

薯蓣单宁的提取及其抑菌活性研究*

李落叶¹ 杨晓朱¹ 雷梦英¹ 梁传冠² 何旭君¹ 黄少彬¹

(1. 广东生态工程职业学院 / 植物有害生物防控与生物环境健康应用技术协同创新中心, 广东 广州 510520;

2. 惠州泰合新创科技有限公司, 广东 惠州 516000)

摘要 为了更好地利用薯蓣 *Dioscorea cirrhosa* 资源, 减少薯蓣渣浪费, 从薯蓣和薯蓣渣中提取生物活性成分, 比较了薯蓣提取物对几种重要植物病原菌的抑菌作用。结果显示, 60% 丙酮浸提法比 75% 乙醇提取法能获得较多提取物, 且提取物中单宁含量较高, 适合用于薯蓣单宁提取。相同提取条件下, 薯蓣渣的浸提物得率比薯蓣低 50%, 但两种提取物中单宁含量无明显差异。抑菌试验结果表明, 薯蓣的丙酮提取物对来自猴耳环 *Pithecellobium clypearia* 的炭疽病菌 (暂定名为 H30, *Colletotrichum* sp.)、拟茎点霉 (暂定名为 H63, *Phomopsis* sp.) 和广藿香青枯病菌 (暂定名为 GHB2, *Ralstonia* sp.) 均有明显的抑制效果。因此, 薯蓣和薯蓣渣可望成为研制新型植物源杀菌剂的原料, 为药用植物病害绿色防控提供新制剂。

关键词 薯蓣; 单宁; 杀菌剂

中图分类号: S763.11 文献标志码: A 文章编号: 2096-2053 (2022) 03-0080-06

Tannic Acid Extraction From *Dioscorea cirrhosa* and Antimicrobial Activity of *D. cirrhosa* Extract

LI Luoye¹ YANG Xiaozhu¹ LEI Mengying¹ LIANG Chuanguan²
HE Xujun¹ HUANG Shaobin¹

(1. Guangdong Eco-Engineering Polytechnic / Collaborative Innovation Center of Plant Pest Management and Bioenvironmental Health Application Technology, Guangzhou, Guangdong 510520, China; 2. Huizhou Taihe Xinchuang Technology Co., Ltd., Huizhou, Guangdong 516000, China)

Abstract For fully utilization of *Dioscorea cirrhosa* and its residues from the manufacturing process of Gambiered Guangdong silk, biologically active substance was tried to be extracted and the antimicrobial activity of *D. cirrhosa* extracts was tested. The results showed that more extracts were obtained and more tannic was in the extracts by 60% acetone than by 75% ethanol. It is suitable to extract tannic from *D. cirrhosa* using 60% acetone. Using the same extraction method, the output rate of extracts from *D. cirrhosa* residues was 50% lower than from *D. cirrhosa*, but the tannic acid content in extracts from both of them were very similar. The extracts of *D. cirrhosa* from 60% acetone showed high antimicrobial activity to a species of *Colletotrichum* and a species of *Phomopsis* from *Pithecellobium clypearia*. It also had obvious antibacterial activity to *Ralstonia solanacearum* of *Pogostemon cablin*. So, It is possible to develop a new botanical germicide using *D. cirrhosa* and its residues and provide a new preparation for nuisanceless control of medicinal plant diseases.

Key words *Dioscorea cirrhosa*; tannic acid; germicide

* 基金项目: 广东省教育厅特色创新项目 (2018GKTSCX006), 广东省林业科技创新项目 (2019kjcx022)。

第一作者: 李落叶 (1974—), 女, 助理研究员, 主要从事植物保护教学与科研工作, E-mail: liluoye822@163.com。

通信作者: 黄少彬 (1965—), 男, 教授, 主要从事植物保护教学与害虫分类, E-mail: h3602@126.com。

薯蓣 *Dioscorea cirrhosa* 是薯蓣科多年生藤本植物，生于山坡、路旁、林中，盛产于我国广东、广西、贵州、湖南、浙江等地。薯蓣块茎含有丰富的单宁，具有抑菌、止血功效，医药领域被用于治疗内伤吐血、外伤出血、胃炎、肠炎等症^[1]。在纺织印染领域，薯蓣浸汁被广泛用于染皮制革、染布等工艺，是国家地理标志产品——香云纱制作过程中的染色原料。

