

竹叶提取物对食源性细菌抑制效应的研究

袁国强, 李云峰, 欧杰, 马晨晨*, 林丰, 黄日浩

(上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

摘要: **目的** 利用两种方法对竹叶有效抑菌成分的进行提取,并对 3 种食源性微生物进行抑菌圈试验比较,研究竹叶提取物对食源性细菌的生长抑制效果以及对比两种提取方法的不同提取效果。**方法** 利用乙醇、乙酸乙酯、丙酮等有机溶剂为提取介质,使用水浴浸提法和超声波微波提取法获得竹叶提取液。并利用提取物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、恶臭假单胞菌三种目标菌株使用抑菌圈法进行抑菌实验。**结果** 利用乙醇+冰醋酸、丙酮、乙酸乙酯为提取介质的抑菌圈实验表明:三种提取介质都能提取到竹叶有效抑菌成分,但乙酸乙酯的提取效果相对较好,另外,超声波微波提取法在提取时间和效果上均优于水浴浸提法。**结论** 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。在竹叶有效成分的提取方面超声波微波提取法可替代传统的水浴浸提法。

关键词: 竹叶; 提取物; 食源性细菌; 抑制

Inhibition effects of bamboo leaf extraction on foodborne bacteria

YUAN Guo-Qiang, LI Yun-Feng, OU Jie, MA Chen-Chen*, LIN Feng, HUANG Ri-Hao

(College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

ABSTRACT: Objective To extract antibacterial compositions from bamboo leaves with two methods and compare the effect of antibacterial to 3 types of foodborne microbial. The effect of bacteriostasis and extract was investigated. **Methods** Water bath method using organic solvents (ethanol, ethyl acetate, acetone) as extraction medium, and ultrasonic microwave method were used to make the bamboo leaf extraction. The antibacterial effects of the extraction were investigated by bactericidal test on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas sputida*. **Results** The experimental results showed that 3 types of extraction could inhibit the growth of foodborne microbial. Moreover, ultrasonic microwave extract method was better than immersion method in extract time and effect. **Conclusion** The bamboo leaf extraction has a high antibacterial activity against foodborne bacteria, and it can be used for the development of natural food preservative. Immersion method can be replaced by Ultrasonic microwave extract method to extract antibacterial compositions.

KEY WORDS: bamboo leaf; extract; foodborne bacteria; inhibition

竹子是我国森林资源的重要组成部分,全国共有竹种 40 余属 500 多种,竹林面积约 484.26 万公顷。已有研究表明,竹叶提取物的主要成分有黄酮类化

合物、苷类、活性多糖、特种氨基酸及其肽类、锰锌硒等多种微量元素,以及以醛醇为主的芳香成分等^[1],其中,类黄酮(flavonoids)是植物产生的一类天然有

基金项目:上海市科委工程中心建设项目(11DZ2280300)

Fund: Supported by Shanghai Science and Technology Engineering Center Project (11DZ2280300)

*通讯作者: 马晨晨, 硕士, 初级实验师, 主要研究方向为食品生物技术。E-mail: ccma@shou.edu.cn

*Corresponding author: MA Chen-Chen, Master, Laboratory Assistant, College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, No. 999, Hucheng Huan Road, Pudong District, Shanghai 201306, China. E-mail: ccma@shou.edu.cn

机化合物,广泛分布于植物根、茎和叶中,具抗菌、消炎、抗病毒、抗衰老等作用^[2]。因此,竹叶提取物在医疗保健、食品防腐保鲜等方面有较为广泛的用途。研究发现竹叶乙醇乙酸提取物对伤寒沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌和变形杆菌等都有广泛的抑制效果,而且抑菌效果随着作用时间延长以及使用提取物浓度的升高而增强,在低碱环境下和较高处理温度后能增强竹提取物的抑菌效果,但对霉菌和酵母的效果相对较差^[3-6]。

