

榆生拟层孔菌粗多糖对 DPPH 自由基清除及抑菌作用研究

唐玉琴, 刘克振, 张瑜, 陈兴银, 洪磊, 沈玲玉

(吉林农业科技学院 生物工程学院, 吉林 吉林 132101)

摘要:以榆生拟层孔菌粗多糖为试材,研究榆生拟层孔菌粗多糖对 DPPH 自由基清除及抑菌作用。结果表明:榆生拟层孔菌粗多糖对 DPPH 自由基具有清除作用,清除率与多糖浓度在一定范围内呈线性关系,即随着粗多糖浓度的增加,清除率逐渐上升。榆生拟层孔菌粗多糖对霉菌几乎没有抑菌作用,而对细菌有较好的抑制作用,对酵母菌也有一定的抑菌作用。说明榆生拟层孔菌粗多糖具有一定的抗氧化及抑菌作用。

关键词:榆生拟层孔菌;粗多糖;DPPH 自由基;抑菌

中图分类号:Q 949.32 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)06-0133-03

榆生拟层孔菌(*Fomitopsis ulmaria* (Sor.; Fr.) Bond. et Sing)属非褶菌目、多孔菌科、拟层孔菌属木腐菌,别名榆层孔,主要分布在吉林、台湾、河南、云南、内蒙古、黑龙江、山西、新疆、四川等地。其生长在榆树等阔叶树干基部或倒木上,菌盖半圆形,较厚,最大直径可达 30 cm,表面白色至土黄色。榆生拟层孔菌是一种珍稀的药用真菌,民间常用此菌入药,具有补骨髓、固精脉等功效。

多糖是真菌的主要生物活性成分,目前关于真菌多糖的研究文献报道极多,如香菇多糖、鸡腿菇多糖、白玉菇多糖、秀珍菇多糖、红菇多糖、藏灵菇多糖、灵芝多糖等,这些真菌多糖普遍具有增强机体免疫功能、抗肿瘤、抑菌、抑制细胞凋亡等生物活性,且这些活性均与真菌多糖的抗氧化性有直接关系^[1-4],因此研究真菌多糖的抗氧化性是研究其它生物活性的基础。目前国内外对榆生拟层孔菌多糖的研究处于空白状态,该研究首先探讨了榆生拟层孔菌多糖对 DPPH 自由基的清除作用,在此基础上测定其抑菌效果,以期为榆生拟层孔菌这一珍稀的药用真菌的进一步开发利用提供技术借鉴。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料:榆生拟层孔菌采集于吉林农业科技学院校园内,经自然风干备用;氯仿、正丁醇、葡萄糖、苯酚、浓硫酸、DPPH、维生素 C 等试剂均为国产分析纯。

供试菌种:大肠杆菌(*Escherichia coli*)、四联球菌(*Micrococcus tetragenus*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)、毛霉(*Mucor strictus*)、根霉(*Rhizopus stolonifer*)、青霉菌(*Penicillus* sp.)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)等均由吉林农业科技学院微生物实验室提供。

仪器:TGL-16M 型高速台式冷冻离心机(江苏湘仪离心机厂);722E 型可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司);HPS-280 型生化培养箱(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司);SW-CJ-2FD 型双人单面净化工作台(苏州净化设备有限公司);FA1004A 型电子天平(上海精天电子仪器有限公司);2D2X-50KB 型立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂)。

1.2 试验方法

1.2.1 榆生拟层孔菌粗多糖提取 采用热水浸法提取榆生拟层孔菌粗多糖,按以下工艺进行:子实体粉碎(过 40 目筛)→加蒸馏水→离心(8 000 r/min, 10 min)→沉淀→浓缩→Sevag 法除蛋白^[5]→离心→浓缩→真空干燥→粗多糖^[6]。

