

琅琊山树舌多糖的抑菌及抗氧化性研究

殷培峰 (滁州学院生物与食品工程学院, 安徽滁州 239000)

摘要 为进一步开发、利用树舌资源,对琅琊山树舌进行液体培养,获得树舌菌丝体,采用碱液提取法获得树舌多糖,研究树舌多糖对食品中常见细菌的抑制效果及其抗氧化性。结果表明:树舌多糖具有一定的抑菌性能,且对枯草芽孢杆菌的抑制效果最好。树舌多糖具有一定的清除超氧阴离子、羟自由基的能力及还原能力,且在一定浓度范围内,其抗氧化能力与多糖的质量浓度呈正相关性。

关键词 多糖;抑菌;抗氧化

中图分类号 S646 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)36-14032-03

Bacteriostatic and Antioxidant Activity of Polysaccharides Produced by Langya Mountain *Ganoderma Applanatum*

YIN Pei-feng (School of Biology and Food Engineering, Chuzhou University, Chuzhou, Anhui 239000)

Abstract For the further research and utilize the resources of *Ganoderma Applanatum*, the strains were got through spores separation and polysaccharides were extracted from mycelia through microwave extraction after liquid culture. The polysaccharide was used to investigate the bacteriostatic activity and their antioxidant effect w in terms of reducing power activity, hydroxyl and superoxide anion free radical scavenging activity, polysaccharide antibacterial and tree tongue oxidation stability. The results showed that the extract had antibacterial properties, especially to bacillus subtilis, and the polysaccharides had some superoxide anion and hydroxyl free radical scavenging activity and reducing power activity in a concentration-dependent fashion. And in a certain concentration range, its antioxidant ability and the polysaccharide is in a concentration-dependent fashion.

Key words Polysaccharide; Antibacterial; Antioxidant

安徽省滁州市琅琊山地区共有大型真菌4纲8目23科47属91种^[1]。树舌是其中一种,为真菌门(Eumycota)层菌纲(Hymenomyces)非褶菌目(Aphyllophorales)真菌,隶属灵芝科(Ganodermataceae)灵芝属(*Ganoderma*),又称树舌灵芝,几乎无柄,菌盖半圆形,表面灰色,渐变褐色,有同心环纹棱,基部常下延,宽(5~35)cm×(10~50)cm,主要生长在阔叶树的枯木上。树舌是我国传统的天然药物,含有多种活性成分,包括多糖、甾体化合物、三萜、脂类、氨基酸、多肽、蛋白质类、生物碱类、酚类、内酯、香豆素类和甙类以及微量元素等,现对其研究主要集中在抗癌、消炎、止痛等方面。树舌多糖是重要的活性成分之一,目前,国内外对树舌多糖研究报道较多,主要集中在多糖成分及结构方面,该糖具有抗肿瘤、提高机体免疫力的作用。笔者在分离菌种基础上,采用液态培养法培养菌丝体,碱液提取,乙醇沉淀,seveg去蛋白,丙酮等洗涤,对获取的多糖进行抑菌及体外抗氧化作用研究,为琅琊山树舌多糖的生产与应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种。树舌菌种采于琅琊山,采用孢子分离法纯化菌种,保存于滁州学院生物学实验室。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*);黑曲霉(*Aspergillus niger*),啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)购于广东省微生物保藏中心。

1.1.2 主要试剂与药品。Sevag试剂,浓盐酸,酵母膏,三氯化铁,磷酸二氢钾,硫酸锌,铁氰化钾,硫酸镁,95%乙醇,三氯甲烷,Tris-HCl,水杨酸,正丁醇,三氯乙酸,双氧水,焦性没

食子酸,硫酸亚铁,以上均为分析纯。

1.1.3 主要仪器。洁净工作台(SW-SF-LFD),旋转蒸发器(RE-52-AA),蒸汽灭菌锅(YXQ-LS-50A),光照培养箱(LRH-250-G),电热鼓风干燥箱(DGX-9073BC-1),微量高速离心机(IEC Multi),落地式摇床(481),冷冻干燥机(LGJ-10B),旋转蒸发仪(RE-85Z),电热鼓风干燥箱(DGX-9073BC-1)等。