Chuyen 等^[7]对一种 Kumazasa 的竹叶进行了非常系统的研究,利用水、甲醇、二乙醚、丙酮和乙酸乙酯 5 种溶剂对竹叶进行提取,发现除了水提物抑菌效果较弱外,甲醇和丙酮提取物有较强抑菌效果,而二乙醚和乙酸乙酯提取物有很强抑菌活性;通过对粗提物碱性、酸性、中性和酚类等 4 个组分抑菌效果的对比研究,发现酸性和酚类组分抑菌效果很强;研究同时还发现酸性组分中起抑菌作用的不仅有游离酸类而且也有钠盐。另外日本已经用竹叶提取物作为主要成分,制成了具有抗菌作用的天然防腐剂,这种防腐剂对导致腐败的耐热菌具有很好的抗菌作用,能有效抑制细菌生长,对酵母和霉菌也有不错的效果,可广泛应用于鱼糜制品、肉类加工品、腌制品、米饭和面食等^[8]。

随着生活水平的提高,人们对“绿色食品”、“有机食品”的要求越来越高,从天然资源中寻找活性物质代替化学食品防腐剂和杀虫剂变得越来越迫切。我国竹资源丰富,但加工产品的原材料利用率低,加工过程中会产生大量剩余物,竹叶提取物的开发和利用,不仅有利于保护环境,提高食品的安全性,而且有利于竹资源的综合利用。因此,竹叶提取物有着广阔的应用开发前景。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用的竹叶(四季竹 *Oligostachyum Cubricum*) 采自浙江诸暨(竹龄 3 年,采集季节为夏季),使用前

保存于-20℃冰箱。

1.2 仪器和试剂

旋转蒸发仪(R250,上海申生科技有限公司),超声波微波萃取仪(XH-2008D,北京祥鹤科技发展有限公司),粉碎机(CLF-20C,浙江省温岭市创力药材器械厂),恒温水浴锅(H.H.S 21-4,上海医疗器械厂),电子天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司),酸度计(PH 计),高压灭菌锅(SYQ-DSX-208B,上海申安医疗器械厂),生化培养箱(SPX-150B-Z,上海博讯实业有限公司医疗设备厂)。

无水乙醇、60%乙醇、丙酮、冰醋酸、乙酸乙酯,均为分析纯,购于国药集团。LB 培养基、营养琼脂等,购于上海生工,实验室用水为蒸馏水。

大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas sputita*) ATCC 12633,来自上海海洋大学食品学院微生物实验室。

1.3 竹叶有效成分的提取

1.3.1 水浴浸提

将新鲜竹叶从-20℃冰箱取出,自然解冻 12 h,用流动自来水洗净泥土灰尘,置于 35℃烘箱烘干 12 h,取适量竹叶置于粉碎机粉碎,准备粉碎的竹叶 3 组,每组 20 g,分别置于 500 mL 的烧杯中^[9]。其中,A 组:加入 60 mL 无水乙醇、40 mL 冰醋酸;B 组:加入 100 mL 乙酸乙酯;C 组:加入 100 mL 丙酮。分别在 60℃水浴条件下浸提 16 h(使用玻璃棒搅动),使用滤纸滤出浸提液,滤液使用旋转蒸发仪设置温度 60℃减压蒸馏至 25 mL,调节 pH 至 6.0。3 组溶液不同溶剂配比及提取液浓度见表 1。

1.3.2 超声波微波萃取法

取新鲜竹叶,洗净,烘干,粉碎,共准备 3 组,每组 10 g。各加入 200 mL 65%乙醇,并调节 pH=6,超声波微波 500 w,60℃提取 30 min。提取液在 1500 r/min 条件下离心 2 min,收集上清液。首先将上清液

表 1 3 组溶液不同溶剂配比及浓度
Table 1 Different solvent ratios and concentrations in 3 groups

组别	竹叶(g)	无水乙醇(mL)	冰醋酸(mL)	丙酮(mL)	乙酸乙酯(mL)	最终浓度(mg/mL)
A	20	60	40	0	0	0.8
B	20	0	0	0	100	0.8
C	20	0	0	100	0	0.8

用旋转蒸发仪 65 °C 旋转蒸发 2 min(去除有机溶剂, 如乙醇、乙酸乙酯等), 然后调整到 90 °C 旋转蒸发适量水, 最后用蒸馏水定容至 10 mL, 放入冰箱保存备用。