1.2.2 榆生拟层孔菌粗多糖对 DPPH 自由基的清除效果 用无水乙醇配置 0.1 mmol/L 的 DPPH 溶液,避光

第一作者简介:唐玉琴(1964-),女,硕士,教授,现主要从事微生物及食用菌等研究工作。E-mail:335673084@qq.com。

基金项目:微生物重点学科培育资助项目(吉农院合字[2013]第 X003 号);吉林省高等学校大学生创新训练资助项目;吉林农业科技学院大学生科技创新资助项目。

收稿日期:2014-11-13

保存。配置 0.5 mg/mL 的维生素 C 溶液(作为对照)。将测试样品稀释至不同浓度。将 2 mL 测试样品溶液及 2 mL DPPH 溶液加入到同一试管中,摇匀,室温下暗处静置 30 min 后测定其吸光度 A_{sample} ,测定 2 mL DPPH 溶液与 2 mL 蒸馏水混合后的吸光度 A_{control} ,以及 2 mL 测试样品溶液与 2 mL 无水乙醇混合后的吸光度 A_{blank} 。

1.2.3 榆生拟层孔菌粗多糖的抑菌效果 供试菌液的制备:分别将细菌(37℃,24 h)与霉菌(28℃,48 h)活化,然后用无菌生理盐水分别将各供试菌配制成含菌量约为 107~108 cfu/mL 的供试菌液备用^[8]。滤纸片法测定抑菌效果^[9]:用二倍稀释法将榆生拟层孔菌粗多糖溶液稀释成浓度分别为 9.000、4.500、2.250、1.125 mg/mL 4 个浓度梯度^[10]。

1.3 项目测定

DPPH 自由基的清除率按以下公式计算:

$$S(\%) = (1 - \frac{A_1 - A_0}{A_2}) \times 100\% ; \text{式中: } A_1 \text{—样品溶液与 DPPH 溶液混合后的吸光度; } A_0 \text{—蒸馏水与 DPPH 溶液混合后的吸光度; } A_2 \text{—样品溶液与无水乙醇溶液混合后的吸光度}^{[7]}$$

采用滤纸片法测定抑菌圈大小,将直径为 10 mm 的滤纸片浸泡于各浓度粗多糖溶液中 2 h,分别吸取 0.5 mL 各供试菌悬液涂布于平板培养基上,在每个培养基表面放 1 或 2 片浸泡好的滤纸片,然后将细菌类(枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌)置于 37℃ 培养 36 h,真菌类(酵母菌、青霉、毛霉、根霉、黑曲霉)置于 28℃ 培养 48 h,测量各供试菌在不同浓度下的抑菌圈大小,以无菌水组作为对照。重复 6 次并记录。

2 结果与分析

2.1 榆生拟层孔菌粗多糖对 DPPH 自由基的清除作用

由表 1 可以看出,榆生拟层孔菌粗多糖对 DPPH 自由基清除作用与其浓度在一定范围内呈线性关系,即随着粗多糖浓度的增加,其清除率逐渐上升增加,其中,粗多糖浓度在 0.075~0.150 mg/mL 范围内对 DPPH 自由基清除能力变化不明显,在 0.150~0.600 mg/mL 范围

内对 DPPH 自由基清除能力随着粗多糖浓度的增加显著提高。其原因可能是榆生拟层孔菌粗多糖具有一定的还原能力,通过与 DPPH 发生氧化还原反应,达到对 DPPH 的清除。

表 1 榆生拟层孔菌粗多糖对 DPPH 自由基清除作用

Table 1 The scavenging effects of crude polysaccharides from *Fomitopsis ulmaria* (Sor. :Fr.) Bond. et Sing on DPPH radical

粗多糖浓度 (mg · mL ⁻¹)	A_{sample}	A_{control}	A_{blank}	清除率 /%
0.600	0.902		0.883	91.100
0.300	0.292	0.192	0.240	78.300
0.150	0.162		0.064	49.000
0.075	0.152		0.046	44.800

