

箬叶抑菌提取物提取工艺优化及抑菌活性

Optimization on extraction technology of bacteriostatic extract from *Indocalamus* leaves and its bacteriostatic test

刘立萍 徐 鹏 雷小红 王 宁 杨 兵

LIU Li-ping XU Peng LEI Xiao-hong WANG Ning YANG Bing

(怀化市检验检测中心, 湖南 怀化 418000)

(Huaihua Inspection & Testing Center, Huaihua, Hunan 418000, China)

摘要:目的:优化箬叶抑菌提取物的提取工艺。方法:分别用水、乙酸乙酯、盐酸水溶液(pH 4)、乙酸水溶液(pH 4)、氨水溶液(pH 10)和不同体积分数乙醇为提取溶剂,采取超声辅助法、回流法和浸提法,制备箬叶不同提取物;以枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、痢疾志贺氏菌和伤寒沙门氏菌为指示菌,总抑菌圈为考察指标,开展抑菌试验,分析抑菌效果,找到最佳提取溶剂和提取方法;以水作提取溶剂,采用超声提取方法,选择液固比、超声时间和超声次数 3 个因素 3 个水平进行正交试验,确定最佳提取工艺参数,同时参照对照品标准系列考察优化条件下的提取物的抑菌效果。结果:水是最佳提取溶剂,超声辅助法是最佳提取方法,最好的工艺参数为:液固比 16:1 (mL/g),超声 4 次,超声时间 55 min;最佳提取物对枯草芽孢杆菌和伤寒沙门氏菌的抑菌作用分别相当于 0.01、0.03 mg/mL 庆大霉素标准品的效果;对铜绿假单胞菌和痢疾志贺氏菌的抑菌效果均大于 0.05 mg/mL 庆大霉素标准品的效果。结论:箬叶抑菌提取物最好的提取方法是水超声法;箬叶的水提取物对枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、痢疾志贺氏菌和伤寒沙门氏菌的抑菌效果显著。

关键词: 箬叶;提取物;抑菌效果;超声辅助法

Abstract: Objective: To study and optimize the extraction technology of bacteriostatic extract from *Indocalamus* leaves. **Methods:** The extracts were drawn from *Indocalamus* leaves by ultrasound-assisted, refluxing and immersing method with extraction solvents: water, ethyl acetate, pH 4 of hydrochloric acid solution, pH 4 of acetic acid solution, pH 10 of ammonia solution and different volume ratio ethyl alcohol. The tests were carried out to analyze the antimicrobial effects with indicator bacteria

Bacillus subtilis, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella Dysenteriae* and *Salmonella typhi* and the total bacteriostatic circle was as inspection indicator, to find out the best extraction solvent and the best extraction method. Using water as extraction solvent, ultrasonic extraction method as method, an orthogonal test $L_9(3^3)$ was carried out by adjusting three impact factors. The impact factors were liquid-solid ratio, sonication period and sonication frequency. The orthogonal test found the optimal extraction process parameters and obtained the best extract. At the same time, the antimicrobial effect of the extract obtained under the optimized conditions was investigated according to the standard series of reference substances. **Results:** The results showed that water was the best solvent, and ultrasound-assisted method was the best method. The best extraction process parameters were as follows: the ratio of liquid to solid was 16:1 (mL/g), ultrasonic frequency was 4 times, ultrasonic period was 55 minutes. The inhibitory effect of the best extract on *Bacillus Subtilis* and *Salmonella Typhi* was equivalent to the effect of 0.01 and 0.03 mg/mL gentamicin, respectively. The bacteriostatic effects on *Pseudomonas Aeruginosa* and *Shigella Dysenteriae* were greater than that of 0.05 mg/mL gentamicin. **Conclusion:** The water ultrasonic method is an effective method for extracting antibacterial substances from *Indocalamus* leaves, and the inhibitive effect of the extract on *Bacillus Subtilis*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Shigella Dysenteriae* and *Salmonella Typhi* is remarkable.

Keywords: *Indocalamus* leaves; extracts; antimicrobial effect; ultrasound-assisted method

基金项目:湖南省市场监督管理局科技计划项目(编号:2021KJJH33)

作者简介:刘立萍(1966—),女,怀化市检验检测中心高级工程师。E-mail: 408306213@qq.com

收稿日期:2022-04-07 **改回日期:**2022-09-05

箬叶是箬竹植物的叶。中国箬竹约有 20 种以上,主要分布在长江以南地区^[1],其中阔叶箬竹分布最广,民间使用也最广泛^[2]。研究^[3-4]表明,箬叶具有一定的防腐抑菌功效,是很好的植物源天然防腐抑菌剂来源。

