

山茱萸多糖抑菌活性研究

赵艳艳, 张晓虎, 王晨霏, 屈顶柱

(商洛学院 生物医药与食品工程学院, 陕西 商洛 726000)

摘要: 探讨山茱萸多糖对细菌和真菌的抑菌活性。以陕西商洛产山茱萸为原料, 采用水提醇沉法提取多糖, 用滤纸片法检测山茱萸多糖抑菌效果。结果表明, 山茱萸多糖对大肠杆菌有很强的抑菌效果, 最小抑菌浓度为 $0.0625 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 对变形杆菌、绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌、链球菌有较强的抑菌效果, 最小抑菌浓度为 $0.125 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 对枯草芽孢杆菌的最小抑菌浓度为 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 对黑曲霉菌和酵母菌基本没有抑菌效果。山茱萸多糖对细菌有较强的抑菌活性, 对真菌则没有抑菌活性, 对革兰氏阳性菌的抑菌活性大于革兰氏阴性菌。

关键词: 山茱萸多糖; 水提液; 抑菌浓度; 抑菌活性

山茱萸 (*Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.) 又名蜀枣, 始载于《神农本草经》, 是山茱萸科 Cornaceae 山茱萸属 Cornus 植物山茱萸的干燥成熟果肉。山茱萸作为一种名贵药材, 具有滋阴补阳的作用, 并具有多种药理活性^[1]。山茱萸多糖是山茱萸的一种重要的化学成分, 具有较强的生物活性, 近年来成为研究热点之一。研究表明山茱萸多糖主要由阿拉伯糖、半乳糖、鼠李糖和葡萄糖组成^[2]。山茱萸多糖具有免疫调节作用^[3]、抗氧化作用^[4]、抗肿瘤作用^[5]、降血糖作用^[6]、抗病毒作用^[7]等, 但是对于山茱萸多糖的抑菌活性研究较少。本研究通过对山茱萸进行提取、分离纯化, 得到山茱萸多糖, 选用金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、酵母菌, 研究山茱萸多糖的抑菌活性。

1 材料与方法

1.1 材料

山茱萸, 产于陕西商洛, 经商洛学院资深专家鉴定为山茱萸; 实验用水为超纯水; 菌种主要为细菌类: 大肠杆菌、变形杆菌、绿脓杆菌、链球菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌; 真菌类: 黑曲霉菌和酵母菌。培养基: 细菌采用牛肉膏固体培养基^[9], 黑曲霉菌采用马铃薯培养基^[10], 酵母菌采用酵母膏胨葡萄糖 (YPD) 琼脂培养基^[11]。

1.2 仪器

电子天平、超纯水制备仪、电热恒温水浴锅 (上海康华生化仪器制造厂)、高速冷冻离心机 (Backman 公司)、真空干燥箱、无菌操作台。

1.3 试验方法

1.3.1 山茱萸多糖的提取 取于 60°C 烘干, 粉碎的山茱萸粗粉 50 g, 加入 150 mL 无水乙醇浸泡 24 h 后, 干燥。加 4 倍体积的超纯水于 80°C 提取 3 次, 每次提取 3 h, 合并三次提取液。对提取液离心, 取上清液; 上清液经过微孔滤膜超滤截留, 得到所要分子量的多糖溶液。对超滤的截流液用 Sevage 法除蛋白质, 并分别用 60% 乙醇溶液、75% 乙醇溶液和无水乙醇分级醇沉, 合并沉淀, 减压浓缩, 得到山茱萸多糖。

1.3.2 供试菌的活化及菌悬液的制备 供试菌置于斜面培养基, 细菌类于 37°C 活化 24 h, 霉菌类于 28°C 活化 48 h, 酵母菌于 30°C 活化 24 h。精挑菌苔于无菌水中, 制备成 $10^6 \sim 10^8$ 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的菌悬液。

1.3.3 山茱萸多糖抑菌效果检测 采用滤纸片法检测山茱萸多糖抑菌效果。用蒸馏水将山茱萸多糖配制成 5.0、10.0、15.0、20.0、25.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 备用。在无菌条件下取直径为 6 mm 的灭菌滤纸片, 分别放入山茱萸多糖溶液中浸泡 4 h, 取出置于干燥箱中干燥。无菌操作台开紫外灯杀菌 30 min 后, 在无菌台上将灭菌

