

桦菌芝多糖抗氧化性及抑菌活性研究

Study on antioxidant and antibacterial activities of polysaccharides in *Phropolyporus fomentarius*

许海燕¹ 彭修娟¹ 王珊¹ 刘艳红¹ 刘峰^{1,2}

XU Hai-yan¹ PENG Xiu-juan¹ WANG Shan¹ LIU Yan-hong¹ LIU Feng^{1,2}

(1. 陕西国际商贸学院医药学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 陕西步长制药有限公司, 陕西 西安 710075)

(1. Medical College, Shaanxi Institute of International Trade, Xianyang, Shaanxi 712046, China;

2. Shaanxi Buchang Pharmaceutical Co., Ltd., Xi'an, Shaanxi 710075, China)

摘要:以桦菌芝为原料,采用水提取乙醇沉淀法提取桦菌芝多糖,分析其清除DPPH自由基和ABTS自由基能力,并用滤纸片法测定不同浓度桦菌芝多糖对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌和四联球菌的抑菌活性及最低抑菌浓度(MIC)。结果表明,桦菌芝多糖对DPPH自由基和ABTS自由基均具有消除作用,当浓度为1.0 mg/mL时,桦菌芝多糖对DPPH自由基和ABTS自由基的清除能力均超过BHT对照品,但较弱于V_c对照品;不同浓度桦菌芝多糖的抗氧化活性具有显著性差异。桦菌芝多糖对4种受试菌均具有抑制作用且存在显著性差异,其中对大肠杆菌的抑制活性最强。大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌和四联球菌的最小抑菌浓度分别为1.25, 1.25, 2.50, 5.00 mg/mL。综上,桦菌芝多糖具有较好的抗氧化及抑菌活性,且抗氧化及抑菌活性随多糖浓度的增大而逐渐加强。

关键词:桦菌芝;多糖;抗氧化活性;抑菌活性

Abstract: In this study, the water-extracted ethanol precipitation method was used to extract Polysaccharides in *Pyropolyporus Formentarius* (PFPS), and the capacities of scavenging DPPH and ABTS were analyzed. Different concentrations of PFPS were used to detect the resistant abilities against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus subtilis*, and *Micrococcus tetragenus*, and the relative minimum inhibitory concentration

(MIC) were also determined. The results showed that PFPS could eliminate DPPH and ABTS. When the concentration of PFPS was 1.0 mg/mL, the ability of scavenging DPPH and ABTS exceeded that of the BHT control, while was weaker than the V_c reference substance. The antioxidant activity of PFPS with different concentrations was significantly different. PFPS had inhibitory effects on the four tested bacteria and there were significant differences, and the strongest inhibitory activity was resistant against *E. coli*. The minimum inhibitory concentrations of *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, and *M. tetragenus* were 1.25, 1.25, 2.50, 5.00 mg/mL, respectively. In summary, PFPS had good antioxidant and antibacterial activities, with gradually increasing associated with the polysaccharide concentration.

Keywords: *Phropolyporus fomentarius*; polysaccharides; antioxidant activity; antibacterial activity

桦菌芝(*Phropolyporus fomentarius*)又名木蹄、木蹄层孔菌,真菌多孔菌科,褐层孔属植物木蹄的菌体,寄生于桦树树干上,广泛分布于中国东北、西北、华南等地区^[1]。其性平,味微苦,有良好的消积化癖、抗癌作用,常用于治疗小儿食积、胃癌、子宫癌等疾病^[2]。桦菌芝中化学成分多样,主要包括多糖、三萜类、酚类、萜醌类、香豆素类、有机酸等^[3]。目前,有关桦菌芝的研究主要集中于多糖、三萜等化学成分的提取工艺优化及多糖的抗肿瘤、提高免疫力等方面^[1,4],关于除多糖外的其他活性成分及多糖抗氧化、抗菌作用的研究尚未见报道。