截至目前,国内外对箬叶的研究主要关注其营养物

质和元素含量^[5-7],以及挥发油^[8]、总黄酮^[9-11]、多糖^[12]等活性物质的提取、分离与测试,其提取物中黄酮类、多糖、生物碱等均具有较好的抑菌杀菌作用^[9]。李俊超等^[13]研究发现箬竹叶的提取物对烟草病原真菌链格孢菌和烟草疫霉菌菌丝生长均具有抑制效果。孙克奎^[12]研究发现,箬叶多糖对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌有很强的抑制效果,对地衣芽孢杆菌也有较明显的抑制效果。乐薇等^[14]和吉瑞冬等^[15]研究箬叶总黄酮提取和对细菌(金黄色葡萄球菌、大肠杆菌)、真菌(白色念珠菌、酿酒酵母菌、青霉菌)的抑菌作用,发现箬叶总黄酮对细菌的抑制效果大于对真菌的抑制效果;并且不同提取方法对箬叶总黄酮的抑菌效果有影响,超声波法比较适合于箬叶总黄酮的提取。何舟等^[16]研究了箬叶水提取物和乙醇提取物对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌抑菌活性的影响,发现水提取物比乙醇提取物的抑菌作用强。邓龙兴等^[17]用菌丝生长速率法比较研究了箬竹叶粗提物及其萃取相对深绿木霉和烟草链格孢菌生长率的影响,发现正丁醇相对深绿木霉的抗菌活性最高,乙酸乙酯相对烟草链格孢菌的抗菌活性最高。Sun 等^[18-19]用 95%乙醇对箬叶抗菌成分进行提取和分离,发现有两种竹叶提取物具有良好的清除自由基、抗氧化、抗菌、抗病毒、增强免疫力等生物功效;同时也对分离得到的化合物进行了体外抗菌活性试验,发现芹菜素 6-C- α -L-阿拉伯吡喃糖基-8-C- β -D-吡喃葡萄糖苷(5)和芹菜素 7-O,8-C-二吡喃葡萄糖苷(6)对 4 株细菌(金黄色葡萄球菌、苏云金芽孢杆菌、大肠杆菌和青枯假单胞菌)均有抑菌活性。这些研究对箬叶提取物抑菌活性和提取方法都比较局限,抑菌试验方法均为滤纸片法,指示菌未涵盖铜绿假单胞菌、痢疾志贺氏菌和伤寒沙门氏菌。研究拟以常见致病菌(痢疾志贺氏菌和沙门氏菌)和腐败菌(枯草杆菌和铜绿假单胞菌)为试验菌,选择阔叶箬竹叶为试验材料,研究提取物的抑菌效果,探明箬叶中抑菌成分最佳提取工艺。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

阔叶箬竹的叶:2021 年 4 月 15 日采自怀化市洪江区;枯草芽孢杆菌 [*Bacillus subtilis*, CMCC(B)63501]、铜绿假单胞菌 [*Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula, ATCC9027-1]、痢疾志贺氏菌 [*Shigella dysenteriae*, CMCC(B)51252] 和伤寒沙门氏菌 [*S.typhi*, CMCC(B)50071]:-80℃ 保存,中国医学细菌保藏管理中心;

抗生素检定培养基 II 号(高):青岛高科技工业园海博生物技术有限公司;

庆大霉素国家药品标准物质:批号 130326-201716,中国食品药品检定研究院;

乙醇:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

盐酸、氨水:优级纯,国药集团化学试剂有限公司;

冰醋酸:分析纯,天津科密欧化学试剂有限公司;

乙酸乙酯:色谱纯,天津化学试剂研究所。

1.2 主要仪器与设备

中药材高速粉碎机:FD-15-T250A 型,上海市闵行区舰艇工贸有限公司;

旋转蒸发器:RE-52AA 型,上海雅荣生化仪器设备有限公司;

立式灭菌器:LMQ.C-80E 型,山东新华医疗器械股份有限公司;

II 级 A2 生物安全柜:1374 型,赛默飞世尔(苏州)仪器有限公司;

超低温冰箱:DW-HL388 型,中科美菱低温科技股份有限公司;

生化培养箱:SPX-150 型,上海金慧科电子有限公司;

超声清洗机:9960B 型,天津科贝尔光电技术有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 对照品标准系列制备 按文献^[20]的方法配制 0.01,0.02,0.03,0.04,0.05 mg/mL 标准系列溶液,用于抑菌试验参比。