收稿日期: 2016-05-17 修回日期: 2016-06-20

基金项目: 商洛学院服务地方经济发展专项 (14SKY-FWDF005); 陕西省大学生创新创业训练计划项目 (1817)。

第一作者简介: 赵艳艳 (1984-), 女, 陕西洛南人, 硕士, 讲师。

后的培养基慢慢倾入无菌培养皿中使其冷却凝固。移取 0.2 mL 制备好的菌悬液分别加到以上平皿上,用涂布棒均匀涂布。用镊子夹取浸泡过山茱萸多糖溶液的滤纸片,轻放在培养基表面,每皿 4 片。含细菌培养基置于 37℃ 恒温箱中培养 24 h,含黑曲霉菌培养基置于 28℃ 恒温培养箱中培养 48 h,含酵母菌培养基置于 30℃ 恒温箱中培养 24 h。测量抑菌圈直径大小,比较抑菌效果。有抑菌圈者记为阳性,无抑菌圈者记为阴性。

1.3.4 最低抑菌浓度(MIC)的测定 用蒸馏水将山茱萸多糖配制成 0.5、0.25、0.125、0.0625、0.0313、0.0156 g · mL⁻¹ 六个浓度梯度,分别移取 1 mL 不同浓度的提取液到各培养基中,使药液与培养基充分混匀,凝固冷却后备用。每个浓度重复三次,并设置空白对照组实验。然后将 1.3.3 中出现阳性结果的菌株接种于含药平板,涂布均匀,含细菌培养基置于 37℃ 恒温箱中培养 24 h,含黑曲霉菌培养基置于 28℃ 恒温培养箱中培养 48 h,含酵母菌培养基置于 30℃ 恒温箱中培养 24 h。观察细菌生长状况,以培养基中完全没有菌生长的最低浓度为最低抑菌浓度(Mic)。

1.3.5 温度对山茱萸多糖抑菌活性的影响 采用滤纸片法检测山茱萸多糖抑菌效果。用蒸馏水将山茱萸多糖配制成 25.0 mg · mL⁻¹ 的溶液,备用。分别移取 10 mL 山茱萸供试液至 5 个小烧杯中,在无菌操作台上取直径为 6 mm 的灭菌滤纸片 5 片,分别置入 5 个小烧杯中,并分别在 20℃、25℃、30℃、35℃、40℃ 的水浴条件下加热 4 h,取出,备用。以大肠杆菌为代表菌,采用滤纸

片法测定不同温度下山茱萸多糖的抑菌活性。

1.3.6 pH 对山茱萸多糖抑菌活性的影响 采用滤纸片法检测山茱萸多糖抑菌效果。用蒸馏水将山茱萸多糖配制成 25.0 mg · mL⁻¹ 的溶液,备用。取五个小烧杯,分别移取 10 mL 山茱萸多糖溶液,用 0.1 mol · mL⁻¹ HCl 和 0.1 mol · mL⁻¹ NaOH 配制成 pH 值为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 的溶液,在无菌条件下取直径为 6 mm 的灭菌滤纸片,浸泡 4 h,以大肠杆菌为代表菌,测定不同 pH 下山茱萸多糖的抑菌活性。

1.3.7 时间对山茱萸多糖抑菌活性的影响 用蒸馏水将山茱萸多糖配制成 25.0 mg · mL⁻¹ 的溶液,备用。以大肠杆菌为代表菌,测定山茱萸多糖溶液对其作用时间与抑菌率之间的关系。分别移取山茱萸多糖溶液 10 mL,与 1.0 mL 大肠杆菌菌悬液混合均匀,当作用时间分别为 1、3、5、7、9、11、13h 时,移取 0.5 mL 混合菌悬液于平皿中,于 37℃ 下培养 24 h,计算菌落数,并计算抑菌率。

抑菌率 = (对照菌落数 - 实验菌落数) / 对照菌落数 × 100%

2 结果与分析

2.1 山茱萸多糖对各种菌的抑菌效果

以抑菌圈的有无及直径大小作为山茱萸多糖抑菌效果的测定指标,山茱萸多糖对各种菌的抑菌效果见表 1。由表 1 可以看出,山茱萸多糖对细菌有较好的抑菌作用,尤其是对大肠杆菌、变形杆菌和绿脓杆菌抑菌效果明显;对真菌类的黑曲霉菌和酵母菌抑菌效果不明显。

表 1 不同浓度山茱萸多糖对实验菌的抑菌效果

供试菌种	多糖浓度/(mg · mL ⁻¹)				
	25.0	20.0	15.0	10.0	5.0
大肠杆菌	+++	+++	++	+	+
变形杆菌	+++	++	+	+	+
绿脓杆菌	+++	++	++	+	+
金黄色葡萄球菌	++	+	+	+	+
链球菌	++	++	+	+	+
枯草芽孢杆菌	++	+	+	+	±
黑曲霉菌	-	-	-	-	-
酵母菌	-	-	-	-	-

