

灰树花多糖体外抑菌及抗氧化活性研究

付佳乐, 耿直(陕西国际商贸学院, 西安 712046)

摘要: 目的 研究灰树花多糖的抑菌及抗氧化活性。方法 采用紫外分光光度法, 以 D-无水葡萄糖为对照品, 测定灰树花提取物中多糖含量; 采用纸片扩散法, 以头孢哌酮为阳性对照, 测量不同浓度灰树花多糖提取物金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌的抑菌圈直径; 采用 DPPH 法和 T-AOC 试剂盒法, 以清除率为指标, 研究灰树花多糖的抗氧化活性。结果 灰树花提取物中多糖含量为 53.49%; 灰树花提取物对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌均有一定的抑菌作用, 抑菌圈直径分别为 13, 11, 10 mm; 灰树花多糖浓度为 0.05~10 mg·mL⁻¹ 时, 对 DPPH 自由基具有一定的清除能力, 当浓度高于 0.5 mg·mL⁻¹ 时, 开始显示出总抗氧化能力。结论 灰树花多糖具有一定的抑菌和抗氧化能力。

关键词: 灰树花; 多糖; 抑菌; 抗氧化

中图分类号: R285.5 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2020)08-0945-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.08.009

引用本文: 付佳乐, 耿直. 灰树花多糖体外抑菌及抗氧化活性研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(8): 945-948.

Study on Antibacterial *in Vitro* and Antioxidant Activity of *Grifola Frondosa* Polysaccharide

FU Jiale, GENG Zhi(Shaanxi Institute of International Trade Commerce, Xi'an 712046, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the antibacterial effect and antioxidant activity of *Grifola frondosa* polysaccharide. **METHODS** UV spectrophotometry was used to determine the content of polysaccharide, D-anhydroglucose was used as a standard. The antibacterial effect produced by Kirby-Baue method with the bacteria of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. Took the scavenging capacity as index to estimate the endogenous antioxidative activity of DPPH and T-AOC. **RESULTS** The total polysaccharides in *Grifola frondosa* extract was 53.82%. *Grifola frondosa* polysaccharide had a good antibacterial effect on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, the diameter of antibacterial were 13, 11, 10 mm. With the concentration between 0.05~10 mg·mL⁻¹, *Grifola frondosa* polysaccharide had a good scavenging activity by DPPH, when the concentration above 0.5 mg·mL⁻¹, showed the total antioxidant activity. **CONCLUSION** The polysaccharides in *Grifola frondosa* has certain antibacterial effect and antioxidant activity.

KEYWORDS: *Grifola frondosa*; polysaccharides; antibacterial; antioxidant activity

灰树花[*Grifola frondosa* (Fr.) S. Gary]又称舞蘑, 是一种肉质子实体真菌, 属多孔菌属, 其子实体中富含氨基酸、多糖以及微量元素等多种有效成分, 其中灰树花多糖是主要的生物活性物质。作为一种生物反应调节剂, 灰树花多糖具有增强免疫力、抑制肿瘤、抗 HIV 病毒、稳定血压、降低血糖、改善脂肪代谢等多种药理活性^[1-3]。本研究对灰树花多糖的抑菌及抗氧化活性进行研究, 以期为灰树花的后续研究提供理论依据, 扩大灰树花的临床应用。

1 材料

1.1 试药与试剂

灰树花提取物(杭州众芝康菇生物技术有限公司); D-无水葡萄糖(ChengduPureChen-Standard Co.

Ltd., 批号: 140409; 纯度≥98%); 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)(Phygene Biotechnology Co.Ltd., 批号: 180915); 总抗氧化能力测试盒(T-AOC, 苏州科铭生物技术有限公司, 货号: TAOC-2-G-20181207); 无水乙醇等为分析纯, 水为纯化水。

金黄色葡萄球菌标准菌株 CMCC(B)26003、大肠杆菌标准菌株 CMCC(B)44102、枯草芽孢杆菌标准菌株 CMCC(B)63501 均来自广东环凯微生物有限公司, 以上菌株于液体牛肉膏蛋白胨培养基(自制), 37℃, 24 h 培养后进行梯度稀释, 浓度稀释至 1×10⁸ cfu·mL⁻¹, 备用。