1.3.2 试验菌种复壮和菌悬液制备 按文献^[20]的方法复壮试验菌,制备约 1×10^7 CFU/mL 的菌悬液用于抑菌试验。

1.3.3 试验菌平板的制作 在试验中,微生物平板表层均匀平铺了试验菌的称为试验菌平板,平板表层为菌层培养基,下层为底层培养基。

取抗生素检定培养基 II 号(高 pH)100 mL 于 200 mL 无菌广口瓶,置于 (46 ± 1) ℃ 水浴,依次接入 1 mL 菌悬液,混匀,趁热取 5 mL,迅速平铺到底层培养基平板,冷却凝固,即得 4 种不同试验菌平板,供提取物抑菌试验使用。

1.3.4 箬叶处理 鲜叶洗净,50~55℃ 烘干,粉碎,过 42 目筛,密封。

1.3.5 提取物制备

(1) 不同溶剂提取物:分别称取 9 份箬叶粉末 10 g 于 250 mL 三角瓶中,依次加入 100 mL 水、乙酸乙酯、盐酸溶液(pH 4)、乙酸水溶液(pH 4)、氨水溶液(pH 10)、30%(体积分数)乙醇、60%(体积分数)乙醇、80%(体积分数)乙醇和 95%(体积分数)乙醇 9 种提取溶剂,浸泡 24 h,再超声 2 次,超声条件为温度 45℃,时间 30 min,2 次提取液合并,然后旋转蒸发(水浴 50℃),减压浓缩至 10 mL,每毫升提取液相当于 1 g 干样。

(2) 不同方法提取物:选择水、60%(体积分数)乙醇、盐酸水溶液(pH 4)、氨水溶液(pH 10)4 种代表性提取溶剂,称取 12 份箬叶粉末,每份 10 g,分成 4 组,每种溶剂按

液固比 10 : 1 (mL/g), 分别用超声辅助法 (40 kHz, 400 W, 45 °C, 30 min)、回流法 (60%乙醇回流温度 80 °C, 其他 100 °C) 和浸提法 (室温, 24 h) 3 种方法进行提取, 提取 2 次, 合并滤液, 旋转蒸发 (水浴 50 °C), 减压浓缩至 10 mL。

1.3.6 抑菌试验 以枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、痢疾志贺氏菌和伤寒沙门氏菌 4 种试验菌为指示菌, 总抑菌圈大小为评价指标, 庆大霉素标准系列为对照, 参照文献 [21], 用牛津杯法开展抑菌试验。按 1.3.3 方法制备试验菌平板, 在平板中均匀放置 4 个无菌牛津杯, 在牛津杯中 加入 0.280 mL 试液, 试液不得溢出, 做两平行, 同时做空白试验, 36.5 °C 培养 15~16 h, 测定抑菌圈直径, 评价抑菌效果。

1.3.7 单因素试验 用水作提取溶剂, 选择超声条件为频率 40 kHz、功率 400 W、温度 45 °C 下, 单因素为液固比、超声次数和超声时间。固定超声时间和超声次数, 研究液固比对提取物抑菌效果的影响; 固定液固比和超声

次数, 研究料超声时间对提取物抑菌效果的影响; 固定液固比和超声时间, 研究超声次数对提取物抑菌效果的影响。试验重复 2 次。

1.3.8 最佳提取工艺参数选择试验 通过单因素试验结果分析, 选择 3 个合适的因素水平, 按 $L_9(3^3)$ 正交试验, 提取箬叶抑菌提取物, 制成含生药 1 g/mL 的试液, 按 1.3.6 方法用各提取物做抑菌试验, 量取抑菌圈直径, 比较抑菌效果, 找到最佳提取工艺参数, 获取最佳提取物。

1.3.9 最佳抑菌提取物与对照品标准系列抑菌效果的比较 在最佳提取工艺条件下, 提取箬叶提取物进行抑菌试验, 试验重复 5 次, 计算其变动范围, 用平均值与庆大霉素标准系列的抑菌效果作比较。

2 结果与分析

2.1 箬叶抑菌提取物提取溶剂和提取方法的筛选

2.1.1 不同提取溶剂箬叶提取物的抑菌情况 用 1.3.6 抑菌试验方法, 对 1.3.5 中不同提取溶剂所获提取物开展抑菌试验, 结果见表 1 和表 2。

表 1 不同提取溶剂箬叶提取物的抑菌情况 (抑菌圈直径)[†]
Table 1 Bacteriostasis of extract from *Indocalamus* leaves with different solvents (diameter of bacteriostatic circle) mm

