

# 灰树花水提物的提取及其抑菌功能

柴瑞娟, 孙 晨

(安徽工程大学生物与化学工程学院, 安徽芜湖 241000)

**摘要:**为研究水溶液提取灰树花营养成分, 采用水溶液对灰树花多糖进行了单因素及正交实验提取, 用苯酚-硫酸法对多糖进行了测定。并用滤纸片法研究了灰树花水提物的抑菌能力。正交实验结果表明, 影响灰树花多糖提取率的因素大小顺序依次是: 温度、液料比、提取时间。灰树花多糖的提取最优条件为: 温度80℃、液料比60:1(mL:g)、提取时间2.0h。灰树花水提物对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌都有不同程度的抑制作用, 抑菌圈直径分别为8.74、10.23、12.42mm。

**关键词:**灰树花, 水提物, 正交实验, 多糖, 抑菌性能

## Water extracts from *Grifola frondosa* and antimicrobial function

CHAI Rui-juan, SUN Chen

(College of Biochemical Engineering of Anhui Polytechnic, Wuhu 241000, China)

**Abstract:** The purpose of this research was to extract polysaccharide from *Grifola frondosa*, single factor and orthogonal tests were carried out. The method of phenol-sulfuric acid was used to determine the content of polysaccharide. Antibacterial performance test about water extracts was studied, too. Orthogonal tests showed that optimum conditions of polysaccharide extraction were as follows: extraction temperature 80℃, liquid ratio 60:1(mL:g) and extraction time 2.0h. Water extracts from *G. frondosa* had antibacterial activity to *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, and antibacterial circle were 8.74, 10.23, 12.42mm respectively.

**Key words:** *Grifola frondosa*; water extracts; orthogonal test; polysaccharide; antimicrobial function

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2014)08-0299-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2014.08.059

真菌多糖生物活性复杂而广泛, 其中, 免疫调节活性是研究最主要的活性, 临床上真菌多糖可以作为免疫调节剂用于免疫性缺陷疾病、自身免疫病和肿瘤等疾病的治疗, 如香菇多糖可剂量依赖性地提高IL-2和TNF- $\alpha$ 的基因表达水平和活性, 这表明香菇多糖可诱导某些免疫反应<sup>[1]</sup>。灰树花(*Grifola frondosa*)属担子菌亚门、多孔菌科, 其主要活性成分是灰树花多糖, 因其有 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)<sup>[2-3]</sup>分支, 可以抑制肿瘤生长防止肿瘤细胞转移、防止正常细胞癌变。

目前研究较多的是灰树花多糖的提取, 传统的热水辅以微波<sup>[4]</sup>、超声波<sup>[5]</sup>等手段可以提高灰树花多糖的提取率, 这些方法适合工厂化或实验室, 现实生活中, 却难以走进普通人家。本文以水提法为基础, 探讨提取温度、液料比和时间对灰树花水提物浸提率的影响, 为日常饮食中灰树花多糖的摄取提供参考, 因此以水溶性多糖为指标表征提取率。灰树花提取物可以清除自由基<sup>[6]</sup>, 但其抑菌功能还少见报道, 本文研究了灰树花水提物的抑菌性能, 为灰树花水

溶性成分的生理活性研究提供借鉴。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

灰树花(*Grifola frondosa*) 购于福建省古田县大丰工贸有限公司; 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 本实验室保藏; 葡萄糖、95%乙醇、苯酚、浓硫酸 国药集团化学试剂有限公司; 青霉素 华北制药股份有限公司。

CN0250型电子天平 上海民桥精密科技仪器有限公司; YM30型全自动电热压力蒸汽消毒器 上海三申医疗器械有限公司; 250B型数显生化培养箱、TGL-16C型高速台式电动离心机、HH-2型数显恒温水浴锅 金坛市杰瑞尔电器有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 葡萄糖标准曲线的绘制 参考文献[7]准确称取干燥至恒重的葡萄糖50mg, 蒸馏水定容至100mL, 再准确吸取5mL该溶液, 蒸馏水定容至100mL, 得25 $\mu$ g/mL的葡萄糖溶液。称取苯酚6g, 溶于蒸馏水并定容至100mL, 即得6%苯酚溶液, 棕色瓶中避光保存。分别取25 $\mu$ g/mL的葡萄糖溶液0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2mL于空白干净试管, 每管分别加入6%苯