头孢哌酮药敏片(杭州微生物试剂有限公司, 批号: 20180918; 规格: 每支 20 片)。

作者简介: 付佳乐, 女, 硕士, 讲师 Tel: (029)33814585 E-mail: 63461425@qq.com

1.2 仪器

UV-1810 紫外可见分光光度计(上海美普达仪器有限公司); JJ-CJ-ID 超净工作台(杭州净化设备厂); SPX-150B 智能生化培养箱(上海琅环实验设备有限公司)。

2 方法

2.1 灰树花提取物多糖含量测定

2.1.1 试液与试剂的配制 对照品溶液的配制: 取对照品 D-无水葡萄糖适量, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加入水适量溶解并定容至刻度, 摇匀, 得浓度为 $0.101 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ D-无水葡萄糖的对照品溶液。

供试品溶液的配制^[4]: 取灰树花提取物约 60 mg, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加入 80%乙醇 100 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 分次洗涤滤渣, 弃去滤液, 滤渣连同滤纸置 100 mL 锥形瓶中, 加热水 60 mL, 振摇, 超声处理 30 min, 滤过, 合并滤液置 100 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 即得供试品溶液。

2.1.2 最大吸收波长的确定 精密量取“2.1.1”项下对照品溶液 1 mL 置试管中, 加水至 2 mL, 精密加入硫酸-苯酚显色剂并于紫外可见分光光度计下进行光谱扫描, 结果表明葡萄糖最大吸收波长为 490 nm。

2.1.3 标准曲线的制备 分别精密量取“2.1.1”项下的对照品溶液 0.2, 0.5, 0.8, 1.1, 1.4, 1.7 mL 置具塞试管中, 分别加水至 2 mL, 摇匀, 各精密加入 5%苯酚溶液 1 mL, 摇匀, 迅速精密加入硫酸 5 mL, 摇匀, 放置 10 min, 置 40 °C 水浴中保温 15 min, 取出, 迅速冷却至室温, 以相应的试剂为空白。按紫外-可见分光光度法, 于波长 490 nm 处测定吸光度, 以吸光度为纵坐标(A), 对照品浓度为横坐标(C), 绘制标准曲线, 计算回归方程。多糖含量在 $20.2 \sim 171.7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内有良好的线性关系, 回归方程为 $A=0.0068C+0.0126$, $r=0.9992$ 。

2.1.4 样品的测定 精密量取“2.1.1”项下供试品溶液 0.5 mL, 置具塞试管中, 按“2.1.3”项下的方法, 自“各精密加入 5%苯酚溶液 1 mL”起, 依法测定吸光度, 代入回归方程, 计算, 即得。

2.2 抑菌作用研究

2.2.1 灰树花多糖溶液的制备 根据“2.1.4”项

下测得多糖含量结果, 称取灰树花提取物, 按无菌操作方法, 加入无菌水, 配置得到浓度为 $600 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品溶液。

2.2.2 含菌平板的制备 在无菌条件下, 取 0.1 mL 混悬菌液置于平板中, 用无菌涂布棒涂布均匀, 室温条件下静置 5 min, 待用。

2.2.3 滤纸片的制备 将直径为 6 mm 的药敏滤纸片放入具塞试管中, 121.3 °C 高压蒸汽灭菌 15 min, 得无菌空白药敏片, 备用; 阳性对照选用头孢哌酮药敏片; 样品组为浸透“2.1.1”项下溶液至周围无水迹渗出的空白药敏片。

2.2.4 纸片扩散法 用无菌操作方法, 在含菌平板上, 将阳性、样品药敏滤纸片约间距 5 cm 放置, 在 37 °C 培养箱中倒置培养 24 h, 以肉眼观察药敏滤纸片周围无明显细菌生长区域为评价指标, 采用游标卡尺测量抑菌圈直径, 重复测量 3 次求平均值^[5-6]。