样品	枯草芽孢杆菌	铜绿假单胞菌	痢疾志贺氏菌	伤寒沙门氏菌	总抑菌圈
水	14.1	18.3	18.6	15.1	66.1
水空白	—	—	—	—	—
pH 4 盐酸溶液	12.0	17.0	12.6	9.0	50.6
pH 4 盐酸溶液空白	—	—	—	—	—
pH 4 乙酸溶液	22.3	22.7	18.6	17.9	81.5
pH 4 乙酸溶液空白	21.0	18.1	17.6	16.5	73.2
pH 10 氨水溶液	13.6	16.9	17.0	11.1	58.6
pH 10 氨水溶液空白	—	—	—	—	—
乙酸乙酯	10.9	20.5	21.4	12.6	65.4
乙酸乙酯空白	8.0	8.0	8.2	10.0	34.2

† “—”无抑菌作用。

表 2 箬叶不同体积分数乙醇提取物的抑菌情况 (抑菌圈直径)
Table 2 Bacteriostasis of different concentrations ethanol extracts from *Indocalamus* leaves (diameter of bacteriostatic circle) mm

样品	枯草芽孢杆菌	铜绿假单胞菌	痢疾志贺氏菌	伤寒沙门氏菌	总抑菌圈
30%乙醇提取物	9.9	14.3	12.8	9.1	46.1
30%乙醇空白	8.0	8.0	8.0	8.0	32.0
60%乙醇提取物	9.8	17.0	13.5	9.0	49.3
60%乙醇空白	8.0	8.0	9.0	8.6	33.6
80%乙醇提取物	12.7	19.1	13.6	10.1	55.5
80%乙醇空白	8.0	8.0	9.5	9.4	34.9
95%乙醇提取物	11.9	19.8	14.6	12.0	58.3
95%乙醇空白	8.0	8.0	10.0	10.5	36.5

表 1 和表 2 结果显示,箬叶乙醇提取物的抑菌效果整体较弱,乙酸溶液(pH 4)提取物抑菌效果最好,为 81.5 mm,水提取物为 66.1 mm,乙酸乙酯提取物为 65.4 mm;但是乙酸溶液(pH 4)空白为 73.2 mm,乙酸乙酯的空白为 34.2 mm,水的空白无抑菌效果,可见,水是最佳的提取溶剂。

2.1.2 不同提取方法箬叶提取物的抑菌情况 用水、60%乙醇、pH 4 乙酸溶液、pH 10 氨水溶液 4 种代表性提取溶剂分别采用超声辅助法、回流法和浸提法 3 种方法进行提取,所获提取物的抑菌效果见表 3,庆大霉素标准系列的抑菌作用见表 4。

由表 3 可知,水超声提取物的抑菌效果最好,超声法是最好的提取方法。

由表 4 可知,庆大霉素对 4 种指示菌抑菌作用显著,标准系列的抑菌效果曲线方程相关系数均大于 0.95,说明在选定的浓度范围内,其对各试验菌的抑菌效果与浓度呈正相关性。

表 1 和表 2 结果表明,水提取物抑菌性能优于乙醇提取物,与文献[16]的研究结果一致,虽然指示菌不同,但同样说明箬叶中水溶性抑菌物质比醇溶性抑菌物质效果好。箬叶中含有丰富的生物活性成分^[19],其中黄酮类、多糖、生物碱等都有着较强的抑菌杀菌作用^[17]。生物活

性成分化学结构不同,极性会有差异,在水中的溶解性也会有差异。黄酮类既有溶于水的,也有溶于醇的;多糖类溶于水,但不是真溶液;萜类物质极性中等偏小,微溶于水,易溶于醇,但萜苷类易溶于水;酚酸类为水溶性物质;生物碱大部分不溶于水,易溶于醇,但由生物碱生成的盐极易溶于水。箬叶水提取物抑菌活性优于乙醇提取物,可能因为箬叶中含有多种强极性水溶性活性物质或者其他活性成分,含中等偏小极性的活性成分相对较少,有待进一步对箬叶水提取物化学成分及其单体开展含量测定和抑菌活性研究。

2.2 提取抑菌活性物单因素试验

2.2.1 液固比对箬叶提取物抑菌效果的影响 固定超声时间 30 min 和超声次数 1 次,选择液固比分别为 4 : 1, 8 : 1, 10 : 1, 12 : 1, 16 : 1, 20 : 1 (mL/g),提取物抑菌效果见图 1。

由图 1 可知,随着液固比的增加,提取物的抑菌活性迅速增强,当液固比增加到 12 : 1 (mL/g)后,提取物抑菌活性增强缓慢,因为随着提取溶剂用量的增加,抑菌物质提取率随之增加,液固比为 12 : 1 (mL/g)后,活性物质大部分已扩散到提取溶剂中,再增加提取溶剂用量,提取物抑菌活性增强缓慢。因此,12 : 1 (mL/g)是比较适宜的液固比。

表 3 3 种提取方法箬叶提取物的抑菌情况(抑菌圈直径)

