

网络出版时间:2015-10-13 08:46

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2015.11.020

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20151013.0846.040.html

竹纤维提取物体外抗菌活性及 提取方法的研究

阮祥春,黄媛媛,赵德学,曾明华

(安徽农业大学 动物科技学院,安徽 合肥 230036)

[摘要] 【目的】研究并明确毛竹纤维提取物的体外抗菌活性及其最佳提取方法。【方法】将毛竹纤维粉碎成粉末后,分别用水、乙醇、乙酸乙酯作为提取溶剂,按照 1:5 和 1:10 料液比($m:V$)分别提取 1,2,4 h,采用琼脂扩散法观察比较不同提取物对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的抑菌作用,用倍比稀释法测定采用最佳提取方法得到的毛竹纤维提取物的最小抑菌质量浓度(MIC)和最低有效质量浓度(MBC)。【结果】毛竹纤维水提取物对 3 种细菌几乎无抑制作用;乙醇提取物仅对金黄色葡萄球菌有抑制作用,对其他 2 种细菌无明显抑制作用;乙酸乙酯提取物对 3 种细菌均有较强抑制作用。由此确定竹纤维提取物的最佳提取方法为:用乙酸乙酯作为提取溶剂,料液比($m:V$)为 1:5,提取时间为 4 h,在此条件下得到的毛竹纤维乙酸乙酯提取物对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的最小抑菌质量浓度分别为 0.125,0.125,0.062 5 mg/mL;最低有效质量浓度分别为 0.500,0.500,0.125 mg/mL。【结论】毛竹纤维在料液比为 1:5 时提取 4 h 的乙酸乙酯提取物的抑菌活性最强。

[关键词] 竹纤维;提取方法;抗菌活性;琼脂扩散法

[中图分类号] S795.08;S482.2⁺92

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2015)11-0134-05

Extraction methods and *in vitro* antibacterial activity of bamboo (*Phyllostachys pubescens*) fiber extracts

RUAN Xiang-chun, HUANG Yuan-yuan, ZHAO De-xue, ZENG Ming-hua

(College of Animal Sciences and Technology, Anhui Agricultural University, Anhui, Hefei 230036, China)

Abstract: 【Objective】The *in vitro* antibacterial activity of extracts from bamboo (*Phyllostachys pubescens*) fiber was investigated and the extract methods were optimized. 【Method】Bamboo fiber was powdered before being extracted with agents of water, ethanol and ethyl acetate, solid-liquid ratios of 1:5 and 1:10($m:V$), and extraction times of 1 h, 2 h and 4 h, respectively. The agar diffusion method was used to estimate the inhibition of extracts against *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*). The double tube dilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) at the obtained optimal conditions. 【Result】The water extract of bamboo fiber had little inhibition effect on three bacteria, the ethanol extract only had inhibition effect on *Staphylococcus aureus*, while the ethyl acetate extract had strong antibacterial activity against all 3 tested bacteria. The optimal extract method was using ethyl acetate with solid-liquid ratio of 1:5 for 4 h. Under optimal conditions, the MIC of bamboo fiber extract against *Esche-*

[收稿日期] 2014-03-26

[基金项目] 安徽省高校自然科学基金项目“毛竹废弃物提取方法的研究”(2010)

[作者简介] 阮祥春(1980—),男,安徽无为,人,实验师,在职博士,主要从事饲料添加剂、动物源性食品安全研究。

E-mail: rxc@ahau.edu.cn

[通信作者] 曾明华(1956—),男,安徽金寨人,副教授,主要从事动物源性食品安全研究。E-mail: zhmzhm@ahau.edu.cn

richia coli (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and *Bacillus subtilis* were 0.125, 0.125, and 0.062 5 mg/mL, and the MBC were 0.500, 0.500, and 0.125 mg/mL, respectively. 【Conclusion】 The ethyl acetate extract of bamboo fiber with solid-liquid ratio of 1 : 5 for 4 h had the strongest inhibition effect against tested bacteria.