注:“+”表示有抑菌圈,“+”越多表示抑菌圈直径越大,“-”表示无抑菌圈,“±”表示抑菌圈不明显。

2.2 山茱萸多糖的最小抑菌浓度(MIC)

以有无菌落生长作为山茱萸多糖抑菌效果的测定指标,山茱萸多糖对各种菌的最小抑菌浓度见表2。由表2可以看出,山茱萸多糖对细菌类有较强的抑菌效果,其MIC值分别为:大肠杆菌

$0.0625 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,变形杆菌、绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌、链球菌均为 $0.125 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,枯草芽孢杆菌 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,对黑曲霉菌和酵母菌抑菌效果不明显。

表2 山茱萸多糖的最小抑菌浓度

供试菌种	多糖浓度/ $(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$					
	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0313	0.0156
大肠杆菌	—	—	—	—	+	++
变形杆菌	—	—	—	+	+	++
绿脓杆菌	—	—	—	+	+	++
金黄色葡萄球菌	—	—	—	+	+	++
链球菌	—	—	—	+	+	++
枯草芽孢杆菌	—	—	+	+	++	++
黑曲霉菌	++	++	++	++	++	++
酵母菌	++	++	++	++	++	++

注:“++”表示菌落生长致密,“+”表示菌落生长稀疏,“—”表示无菌落生长。

2.3 温度对山茱萸多糖抑菌活性的影响

以抑菌圈的直径大小作为山茱萸多糖抑菌效果的测定指标,温度对山茱萸多糖抑菌活性的影响见表3。由表3可知,温度对山茱萸多糖抑菌

效果有显著影响,在 35°C 以下,抑菌圈直径随着温度的增大而增大,因为随着温度升高,山茱萸多糖溶液有不同程度的浓缩,溶液浓度增大。在 35°C 时抑菌圈直径最大。

表3 温度对山茱萸多糖抑菌活性的影响

温度/ $^\circ\text{C}$	20	25	30	35	40
抑菌圈直径/mm	11.3	12.4	14.6	16.1	15.7

2.4 pH对山茱萸多糖抑菌活性的影响

以抑菌圈的直径大小作为山茱萸多糖抑菌效果的测定指标,pH对山茱萸多糖抑菌活性的影响见表4。由表4可以看出,酸性条件下,山茱萸

多糖的抑菌活性弱于中性和碱性条件下。多糖在酸性条件下部分降解为单糖和低聚糖,抑菌活性降低。

表4 pH对山茱萸多糖抑菌活性的影响

pH	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
抑菌圈直径/mm	7.1	7.9	16.1	16.8	16.2

2.5 时间对山茱萸多糖抑菌活性的影响

时间对山茱萸多糖抑菌活性的影响见图1。由图1可知,在1~13 h,山茱萸多糖的抑菌率分别为82.2%、81.1%、81.4%、81.2%、80.7%、89.4%和89.9%,在1、3、5、7、9 h,由于处于大肠杆菌生长的稳定期,时间对山茱萸多糖抑菌活性的影响不明显。在11 h和13 h时,大肠杆菌生长处于衰亡期,山茱萸多糖抑菌活性增强。