收稿日期: 2013-07-18

作者简介: 柴瑞娟(1975-), 女, 硕士研究生, 副教授, 主要从事微生物学方面的研究。

酚溶液1.0mL和浓硫酸各5.0mL,用蒸馏水补足到8.0mL后摇匀放置20min。以不加葡萄糖标准溶液的0号作为空白调零,在最大吸收波长处(490nm)测定吸光度。

1.2.2 单因素实验 取6.0g灰树花烘干(60℃),粉碎机粉碎,对温度,液料比和提取时间进行多糖提取单因素实验。3000r/min离心15min后,得到灰树花多糖提取液,稀释100倍,用移液管取1mL到试管中,依次向试管中加入1.0mL蒸馏水、1.0mL 6%苯酚溶液、5.0mL浓硫酸,利用苯酚硫酸法<sup>[9]</sup>测得反应后的溶液OD值,根据葡萄糖标准曲线读出OD值对应的多糖浓度,重复3次。

1.2.2.1 温度对灰树花多糖提取率的影响 液料比40:1 (mL/g),温度分别为50、60、70、80、90℃,恒温水浴浸提2.0h研究温度对灰树花多糖提取的影响。

1.2.2.2 液料比对灰树花多糖提取率的影响 液料比10:1、25:1、40:1、60:1、80:1,60℃的恒温水浴浸提2.0h,研究液料比对灰树花多糖提取率的影响。

1.2.2.3 提取时间对灰树花多糖提取率的影响 液料比40:1,60℃恒温水浴浸提1.0、1.5、2.0、2.5、3.0h,研究提取时间对灰树花多糖提取率的影响。

1.2.3 灰树花多糖的提取正交实验 因此根据单因素实验结果,设计三因素的正交实验,研究灰树花多糖的提取,重复3次。

表1 灰树花多糖水提正交实验因素水平表

Table 1 Design of the orthogonal test of extracting polysaccharide from *Grifola frondosa*

水平	因素		
	A 温度(℃)	B 液料比(mL:g)	C 提取时间(h)
1	60	25:1	1.0
2	70	40:1	1.5
3	80	60:1	2.0

1.2.4 灰树花水提物的最小抑菌浓度(MIC) 最小抑菌浓度是指抑制某种微生物出现明显增长的最低药物浓度,可用于定量测定体外抗菌活性。按正交实验的验证实验结果提取灰树花水提物,此水提物为原液,用两倍法稀释成1:2、1:4、1:8浓度梯度。采用滤纸片法<sup>[9]</sup>(直径6mm)考察原液及不同稀释度的灰树花水提物对各供试菌的抑菌效果。并用氯化汞(0.3%)、乙醇(75%)、新洁尔灭(1:2)、青霉素(1.6×10<sup>5</sup>IU)作相应对比,重复3次。

### 1.3 灰树花多糖提取率

灰树花多糖提取率的计算式为:

多糖提取率(%)=(多糖浓度(μg/mL)×提取液总体积(mL))/(灰树花质量(g)×10<sup>6</sup>)×100。

## 2 结果与讨论

### 2.1 葡萄糖标准曲线测定

得回归方程:  $y=0.0264x+0.004$ ,  $r^2=0.9990$ ,表明葡萄糖浓度在0~15μg/mL范围内,吸光度与浓度呈良好线性关系,可以在此范围内采用上述方法测定葡萄糖含量。(y为吸光度,x为葡萄糖含量μg/mL)。

## 2.2 单因素实验

2.2.1 温度对灰树花多糖提取率的影响 当温度小于80℃时,灰树花多糖的提取率随着温度的升高而增加,80℃时多糖的提取率最高,而当温度大于80℃时灰树花多糖的提取率有所下降。其原因是:在温度较低时,升高温度可以提高传质效率,有利于多糖的浸提,而当温度高于80℃时,过高的温度会破坏多糖成分,导致提取率有所下降,与陈欣等<sup>[10]</sup>报道类似。高温(90℃)容易破坏多糖。

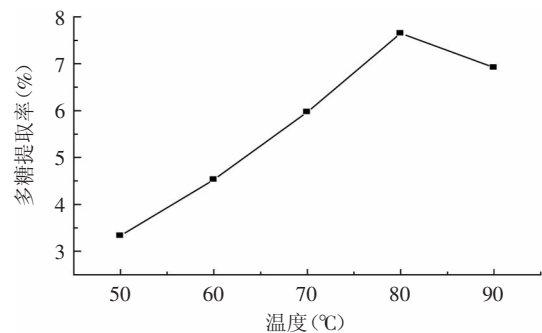


图1 温度对灰树花多糖提取率的影响

Fig.1 Effect of temperature on extraction rate of polysaccharose from *G. frondosa*