单宁是一类广泛存在于植物界的酚类化合物，是高等植物体内的次级代谢产物，其具有丰富多样的结构类型和各种生物活性。研究发现，单宁类化合物对细菌、真菌、病毒等多种微生物都有很强的抑菌作用^[2-5]。据报道，番石榴 *Psidium guajava* 叶片提取物（主要成分为单宁）对白菜软腐病菌有抑制作用，能延缓白菜软腐病的发生^[6]。多种植物的单宁提取物对烟草花叶病毒（TMV）具有明显的体外抑制作用^[7]。薯蓣块茎中单宁含量非常高，为 11%~38% 之间^[8]，因此，薯蓣具备开发天然杀菌剂的潜力。

本试验以薯蓣和薯蓣渣为原料，比较了丙酮浸提和乙醇浸提两种方法提取薯蓣单宁的产物得率，并采用体外抑菌试验测定薯蓣提取物对供试细菌和真菌菌株的抑菌活性，为进一步研究开发薯蓣植物源杀菌剂、充分利用薯蓣资源、减少资源浪费奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 薯蓣原料 来自惠州大岚的野生薯蓣块茎，经洗净、晾干后，切成长宽约 5 mm × 5 mm、厚度 2 mm 至 5 mm 的小块，分成两组，一组直接用 40℃ 烘箱烘干备用。香云纱制作过程中，需要用到薯蓣水对织物进行浸染^[9-10]，过水后剩下的薯蓣渣被当做废弃物随意堆放、焚烧处理，未得到有效利用。为了充分利用资源、减少浪费，研究薯蓣渣中生物活性成分单宁的含量情况，本研究模拟香云纱制作中薯蓣渣的生成过程，将另一组薯蓣先过两次水，然后沥干得薯蓣渣，再用 40℃ 烘箱烘干备用。

1.1.2 供试菌株 所用菌株都为本研究室从患病植物分离保存。真菌菌株 3 个：引起猴耳环 *Pithecellobium clypearia* 枝干病害的炭疽病菌（暂定名为 H30, *Colletotrichum* sp.）、拟茎点霉（暂定名为

H63, *Phomopsis* sp.），引起猴耳环叶斑病的拟盘多毛孢属真菌（暂定名为 H69, *Pestalotiopsis* sp.）；以及来自广藿香 *Pogostemon cablin* 青枯病病株的细菌菌株 1 个（暂定名为 GHB2, *Ralstonia* sp.）。

1.1.3 培养基 本试验真菌、细菌均采用马铃薯葡萄糖培养基（PDA）：200 g 马铃薯煮汁，加入 20 g 葡萄糖、20 g 琼脂粉，蒸馏水定容到 1 000 mL，灭菌，冷却后，制成固体平板培养基。

1.2 方法

1.2.1 薯蓣单宁提取及含量测定 比较了丙酮浸提和乙醇浸提两种方法。称取备用的干薯蓣或薯蓣渣，用 60% 丙酮或 75% 乙醇按照料液比 1 : 10 在 60℃ 下浸提 3 h，过滤，滤液用 Heidolph Laborota 4000 旋转蒸发仪旋蒸，蒸发条件为 50℃、0.08 MP，获得的浸膏在 40℃ 下烘干成粉状。

提取物得率计算：提取物得率 = (浸出物干粉质量 ÷ 干薯蓣质量) × 100%

提取物中单宁含量测定：Follin 酚法，具体参照林倩等的方法^[11]。

1.2.2 药剂的准备 称取适量丙酮浸提法获得的薯蓣提取物干粉，用 50% 甲醇溶解，分别配制成 200、150、100、50、10、5 mg/mL 溶液；阳性对照采用华诺生物科技有限公司生产的噁霉灵，用 50% 甲醇稀释成浓度为 3 mg/mL 的溶液；阴性对照为 50% 甲醇溶液。