2.3 抗氧化活性研究

2.3.1 灰树花多糖对 DPPH 自由基的清除作用 按照参考文献^[7-8]中的方法, 将灰树花提取物配制并稀释成含不同浓度多糖的待测液(0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), DPPH 以甲醇为溶剂制成浓度为 $0.72 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 精密量取 2 mL DPPH 甲醇溶液与 2 mL 甲醇溶液混合均匀, 作为 A1 管, 以 2 mL 不同浓度多糖的待测液与 2 mL 甲醇溶液混合均匀, 作为 A2 管, 以 2 mL 不同浓度多糖的待测液与 2 mL DPPH 甲醇溶液混合均匀, 作为 A3 管, 同时置暗室充分反应 30 min, 于 517 nm 处分别测定其吸光度值(A), 记作 A_1 、 A_2 、 A_3 , 按照下式计算 DPPH 清除率。

$$\text{DPPH 清除率}(\%)=[1-(A_3-A_2)/A_1] \times 100\%$$

2.3.2 灰树花多糖总抗氧化(T-AOC)能力测定 取“2.3.1”项下不同浓度的灰树花多糖待测溶液(0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 将试剂盒中的试剂一、试剂二、试剂三按 10:1:1 的比例混合, 使用前预温至 37 °C, 按 T-AOC 试剂盒说明书操作。测定 593 nm 处 A 值, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。计算公式如下: 总抗氧化能力($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)= $(\Delta A=0.0645) \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div 0.6308=53.9 \times (\Delta A=0.0645)$ 。

其中, $V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 1.02 mL; $V_{\text{样}}$: 反应中样品体积, 0.03 mL。

3 结果与结论

3.1 灰树花提取物多糖含量测定

通过“2.1.4”灰树花提取物含量测定方法进行计算,灰树花提取物按干燥品计算,含多糖以葡萄糖($C_6H_{12}O_6$)计,平均含量为 53.49%,RSD 值为 2.143%,说明在误差允许范围内供试品溶液中有效组分含量稳定。结果见表 1。

表 1 样品含量测定

Tab. 1 Determination of sample content

序号	取样量/mg	测得量/mg	含量/%	平均值/%	RSD/%
1	59.4	30.10	54.60		
2	60.2	29.22	52.31	53.49	2.143
3	60.2	29.92	53.55		

3.2 灰树花多糖抑菌作用研究

对试验数据进行分析,灰树花多糖对 3 种不同种类病原菌的抑菌作用见表 2,实验结果见图 1。

按照纸片法通用的评价标准,抑菌圈直径 $d < 6$ mm 为无抑菌作用, $6 \text{ mm} \leq d < 10$ mm 为低度敏感, $10 \leq d < 15$ 为中度敏感, $d \geq 15$ mm 为高度敏感。灰树花多糖对 3 种病原菌均为中度敏感,结果见表 2。

表 2 灰树花多糖对 3 种不同病原菌的抑制作用

Tab. 2 Inhibition of *Grifola frondosa* polysaccharide to 3 different pathogen

病原菌	抑菌圈直径/mm	
	样品	阳性对照
大肠杆菌	11	29
金黄色葡萄球菌	13	30
枯草芽孢杆菌	10	24

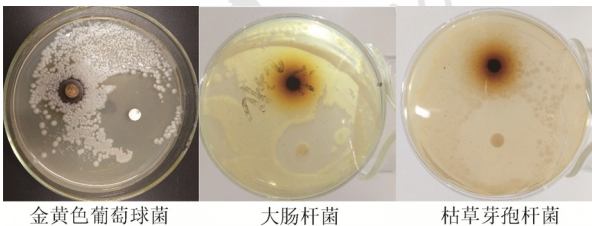


图 1 灰树花多糖抑菌作用

Fig. 1 Bacteriostasis of *Grifola frondosa* polysaccharide

3.3 灰树花多糖对 DPPH 自由基的清除作用

以灰树花多糖浓度为横坐标,以清除率为纵坐标。灰树花多糖在 $0.05 \sim 10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内,对 DPPH 自由基具有一定的清除能力,且清除能力随着灰树花多糖的浓度升高而增大,但当灰树花多糖浓度高于 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,其抑制率均在 90% 以上并

有小幅波动,证明灰树花多糖具有较好的 DPPH 自由基清除能力。灰树花多糖对 DPPH 自由基的清除作用见图 2。

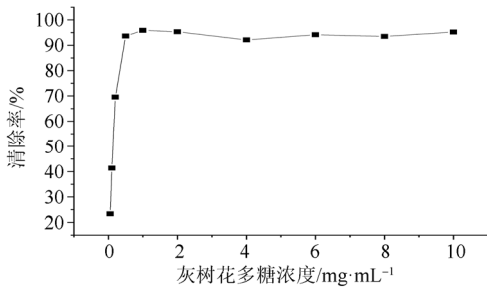


图 2 灰树花多糖对 DPPH 自由基的清除率

Fig. 2 Clearance of *Grifola frondosa* polysaccharide to DPPH

3.4 灰树花多糖 T-AOC 能力测定

以灰树花多糖浓度为横坐标,以总抗氧化能力为纵坐标。灰树花多糖在 $0.5 \sim 10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内 T-AOC 能力随着灰树花多糖的浓度升高而增大,但当灰树花多糖浓度低于 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,其抑制率无法计算,证明灰树花多糖在 $0.5 \sim 10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内表现出较好的 T-AOC 能力,结果见图 3。