2.2.2 液料比对灰树花多糖提取率的影响 液料比会影响溶质与提取液的接触面积,料液比越大,接触面积越大,多糖就越容易溶出,因此可以看到液料比越大提取率越高。同时液料比在25:1和40:1之间时灰树花多糖的提取率随着液料比的增大而增加较快,但因为材料中多糖含量是一定的,当液料比大于40:1时,基本完全溶出,因此多糖的提取率随着液料比的增大而增加缓慢。

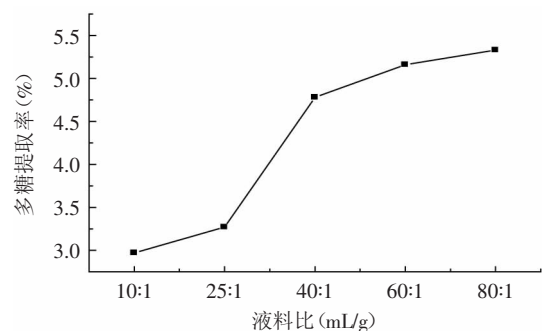


图2 液料比对灰树花多糖提取率的影响

Fig.2 Effect of solvent ratio on extraction rate of polysaccharose from *G. frondosa*

2.2.3 时间对灰树花多糖提取率的影响 不同提取时间条件下灰树花多糖的提取率有所不同,并且在实验提取时间条件范围内(1.5~3.0h),灰树花多糖的提取率随着提取时间的增加而逐渐增加,而当提取时间大于2h时,随着提取时间的增加,灰树花多糖的提取率增加缓慢,因为经过2.0h的提取多糖已基本完全溶出。

### 2.3 灰树花多糖的提取正交实验

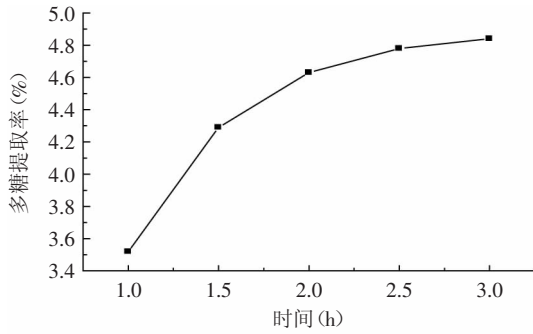


图3 时间对灰树花多糖提取率的影响

Fig.3 Effect of extraction time on extraction rate of polysaccharose from *G. frondosa*

表2 灰树花多糖的提取三因素正交实验结果

Table 2 Result of orthogonal experiment

实验号	A	B	C	多糖得率 (%)
1	1	1	1	3.06
2	2	1	2	5.24
3	3	1	3	7.21
4	1	2	2	4.32
5	2	2	3	5.96
6	3	2	1	7.47
7	1	3	3	5.03
8	2	3	1	6.13
9	3	3	2	7.87
K <sub>1</sub>	12.41	15.51	16.66	
K <sub>2</sub>	17.33	17.75	17.43	
K <sub>3</sub>	22.55	19.03	18.20	
R	3.38	1.17	0.51	

极差分析表明温度在实验范围内对灰树花多糖的提取影响相对较大,液料比在实验范围内对灰树花多糖的提取影响其次,而提取时间在实验范围内对灰树花多糖的提取影响相对最小。因此,由灰树花多糖的提取三因素正交实验可以确定灰树花多糖的提取最优条件A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>为:温度80℃、料液比60:1、提取时间2.0h。

### 2.4 正交实验验证结果

在最优条件下进行灰树花多糖的提取验证实验(重复3次),灰树花多糖的平均提取率达到7.94%,大于极值,因此正交结果得以验证。

### 2.5 灰树花水提物的抑菌性能

灰树花水提物对金黄色葡萄球菌的抑菌效果较明显,在1:8时即可对金黄色葡萄球菌的生长产生抑制作用,抑菌圈直径达到12.42mm;而对枯草芽孢杆菌和大肠杆菌的抑菌作用只有在1:1时才会显现出来,抑菌圈直径分别为8.74、10.23mm,通过对三种细菌抑菌圈大小的比较可知灰树花水提物对枯草芽孢杆菌的抑菌作用最弱。

与化学物质相比,灰树花水提物对枯草芽孢杆菌的抑菌效果大约介于氯化汞(0.3%)和青霉素(1.6×10<sup>5</sup>IU)之间,对大肠杆菌的抑菌效果和青霉素(1.6×