1.1.4 主要培养基。树舌液体培养基:可溶性淀粉3%、黄豆粉1.5%、酵母膏0.3%、磷酸二氢钾0.3%、硫酸锌0.002%、硫酸镁0.1%^[2]。细菌培养基:牛肉膏3g,蛋白胨5g,琼脂20g,NaCl5g,蒸馏水1000ml,调pH为7.0。真菌培养基:20%的土豆汁1000ml,葡萄糖20g,琼脂20g,调pH为7.2。酵母菌培养基:酵母膏10g,蛋白胨10g,葡萄糖20g,琼脂15~20g,水1000ml,pH自然。

1.2 方法

1.2.1 树舌液体培养。将菌种接种于斜面培养基进行培养,在25℃下菌丝长满整个斜面,挑取生长旺盛的菌丝配制成5ml菌悬液,接种于树舌液体培养基中,在25℃、100r/min的恒温振荡器上振荡培养。采集15d振荡培养的菌丝,将菌丝用无菌水经4层纱布过滤清洗3次以上,去除液态培养基成分,菌丝于80℃电热鼓风干燥箱中干燥,用于多糖提取^[3]。

1.2.2 多糖提纯。①多糖提取。称取菌丝体10g,加入400ml浓度4%NaOH,80℃条件下提取4h,将浸提液经4层纱布过滤,去除残渣,取滤液;滤液于旋转蒸发器浓缩至原来的1/5,冷却后,3000r/min离心,去沉淀,在液体中边搅拌边加入3倍体积的无水乙醇,4℃下静置过夜,8000r/min离心8min得沉淀物,脱色,之后沉淀物用少量水溶解,加入等体积的sevag试剂,3000r/min离心,然后将上清液吸出,加入3倍体积无水乙醇,8000r/min离心8min,将沉淀用乙醚、丙酮洗涤,真空干燥,得粗多糖^[4]。②多糖纯化。交联葡聚糖

基金项目 滁州学院自然科学项目(2012kj012B)。

作者简介 殷培峰(1979-)男,山东临沂人,实验师,在读博士,从事大型真菌资源开发应用方面的研究。

收稿日期 2013-11-03

G-100 悬浮液边搅拌边装入层析柱 30 cm, 继续加入 3 ml 缓冲液, 稳定 10 min 后, 用浓度 0.05 mol/L NaCl 溶液平衡。取粗多糖 0.2 g 溶于 20 ml 双蒸水中, 沿管内壁轻轻加进样品, 打开出口, 使样品缓慢进入凝胶内, 至胶面露出, NaCl 溶液进行洗脱。以 10 滴/min, 5 min/管的速度进行收集。将每管收集液加入缓冲液至 4 ml, 浓度 8% 苯酚 1.0 ml, 浓硫酸 5.0 ml, 45 °C 水浴 30 min, 在 490 nm 处测其吸光度, 取主峰多糖用于试验。

1.2.3 抑菌试验。①菌悬液的制备。受试菌种活化: 配制培养基, 灭菌, 冷却, 接种, 于霉菌培养箱中培养(大肠杆菌和枯草芽孢杆菌培养条件为: 培养温度 37 °C, 培养时间 24 h, 金黄色葡萄球菌和酵母培养温度分别为 37、28 °C, 培养时间 48 h)。菌悬液的制备: 用接种环挑取半环菌种, 在盛有无菌生理盐水的刻度试管, 涡旋均匀, 梯度稀释至 10^{-7} , 试验选用终浓度约为 $10^7 \sim 10^8$ cfu/ml 稀释液。②多糖最低抑菌浓度(MIC)的测定。取用打孔器制取的直径为 6 mm 的圆形滤纸片, 150 °C 干热灭菌 2 h, 分别放入浓度为 20.000、10.000、5.000、2.500、1.250、0.125 mg/ml 的多糖溶液, 浸泡 1 h。融化培养基, 倒平板, 待冷却凝固后, 取 200 μ l 菌悬液, 均匀涂布于平板, 10 min 后^[5-6], 用尖头镊子夹取滤纸片于平板, 每平板放 3 片, 3 次重复, 1 h 后放相应试验条件下倒置培养。通过测量滤纸片抑菌圈的直径大小, 计算抑菌效果。③测定树舌多糖抑菌作用。测定浓度 20.000 mg/ml 树舌多糖溶液的抑菌效果, 试验过程同上。

1.2.4 抗氧化性能试验。①清除超氧阴离子自由基的测定^[7-9]。用浓度 10 mmol/L HCl 溶解邻苯三酚, 制得浓度 250 mmol/L 的溶液。浓度 0.1 mol/L 的 Tris-HCl (pH=8.2) 缓冲液 4.5 ml, 预热至 25 °C, 加入 20 μ l 的邻苯三酚溶液, 充分摇匀, 加入不同浓度的 1 ml 样品液, 每隔 30 s 测 325 nm 处吸光