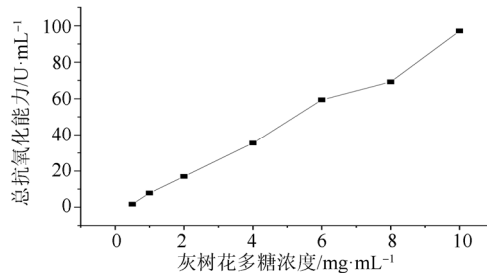


图 3 灰树花多糖 T-AOC 能力

Fig. 3 Clearance of *Grifola frondosa* polysaccharide to T-AOC

4 讨论

在抑菌试验过程中,还研究了灰树花多糖 300, 900 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度,但是 300 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的抑菌圈直径在 7~8 mm 范围内,提示灰树花多糖提取物在 300 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 左右即能产生抑菌作用。

在抗氧化研究过程中,随着灰树花多糖浓度的升高,抗氧化活性也逐渐增强。其中当灰树花多糖浓度达到 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时对 DPPH 自由基清除作用已接近 70%,而浓度在 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以上时,清除率维持在 90% 以上,这也为灰树花的临床应用提供了一定的理论依据。

多糖在抗菌药物的替代、防腐剂的寻找及抗氧化制剂的研发方面起着重要的作用。通过文献查阅可知,关于多糖抑菌及抗氧化作用机制目前

尚不明确,可能与其分子结构关系密切,但其分子结构仍作为目前研究的热点和难点,有待于进一步研究。

研究表明,灰树花多糖提取物具有一定的抑菌及抗氧化活性,其对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌均显示出不同程度的抑制作用。同时,具有较好的清除 DPPH 自由基和 T-AOC 能力。目前灰树花的研究重点是其药理作用及保健功能,但其胞外多糖结构和理化性质的系统性研究仍未见报道。因此,对其开发利用的研究空间仍很大。

REFERENCES

- [1] 吴智艳, 闫训友. 灰树花生理活性物质的研究进展[J]. 食用菌, 2006, 28(6): 1-2.
- [2] LI X D, RONG J H, WU M C, et al. Anti-tumor effect of polysaccharide from *Grifola frondosa* and its influence on immunological function [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2003, 26(1): 31-32.
- [3] ZHANG Z Q, WU T X, LIU L P. Research progress on structural characteristics and bioactivities of the polysaccharides from *Grifola frondosa* [J]. China Brewing(中国酿造), 2018, 37(5): 10-16.
- [4] AN J S, WANG D, MA S Q, et al. Optimization of the ultrasonic assisted extraction conditions of *Grifola frondosa* polysaccharides using response surface methodology [J]. Food Res Dev(食品研究与开发), 2008, 29(6): 11-15.
- [5] GUO J X, WANG Y M, MENG M, et al. Study on antimicrobial effect of *Salvia plebeia* extract and its preparation of cream [J]. J Harbin Univ Commer Nat Sci Ed(哈尔滨商业大学学报: 自然科学版), 2018, 34(5): 528-532.
- [6] CAO G H, LI Z D, ZHAO R H, et al. Compare of antibacterial effect produced by polysaccharides between raw materials and processing *Polygonatum sibiricum* [J]. Food Sci Technol(食品科技), 2017, 42(9): 202-206.
- [7] ZOU R C, WU S J, JIAO S Q, et al. Antioxidant activity and α -glucosidase inhibitory activity of *Cyclocarya paliurus* polysaccharides from different regions [J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技), 2018, 39(22): 25-29.
- [8] LIU C L, YANG Y, HE L, et al. Advance of research methods of polysaccharide in bacteriostatic effect [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2013, 24(7): 1725-1727.

收稿日期: 2019-04-25

(本文责编: 沈倩)