10<sup>5</sup>IU)的抑菌效果接近,对金黄色葡萄球菌的抑菌效果与氯化汞(0.3%)的抑菌效果相当。

表3 灰树花水提物的抑菌性能

Table 3 Antimicrobial effects about water extract from *G. frondosa*

供试菌种	灰树花水提物	
	最小抑菌浓度(MIC)	抑菌圈直径(mm)
枯草芽孢杆菌	1:1	8.74
大肠杆菌	1:1	10.23
金黄色葡萄球菌	1:8	12.42

表4 四种化学物质的抑菌性能

Table 4 Antimicrobial effects about chemical substances

供试菌种	四种化学物质抑菌圈直径(mm)			
	新洁尔灭(1:2)	乙醇(75%)	氯化汞(0.3%)	青霉素(1.6×10 <sup>5</sup> IU)
枯草芽孢杆菌	12.65	8.15	10.24	9.22
大肠杆菌	13.21	7.96	12.91	10.79
金黄色葡萄球菌	14.4	8.58	12.53	11.21

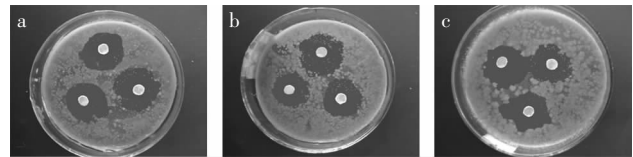


图4 灰树花水提物对三种细菌的抑菌圈

Fig.4 Antibacterial circle of water extract from *G. frondosa* to bacteria

注:a:灰树花水提物对枯草芽孢杆菌的抑菌圈;b:灰树花水提物对大肠杆菌的抑菌圈;c:灰树花水提物对金黄色葡萄球菌的抑菌圈。

## 3 结论

目前市场上有多种以多糖为主要成分的保健品或药品,但一般都价格昂贵,大众难以接受。灰树花多糖也有同样的保健和治疗功能,且子实体味道鲜美,因此可通过日常食用达到保护健康的目的。本研究结果认为温度80℃、液料比60:1、提取时间2.0h,可使灰树花多糖尽量溶出,即平常食用时小火慢炖会更有利于食材的利用。

本研究表明灰树花水提物有很好的抑菌效力,但灰树花水提物成分复杂,不仅含有多糖,蛋白,矿物质离子,还含有挥发成分<sup>[1]</sup>。虽然真菌多糖也有一定的抑菌效果<sup>[2]</sup>,但其他小分子化合物如多酚类<sup>[3]</sup>也会有此功能,本研究中灰树花水提物的具体抑菌成分还有待探讨。

### 参考文献

- [1] 刘美琴,李建中,孔繁祚,等. 香菇菌丝体多糖的分离鉴定与免疫功能研究[J]. 生物化学与生物物理学报, 1999, 31(1): 46-50
- [2] Ohno N, Iino K. Fractionation of acidic antitumor β-glucan (下转第305页)



表6 蜂花粉喷雾干燥正交实验设计及结果  
Table 6 Design and results of orthogonal experiment

实验号	A	B	C	D	出粉率(%)	含水量(%)	堆积密度(g/mL)	溶解时间(s)	综合评分
1	1	1	1	1	25.5±0.17	6.91±0.06	0.37±0.00	49±1	18.5±0.11
2	1	2	2	2	27.6±0.15	6.23±0.04	0.62±0.00	57±1	13.2±0.10
3	1	3	3	3	36.9±0.17	5.11±0.03	0.41±0.00	68±2	24.3±0.12
4	2	1	2	3	37.5±0.14	4.21±0.05	0.53±0.00	45±1	31.1±0.13
5	2	2	3	1	41.2±0.18	4.67±0.07	0.38±0.00	40±1	37.3±0.15
6	2	3	1	2	28.3±0.14	4.61±0.04	0.51±0.00	45±1	25.4±0.13
7	3	1	3	2	29.5±0.19	4.11±0.03	0.47±0.00	50±1	27.1±0.14
8	3	2	1	3	27.4±0.13	6.23±0.06	0.71±0.00	38±1	16.1±0.11
9	3	3	2	1	29.7±0.17	6.07±0.08	0.48±0.00	41±1	23.4±0.12
K <sub>1</sub>	56.0	76.7	60.0	79.2					
K <sub>2</sub>	93.8	66.6	67.7	65.7					
K <sub>3</sub>	66.6	73.1	88.7	71.5					
k <sub>1</sub>	18.7	25.6	20.0	26.4					
k <sub>2</sub>	31.3	22.2	22.6	21.9					
k <sub>3</sub>	22.2	24.4	29.6	23.8					
R	12.6	3.4	9.6	4.5					