Key words: bamboo fiber; extract method; antibacterial activity; double tube dilution method

毛竹广泛分布在世界温带与亚热带地区。近期研究发现,竹的提取物含有很多生物活性物质,如竹叶黄酮、多糖和氨基酸等^[1],具有抗菌活性、抗氧化性和抗炎症等作用。

据 Tanaka 等^[2]报道,竹笋皮的二氯甲烷提取物对金黄色葡萄球菌具有抗菌活性。Chen 等^[3]发现,用含 0.3 g/kg 竹粉末提取物的饲料喂鸡 1 周后,其体质量较对照组明显增加,且在冷应激情况下具有防止鸡体质量降低的作用。Wang 等^[4]报道,将竹醋添加到仔猪日粮中,可以影响肠道的菌群改变,具有同添加抗生素类似的效果,有利于仔猪生长。贾若愚等^[5]发现,在中国荷斯坦奶牛日粮中添加适量的竹提取物后,可以有效提高奶牛产奶量,改善乳品质,优化奶牛体内的物质代谢。因此,根据竹提取物具有抗菌活性和抗炎症作用,可以将其用于开发鸡、猪、牛等饲料的添加剂。

关于竹提取物的活性研究已经较多的报道,主要集中在水、醇和有机溶剂提取方面^[6-7]。随着制造技术的发展,也出现了更为先进的提取技术,如超临界 CO₂ 萃取法、超声波提取和微波提取^[8-9]等,但是这些技术目前还不能大规模应用于生产,且生产成本较高。另外,在采用不同提取方法时,提取物的生物活性种类、含量都有很大差别,即使采用相同的微波技术提取竹叶,溶剂的不同提取出的竹叶活性成分也有差异^[10]。

本研究分析了竹纤维水、乙醇和乙酸乙酯提取物对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的抑制作用,以期探索毛竹纤维提取物的抗菌活性并筛选简便易行的最佳提取方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料及菌种 毛竹纤维,收集于安徽安庆竹加工企业的毛竹纤维废料;金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, 简写 *S. aureus*, 编号 CMCC 26003)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*, 简写 *B. subtilis*, 编号 CMCC 63501)、大肠埃希菌 (*Escherichia coli*, 简写 *E. coli*, 编号 CMCC 44102), 均由

安徽省兽药饲料监察所赠送。

1.1.2 仪器 数显式恒温水浴锅,国华电器有限公司生产;循环水式真空泵,河南太康科教仪器厂生产;旋转蒸发仪,上海市亚荣实验仪器厂生产。

1.1.3 试剂 MH 琼脂培养基、MH 肉汤培养基,均购于北京奥博星生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 毛竹纤维的提取 将毛竹纤维废料干燥后,粉碎成粉末。取 100 g 毛竹纤维粉末分别浸泡在含 5 倍和 10 倍体积(即料液比(m/V)为 1 : 5 和 1 : 10)的水、乙醇、乙酸乙酯的圆底烧瓶中 1 h。以水为提取溶剂时,加热煮沸提取 1, 2, 4 h, 以乙醇、乙酸乙酯分别为提取溶剂时,加热回流提取 1, 2, 4 h。将所获得的提取液分别用定性滤纸进行抽滤过滤,然后用旋转蒸发仪浓缩至相当于含生药质量浓度为 1 mg/mL, 于 4 ℃ 保存备用。

1.2.2 菌液制备及抑菌圈的测定 将大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌 3 种细菌接种到配制好后的肉汤培养基中,培养 12~16 h, 然后稀释到 5×10^7 mL⁻¹。

将 100 μ L 的菌液加到配制好后的琼脂固体培养基表面,用玻棒涂匀,放置牛津杯,往牛津杯中加入各提取物,培养 18~24 h, 观察并记录各抑菌圈的直径,比较筛选最佳的提取方法。