度值($A_{325\text{nm}}$)。每隔 30 s 记 1 次, 一直记到 4 min。对照管以 20 μ l 浓度 10 mmol/ml HCl 代替邻苯三酚。公式为: 清除率 $S(\%) = (F_{\text{空}} - F_{\text{样}}) / F_{\text{空}} \times 100$ 。式中, $F_{\text{空}}$ 为对照溶液吸光度, $F_{\text{样}}$ 为被测液吸光度。②清除羟基自由基($\cdot\text{OH}$)的测定^[10-11]。参照钟耀广方法, H_2O_2 与 Fe^{2+} 产生 $\cdot\text{OH}$ 在体系内加入水杨酸捕捉 $\cdot\text{OH}$ 并产生有色物质。反应体系: 浓度 8.8 mmol/L H_2O_2 1 ml、浓度 9 mmol/L FeSO_4 1 ml、浓度 9 mmol/L 水杨酸-乙醇 1 ml、待测溶液 1 ml, H_2O_2 最后加入。37 °C 反应 0.5 h 后, 以蒸馏水为参比, 在 510 nm 下测定吸光度。以浓度 9 mmol/L FeSO_4 1 ml、浓度 9 mmol/L 水杨酸-乙醇 1 ml、不同浓度多糖溶液 1 ml 和蒸馏水 1 ml 作为待测溶液的本底吸收值。公式为: 清除率($\%$) = $[A_0 - (A_x - A_{x_0})] / A_0 \times 100$ 。式中, A_0 为不加糖液的空白对照液的吸光度; A_x 为加入待测溶液后的吸光度; A_{x_0} 为无显色剂时多糖的本底吸收值。③还原力的测定^[12-14]。参照李润丰方法, 向试管中加入 2.5 ml 多糖样品液和 2.5 ml 浓度 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH=6.6) 后加入 2.5 ml 浓度 1% 铁氰化钾溶液, 涡旋振荡, 置 50 °C 水浴锅 20 min, 取出快速冷却, 加入 2.5 ml 浓度 10% 三氯醋酸, 涡旋振荡后离心 (4 000 r/min \times 10 min), 取上清液 2.5 ml, 加 2.5 ml 蒸馏水及 0.5 ml 浓度 0.1% 三氯化铁, 涡旋振荡, 10 min 后在 700 nm 处测吸光度值 ($A_{700\text{nm}}$), 同时做空白对照试验。

2 结果分析

2.1 树舌多糖最低抑菌浓度(MIC)测定结果 由表 1 可知, 树舌多糖对金黄色葡萄球菌、酿酒酵母、大肠杆菌的最低抑制浓度为 10.000 mg/ml, 对枯草芽孢杆菌的最低抑制浓度为 5.000 mg/ml, 对黑曲霉的最低抑制浓度为 20.000 mg/ml, 且对枯草芽孢杆菌的抑菌效果最好。

2.2 树舌多糖对食品中常见菌的抑制作用 由表 2 可知,

表 1 树舌多糖对各受试菌的抑菌圈直径

| 供试菌种 | 树舌多糖浓度//mg/ml | | | | | | MIC mg/ml |
|---------|---------------|-------|-------|--------|--------|--------|--------------|
| | 1.560 | 3.125 | 6.250 | 12.500 | 25.000 | 50.000 | |
| 大肠杆菌 | - - | - - | - - | - | + | + | 10.000 |
| 金黄色葡萄球菌 | - - | - - | - - | - | + | + | 10.000 |
| 枯草芽孢杆菌 | - - | - - | - | + | + | ++ | 5.000 |
| 黑曲霉 | - - | - - | - - | - | - | + | 20.000 |
| 酿酒酵母 | - - | - - | - - | - - | + | + | 10.000 |

注 “- -”表示无抑菌圈,“-”表示抑菌圈在 7~8 mm,“+”表示抑菌圈在 8~10 mm,“++”表示抑菌圈在 10 mm 以上。

树舌多糖对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、黑曲霉、酿酒酵母等常见菌有一定抑制作用, 其中对枯草芽孢杆菌的抑菌效果最好。