1.2.3 薯蓣提取物对菌丝生长的影响 采用菌丝生长速率法。分别取 150、100、50 mg/mL 的薯蓣提取物各 0.2 mL，均匀涂布于 PDA 平板培养基，以涂布 3 mg/mL 噁霉灵和 50% 甲醇 0.2 mL 作为对照。用灭菌的尖头镊子，在新鲜活化的病原菌菌落边缘小心夹取极小量菌丝，接种到上述含有药剂的平板培养基，26℃ 下暗培养 3 d，用十字交叉法测量菌落直径。每个处理重复 3 次，取平均值。

菌丝抑制率 = (对照组菌落直径 - 试验组菌落直径) ÷ 对照组菌落直径 × 100%。

1.2.4 细菌悬液的制备 保存的菌液先划线活化培养，24 h 后挑取单菌落用无菌水稀释后涂平板，继续培养 24 h，无菌水洗脱平板上的新鲜菌苔，并制成悬浮菌液，菌液浓度调整为 OD₆₀₀ = 0.1，现用现配。

1.2.5 薯蓣提取物抑制细菌能力的测定 采用滤纸片法。用打孔器将滤纸制成直径为 6 mm 的圆纸片，高压锅灭菌内 121℃ 灭菌 20 min 后烘干，取

表 1 不同条件下提取物得率及其单宁含量

Tab.1 The output rate of extracts and tannic acid content in extracts under different extraction method

原料 Materials	料液比 Ratio of material to solution	溶剂 Solvent	提取物得率 /% Output rate of extracts	提取物中单宁含量 /% Tannic acid content in extracts
薯蓣	1 : 10	60% 丙酮	13.0	45.5
薯蓣	1 : 10	75% 乙醇	7.5	39.8
薯蓣渣	1 : 10	60% 丙酮	6.5	45.4
薯蓣渣	1 : 10	75% 乙醇	4.0	35.1

0.1 mL 新鲜菌液均匀涂布在 PDA 固体平板培养基上, 用无菌镊子夹取滤纸片平铺于含菌平板上, 每皿放 4 个滤纸片, 使各纸片之间均匀间隔一定距离, 在每个纸片上滴加 5 μ L 药剂, 以滴加 50% 甲醇为阴性对照, 设 3 次重复。28 $^{\circ}$ C 下暗培养 24 h, 十字交叉法测量各处理的抑菌圈直径, 取平均值。

2 结果与分析

2.1 薯蓣提取物得率及单宁含量

按照 1.2.1 的方法, 薯蓣提取物得率及有效成分含量如表 1。从表 1 可以看出, 采用丙酮浸提法时, 薯蓣产物得率和产物中单宁含量都明显高于乙醇提取法, 因此, 丙酮提取法更适合提取薯蓣单宁。同样的提取方法下, 薯蓣渣的提取物得率比薯蓣提取物得率低约 50%, 其原因可能是由于过水后薯蓣中部分单宁等物质随水流失, 所以产物变少, 但产物中单宁含量仍然很高, 与薯蓣提取物相近, 说明薯蓣渣提取物同样具备抑菌潜力。

2.2 薯蓣提取物对真菌的抑制作用

测试了薯蓣丙酮提取物(下面以“T”表示)对炭疽病菌 H30、拟茎点霉 H63 和拟盘多毛孢属真菌 H69 的抑制活性。噁霉灵是当前广泛应用的真菌杀菌剂, 本实验设置了 3 mg/mL 噁霉灵为阳性对照。结果表明, T 液对 H30 有明显的抑制作用, 但抑制程度低于噁霉灵(图 1. a, b, c); 对 H63 菌丝的生长也有明显抑制, 浓度在 100 mg/mL 时的抑制程度接近 3 mg/mL 噁霉灵(图 1. d, e, f), 而对 H69 无抑制作用(图 1. g, h, i)。

不同浓度的 T 液对 H30 和 H63 均有抑制活性, 抑制效果随浓度增大而增强, 100 mg/mL 的 T 液对 H30 的菌丝抑制率达 46.2%; 对 H63 的菌丝抑制率也达到 31.9%, 接近 3 mg/mL 噁霉灵的抑