1.2.3 最佳提取方法下毛竹纤维提取物最低抑菌质量浓度(MIC)的测定 采用倍比稀释法测定 MIC。取 3 组试管,每组 13 个。第 1 组试管均加入 2 mL 灭菌的肉汤培养基,先将 2 mL 1 mg/mL 的竹纤维提取液加入到 1 号试管中,然后从 1 号试管中吸取 2 mL 加入到含有 2 mL 肉汤的 2 号试管中,以此类推,一直到 11 号试管;然后在 1~12 号试管中分别接种大肠埃希菌菌液 20 μ L, 13 号试管不接种菌液,将 12, 13 号试管作为对照。第 2, 3 组试管按同样方法分别接种金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌菌液。然后将各试管均于 37 ℃ 培养 18~24 h。与对照组相比,有絮状沉淀的试管为有细菌生长,无絮状沉淀的试管表明细菌生长受到抑制,肉眼观察的无絮状沉淀试管的最低药物质量浓度,即为最佳提

取方法下毛竹纤维提取物对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的最低抑菌质量浓度(MIC)。

1.2.4 最佳提取方法下毛竹纤维提取物最低有效质量浓度(MBC)的测定 测定 MIC 后,再依次从未见细菌生长的各试管培养物中取一接种环菌液,接种于普通琼脂平板上,37 ℃培养 24 h,观察有无细菌生长。在普通琼脂平板中,生长菌落数小于 5 个时对应的药液最低质量浓度,即为最低杀菌浓度(MBC)。

表 1 毛竹纤维水提取物对 3 种细菌的抑菌作用

Table 1 Inhibition effect of bamboo fiber water extracts against three bacteria($\bar{X}\pm SD,n=6$)

料液比($m:V$) Solid-liquid ratio	提取时间/h Time	抑菌圈直径/mm Diameters of inhibition zone		
		大肠埃希菌 <i>E. coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>
1:5	1	2.82±0.33 ac	3.01±0.73 ac	3.16±0.59 ac
	2	3.08±0.32 ac	3.13±0.68 ac	2.81±0.63 ac
	4	2.84±0.25 ac	3.04±0.52 ac	3.02±0.31 ac
1:10	1	2.98±0.25 ac	3.34±0.48 ac	2.11±0.19 ac
	2	2.85±0.50 ac	3.30±0.25 ac	2.99±0.64 ac
	4	3.15±1.00 ac	3.38±0.40 ac	3.33±0.82 ac

注:同行数据后标不同小写字母者表示差异显著($P<0.05$),标不同大写字母者表示差异极显著($P<0.01$)。表 2,3 同。
Note: Different lowercase letters mean significantly difference ($P<0.05$), and different capital letters mean extremely significant difference ($P<0.01$). The same for table 2,3.

2.2 毛竹纤维乙醇提取物对 3 种细菌的抑菌作用

表 2 显示,在相同料液比和提取时间下,毛竹纤维乙醇提取物对金黄色葡萄球菌具有极显著的抑菌作用($P<0.01$),而对大肠埃希菌和枯草芽孢杆菌

1.2.5 数据的处理 试验数据用 SPSS 13.0 进行处理与分析。

2 结果与分析

2.1 毛竹纤维水提取物对 3 种细菌的抑菌作用

表 1 显示,以水为提取溶剂时,在相同料液比和浸泡提取时间下,所得毛竹纤维水提取物对 3 种细菌的抑菌作用差异不明显;在不同料液比和提取时间下提取的毛竹纤维水提取物对同一种细菌的抑菌作用差异也不显著($P>0.05$)。

均无明显抑菌作用。对同一种细菌而言,不同的料液比和提取时间的毛竹纤维乙醇提取物之间抑菌作用差异不显著($P>0.05$)。

表 2 毛竹纤维乙醇提取物对 3 种细菌的抑菌作用

Table 2 Inhibition effect of bamboo fiber ethanol extracts against three bacteria($\bar{X}\pm SD,n=6$)