Table 3 Bacteriostasis of the extracts from *Indocalamus* leaves by three extraction methods (diameter of bacteriostatic circle)

指标菌	水			60%乙醇			pH 4 盐酸水溶液			pH 10 氨水溶液		
	超声	回流	浸提	超声	回流	浸提	超声	回流	浸提	超声	回流	浸提
枯草芽孢杆菌	14.2	11.1	12.0	9.0	9.8	10.2	11.5	11.2	10.3	13.0	11.0	12.2
铜绿假单胞菌	21.1	18.5	15.1	14.8	17.3	16.7	10.0	17.6	16.3	15.8	15.8	14.5
痢疾志贺氏菌	19.0	16.2	17.9	11.1	12.6	11.0	12.4	12.2	13.2	14.0	10.6	12.9
伤寒沙门氏菌	14.1	8.9	11.0	8.5	10.0	10.3	9.0	8.2	8.2	11.5	10.0	10.4
总抑菌圈	67.4	54.7	56.0	43.4	49.7	48.2	42.9	49.2	48.0	54.3	47.4	50.0

表 4 庆大霉素对照品标准系列对 4 种指示菌的抑菌作用(抑菌圈直径)

Table 4 Bacteriostatic effects of gentamicin standard series on 4 indicator bacteria (diameter of bacteriostatic circle)

庆大霉素质量浓度/ (mg · mL ⁻¹)	枯草芽孢杆 菌/mm	铜绿假单胞 菌/mm	痢疾志贺氏 菌/mm	伤寒沙门氏 菌/mm	总抑菌圈/ mm
0.01	15.0	14.5	12.4	15.0	56.9
0.02	18.1	15.5	13.4	16.6	63.6
0.03	19.4	17.0	14.3	17.6	68.3
0.04	20.8	17.5	15.1	18.4	71.8
0.05	21.3	18.5	16.1	19.1	75.0
标准系列曲线方程	y = 153x + 14.33	y = 100x + 13.6	y = 91x + 11.53	y = 100x + 14.34	y = 444x + 53.8
相关系数	0.958 7	0.990 2	0.999 3	0.984 7	0.987 3

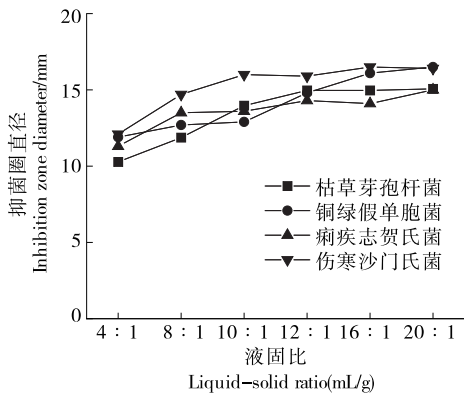


图1 液固比对箬叶提取物抑菌效果的影响

Figure 1 Effects of liquid-to-material ratio on bacteriostasis of *Indocalamus* leaves extract

2.2.2 超声时间对箬叶提取物抑菌效果的影响 固定液固比 10 : 1 (mL/g)和超声次数 1 次,选择超声时间分别为 15,25,35,45,55,65 min,提取物抑菌效果见图 2。

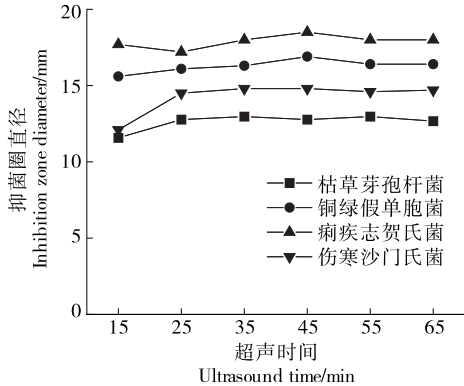


图2 超声时间对箬叶提取物抑菌效果的影响

Figure 2 Effects of ultrasonic time on bacteriostasis of *Indocalamus* leaves extract

由图 2 可知,总体上随着超声时间的延长,提取物抑菌活性增强,当超声时间增加到 45 min 后,提取物抑菌活性趋于平稳,说明随着超声时间的延长,细胞内抑菌物质逐渐溶出。从 45 min 增加到 55 min,提取物对痢疾志贺氏菌和铜绿假单胞菌活性有所下降,可能由于受热时间延长,个别成分变化所致;也可能是试验误差所致。从 15 min 增加到 25 min,提取物对痢疾志贺氏菌活性有所下降,因试验误差所致。所以,提取时间选择 45 min 左右比较合适。