制率, 150 mg/mL 的 T 液对 H63 的菌丝抑制率略高于 3 mg/mL 噁霉灵; 测试浓度下, T 液没有表现出对 H69 的抑制效果(表 2)。

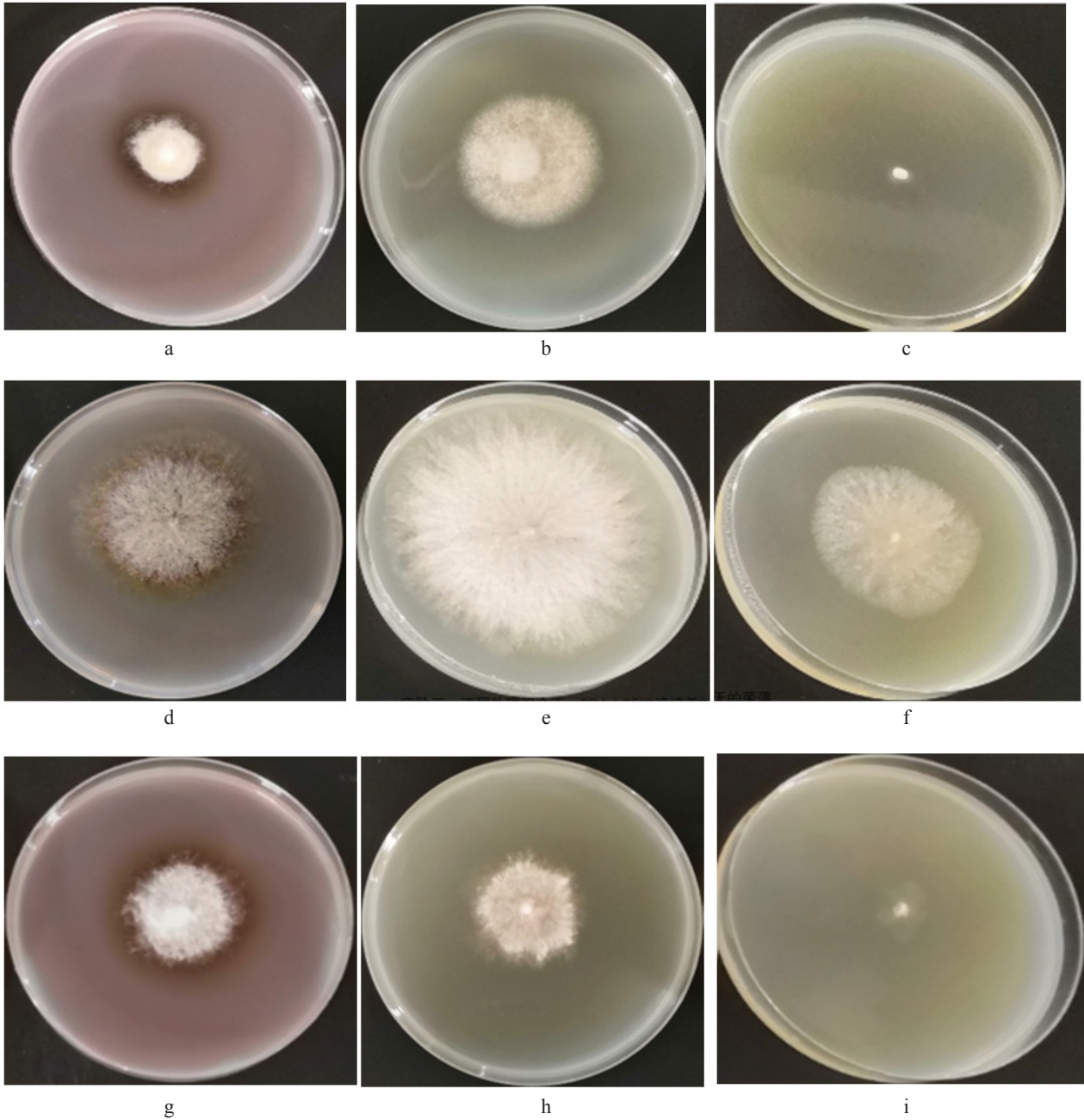
表 2 薯蓣提取物对猴耳环真菌病原菌丝生长的影响

Tab.2 The effects of *Dioscorea cirrhosa* extracts on three pathogenic fungi of *A. lucidum*