料液比($m:V$) Solid-liquid ratio	提取时间/h Time	抑菌圈直径/mm Diameters of inhibition zone		
		大肠埃希菌 <i>E. coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>
1:5	1	5.29±0.49 cB	11.58±0.77 cA	3.64±1.00 cB
	2	5.12±0.66 cB	11.51±1.26 cA	3.82±1.20 cB
	4	5.10±0.17 cB	12.76±0.47 cA	3.50±1.14 cB
1:10	1	5.22±0.35 cB	11.39±0.59 cA	2.88±0.82 cB
	2	5.64±0.79 cB	10.83±1.00 cA	4.16±0.91 cB
	4	5.76±0.78 cB	12.02±1.05 cA	3.96±1.27 cB

2.3 毛竹纤维乙酸乙酯提取物对 3 种细菌的抑菌作用

表 3 显示,毛竹纤维乙酸乙酯提取物对 3 种细菌都有较强的抑制作用。对大肠埃希菌而言,在 1:5 料液比下,不同提取时间得到的提取物的抑菌作用无明显差异($P>0.05$);在 1:10 料液比下,提取 4 h 得到的提取物对大肠埃希菌的抑菌活性极显著增强($P<0.01$)。对金黄色葡萄球菌而言,1:5 和 1:10 的料液比条件下,提取 2 h 得到的提取物

与 1,4 h 得到的提取物的抑菌活性有显著差异($P<0.05$)。对枯草芽孢杆菌而言,在 1:5 料液比下,提取 4 h 的提取物与提取 1,2 h 的提取物的抑菌活性有极显著差异($P<0.01$);在 1:10 料液比下,提取 2 h 得到的提取物与 1,4 h 提取物有显著差异($P<0.05$)。总体而言,当料液比为 1:5 或者 1:10、提取时间为 4 h 时,毛竹纤维乙酸乙酯提取物的抑菌活性最高。从实际生产考虑,料液比以 1:5 为宜,不仅能节省提取溶剂使用量,还可减少能源的损耗。

由以上研究结果可知,在相同料液比和提取时间下,毛竹纤维乙酸乙酯提取物对供试 3 种细菌的抑制作用明显高于水和乙醇提取物,可知乙酸乙酯

是毛竹纤维的最佳提取溶剂,用其提取时的最佳料液比为 1 : 5,提取时间为 4 h。

表 3 毛竹纤维乙酸乙酯提取物对 3 种细菌的抑菌作用

Table 3 Inhibition effect of bamboo fiber ethyl acetate extracts against three bacteria($\bar{X}\pm SD,n=6$)

料液比(<i>m</i> : <i>V</i>) Solid-liquid ratio	提取时间/h Time	抑菌圈直径/mm Diameters of inhibition zone		
		大肠埃希菌 <i>E. coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>
1 : 5	1	16. 56±1. 07 CA	14. 44±1. 96 cB	13. 97±0. 84 DB
	2	15. 07±0. 93 CA	11. 07±1. 17 dB	14. 88±1. 37 DA
	4	15. 65±0. 47 CB	13. 58±0. 89 cB	17. 95±0. 87 CA
1 : 10	1	15. 45±2. 06 CA	13. 09±0. 60 cB	16. 60±0. 66 cA
	2	14. 75±1. 19 CA	11. 18±2. 41 dB	13. 91±1. 38 dA
	4	17. 72±1. 78 DA	12. 84±0. 31 cB	16. 53±0. 77 cA

2. 4 毛竹纤维乙酸乙酯提取物的 MIC,MBC 测定

鉴于料液比为 1 : 5、提取时间为 4 h 时,毛竹纤维乙酸乙酯提取物对 3 种细菌具有较强的抑制作用,故测定其对 3 种细菌的 MIC、MBC。测定结果(表 4)显示,其对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的 MIC 和 MBC 分别为 0. 125,0. 125,0. 062 5 mg/mL 和 0. 500,0. 500,0. 125 mg/mL。