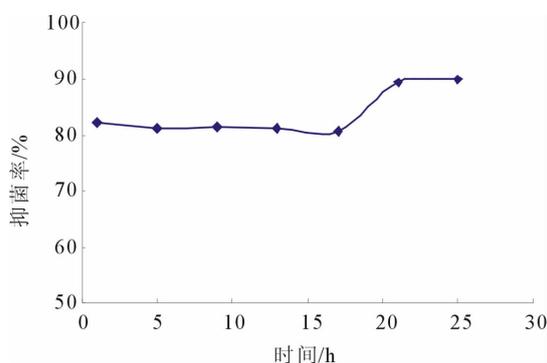


图1 时间对山茱萸多糖抑菌活性的影响

3 结论与讨论

多糖是由 10 个以上的单糖基通过糖苷键连接而成的一类高分子化合物,属于生物活性物质,近年来,多糖的提取纯化、抑菌活性研究、免疫活性等已经成为研究热点。大量学者研究表明,山茱萸水提液(含有多糖成分)对金黄色葡萄球菌的抑菌活性强于其他菌,对绿脓杆菌也有一定的抑菌活性^[9]。有学者研究发现山茱萸水煎液对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、苏云金杆菌和蜡样芽孢杆菌等具有抑菌效果,对霉菌和酵母的抑菌效果不明显^[10~11]。以上研究均未单独对山茱萸多糖进行抑菌活性研究,因此,笔者采用水提醇沉法制备山茱萸多糖,采用滤纸片法测定其对于金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、变形杆菌、绿脓杆菌、链球菌、枯草芽孢杆菌、黑曲霉菌和酵母菌的抑菌效果,并考察了温度、pH 和时间对抑菌效果的影响。研究发现,山茱萸多糖对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、变形杆菌、绿脓杆菌、链球菌和枯草芽孢杆菌均有较强的抑菌效果;以大肠杆菌为例,其最佳抑菌温度为 35℃,最佳 pH 为 8.0,最佳抑菌时间为 11 h。这是因为山茱萸多糖的抑菌活性与其化学结构有一定的关系;当山茱萸多糖的糖苷键被酸水解后,其抑菌活性会大大降低;山茱萸多糖表现出对细菌有较强的抑菌活性,对真菌抑菌活性不明显。山茱萸多糖的具体抑菌机理,有待进一步的研究考察。

参 考 文 献:

[1] 陈汝贤,徐桂云,张瑞,等. 山茱萸多糖 SZYP-2 的结构分析[J]. 分析测试学报,2002,21(01):68-70.
 [2] 杨丽艳. 活性山茱萸多糖 FCP5-A 和 FCAP1 的分离纯化与结构解析[D]. 西北大学,2008.
 [3] 李平,王艳辉,马润宇. 碱提山茱萸多糖的理化性质及抗氧化活性研究[J]. 中草药,2003,34(11):973-976.
 [4] 苗明三,杨云. 山茱萸多糖抗氧化作用研究[J]. 河南中医,2002,22(01):64-67.
 [5] 戴岳,杭秉茜,黄朝林,等. 山茱萸对小鼠免疫系统的影响[J]. 中国药科大学学报,1990,21(04):226-228.
 [6] 吕晓东,张永祥,茹祥斌,等. 山茱萸体液免疫抑制活性成分的药理学导向评价分离[J]. 解放军药理学学报,2002,18(06):357-359.
 [7] 赵武述. 山茱萸的免疫药理研究 II:总苷部分抑制免疫反应的体外效应[J]. 中日友好医院学报,1991,5(02):71-73.
 [8] 姜延伟,王懿萍,吴玉娟,等. 黄连多糖抑菌活性初探[J]. 时珍国医国药,2009,20(01):48-49.
 [9] 黄钰铃,王斌. 山茱萸果肉抑菌物质的提取及抑菌作用研究[J]. 食品科学,2004,25(05):40-43.
 [10] 陈汝贤,徐桂云,张瑞. 山茱萸多糖 SZYP-2 的结构分析[J]. 分析测试学报,2002,21(01):68-72.
 [11] 李中兴,王秀华. 山茱萸对 252 株临床菌株的体外抗菌活性的研究[J]. 中国中医药科技,2000,7(06):390-396.

(上接第 45 页)

表 2 黄瓜

	黄瓜须根	结果层	产量/(kg·667m ⁻²)	维 C/(mg·kg ⁻¹)
使用蚯蚓粪	>1/3	7~8	6 500~7 000	9.5~11
常规(ck)	<1/3	5~6	5 500	8

蚯蚓粪由于其特殊功效,能充分供给植物生长发育过程中所需的各种亿级/克以上的有益微生物和十万级克放线菌,不但能改善土壤环境,而且还能有效抑制土壤病原菌的生长,使植株得以健康生长发育。在施用蚯蚓粪的大棚无须使用农药,同时由于蚯蚓粪的营养全面,和其无毒无害性,生产出的蔬菜均为安全有机蔬菜,应于以推广。

参 考 文 献:

[1] 李晓明,杨晓红,等. 以蚯蚓为链条的低碳循环农业

[J]. 陕西农业科学,2010,(06):95-96.
 [2] 黄福珍. 蚯蚓[M]. 北京:农业出版社,1982.
 [3] 许永利,张俊英,等. 蚯蚓粪综合利用现状[J]. 安徽农业科学,2007,35(23):7179-7180.
 [4] 胡艳霞,孙振钧,等. 蚯蚓粪对黄瓜苗期土传病害的抑制作用[J]. 生态学报,2002,22(07):1 106-1 115.
 [5] 崔玉珍,牛明芬,等. 蚯蚓粪对土壤的培肥作用及草莓产品量和品质的影响[J]. 土壤通报,1998,29(04):156-157.
 [6] 吕振宇,马永良. 蚯蚓粪有机肥对土壤肥力与甘蓝生长品质的影响[J]. 中国农学通报,2005,(12):236-240.