表 2 树舌多糖对食品中常见菌的抑制作用

| 编号 | 供试菌种 | 抑菌直径//mm |
|----|---------|------------------|
| 1 | 大肠杆菌 | 9.03 \pm 0.67 |
| 2 | 金黄色葡萄球菌 | 9.92 \pm 0.35 |
| 3 | 枯草芽孢杆菌 | 11.45 \pm 0.23 |
| 4 | 黑曲霉 | 8.00 \pm 0.12 |
| 5 | 酿酒酵母 | 9.65 \pm 0.54 |
| 6 | 无菌水 | - |

注 “-”表示无抑菌效果, 数据为 3 次重复的平均值。

2.3 清除超氧阴离子自由基测定结果 超氧阴离子是生物体内第 1 个氧自由基, 为其他活性氧的前体, 对生物体内细胞、酶、DNA 及不饱和脂肪酸等物质均能产生影响。以 Vc 作为阳性对照, Vc 浓度为 1.000 mg/ml 时, 清除率为 49%。由图 1 可知, 树舌多糖具有清除超氧阴离子自由基的能力, 且随多糖浓度的增大而增加。当多糖浓度为 3.000 mg/ml 时, 对超氧阴离子自由基的清除率可达 40%, 随着浓度的增加, 清除效果没有明显增加。与浓度 1.000 mg/ml 的 Vc 清除率接近。

2.4 清除羟基自由基($\cdot\text{OH}$)测定结果 羟基自由基是 1 种重要的活性氧, 从分子式上看是由氢氧根(OH^-)失去 1 个

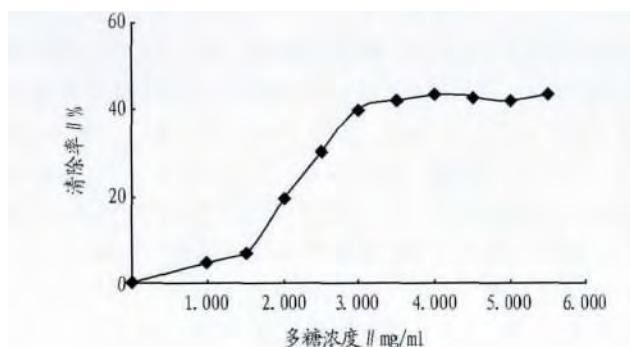


图1 树舌多糖对超氧阴离子自由基的清除作用

电子形成。羟基自由基具有极强的得电子能力,也就是氧化能力,氧化电位2.8 V,是自然界中仅次于氟的氧化剂,可以通过电子转移、加成以及脱氢等方式与生物体内的多种分子作用,造成糖类、氨基酸、蛋白质、核酸和脂类等物质的氧化损伤,使细胞坏死或突变,羟基自由基还与衰老、肿瘤、辐射损伤和细胞吞噬等有关。以V_c作为阳性对照,V_c浓度为1.000 mg/ml时,清除率为45%。由图2可以看出,树舌多糖有明显的清除羟基自由基的作用,且在浓度5.000 mg/ml范围内,随浓度的增加呈递增趋势,浓度1.000 mg/ml的树舌多糖对羟基自由基的清除率为24%,低于V_c的45%。而当浓度达到4.500 mg/ml时,多糖的清除率为60%。之后随着浓度的增加,清除率没有明显增加。

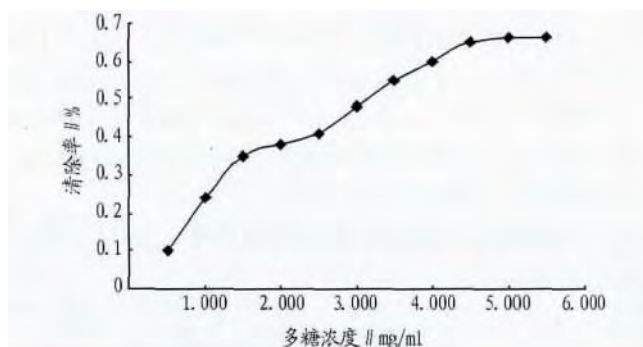


图2 树舌多糖对羟基自由基的清除作用

2.5 还原力的测定结果 还原力强表明样品具有很好的电子供应,其抗氧化性也就越强。原理为: $K_3Fe(CN)_6 + \text{样品} \rightarrow K_4Fe(CN)_6 + \text{样品氧化物}$ $K_4Fe(CN)_6 + Fe^{3+} \rightarrow Fe_4[Fe(CN)_6]_3$ 。在反应体系中,还原物质与铁氰化钾反应生成亚铁氰化钾,再与3价铁离子反应生成普鲁士蓝,在波长700 nm处有特异吸收,吸光度越大,则样品的还原力越大。以V_c作阳性对照,V_c浓度为1.000 mg/ml时,吸光度为0.48。不同浓度多糖的还原力测定结果见图3。由图3可知,树舌多糖表现出一定的还原能力,在浓度为6.000 mg/ml内,还原力效力随浓度的增加而增大,同浓度的V_c所表现出的还原力是树舌多糖的1倍左右。