表 4 毛竹纤维乙酸乙酯提取物对 3 种细菌的 MIC 和 MBC 值

Table 4 MIC and MBC values of bamboo fiber ethyl acetate extracts against three bacteria mg/mL

细菌种类 Bacterial species	MIC	MBC
大肠埃希菌 <i>E. coli</i>	0. 125	0. 500
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	0. 125	0. 500
枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	0. 062 5	0. 125

3 讨 论

竹提取物中含有多种活性物质,具有抗氧化性、抗细菌、抗真菌及抗植物害虫等多方面的作用^[11]。操海群等^[12-13]报道,毛金竹、白纹短穗竹、苦竹、巨县苦竹乙醚提取物对萝卜蚜具有拒食活性和触杀作用,同时竹提取物可以激活棉铃虫中肠蛋白酶和淀粉酶的活性,降低羧酸酯酶的活性从而抑制棉铃虫幼虫的发育。据报道,*Sasa borealis* 竹的水提取物中可能含有治疗或抑制糖尿病的肺泡表皮功能障碍及其相关并发症的成分^[14]。同时,竹衍生热裂解产物对 N-甲基天冬氨酸诱导的皮质神经元初级培养物的细胞死亡具有保护和抗纤溶酶作用^[15]。

本试验结果表明,采用不同溶剂提取的毛竹纤维提取物对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌 3 种细菌具有不同的抗菌活性:毛竹纤维的水提取物对 3 种细菌几乎无抑菌作用;乙醇提取物只

对金黄色葡萄球菌有抑菌作用,而对大肠埃希菌和枯草芽孢杆菌无明显抑菌活性;乙酸乙酯提取物对 3 种细菌都有较强的抑制作用。这与陈杰等^[16]报道的结果相一致。

本研究中,当提取溶剂为乙酸乙酯、料液比为 1 : 5、提取时间为 4 h 时,提取得到的竹纤维提取物对 3 种细菌具有较强的抗菌活性,故确定其为毛竹纤维的最佳提取方法,该方法简便、易操作,而且乙酸乙酯可以回收,能进行反复利用,可节约大量的提取溶剂成本,这为将毛竹纤维及相似的固体毛竹废物开发成天然饲料添加剂奠定了理论基础。

[参考文献]

[1] 岳永德,操海群,汤 锋. 竹提取物的化学成分及其利用研究进展 [J]. 安徽农业大学学报,2007,34(3):328-333.
Yue Y D,Cao H Q,Tang F. Advance in bamboo chemical ingredients and its utilizations [J]. Journal of Anhui Agricultural University,2007,34(3):328-333. (in Chinese)
[2] Tanaka A,Kim H J,Oda S,et al. Antibacterial activity of moso bamboo shoot skin (*Phyllostachys pubescens*) against *Staphylococcus aureus* [J]. J Wood Science,2011,57:542-544.
[3] Chen X Y,Jiang R S,Li X D,et al. Effect of bamboo (*Phyllostachys pubescens*) extract on broiler chickens under cold stress [J]. South African Journal of Animal Science,2011,41:57-62.
[4] Wang H F,Wang J L,Wang C,et al. Effect of bamboo vinegar as an antibiotic alternative on growth performance and fecal bacterial communities of weaned piglets [J]. Livestock Science,2012,144:173-180.
[5] 贾若愚,刘洪瑜,汪家玲,等. 竹提取物对奶牛产奶性能及血液指标的影响 [J]. 中国牛业科学,2010,36(6):27-31,80.
Jia R Y,Liu H Y,Wang J L,et al. Effects of dietary biotin supplement on performance and blood parameters in lactating cows [J]. China Cattle Science,2010,36(6):27-31,80. (in Chinese)
[6] 刘铁秋,孙雪丹,卢发瑞,等. 石菖蒲提取物的抑菌效果及其提

取工艺的优化 [J]. 中国生物制品学杂志, 2014, 27(1): 89-94.