多糖是由多个单糖缩合失水连接而成的高聚物^[5],几乎存在于所有动植物中。研究^[6-7]表明,多糖具有很强的生物活性,可调控细胞分裂和分化,具有免疫调节、抗肿瘤、抗氧化、抗炎、抗病毒等药理活性。多糖的抗氧化作用机制具有多途径、多靶点、多效应,主要是通过内源性抗氧化应激通路 Nrf2-ARE 通路,调节编码下游抗氧化酶基因的表达^[8]。这些抗氧化酶能够阻断自由基链式

基金项目:陕西省科技厅项目(编号:2016SF-378);陕西省教育厅项目(编号:17JK0951);陕西高校青年科技创新团队项目(编号:陕教[2019]90号);陕西省中药产业技术创新服务共享平台项目(编号:2018PT-07);陕西国际商贸学院中药质量标志物创新团队项目(编号:SSY18TD02)

作者简介:许海燕,女,陕西国际商贸学院副教授,硕士。

通信作者:刘峰(1968—),男,陕西步长制药有限公司主任药师,硕士生导师。E-mail: liufeng1720@163.com

收稿日期:2020-02-25

反应,从而减少自由基的生成,消除过多自由基,从根源上防治疾病的产生。抑菌方面,多糖等植物提取物不仅能够选择性抑制外源性有害菌的生长,还能通过调控肠道微生物菌群的组成最终达到改善肠道功能和提高宿主免疫力的目的^[9]。因此,通过研究植物提取物的抗氧化和抑菌作用,可从根源上防治疾病的产生及调节菌群抑制有害菌的生长,在开发药品、食品、保健品领域具有广阔的应用前景。

试验拟以桦菌芝为原料,采用水提取乙醇沉淀法提取分离桦菌芝多糖,分析其清除 DPPH 自由基和 ABTS 自由基能力,并用滤纸片法测定不同浓度桦菌芝多糖对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌和四联球菌的抑菌活性及最低抑菌浓度(MIC),旨在为桦菌芝活性的进一步研究补充资料,也为其多糖的开发利用提供依据。

1 试验材料

1.1 试药与试剂

桦菌芝:陕西省商洛市镇安县,经陕西中医药大学杨新杰副教授鉴定为多孔菌科桦菌芝的菌体;

DPPH:分析纯,北京中生瑞泰科技有限公司;

ABTS:分析纯,上海华蓝化学科技有限公司;

无水乙醇:分析纯,上海红岩试剂厂;

BHT:分析纯,郑州超群化工食品有限公司;

抗坏血酸(V_C)、过硫酸钾:分析纯,天津科密欧化学试剂有限公司;

试验用水均为纯化水;

大肠杆菌[CMCC(B)44102]、金黄葡萄球菌[CMCC(B)26003]、枯草杆菌[CMCC(B)63501]、四联球菌[CMCC(B)72743]:中国微生物菌种保藏中心;

青霉素钠(A090702511):河北新张药股份有限公司。

1.2 仪器与设备

植物粉碎机:FZ102型,上海洪纪仪器设备有限公司;

紫外—可见分光光度计:UV-1800型,北京莱茵赛威科技有限公司;

电子天平:FA1004B型,苏州江东精密仪器有限公司;

电动离心机:80-1型,江苏中大仪器科技有限公司;

数显电热恒温水浴锅:DZKW-S-6型,成都一科仪器设备有限公司;

超声波清洗器:KO5200DE型,上海瑞兹仪器设备有限公司;

恒温培养箱:BPX-82型,上海博迅实业公司。

1.3 试验方法

1.3.1 桦菌芝多糖的制备 称取预处理后的桦菌芝药材粉末 20 g,参照陈胜发等^[10]的方法提取桦菌芝多糖。

1.3.2 抗氧化活性测定

(1) 供试品、对照品的制备:参照文献^[11]的方法并

修改。配制 2.0 mg/mL 的多糖样品溶液 50 mL,再分别稀释成 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0 mg/mL,待用,同浓度配制 BHT 和 V_C 对照品溶液,供抗氧化活性测定。