菌株 Pathogenic fungi	处理 Treatments	菌落直径 / cm Colony diameter	菌丝抑制率 /% Percentage mycelial growth inhibition
H30	T (150 mg/mL)	1.7	56.4
	T (100 mg/mL)	2.1	46.2
	T (50 mg/mL)	3.4	12.8
	3 mg/mL 噁霉灵	0.6	84.6
	CK	3.9	/
H63	T (150 mg/mL)	4.4	38.9
	T (100 mg/mL)	4.9	31.9
	T (50 mg/mL)	5.6	22.2
	3 mg/mL 噁霉灵	4.5	37.5
	CK	7.2	/
H69	T (150 mg/mL)	3.0	0
	T (100 mg/mL)	3.2	-6.6
	T (50 mg/mL)	3.1	-3.3
	3 mg/mL 噁霉灵	1.5	50.0
	CK	3.0	/

2.3 薯蓣提取物对细菌的抑制作用

抑菌实验结果表明, 薯蓣提取物对广藿香青枯病菌株 GHB2 有显著抑制效果, 浓度越大抑菌



注：a-c. H30 分别在表面涂有 100 mg/mL T 液、50% 甲醇、3 mg/mL 噻霉灵的 PDA 上培养 3 天的生长情况。d-f. 表示 H63 分别在表面涂有 100 mg/mL T 液、50% 甲醇、3 mg/mL 噻霉灵的 PDA 上培养 3 天的生长情况。g-i. 表示 H69 分别在表面涂有 100 mg/mL T 液、50% 甲醇、3 mg/mL 噻霉灵的 PDA 上培养 3 天的生长情况。

Note: Figure a-c means that mycelial of H30 cultured on PDA for 3 days with 100 mg/ml T, 50% methanol or 3 mg/ml hymexazol, respectively. Figure d-f means that mycelial of H63 cultured on PDA for 3 days with 100 mg/ml T, 50% methanol or 3 mg/ml hymexazol, respectively. Figure g-i means that mycelial of H69 cultured on PDA for 3 days with 100 mg/ml T, 50% methanol or 3 mg/ml hymexazol, respectively.

图 1 薯蓣提取物对来自猴耳环的炭疽病菌 H30、拟茎点霉 H63 和拟盘多毛孢属真菌 H69 的抑制活性

Fig.1 The antimicrobial activity of the extracts from *Dioscorea cirrhosa* to a species of *Colletotrichum* H30, a species of *Phomopsis* H63 and a species of *Pestalotiopsis* H69 from *Archidendron lucidum*

效果越好，浓度达到 50 mg/mL 时，抑菌圈直径 14.3 mm，抑菌效果明显（图 2a），低浓度下抑菌效果较弱，浓度为 10 mg/mL 时，抑菌圈直径 10

mm（图 2b）；5 mg/mL 时，抑菌能力极微弱，但与空白对照相比，仍然能观察到很小的抑菌圈（图 2c，表 3）。

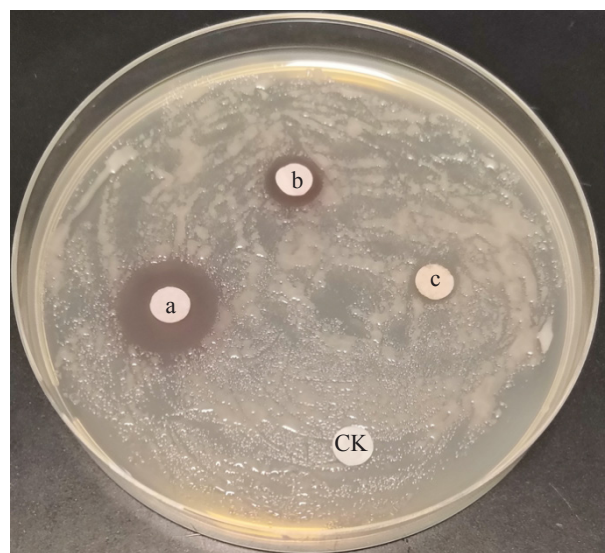


图 2 薯蓣提取物对广藿香青枯病菌 GHB2 的抑菌效果

Fig.2 The antibacterial activity of *Dioscorea cirrhosa* extracts to *Ralstonia solanacearum* of *Pogostemon cablin*