本研究首先对蜂花粉破壁工艺进行比较研究,选出最佳的破壁工艺为胶体磨(2890r/min),并在此破壁条件下进行喷雾干燥的正交实验,优化出最佳喷雾干燥工艺为:料液比为1:15(g/mL),进料流量为200mL/h,进风温度为200℃,麦芽糊精的加入量为10%,此时产品的出粉率为39.8%,含水率为3.9%,堆积密度为0.37g/mL,溶解时间为42s,产品保持了滁菊蜂花粉本身的黄色和清香。

参考文献

[1] 刘光楠,赖由运,刘振水,等. 蜂花粉抗氧化作用的研究进展[J]. 蜜蜂杂志, 2011, 9(11):34-35.  
 [2] Johnson S A, Nicolson S W. Pollen digestion by flower-feeding Scarabaeidae: protea beetles (Cetoniini) and monkey beetles(Hopliini)[J]. Insect Physiology, 2000, 47:725-733.  
 [3] Chichiricco G, Pacini E. Cupressus arizonica pollen wall  
 zona-tion and *in vitro* hydration[J]. Plant Systematics and Evolution, 2008, 270(3):231-242.  
 [4] 孟良玉,蔡文倩,兰桃芳,等. 纤维素酶对油菜花蜂花粉的破壁作用[J]. 食品科学, 2012, 33(22):72-75.  
 [5] 郭卫芸,张彦岭,曹琼. 喷雾干燥法生产麦胚粉的工艺研究[J]. 广东化工, 2011, 38(4):72-73.  
 [6] 辛修锋,余小林,胡卓炎. 杨梅颗粒固体饮料的工艺研究[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(2):162-165.  
 [7] 刘建党. 全藕粉喷雾干燥工艺实验研究[J]. 农业工程学报, 2006, 22(9):229-231.  
 [8] 苑玉凤. 多指标正交实验分析[J]. 湖北汽车工业学院学报, 2005, 19(4):53-56.  
 [9] 王泽南,范芳宇,王华,等. 草莓粉喷雾干燥工艺参数及助干剂配料的研究[J]. 食品工业科技, 2006, 27(9):117-119.  
 [10] 张慧,任斯嘉,胡文文,等. 喷雾干燥技术对食品微胶囊性质影响的研究进展[J]. 食品与机械, 2013, 29(2):214-217.

of *Grifola frondosa* by anion-exchange chromatography using urea solutions of low and high ionic strengths[J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1986, 34(8):3328-3332.  
 [3] Ohno N, Ohsawa M. Conformation of grifolan in the fruitbody of *Grifola frondosa* assessed by carbon-13 cross polarization magic angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1987, 35(6):2585-2588.  
 [4] 袁筱琦,李行诺,陈佳丽,等. 微波法提取灰树花多糖的工艺研究[J]. 食药菌, 2012, 20(5):286-287.  
 [5] 郑亚凤,谢宝贵,徐培雄,等. 正交法优化三种灰树花多糖提取工艺[J]. 食用菌, 2008(5):55-57.  
 [6] 周昌艳,唐庆九,王军,等. 灰树花提取物清除氧自由基的研究[J]. 菌物研究, 2006, 4(3):31-34.  
 [7] 颜廷才,张旋,孟宪军,等. β-葡萄糖苷酶酶解刺嫩芽皂甙最佳工艺条件的研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(1):282-284.  
 [8] 杨建雄. 生物化学与分子生物学实验技术教程[M]. 第二版. 北京:科学出版社, 2009:35-36.  
 [9] 沈萍,范秀容,李广武. 微生物学实验[M]. 第三版. 北京:高等教育出版社, 2007:100.  
 [10] 陈欣,龚兰,刘冠卉. 食用真菌多糖提取条件的优化及其还原力的比较[J]. 食品科学, 2010, 31(14):140-144.  
 [11] 杨生兵,陆震鸣,耿燕,等. 灰树花子实体与发酵菌丝体挥发性化合物分析[J]. 菌物学报, 2013, 32(1):103-113.  
 [12] 胡国元,李超影,陈默,等. 香菇多糖和金针菇多糖的提取及其抑菌活性[J]. 武汉工程大学学报, 2013, 35(6):30-34.  
 [13] 刁小琴,关海宁. 超声辅助提取黑木耳多酚及其抑菌活性研究[J]. 食品工业, 2013, 34(3):69-72.

(上接第301页)