(2) DPPH 自由基清除活性的测定:参照文献^[12]的方法并修改。取各浓度样品液 2 mL,加入新配制的稳定 DPPH 自由基溶液(1 × 10⁻⁴ mol/L) 2 mL,摇匀,共 10 组,室温下避光放置 30 min,测定 517 nm 处吸光度值。以无水乙醇为空白对照,以 BHT 溶液和 V_C 溶液为阳性对照,并按式(1)计算 DPPH 自由基清除率。

$$C = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

C——DPPH 自由基清除率, %

A_i——多糖样品与 DPPH 自由基混合溶液吸光度;

A_j——多糖样品与无水乙醇混合溶液吸光度;

A₀——DPPH 自由基和无水乙醇混合溶液吸光度。

(3) ABTS 自由基清除活性的测定:参照文献^[13]的方法并修改。将 ABTS 溶液与不同浓度的多糖样品溶液按体积比 19 : 1 配制成 4 mL 的混合溶液,摇匀,室温下避光放置 6 min,测定 734 nm 处吸光度值,以无水乙醇为空白对照,以 BHT 和 V_C 为阳性对照,并按式(2)计算 ABTS⁺ 自由基清除率。

$$C = \left(1 - \frac{A_1}{A_0}\right) \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

C——ABTS 自由基清除率, %

A₁——多糖样品与 ABTS 自由基混合溶液吸光度;

A₀——多糖样品与无水乙醇混合溶液吸光度。

1.4 抑菌活性测定

1.4.1 菌种活化 选取大肠杆菌、金黄葡萄球菌、四联球菌、枯草杆菌 4 种菌种,在琼脂培养基上划线培养,37 °C 倒置培养 24 h,连续 2~3 次。

1.4.2 供试品、对照品的制备 参照文献^[14]的方法并修改。精密称取适量桦菌芝多糖溶于无菌水,使其浓度为 10.0 mg/mL,用于抑菌活性测定;另取适量桦菌芝多糖溶于无菌水,配制成 10.0 mg/mL 的多糖样品溶液作为母液,采用连续稀释法,配制成 5 组不同浓度(0.625, 1.250, 2.500, 5.000, 10.000 mg/mL)桦菌芝多糖提取物溶液,用于最小抑菌浓度测定。称取 1 g 注射用青霉素钠干粉溶于 100 mL 氯化钠注射液中,得到浓度为 10 mg/mL 注射用青霉素钠溶液为阳性对照。

1.4.3 抑菌活性的测定 参照文献^[15]的方法并修改。取直径为 7 mm 的滤纸片,于不同浓度的多糖溶液及对照品溶液中浸泡 2 h,贴于琼脂平板中,37 °C 培养 24 h。用浸有无菌水的滤纸片作为空白对照,青霉素钠为阳性药物对照。每菌种平行 3 个,测定抑菌圈直径。

1.4.4 最低抑菌浓度的测定(MIC) 参照延永等^[16]的方法并修改。取 10.0 mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基、100.0 μ L菌悬液(105~106 CFU/mL)和 2.0 mL 不同浓度桦菌芝多糖溶液于锥形瓶中,37 $^{\circ}$ C下振荡培养 24 h,测定 517 nm 处吸光度。吸光度为 0 的培养基中加入的秦岭龙胆提取物溶液为最低抑菌浓度(MIC)。

1.5 统计学分析

所有数据采用 SPSS 17.0 软件处理,采用邓肯氏法进行显著性分析, $P < 0.05$ 为显著性差异。所有试验重复 3 次,结果以平均值 \pm 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 抗氧化能力