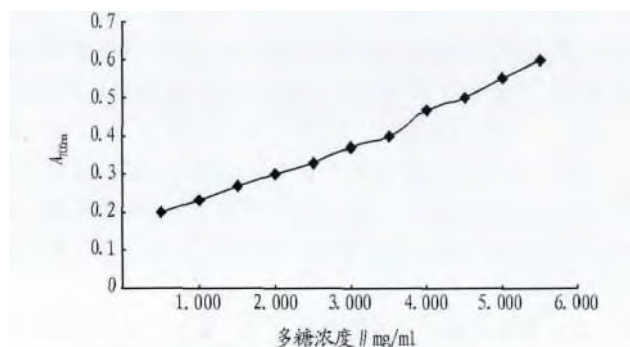


图3 树舌多糖的还原力效力

3 结论

试验结果表明,琅琊山树舌多糖具有抑菌作用。抑菌效果随多糖浓度的增大而增强。树舌多糖对金黄色葡萄球菌、酿酒酵母、大肠杆菌的最低抑制浓度为10.000 mg/ml,对枯草芽孢杆菌的最低抑制浓度为5.000 mg/ml,对黑曲霉的最低抑制浓度为20.000 mg/ml,且对枯草芽孢杆菌的抑菌效果最强。

树舌多糖有一定的抗氧化能力,在试验质量浓度范围内,树舌多糖的还原能力随质量浓度的增大而增加,其中,当多糖质量浓度为3.000 mg/ml时,超氧阴离子自由基清除能力达40%;多糖质量浓度为4.500 mg/ml时,对羟基自由基的清除能力达60%,且具有一定的还原力。试验结果表明,树舌多糖具有抑菌效果和抗氧化性能。

参考文献

- [1] 柴新义,汪美英,张彬,等.安徽省琅琊山大型真菌资源初步调查[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2007,35(12):217-221.
- [2] 朱家骥,张琪晓,李元梅.树舌液体培养基及培养条件试验[J].浙江食用菌,2009,17(4):26-27.
- [3] 于海茹,李艳茹,许广波.长白山树舌在液体培养中菌丝体生长及多糖得率变化[J].食用菌,2008(2):238-239.
- [4] 李志洲,杨海清,邓百万.红汁乳菇多糖提取最佳工艺研究[J].中国食用菌,2003,22(5):40-43.
- [5] 白丹,常适滔,李大海,等.灵芝多糖抑菌活性初探[J].华北农学报,2008(23):282-285.
- [6] 刘莹.三种食用菌粗多糖体外抗菌活性研究[J].食用菌,2009(2):66-68.
- [7] 魏行,程明,冯睿,等.碱性菜籽多糖的提取条件优化及体外抗氧化活性研究[J].食品科学,2007,28(8):195-198.
- [8] 郭晓强,颜军,郭晓勇,等.决明子水溶性多糖的纯化及抗氧化活性研究[J].食品科学,2007,28(8):205-208.
- [9] 许平.黄瓜多糖抗氧化活性研究[J].重庆工商大学学报:自然科学版,2009,26(1):54-56.
- [10] 金鸣,蔡亚欣,李金荣,邻二氮菲-Fe²⁺氧化法检测H₂O₂/Fe²⁺产生的羟自由基[J].生物化学与生物物理进展,1996,23(6):553-555.
- [11] 王多宁,张小莉,杨颖.百合多糖对羟自由基的清除作用[J].陕西中医学院学报,2006,29(4):53-55.
- [12] 严成,严夏.枸杞多糖提取工艺比较及体外抗氧化性研究[J].食品科学,2008,29(17):183-187.
- [13] 钟耀广,林楠,王淑琴,等.香菇多糖的抗氧化性能与抑菌作用研究[J].食品科技,2007(7):141-144.
- [14] 李润丰,赵月卿.不同种类茶提取物抗氧化活性的研究[J].安徽农业科学,2009,37(9):4134-4136.