1.4 标准菌株菌悬液及带菌平板制备

将两株菌纯菌株(大肠杆菌、金黄色葡萄球菌)分别接种于营养琼脂斜面活化培养 24 h, 将活化菌种接种于 LB 液体培养基培养得到菌悬液, 选择经 10 倍梯度稀释液, 取 1 mL 加入灭菌培养皿, 利用浇注法浇注此培养皿得到营养琼脂带菌平板, 经培养选择合适稀释度进行抑菌试验(选择要求在该浓度下, 细菌能长满整个培养基且分布均匀)。

1.5 抑菌实验方法

用无菌吸管吸取各自适宜浓度的菌悬液 1 mL 滴加在已灭菌的平板培养皿中, 将灭好菌的营养琼脂培养基用浇注法倾注于此培养皿内, 并使培养基与事先加入的菌悬液混匀, 待培养基凝固后用无菌镊子分别取事先浸泡的滤纸片平放于培养基表面, 经 37 °C, 24 h 培养, 培养后测量其抑菌圈直径, 比较抑菌效果。

2 结果与讨论

2.1 提取方法的比较

按方法 1.3.1 与方法 1.3.2 得到的 A、B、C 三种提取液抑菌效果见表 2。

表 2 中两种提取方法对比实验表明: 超声波微波萃取法与浸提法在提取时间上有很大的差别, 其中超声波微波萃取法所用时间为 30 min, 而普通浸提法所用时间为 16 h, 而超声波微波萃取法所得提取物对大肠杆菌和恶臭假单胞菌的抑菌效果较优于普通浸提法。

2.2 提取液的抑菌效果

由表 2 可以得出, 竹叶的无水乙醇+冰醋酸, 乙酸乙酯, 丙酮浸提液, 以及超声波微波萃取液均对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、恶臭假单胞菌表现出一定的抑菌效果。

贾桂云等^[10]的研究表明, 以冰醋酸+乙醇, 乙醇, 正己烷为提取介质得到对大肠杆菌的抑菌圈直径分别为 9.3、8.7、8.0 mm, 对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径分别为 103、93、7.0 mm, 对枯草芽孢杆菌抑菌圈直径分别为 9.0、8.3、7.7 mm, 对根霉的抑菌圈直径分别为 7.6、7.3、7.3 mm, 对曲霉没有抑菌效果。与本研究相比, 其冰醋酸提取液对大肠杆菌以及金黄色葡萄球菌的抑制效果略好, 但以正己烷为提取介质时, 抑菌效果不如冰醋酸+乙醇、丙酮以及乙酸乙酯。贾桂云等^[10]还研究了不同 pH 对抑菌效果的影响: ①冰醋酸+乙醇提取液对大肠杆菌的抑菌圈直径(mm)分别为: 9.3(pH=5)、8.7(pH=7)、7.3(pH=8); 对金黄色葡萄球菌抑菌圈直径(mm)分别为: 9.3(pH=5)、8.0(pH=7)、无(pH=8)。②乙醇提取液对大肠杆菌的抑菌圈直径(mm)分别为: 9.3(pH=5)、8.0(pH=7)、无(pH=8); 对金黄色葡萄球菌抑菌圈直径(mm)分别为: 7.7(pH=5)、7.3(pH=7)、7.0(pH=8)。可见, 在酸性条件下提取液的抑菌效果更为明显。所以, 本实验控制提取液 pH=6 是合适进行抑菌实验的。黄占旺等^[11]利用乙醇和乙酸从毛竹中提取抑菌物质, 并利用此提取液对蜡状芽孢杆菌、沙门氏菌、枯草杆菌、荧光假芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、啤酒酵母、孙逊酵母、产阮酵母进行了抑菌实验。结果表明: 竹叶提取液对沙门氏菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、腊状芽孢杆菌、枯草杆菌、荧光假芽孢杆菌有一定的抑菌效果, 对巨大芽孢杆菌、普通变形杆菌、啤酒酵母、汉逊氏酵母和产阮酵母菌几乎无抑菌效果。结合本研究结果以及贾桂云等研究

表 2 浸提法与超声波微波萃取法竹叶提取液的抑菌效果(n=3)

Table 2 Antibacterial activity of immersion method and ultrasonic microwave extract method (n=3)