2.2 榆生拟层孔菌粗多糖的抑菌作用

由表 2 可以看出,各浓度粗多糖对霉菌均未出现抑菌圈,对大肠杆菌的最小抑菌浓度为 2.250 mg/mL,对四联球菌的最小抑菌圈浓度为 4.500 mg/mL,对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度为 4.500 mg/mL,对枯草芽孢杆菌的最小抑菌浓度为 9.000 mg/mL,对酵母菌的最小抑菌浓度为 2.250 mg/mL。在 9.000 mg/mL 下,各供试菌的抑菌圈直径分别为 1.510、1.850、1.500、1.550、1.800 mm;在 4.500 mg/mL 下,抑菌圈直径分别为 1.260、1.450、1.400、0.000、1.550 mm;在 2.500 mg/mL 下,抑菌圈直径分别为 1.140、0.000、0.000、0.000、1.210 mm。说明榆生拟层孔菌粗多糖对霉菌几乎没有抑菌作用,而对细菌有较好的抑制作用,对酵母菌也有一定的抑菌作用。其原因可能为霉菌抗逆性强、繁殖能力很强,繁殖方式为有性和无性 2 种方式,且细胞壁主要成分为几丁质较厚,粗多糖溶液不易对其生长产生抑制作用;而对于酵母菌其细胞壁主要成分为葡聚糖和甘露聚糖,粗多糖可能能够通过细胞壁影响其生长代谢过程,从而表现出抑菌效果;而对于原核类的细菌因为其细胞壁主要成分为肽聚糖较薄,其抗逆性相对较差,细胞体积较小,粗多糖溶液很容易影响其周围的环境,进而表现出抑菌效果。

表 2 榆生拟层孔菌粗多糖对各供试菌的最小抑菌浓度(MIC)

Table 2 The minimum inhibitory concentration (MIC) of polysaccharides from *Fomitopsis ulmaria* (Sor. :Fr.) Bond. et Sing on tested strains

粗多糖度 (mg · mL ⁻¹)	平均抑菌圈直径/mm							
	大肠杆菌	四联球菌	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	酵母	青霉	毛霉	根霉
9.000	1.510	1.850	1.500	1.550	1.800	—	—	—
4.500	1.260	1.450	1.400	—	1.550	—	—	—
2.250	1.140	—	—	—	1.210	—	—	—
1.125	—	—	—	—	—	—	—	—
0.000	—	—	—	—	—	—	—	—

3 结论

榆生拟层孔菌粗多糖对 DPPH 自由基具有清除作用,且其浓度与清除率在一定范围内呈线性关系,即随

着粗多糖浓度的增加,其清除率逐渐上升增加。这表明榆生拟层孔菌粗多糖具有一定的体外抗氧化能力。榆生拟层孔菌粗多糖的抗氧化性是其具有其它生物活性的药

理基础。

榆生拟层孔菌粗多糖的抑菌作用表明,其对霉菌几乎没有抑菌作用,而对细菌有较好的抑制作用,对酵母菌也有一定的抑菌作用,因此榆生拟层孔菌粗多糖有可能作为一种新型的抗菌药物,具有较好的开发潜力与应用前景。该研究对榆生拟层孔菌粗多糖的 DPPH 自由基清除及抑菌作用做了初步探讨,尽管其相关研究及机理还有待进一步完善,但该研究对其下一步的研究及开发利用提供了一定的技术借鉴。

参考文献

- [1] 张俊会,王谦. 杏鲍菇多糖的抗氧化活性研究[J]. 中国食用菌,2003,22(2):38-39.
- [2] 韩天龙,李知平. 食用菌子实体多糖的提取工艺研究和保健作用探讨[J]. 吉林工程技术师范学院学报,2005(3):14-16.
- [3] 朱美静. 猴头菌多糖的提取及理化性质研究[D]. 无锡:江南大学,2006.
- [4] 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.
- [5] 董爱文,陈建华,周辉,等. 爬山虎多糖的提取及抑菌作用[J]. 广州食品工业科技,2003,19(3):15-17.
- [6] 辛英姬,方绍海,王筱凡,等. 茶树菇多糖抑菌效果的实验[J]. 食用菌,2011(4):64-65.
- [7] 彭长连,陈少薇. 用清除自由基 DPPH 法评价植物的抗氧化能力[J]. 生物化学与生物物理进展,2000,27(6):658-661.
- [8] 盛伟,方晓阳. 杏鲍菇菌丝体胞内与胞外多糖体外抗氧化活性研究[J]. 中国林副特产,2009(1):7-10.
- [9] 顾有芳,李卫民,李升和,等. 大枣多糖对小鼠四氯化碳诱发肝损伤防护作用的实验研究[J]. 中国中医药科技,2006,13(2):105-107.
- [10] 郑晶泉. 抗氧化剂抗氧化实验研究进展[J]. 国外医学,2000,27(1):37-40.