2.1.1 清除 DPPH 自由基的能力 由图 1 可知,桦菌芝多糖对 DPPH 自由基具有较强的清除作用,当浓度为 0.2~2.0 mg/mL 时,DPPH 自由基清除率随多糖浓度的增加而增强;当浓度为 1.2 mg/mL 时,桦菌芝多糖对 DPPH 自由基的清除率(76%)高于对照品 BHT(74%),但低于对照品 Vc(79%);当浓度为 1.4 mg/mL 时,桦菌芝多糖对 DPPH 自由基的清除率(82%)均高于对照品 BHT(76%)和 Vc(81%);当浓度为 1.2~2.0 mg/mL 时,桦菌芝多糖对 DPPH 自由基的清除率均高于对照品 BHT 及 Vc,表明桦菌芝多糖的抗氧化效果较好,可以作为植物抗氧化剂使用。

2.1.2 清除 ABTS 自由基的能力 由图 2 可知,当浓度

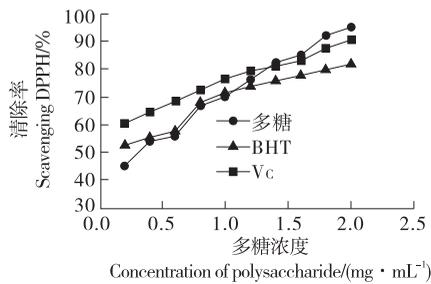


图 1 桦菌芝多糖对 DPPH 自由基清除率的影响

Figure 1 Free radical scavenging capacity to DPPH of *Phropolyporus fomentarius* polysaccharides

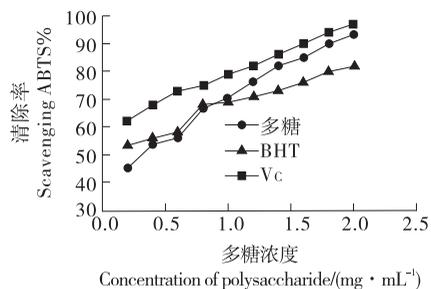


图 2 桦菌芝多糖对 ABTS 自由基清除率的影响

Figure 2 On ABTS cation radical scavenging effect of *Phropolyporus fomentarius* polysaccharides

为 0.2~2.0 mg/mL 时,桦菌芝多糖对 ABTS 自由基的清除能力与溶液浓度呈正相关。当供试品浓度为 1.0 mg/mL 时,桦菌芝多糖对 ABTS 自由基的清除率(70%)高于对照品 BHT(69%),且清除率随多糖浓度的增大而显著增强($P < 0.05$);相同浓度下桦菌芝多糖与对照品 BHT、Vc 间具有显著性差异($P < 0.05$),说明一定浓度范围内的桦菌芝多糖对 ABTS 自由基有很好的清除作用。

综上,桦菌芝多糖对 DPPH 自由基和 ABTS 自由基有很好的清除作用,可以直接作用于自由基或间接消耗掉容易生产自由基的物质,抑制氧化反应的发生^[17],起到抗氧化的作用。

2.2 桦菌芝多糖的抑菌能力

2.2.1 对细菌的抑制效果 由表 1 可知,桦菌芝多糖对大肠杆菌、金黄葡萄球菌、枯草杆菌、四联球菌具有不同程度的抑制作用,其抑菌效果与对照品青霉素钠之间无显著性差异($P > 0.05$),但 4 种指示菌间的抑菌作用具有显著性差异($P < 0.05$)。其中,桦菌芝多糖对大肠杆菌的抑制作用最强,抑菌直径为(12.24 \pm 2.16) mm,接近阳性对照青霉素钠的[(12.36 \pm 1.86) mm],对四联球菌的抑制较弱,抑菌直径为(3.54 \pm 0.76) mm。后续可通过大孔树脂色谱、凝胶过滤色谱、硅胶柱色谱等分离方法,筛选出抑菌活性成分。