2.2.3 超声次数对箬叶提取物抑菌效果的影响 固定液固比 10 : 1 (mL/g)和超声时间 30 min,选择超声次数分别为 1,2,3,4,5,6 次,提取物抑菌效果见图 3。

由图 3 可知,总体上随着超声次数的增加,提取物的抑菌活性不断增强,当超声次数增加到 3 次后,提取物抑菌活性趋于平稳,说明此时抑菌物质提取比较充分。但

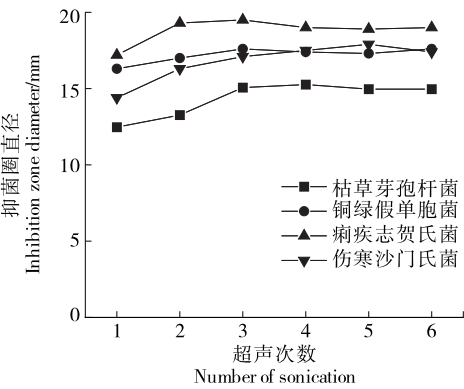


图3 超声次数对箬叶提取物抑菌效果的影响

Figure 3 Effects of ultrasonic number of times on bacteriostasis of *Indocalamus* leaves extract

提取物对痢疾志贺氏菌和铜绿假单胞菌活性有所下降,超声次数增加到 5,提取物对伤寒沙门氏菌的活性才有所下降,可能由于超声次数增加,受热时间也增加,个别成分被破坏所致,也可能是试验误差所至。为节约能源,选择超声 3 次比较理想。

2.3 最佳提取工艺参数

以水为提取溶剂,选择表 5 的因素和水平,按照 $L_9(3^3)$ 开展正交试验,制备箬叶提取物,用 1.3.6 方法开展抑菌试验,分析各条件下所获提取物的抑菌效果,结果分析见表 6 和表 7。

由表 6 可知,影响抑菌物质提取效果因素的主次顺序为超声次数>料液比>超声时间,最佳提取工艺为固液比 16 : 1 (mL/g),超声次数 4 次,超声时间 55 min。由表 7 可知,超声次数是重要的影响因素。

2.4 最佳提取物与对照品标准系列的抑菌情况比较

按最佳工艺参数,提取箬叶中最佳提取物,用 1.3.6 方法进行抑菌试验,共试验 5 次,同时与对照品标准系列抑菌效果进行比较,结果见表 8。

表 8 结果显示,最佳提取物对枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、痢疾志贺氏菌和伤寒沙门氏菌的抑菌圈直径分别为 (16.9 ± 1.54) , (23.8 ± 1.80) , (22.3 ± 1.41) , (17.9 ± 1.13) mm,平均总抑菌圈为 80.9 mm,平均抑菌效果相当于 0.01, >0.05 , >0.05 ,0.03 mg/mL 庆大霉素,说明对 4 种试验菌的抑菌效果显著,可作为食品添加剂、化妆品和日用化工原料进行开发和利用,同时,比较表 6,参数 $A_3B_2C_1$ 条件下的总抑菌圈与此结果相差不大。

表 5 正交试验的因素和水平

Table 5 Factors and levels of the orthogonal test			
水平	A 液固比(mL/g)	B 超声次数	C 超声时间/min
1	10 : 1	2	35
2	12 : 1	3	45
3	16 : 1	4	55

表 6 正交试验设计及结果

Table 6 Orthogonal experimental design and results

试验序号	A	B	C	抑菌圈直径/mm				
				枯草芽孢杆菌	铜绿假单胞菌	痢疾志贺氏菌	伤寒沙门氏菌	总抑菌圈
1	1	1	1	7.0	12.1	12.9	7.7	39.7
2	1	2	2	12.0	17.3	18.9	11.6	59.8
3	1	3	3	15.7	21.6	21.9	17.2	76.4
4	2	1	2	11.0	16.0	17.4	8.9	53.3
5	2	2	3	14.3	20.6	21.6	15.3	71.8
6	2	3	1	16.0	22.0	21.9	17.9	77.8
7	3	1	3	11.2	16.9	16.6	12.2	56.9
8	3	2	1	16.1	23.3	21.8	18.3	79.5
9	3	3	2	13.4	23.7	22.7	18.0	77.8
k_1	58.63	50.00	65.67					
k_2	67.63	70.37	63.63					
k_3	71.40	77.33	68.37					
R	12.77	27.33	4.74					

表 7 正交试验方差分析

Table 7 Results of variance analysis of orthogonal test

方差来源	自由度	变差平方和	均方	F 值	F_{α} 临界值
A	2	258.18	129.09	3.64	$F_{0.05}(2,2)=19.0$
B	2	1 213.63	606.97	17.09	$F_{0.10}(2,2)=9.0$
C	2	33.83	16.92	0.48	$F_{0.20}(2,2)=4.0$
误差	2	71.02	35.51		
总和	8	1 576.66			