Study on Effect of *Fomitopsis ulmaria* (Sor. :Fr.) Bond. et Sing *Phellinus Polysaccharide* on Removal of DPPH Freedom Radical and Bacterostation Action

TANG Yu-qin, LIU Ke-zhen, ZHANG Yu, CHEN Xing-yin, HONG Lei, SHEN Ling-yu

(College of Biological Engineering, Jilin Academy of Agricultural Science and Technology, Jilin, Jilin 132101)

Abstract: Taking *Fomitopsis ulmaria* (Sor. :Fr.) Bond et Sing polysaccharides as the research object, the DPPH radical scavenging ability of the test method conducted elm *Phellinus polysaccharide* inhibitory effect and anti-oxidation were studied. The results showed that the inhibitory effect of the selected fungal inhibition zone does not appear on *Escherichia coli* and yeast minimal inhibitory concentration 2. 250 mg/mL, the smallest of the four bacteria and *Staphylococcus aureus* associated suppression concentration of bacteria circle 4. 500 mg/mL, the minimum inhibitory concentration of *Bacillus subtilis* was 9. 000 mg/mL, research in anti-oxidation polysaccharide concentration in the range of 0. 075—0. 150 mg/mL DPPH radical scavenging capacity was not obvious, in with increasing concentration of polysaccharides significantly increased within the range of 0. 150—0. 600 mg/mL.

Keywords: *Fomitopsis ulmaria* (Sor. :Fr.) Bond. et Sing; polysaccharides; DPPH freedom radical; antioxidant

食用菌土法施肥实现增产

知识窗

食用菌到了出菇中后期,大量的养分基本消耗。为了增强出菇后劲,必须适当的追施肥料,可提高产量。

(1)施蘑菇汤:将蘑菇采收加工切下的菇脚和碎菇集中洗净,切成薄片,1 kg 料加水 1~1.5 kg,煮沸 15 min,取滤汁加水 10~15 kg,喷施菇盘或菌袋上,在出菇高峰期时使用,可使子实体肥厚和延长出菇高峰期。

(2)豆浆肥:取黄豆 1 kg,放入水中浸泡后磨成豆浆,滤去杂质,加凉开水 50 kg 搅拌均匀后喷施,可使蘑菇白而粗壮。

(3)盐水肥:取食盐 0.5 kg,加凉开水 50 kg,在出菇高峰期喷施可使菇体洁白。

(4)施牛粪尿:取新鲜的牛粪尿煮沸到泡沫消失,加凉开水 7~8 倍稀释,每隔 2~3 d 喷 1 次,以喷湿盘袋为宜,如有子菇喷后用清水喷 1 次,能促进子菇生长。

(5)鸡粪肥:将 5 kg 鸡粪加水 20 kg 煮沸取汁再加水 100 kg 进行喷雾,可提高菇产量。

(6)草木灰浸出液:用草木灰 12.5 kg 加水 25 kg 浸泡后过滤喷施,可预防食用菌发红。

(7)喷化肥液:用 0.1%~0.2% 的尿素液,每隔 2~3 d 喷 1 次,0.2% 的磷酸二氢钾溶液喷施,可使菇体肥厚,能增产 15%~20%。

(8)淘米液:取淘米液 100 kg,澄清后取上面的清液加葡萄糖 1 kg,于采菇后 3~4 d 开始喷施,可明显增加产量。

(9)松针肥:取鲜松针 1 kg,加水煮沸 20 min,滤去渣加水 15 kg 喷施,可使菇体肥大。

(10)胡萝卜汁:将 10 kg 胡萝卜切碎加水 15 kg 煮沸 15 min,过滤取汁加水 40 倍喷施,可提高菇产量 10%~15%。

(源自中国化肥网)