] 戚彬. 竹叶提取物对食源性细菌的生长抑制效应[D]. 上海: 上海海洋大学, 2015.
- [10] 张平远. 日本: 从竹叶中提取出防霉防腐剂[J]. 湖南饲料, 2005(2): 41. DOI: 10.3969/j.issn.1673-7539.2005.02.024.
- [11] 陈冠敏, 姜瑞, 陈勿雄, 等. 天然防腐剂——“竹叶提取液”的致突变性研究[J]. 卫生毒理学杂志, 1994(4): 309. DOI: 10.16421/j.cnki.1002-3127.1994.04.064.
- [12] 傅剑云, 郑云燕, 夏勇, 等. 竹叶抗氧化物大鼠生殖毒性研究[J]. 浙江预防医学, 2004, 16(8): 20. DOI: 10.19485/j.cnki.issn1007-0931.2004.08.009.
- [13] LU B Y, WU X Q, TIE X W, et al. Toxicology and safety of anti-oxidant of bamboo leaves. Part 1: acute and subchronic toxicity studies on anti-oxidant of bamboo leaves[J]. Food and Chemical Toxicology, 2005, 43(5): 783. DOI: 10.1016/j.fct.2005.01.019.
- [14] 赵艳芹, 于湖生, 吴娇. 淡竹叶抗菌再生纤维素纤维制备及性能研究[J]. 针织工业, 2017(8): 27. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4033.2017.08.008.
- [15] 王媛媛. 竹叶精油的复配及其抑菌机理研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2016.
- [16] 操海群, 岳永德, 彭镇华, 等. 毛竹提取物的抑菌活性及其有效成分的初步分离[J]. 植物病理学报, 2005, 35(5): 428. DOI: 10.13926/j.cnki.apps.2005.05.007.
- [17] 江惠, 张国栋. 竹叶天然抗菌肽的分离纯化与抗菌活性研究[J]. 食品工业, 2011(5): 12. DOI: 10.3969/j.issn.1672-5026.2011.05.005.
- [18] 姚志蕊. 毛竹叶中抑菌活性成分的提取及其分析[D]. 无锡: 江南大学, 2008.

责任编辑: 何馨成