表 8 最佳提取物抑菌试验结果统计

Table 8 Statistical analysis of the results of bacteriostatic test of the best extract (n=5)

指示菌	抑菌圈直径/mm		平均效果相当于 对照品质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)
	测定 平均值	测定值 变动范围	
枯草芽孢杆菌	16.9	16.9±1.54	0.01
铜绿假单胞菌	23.8	23.8±1.80	>0.05
痢疾志贺氏菌	22.3	22.3±1.41	>0.05
伤寒沙门氏菌	17.9	17.9±1.13	0.03
平均总抑菌圈	80.9		

3 结论

箬叶抑菌物最佳提取工艺条件为:以水为提取溶剂,采用超声辅助提取方法,提取参数为液固比 16 : 1 (mL/g),超声 4 次,时间 55 min。该工艺条件简单易行,环境友好,无污染;所获取的提取物对铜绿假单胞菌和枯草芽孢杆菌两种典型腐败菌,伤寒沙门氏菌和痢疾

志贺氏菌两种常见致病菌的抑菌效果显著;从节约能源和提高工作效率考虑,建议实际工作中使用工艺参数液固比 16 : 1 (mL/g),超声 3 次,时间 35 min。另外,目前对箬叶水提物的研究严重不足,应加强其中未知抑菌成分分析,开展广普抑菌试验,多方面开展活性稳定性研究,开发更多相关产品。

参考文献

[1] 刘立萍, 沈宏桂, 罗宏泉, 等. 返青箬叶中铜和锌在不同食品模拟物中迁移情况[J]. 包装工程, 2021, 42(21): 72-78.
LIU L P, SHEN H G, LUO H Q, et al. Study on the migration of copper and zinc in regreen Indocalamus leaves in different food stimulants[J]. Packaging Engineering, 2021, 42(21): 72-78.
[2] 刘立萍, 陈慧, 罗宏泉, 等. 怀化市食品包装用箬叶所属物种调查和 7 种元素含量测定[J]. 包装工程, 2022, 43(5): 122-129.
LIU L P, CHEN H, LUO H Q, et al. Species survey and seven elements determination of Indocalamus leaves for food packaging in Huaihua area[J]. Packaging Engineering, 2022, 43(5): 122-129.
[3] 陈云辉. 粽子的蒸煮等加工特性分析及其工艺优化[D]. 广州: 华南理工大学, 2013: 5.