2.2.2 最小抑菌浓度(MIC) 由表 2 可知,桦菌芝多糖

表 1 桦菌芝多糖对 4 种指示菌的抑制效果[†]

Table 1 Inhibitory effect of *Phropolyporus fomentarius* polysaccharides from indicator bacteria ($n = 3$)

指示菌	抑菌直径	mm	
		青霉素钠阳性对照	无菌水
大肠杆菌	12.24 \pm 2.16 ^{Aa}	12.36 \pm 1.86 ^{Aa}	—
金黄葡萄球菌	9.62 \pm 1.82 ^{Ab}	9.86 \pm 1.48 ^{Ab}	—
枯草杆菌	8.96 \pm 1.06 ^{Ab}	9.42 \pm 1.04 ^{Ab}	—
四联球菌	3.54 \pm 0.76 ^{Ac}	4.56 \pm 0.48 ^{Ac}	—

[†] 大写字母不同表示同行间有显著性差异($P < 0.05$);小写字母不同表示同列间有显著性差异($P < 0.05$)。

表 2 桦菌芝多糖的最小抑菌浓度[†]

Table 2 The minimum inhibitory concentration of *Phropolyporus fomentarius* polysaccharides

多糖浓度/ (mg · mL ⁻¹)	大肠杆菌	金黄葡萄球菌	枯草杆菌	四联球菌
0.625	—	—	—	—
1.250	+	+	—	—
2.500	+	+	+	—
5.000	+	+	+	+
10.000	+	+	+	+

[†] +表示有抑菌作用;—表示无抑菌作用。

对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌和四联球菌的 MIC 值分别为 1.250, 1.250, 2.500, 5.000 mg/mL, 说明桦菌芝多糖对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌作用最强, 对四联球菌的抑菌活性最弱; 桦菌芝多糖的抑菌活性随浓度的增大而增强。后续可通过一定的分离纯化手段, 得到准确的多糖 MIC 值。

3 结论

利用水提取乙醇沉淀法对桦菌芝多糖进行了提取及初步分离, 研究了桦菌芝多糖的抗氧化和抑菌活性。结果表明, 桦菌芝多糖对 DPPH 自由基和 ABTS 自由基均具有清除作用, 且其清除能力与多糖浓度呈显著正相关, 说明多糖是桦菌芝的主要抗氧化活性成分。体外抑菌试验显示, 桦菌芝多糖对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、四联球菌具有不同程度的抑制作用, 其中对大肠杆菌的抑制作用最强。后续将对桦菌芝多糖进行进一步的分离纯化, 以得到明确的抗氧化、抑菌活性成分, 为桦菌芝多糖的深入研究利用, 以及将其开发成为天然抗氧化剂和抑菌剂方面提供依据。

参考文献

- [1] 张艳华. 桦菌芝抗肿瘤研究及其机制探讨[D]. 西安: 陕西师范大学, 2015: 30.
- [2] 黑育荣, 彭修娟, 杨新杰. 桦菌芝化学成分及药理活性研究进展[J]. 农产品加工, 2019, 17(16): 71-72.
- [3] 王世龙. 桦菌芝多糖对 H22 小鼠瘤组织中 Bax、Bcl-2 的影响[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2013: 22-23.
- [4] 齐彦, 王瑶, 郭丽新, 等. 桦菌芝多糖的抗突变作用研究[J]. 中医药信息, 2011, 28(1): 21-23.
- [5] 张文晋, 王升, 黄璐琦, 等. 中药多糖质量评控方法探析[J/OL]. 中国中药杂志. (2020-03-03) [2020-03-06]. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcmm.20200229.201>.