Liu T Q, Sun X D, Lu F R, et al. Inhibitory effect on *Botrytis cinerea* and optimization of extraction procedure of antifungal substances from rhizome *Acorus tatarinowii* [J]. Chian Journal of Biologicals, 2014, 27(1): 89-94. (in Chinese)

[7] 郭磊, 罗元军, 胡仕, 等. 龙竹竹叶多糖的提取及体外抗氧化研究 [J]. 食品科技, 2013, 38(2): 177-182.

Guo L, Luo Y J, Hu S, et al. Extraction and antioxidative in vitro of polysaccharide from *Dendrocalamus giganteus* leaves [J]. Food Science and Technology, 2013, 38(2): 177-182. (in Chinese)

[8] 任美玲, 吕兆林, 欧阳屹林, 等. 气相色谱柱前衍生化测定竹叶多糖超临界 CO₂ 提取物 [J]. 食品科学, 2012, 33(6): 215-219.

Ren M L, Lu Z L, Ouyang Y L, et al. Supercritical CO₂ fluid extraction and pre-column derivatization GC analysis of polysaccharides bamboo leaf polysaccharides in a static-dynamic mode [J]. Food Science, 2012, 33(6): 215-219. (in Chinese)

[9] 马华林, 李云飞, 陈俊, 等. 益智油的微波提取及其抗氧化作用研究 [J]. 食品科技, 2014, 39(2): 198-201.

Ma H L, Li Y F, Chen J, et al. Extracting and the antioxidant effect of microwave extraction of alpiniae oxyphyllae miq oil [J]. Food Science and Technology, 2014, 39(2): 198-201. (in Chinese)

[10] 夏玉红, 董晋文, 钟耕. 竹叶提取物的研究开发现状 [J]. 中国食品添加剂, 2009(2): 77-81.

Xia Y H, Dong J W, Zhong G. The development status of bamboo leaf extract [J]. China Food Additives, 2009(2): 77-81. (in Chinese)

[11] 贾洪锋, 陈云川, 孙俊秀, 等. 竹叶提取物的生理活性及其在食品中的应用 [J]. 食品与发酵科技, 2010, 46(4): 25-28.

Jia H F, Chen Y C, Sun J X, et al. Physiological activities and applications of bamboo leaves extracts [J]. Food and Fermentation Technology, 2010, 46(4): 25-28. (in Chinese)

[12] 操海群, 岳永德, 彭镇华, 等. 竹提取物对蚜虫生物活性的研究 [J]. 植物保护, 2003, 29(2): 33-36.

Cao H Q, Yue Y D, Peng Z H, et al. Bioactivities of extracts from bamboo to *Lipaphis erysimi* [J]. Plant Protection, 2003, 29(2): 33-36. (in Chinese)

[13] 操海群, 岳永德, 彭镇华, 等. 竹提取物对棉铃虫幼虫体内几种酶系活性的影响 [J]. 林业科学, 2006, 42(7): 145-148.

Cao H Q, Yue Y D, Peng Z H, et al. Effects of bamboo extracts on the activities of several enzymes in *Helicoverpa armigera* Larvae [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2006, 42(7): 145-148. (in Chinese)

[14] Choi Y J, Lim H S, Choi J S, et al. Blockade of chronic high glucose-induced endothelial apoptosis by *Sasa borealis* bamboo extract [J]. Experimental Biology and Medicine, 2008, 233: 580-591.

[15] Hong E J, Jung E M, Lee G S, et al. Protective effects of the pyrolyzates derived from bamboo against neuronal damage and hematoaggregation [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2010, 128: 594-599.

[16] 陈杰, 黄春年, 姜润深, 等. 竹加工废弃物提取物体外抑菌效果比较 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(30): 16956-16957.

Chen J, Huang C N, Jiang R S, et al. Comparison of bacteriostasis *in vitro* on bamboo processing wastes extract [J]. Journal of Anhui agricultural Sciences, 2010, 38(30): 16956-16957. (in Chinese)