试验菌种	抑菌直径(mm)							
	A 提取液		B 提取液		C 提取液		空白对照	
	方法 1	方法 2	方法 1	方法 2	方法 1	方法 2	方法 1	方法 2
大肠杆菌	8.4±0.1	9.4±0.2	9.6±0.1	8.5±0.2	6.8±0.2	9.8±0.3	0.0	0.0
金黄色葡萄球菌	9.2±0.2	8.7±0.1	9.2±0.3	8.6±0.1	7.4±0.1	7.2±0.1	0.0	0.0
恶臭假单胞菌	8.4±0.1	9.2±0.1	9.3±0.1	8.4±0.1	7.1±0.2	8.6±0.1	0.0	0.0

注: 方法 1 代表浸提法; 方法 2 代表超声波微波萃取法; 抑菌圈直径为 3 次重复实验的平均值

结果可以发现, 竹叶提取液对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌都有良好的抑菌效果, 但对真核微生物的抑制效果并不明显。

目前竹叶提取物的提取方法大多采用直接浸提的方法^[10,11], 这种方法浸提时间通常为 16 h, 本实验利用超声波微波辅助提取, 提取时间可缩短至 30 min, 其提取物的抑菌效果与普通浸提法比较也有较明显的优势, 因此利用超声波微波辅助提取可大大缩短提取的时间, 另外本文通过对比不同提取液条件下的不同的抑菌效果, 可以发现, 不同的溶剂配比对提取效果也有一定的差别, 实验表明: 乙酸乙酯优于乙醇+冰醋酸, 乙醇+冰醋酸优于丙酮。

3 总结与展望

竹叶提取物含有丰富的黄酮碳苷^[12]、多糖等成分, 具有良好的防腐抑菌和抗氧化等的生物学功能^[13], 同时具有安全、无毒、提取方法简单和抑菌性强的方面等突出的优势^[14], 另外, 其对食品的感官品质影响也较小^[15,16]。经过对竹叶有效成分不同的方法的提取, 以及抑菌试验, 研究发现利用超声波微波辅助提取可以较大的缩短提取时间, 而提取物的抑菌效果也有一定提高, 另外竹叶富含丰富的抑菌成分, 不同的提取溶剂对抑菌效果有不同程度的影响, 不同的方法也会对提取时间造成不同, 同时其抑菌效果也因微生物种类不同而不同。虽然目前对竹叶提取物的研究有了一定的进展, 但在其开发利用领域所见报道甚少。如今面临食品安全问题日益频发的现状, 寻找一种新的食品防腐添加剂显得尤为迫切。随着人们生活水平的提高, 安全健康消费意识不断增强, 防腐剂的使用要求将更为严格, 竹叶提取物作为天然食品防腐剂一定会受到广大消费者的欢迎, 竹叶提取物防腐剂的开发研究蕴藏着良好的市场前景。