(上接第 116 页)

4 结论

利用 PLC 控制技术, 结合多颗粒态油辣椒物料的物理特征和企业实际灌装工艺要求, 研制出了新一代油辣椒灌装控制系统, 该控制系统灌装合格率为 100%, 平均灌装速度约为 411 瓶/h, 平均固体含量约为 63.6%, 能够很好地实现多颗粒态油辣椒物料的高速、精确自动化灌装, 满足了企业的生产需求, 且具有良好的通用性与经济性。

参考文献

- [1] 李玉琳. 灌装机控制系统及关键技术研究[D]. 武汉: 武汉理工大学, 2010: 22-62.
- [2] 黄小兰. 基于 PLC 的旋转型灌装机控制系统研究[D]. 武汉: 武汉理工大学, 2012: 9-18.
- [3] 杨政通, 李少波, 何玲, 等. 颗粒黏稠物料自动灌装机控制

- [6] 周欣, 付志飞, 谢燕, 等. 中药多糖对肠道菌群作用的研究进展[J]. 中成药, 2019, 41(3): 623-627.
- [7] 张彦洁, 章丽雅, 吴菁, 等. 糖生物学与免疫调控的病生理意义及进展[J]. 生命科学, 2013, 25(1): 20-27.
- [8] 孟祥云, 汪永锋, 杨丽霞, 等. 中药多糖抗氧化作用及其机制研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(8): 3 504-3 509.
- [9] 周云冬. 植物提取物抑菌活性及抑菌机理[D]. 无锡: 江南大学, 2019: 11-12.
- [10] 陈胜发, 彭修娟, 顾国强, 等. 响应面法优化桦菌芝多糖的超声辅助提取工艺[J]. 化学与生物工程, 2018, 35(10): 31-35.
- [11] 刘婷. 胡桃醌的抗氧化、抑菌活性及抑菌机理研究[D]. 临汾: 山西师范大学, 2018: 8-9.
- [12] 刘胜帅, 薛楠楠, 段银祥, 等. 绿花白千层叶油的 GC-MS 分析及其体外抑菌、抗炎活性研究[J]. 中国药理学杂志, 2019, 54(16): 1 292-1 298.
- [13] 尹显楼, 詹济华, 谭洋, 等. 铁苋菜不同极性萃取物的抗氧化及抑菌活性研究[J]. 食品与机械, 2019, 35(6): 172-176.
- [14] 许海燕, 李亚玲, 彭修娟, 等. 秦岭龙胆挥发油成分分析及抗氧化活性研究[J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(1): 106-109.
- [15] 吴永祥, 程满怀, 江海涛, 等. 白及萃取物的抑菌活性及其二氯甲烷萃取物化学成分分析[J]. 食品与机械, 2017, 33(12): 76-79.
- [16] 延永, 李玉萌, 张亦琳, 等. 红薯叶总黄酮的提取工艺优化及其抑菌、抗氧化活性研究[J]. 广西林业科学, 2018, 47(3): 311-315.
- [17] YANG Hui, HUA Jun-li, WANG Chuang. Anti-oxidation and anti-aging activity of polysaccharide from Malus micromalus Makino fruit wine[J]. Int J Biol Macromol, 2019, 121: 1 203-1 212.

系统研究[J]. 食品机械, 2016, 37(7): 234-236.

- [4] 孙国梁. 油制辣椒自动灌装机设计与研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2015: 49-63.
- [5] 张沂阳. 油制辣椒灌装机控制系统的设计[D]. 贵阳: 贵州大学, 2015: 42-63.
- [6] 胡飞, 彭秀英, 李荣隆. 油性多颗粒态物料自动灌装机控制系统的研究[J]. 制造业自动化, 2014(20): 97-99.
- [7] 胡飞. 自动灌装机输送机构及控制系统的研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2015: 61-82.
- [8] 阮友德. PLC、变频器、触摸屏综合应用实训[M]. 北京: 中国电力出版社, 2009: 1-2.
- [9] 刘明. PLC 在工业自动化控制中的应用[J]. 江苏科技信息, 2014(11): 40-41.
- [10] 廖常初. PLC 编程及应用[M]. 北京: 机械工业出版社, 2013: 1-3.