表 3 不同浓度薯蓣提取物对广藿香青枯病菌 GHB2 的抑菌活性

Tab.3 The antibacterial activity of different concentrations of *Dioscorea cirrhosa* extracts to *Ralstonia solanacearum* of *P. cablin*

薯蓣提取物浓度 / (mg · mL ⁻¹) Concentrations of <i>Dioscorea cirrhosa</i> extracts	抑菌圈直径 /mm Diameters of the zone of inhibition
200	16.0
100	15.0
50	14.3
10	10.0
5	8.0
CK	/

注：/ 表示无抑菌圈。
Note: / indicates no zone of inhibition.

3 结论与讨论

提取植物活性成分的方法很多，不同植物原料、不同溶剂，不同料液比、不同浸提温度和浸提时间等都会对提取物的得率和成分造成影响^[12-14]。利用乙醇和丙酮浸提是两种常用方法，有研究表明丙酮为溶剂提取薯蓣单宁时，浓度以 60% 为好^[10]，以乙醇为溶剂时，浓度在 80% 左右为佳^[11]。本研究比较了 60% 丙酮和 75% 乙醇对薯蓣单宁的提取效率及提取物中单宁含量的差异，发现不管是薯蓣还是薯蓣渣，以 60% 丙酮浸提获得的产物得率更高、产物单宁含量也更高。因此，

在本研究采用的提取方法中（见 1.2.1），用丙酮浸提薯蓣单宁比用乙醇浸提更合适。近期有报道用“乙醇 + 甘油”和“甲醇 + 甘油”等复合溶液为溶剂提取植物单宁，大大提高了产物得率^[15]，未来可考虑利用类似的办法进一步改进提取方法，提高产物得率。

猴耳环和广藿香都是重要中药材，种植过程中病害较多，对药材产量和质量影响大，药材的用途决定了其病害的防治要更加注重绿色、无公害，开发植物源杀菌剂防治中药植物病害具有良好的应用前景。本研究选择了分离自猴耳环病株的 3 种真菌：炭疽病菌、拟茎点霉、拟盘多毛孢菌，这些病菌能引起多种植物病害，具有代表性。测试了薯蓣提取物对其抑制活性，结果显示，薯蓣提取物对炭疽病菌和拟茎点霉的菌丝生长有良好的抑制效果，说明薯蓣提取物的确具备开发植物源杀菌剂的潜力，也可以考虑与其它药剂进行混配，形成互补，拓宽杀菌谱。研究也发现薯蓣提取物对拟盘多毛孢真菌无作用，甚至在较低浓度下对拟盘多毛孢菌丝有轻微促生作用，说明其对真菌生长的抑制具有选择性。对广藿香青枯病菌的抑菌实验结果表明，50 mg/mL 的薯蓣提取物对该菌具有良好抑制效果。导致植物青枯病的菌群复杂、变异多^[16]，要将薯蓣提取物开发成防治青枯病的药剂，还需要测定其在植株上的实际防治效果。无论如何，薯蓣提取物至少能够抑制部分青枯病菌株的生长繁殖速度，可考虑制成无毒副作用的病害防治辅助剂，减轻病情，降低损失。

我国薯蓣资源十分丰富，自然分布范围广，主要分布于南方中低海拔山区，广东和广西为薯蓣的最高适生区，是当前最密集分布区域，在未来气候变化的影响下，薯蓣有进一步向最高适生区即广东、广西两省集中的趋势^[17]。目前，薯蓣最多用于香云纱的制作工艺中，每到秋冬季节，数万吨的薯蓣废渣经风干后直接被焚烧处理^[18]，资源浪费和环境污染较大。为充分利用本地薯蓣资源，减少浪费，减轻环境污染，本研究试图从农药开发的角度探索薯蓣利用的新途径。研究发现，泡过水的薯蓣渣中仍然含有大量单宁，提取物的得率是薯蓣块茎提取物得率的 50% 左右，提取物中单宁含量与薯蓣提取物相仿，因此，薯蓣渣提取物与薯蓣提取物一样具备开发成植物源农药的潜力。未来可从提高提取效率、降低提取成