参考文献

- [1] 郝培应, 徐有明, 皮忠来. 竹类植物衍生物的生理活性及其疗效的研究进展[J]. 世界林业研究, 2004, 17(3): 21-24.
Hao PY, Xu YM, Pi ZL. Advances in studying on physiological activity and curative effect of bamboo derivative [J]. World Forestry Res, 2004, 17(3): 21-24.
- [2] 李瑶, 齐晓丽, 孟祥颖, 等. 竹叶中黄酮提取纯化工艺研究[J]. 东北师大学报: 自然科学版, 2006, 38(1): 91-94.
Li Y, Qi XL, Meng XY, *et al.* Extraction and purification technique of flavones from bamboo leaves [J]. J Northeast Norm Univ (Nat Sci Ed), 2006, 38(1): 91-94.
- [3] 许钢, 张红. 竹叶、六月霜提取物抑菌作用比较研究[J]. 食品科技, 2001, 6: 38-39.
Xu G, Zhan H. A Comparison of the Antimicrobial Function of Both Extracts to Bacterium Between Bamboo Leaves and Artemisia Anomala S. Moore [J]. Food Sci Technol, 2001, 6: 38-39.
- [4] 张伟, 袁耀武, 檀建新. 竹叶防腐剂研究[J]. 食品科技, 2003, 7: 37-39.
Zhang W, Yuan YW, Tan JX, *et al.* Research of Preservative Extracted From Bamboo Leaves [J]. Food Sci Technol, 2003, 7: 37-39.
- [5] 张伟, 檀建新, 贾英民. 竹叶对食品致病菌的抑制作用[J]. 食品科学, 1998, 19(4): 37-39.
Zhang W, Tan JX, Jia MY. Inhibition effects of bamboo leaf on food pathogenic microbe [J]. Food Sci, 1998, 19(4): 37-39.
- [6] 黄文, 王益, 胡筱波, 等. 竹叶提取物抑菌特性的研究[J]. 林产化学与工业, 2002, 22(1): 68-70.
Huang W, Wang Y, Hu XB, *et al.* Study on antimicrobial characteristics of bamboo leaf extraction [J]. Chem Ind Forest Prod, 2002, 22(1): 68-70.
- [7] Chuyen NV, Kurata T, Kato H, *et al.* Antimicrobial Activity of Kumazasa (*Sasa albo-marginata*) [J]. Agric Biol Chem, 1982, 46(4): 971-978.
- [8] 龚金炎, 吴晓琴, 张英. 竹提取物抗菌杀虫性能的研究进展[J]. 竹子研究汇刊, 2006, 24(3): 28-31.
Gong JY, Wu XQ, Zhang Y. Current research progress on antibacterial and pesticidal function of bamboo extracts [J]. J Bamboo Res, 2006, 24(3): 28-31.
- [9] 黄锁义, 姚小敏, 覃成箭, 等. 竹叶中总黄酮的提取及鉴别[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(7): 1228-1229.
Huang SY, Yao XM, Tan CJ, *et al.* The extraction and determination of contents of the total flavanones of the leaves of *phyllostachys pubescens* [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2006, 17(7): 1228-1229.
- [10] 贾桂云, 邹润英, 郭飞燕. 竹叶提取物抑菌效果研究[J]. 海南师范大学学报(自然科学版), 2010, 32(4): 420-422.
Jia GY, Zou RY, Guo YF. Study on antimicrobial effects by extract of bamboo leaves [J]. J Hainan Norm Univ (Nat Sci), 2010, 32(4): 420-422.
- [11] 黄占旺, 邹双双, 熊小波. 毛竹叶提取物抑菌作用的初步研究[J]. 江西农业大学学报, 2005, 27(6): 960-963.
Huang ZW, Zou SS, Xiong XB. A Study on Antibacterial Properties of Bamboo Leaf Extracts from *Phyllostachys pubescens* [J]. Acta Agric Univ Jiangxi, 2005, 27(6): 960-963.
- [12] Zhang Y, IAO JJ, Liu CM, *et al.* Isolation and purification of

- four flavone C-glycosides from antioxidant of bamboo leaves by macroporus resin column chromatography and preparative high-performance liquid chromatography [J]. *Food Chem*, 2008, 107(1): 1326–1336.
- [13] 宋伸容, 江相兰, 李树伟, 等. 竹叶提取物的抗氧化活性研究 [J]. *化学研究与应用*, 2006, 8(1): 67–69 .
Sun SR, Jiang XL, Li SW, *et al.* Study on antioxidant activity of extracts of bamboo leaves [J]. *Chem Res Appl*, 2006, 8(1): 67–69..
- [14] Lu BY, Wu XQ. Toxicology and safety of antioxidant of bamboo leaves . Part 1: Acute and subchronic toxicity studies on antioxidant of bamboo leaves [J]. *Food Chem Toxicol*, 2005, 43(5): 78–792.
- [15] Zhang Y, Xu WZ, Wu XQ, *et al* . Addition of antioxidant from bamboo leaves as all efective way to reduce the formation of aerylamide in fried chicken wings [J]. *Food Addit Contam*, 2007, 24(3): 242–251.
- [16] Zhang Yu, Chen J, Zhang XL, *et al* . Addition of Antioxidant of Bamboo Leaves (AOB)Efectively Reduces Acrylamide Formation in Potato Crisps and French Fries [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55:523–528.

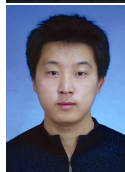
(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



袁国强, 本科, 讲师, 主要研究方向为食品科学。

E-mail: gyyuan@shou.edu.cn



马晨晨, 硕士, 初级实验师, 主要研究方向为食品生物技术。

E-mail: ccma@shou.edu.cn