- CHEN Y H. Properties analysis and optimization of cooking process of Zongzi[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2013: 5
- [4] 龚乃超, 锁进猛, 张浩, 等. 半仿生法提取箬叶总黄酮的研究[J]. 绿色科技, 2018, 6(3): 178-181.
- GONG N C, SHUO J M, ZHANG H, et al. Extraction of total flavonoids from *Indocalamus* leaves by semi-bionic method[J]. Journal of Green Science and Technology, 2018, 6(3): 178-181.
- [5] 李冬林, 金雅琴, 王文君, 等. 箬竹叶片营养成分分析[J]. 江苏林业科技, 2021, 48(1): 41-45.
- LI D L, JIN Y Q, WANG W J, et al. Analysis of nutrient components of *Indocalamus tessellatus* leaves[J]. Journal of Jiangsu Forestry Science & Technology, 2021, 48(1): 41-45.
- [6] 陈召桂, 何剑飞, 成凌, 等. 微波消解-AAS法测定箬叶中微量离子的含量[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(8): 76-78.
- CHEN Z G, HE J F, CHENG L, et al. Determination of trace elements in *Indocalamus* leaves by microwave digestion-atomic absorption spectroscopy[J]. Food Research and Development, 2014, 35(8): 76-78.
- [7] SHEN M, CHEN L Y, HAN W L, et al. Methods for the determination of heavy metals in *Indocalamus* leaves after different preservation treatment using inductively-coupled plasma mass spectrometry[J]. Journal of Microchemical Journal, 2018, 139: 295-300.
- [8] 李水芳, 文端芝, 曾栋, 等. 气相色谱-质谱法分析湖南产阔叶箬竹叶挥发油的化学成分[J]. 质谱学报, 2007, 28(2): 117-121.
- LI S F, WEN R Z, ZHONG D, et al. Analysis of essential oils from *Indocalamus latifolius* leaves by GC/MS[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2007, 28(2): 117-121.
- [9] 乐薇, 吴士筠. 热浸法提取箬叶总黄酮的动力学研究[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(11): 359-361.
- LE W, WU S J. Kinetic study on the extraction of total flavones from *Indocalamus* leaves by hot dipping method[J]. Jiangsu Agricultural Science, 2015, 43(11): 359-361.
- [10] 乐薇, 赵淳, 韦琴. 聚酰胺树脂对箬叶黄酮碳苷分离效果的研究[J]. 保鲜与加工, 2018, 18(6): 100-106.
- YUE W, ZHAO C, WEI Q. The separation of c-glycosylflavones from *Indocalamus* leaf by polyamide resin[J]. Storage and Process, 2018, 18(6): 100-106.
- [11] 闫荣玲, 廖阳, 唐秋玲, 等. 粽叶中黄酮的提取工艺及其与稀土离子在沸水中的析出规律[J]. 天然产物研究与开发, 2016(28): 1 313-1 318.
- YAN R L, LIAO Y, TANG Q L, et al. Extraction process of flavonoids and precipitation law of flavonoids and rare earth elements in boiling water from *Indocalamus latifolius* leaves[J]. Natural Products Research Development, 2016(28): 1 313-1 318.
- [12] 孙克奎. 响应面法优化箬叶多糖提取工艺及抑菌活性研究[J]. 食品工业, 2014, 35(4): 35-38.
- SUN K K. Optimization of extraction of polysaccharide from *Indocalamus tessellatus* leaves and its antibacterial activity[J]. Food Industry, 2014, 35(4): 35-38.
- [13] 李俊超, 胡坚, 杨春雷, 等. 箬竹叶提取物对烟草病原真菌的抑制作用[J]. 化学与生物工程, 2015, 32(2): 43-47.
- LI J C, HU J, YANG C L, et al. Inhibitory activity of *Indocalamus tessellatus* leaves against pathogenic fungi of tobacco[J]. Chemistry & Bioengineering, 2015, 32(2): 43-47.
- [14] 乐薇, 余雨珊, 吴士筠. 提取方法对箬叶总黄酮抑菌效果的影响[J]. 化学与生物工程, 2015, 32(11): 31-33.
- YUE W, SHE Y S, WU S J. Effect of extraction methods on antibacterial activities of total flavonoids from *Indocalamus* leaves[J]. Chemistry & Bioengineering, 2015, 32(11): 31-33.
- [15] 吉瑞冬, 孙雯, 乐薇, 等. 箬叶黄酮抑菌洗手液的研制[J]. 化工技术与开发, 2017, 46(1): 1-4.
- JI R D, SUN W, YUE W, et al. Research on antibacterial hand sanitizer with *Indocalamus* leaf[J]. Technology & Development of Chemical Industry, 2017, 46(1): 1-4.
- [16] 何舟, 陈新, 杨桃, 等. 箬叶中抑菌成分的提取及抑菌试验[J]. 武汉工业学院学报, 2013, 32(1): 35-39.
- HE Z, CHEN X, YANG T, et al. Research on extraction of antibacterial active components from *aspidistra elatior* blume and study on its inhibitory activity[J]. Journal of Wuhan Polytechnic University, 2013, 32(1): 35-39.
- [17] 邓龙兴, 余君, 覃光炯, 等. 箬竹叶提取物抗真菌活性研究[J]. 化学与生物工程, 2019, 36(7): 19-21.
- DENG L X, YU J, QING G J, et al. Antifungal activity of extracts from *Indocalamus tessellatus* leaves[J]. Chemistry & Bioengineering, 2019, 36(7): 19-21.
- [18] SUN J, XUN H, YU J, et al. Chemical constituents and antibacterial properties of *Indocalamus latifolius* McClure leaves, the packaging material for "Zongzi"[J]. Molecules, 2015, 20(9): 15 686-15 700.
- [19] NI Q X, ZHANG Y Z, XU G Z, et al. Influence of harvest season and drying method on the antioxidant activity and active compounds of two bamboo grass leaves[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2014, 38(4): 1 565-1 576.
- [20] 刘立萍, 王宁, 雷小红, 等. 食品包装用箬叶提取物抑菌活性的初步研究[J]. 食品科技, 2022, 47(6): 257-262.
- LIU L P, WANG N, LEI X H, et al. Primary study on the antimicrobial activity of the extracts from *Indocalamus tessellatus* leaves for food packaging[J]. Food Science and Technology, 2022, 47(6): 257-262.
- [21] 周芳, 熊海涛, 张江, 等. 牛津杯法测定抗菌肽对四种有害微生物的抑制效果[J]. 饲料工业, 2018, 39(6): 48-51.
- ZHOU F, XIONG H T, ZHANG J, et al. The inhibitory effect of antimicrobial peptide against four kinds of harmful microorganisms by the Oxford cup method[J]. Feed Industry, 2018, 39(6): 48-51.