本方面进一步研究薯蓣单宁的大规模提取工艺, 为实现薯蓣资源的规模化利用奠定基础。

本研究明确了薯蓣提取物对多种重要植物病原菌具有良好的直接抑菌效果, 薯蓣渣中亦提取到有效成分含量相同的提取物, 对充分利用薯蓣资源研发新型植物源杀菌剂、减少薯蓣资源浪费具有参考价值。

参考文献

- [1] 李忠军, 杨燕军, 孟巨光. 薯蓣鞣质成分及生物活性的研究进展[J]. 广东微量元素科学, 2015, 22(1): 48-52.
- [2] ABOH M, OLAYINKA BO, ADESHINA GO et al. Antifungal activities of phyto compounds from *Mitracarpus villosus* (Sw.) DC from Abuja, Nigeria [J]. Journal of Microbiology Research, 2014, 4(2): 86-91.
- [3] 王虹玲, 武婷茹, 姜诗文, 等. 香蕉皮单宁的提取及其提取物的抑菌抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(11): 253-259.
- [4] 李海帆, 李玉环, 黄杰, 等. 香蕉皮单宁提取物对大肠杆菌的抑菌机理探究[J]. 食品与发酵科技, 2018, 54(3): 42-45.
- [5] XIAO X, HE L, CHEN Y. et al. Anti-inflammatory and antioxidative effects of *Camellia oleifera* Abel .components[J]. Future Medicinal Chemistry, 2017, 9(17): 2069-2079.
- [6] 庄佩蓉. 番石榴叶片水萃取液防治结球白菜软腐病之研究[D]. 台湾: 中兴大学, 2013.
- [7] 刘国坤, 谢联辉, 林奇英, 等. 15种植物的单宁提取物对烟草花叶病毒(TMV)的抑制作用[J]. 植物病理学报, 2003, 33(3): 279-283.
- [8] 苏青, 黄瑞松. 民族药薯蓣鞣质的分析[J]. 华西药学杂志, 1999, 14(3): 185-186.
- [9] 杨晓丽. 香云纱的加工工艺及其生态性[J]. 神州美学, 2019(12): 16-18.
- [10] 李维贤, 赵耀明, 师严明. 香云纱的加工工艺及其生态性[J]. 印染, 2008(16): 30-38.
- [11] 林倩, 吴昊, 刘芊辰, 等. 响应面法优化福林酚法测定冬枣中总酚含量[J]. 食品工业, 2020, 41(4): 86-90.
- [12] 熊晓燕, 陈曼群, 黎碧娜. 从薯蓣中提取单宁的最佳工艺条件研究[J]. 广东工业大学学报, 1998, 15(增刊): 35-39.
- [13] 黎碧娜, 何鸣, 杨辉荣. 从野生植物薯蓣中提取抗氧化成分的研究[J]. 现代化工, 1996 (6) : 26-28.
- [14] 张萌雨, 王静, 张应中, 等. 水提醇沉法提取油茶饼粕多糖的响应面优化[J]. 林业与环境科学, 2019, 35(5): 1-6.
- [15] 曾鑫海, 梁惠芬, 杨东娟, 等. 以橄榄为例研究单宁提取方法的改进及优化[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(21): 117-122.
- [16] 邹阳, 肖崇刚, 马冠华, 等. 青枯菌生理分化及致病型测定研究进展[J]. 中国植保导刊, 2016, 36(7): 21-28.
- [17] 林艳, 黄志华, 梁益斌, 等. 薯蓣地理分布及适生区预测[J]. 林业与环境科学, 2021, 37(4): 55-61.
- [18] 李晓菲, 林海荣, 卢治友, 等. 薯蓣的研究概况[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(20): 8517-8521.